



# Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni

## *Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association*

e-ISSN: 2667-8381



Cilt (Volume): 14 - Sayı (Issue): 3 - 2023  
<https://dergipark.org.tr/vetfarmatoksbulten>



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

**Baş Editör / Editor-in-Chief**

Prof.Dr. Ender YARSAN (Ankara Üniversitesi, Türkiye)



**Editörler Kurulu / Editorial Board**

Prof.Dr. Levent ALTINTAŞ (Ankara Üniversitesi, Türkiye)  
Prof.Dr. Füsün TEMAMOĞULLARI (Harran Üniversitesi, Türkiye)  
Prof.Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN (Ankara Üniversitesi, Türkiye)  
Doç.Dr. Hüsamettin EKİCİ (Kırıkkale Üniversitesi, Türkiye)  
Doç.Dr. Mustafa YİPEL (Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Türkiye)  
Dr. Sedat SEVİN (Ankara Üniversitesi, Türkiye)

**Danışma Kurulu / Advisory Board**

Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY (Ondokuzmayıs Üniversitesi)	Prof.Dr. Cavit KUM (Adnan Menderes Üniversitesi)
Prof.Dr. Arif ALTINTAŞ (Ankara Üniversitesi)	Prof.Dr. Aneliya MILANOVA (Trakya Üniversitesi, Bulgaristan)
Prof.Dr. Nuri ALTUĞ (Namık Kemal Üniversitesi)	Prof.Dr. Songül SONAL (Uludağ Üniversitesi)
Prof.Dr. Yavuz Osman BİRDANE (Afyon Kocatepe Üniversitesi)	Prof.Dr. İbrahim TAŞAL (Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi)
Prof.Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU (Fırat Üniversitesi)	Prof.Dr. Bünyamin TRAŞ (Selçuk Üniversitesi)
Prof.Dr. Gürdal DAĞOĞLU (Fırat Üniversitesi)	Prof.Dr. Murat YILDIRIM (İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi)
Prof.Dr. İbrahim DEMİRKAN (Afyon Kocatepe Üniversitesi)	Prof.Dr. Ali Cesur ONMAZ (Erciyes Üniversitesi)
Prof.Dr. Ahmet DOĞANAY (Ankara Üniversitesi)	Dr. Ishraga G. İBRAHİM (Central Veterinary Res Lab, Sudan)
Prof.Dr. Gökhan ERASLAN (Erciyes Üniversitesi)	Dr. Shahram SAGHAEI (Orumieh Azad Üniversitesi, İran)
Prof.Dr. İzzet KARAHAN (Balıkesir Üniversitesi)	Dr. Tomaž SNOJ (Ljubljana Üniversitesi, Slovenya)





Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association



**İmtiyaz Sahibi :** Prof.Dr. Ender YARSAN

**Yazı İşleri Müdürü :** Prof.Dr. Levent ALTINTAŞ

**Dernek Yazışma Adresi :** Atmaca Sokak No: 8/3 06110, Dışkapı- Ankara

**Kapak Tasarım :** Makromedya Halkla İlişkiler Ltd. Şti.

**Dizgi :** Doç.Dr. Hüsamettin EKİCİ

Bültenin amacı, bilimsel etik kuralları çerçevesinde, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji ile ilgili ulusal - uluslararası literatüre katkıda bulunacak derleme türünde çalışmalarını yayınlamaktır. Yılda üç kez yayınlanan kör hakemli bir açık erişim bültenidir. Bültenin yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir. Alınan tüm yazılar intihal yazılımları (iThenticate veya Turnitin programı) ile kontrol edilmektedir.

Bültenimiz 2019 yılı Cilt 10, Sayı 1'den itibaren ResearchBib (Academic Research Index), ESJI (Eurasian Scientific Journal Index), ROOTINDEXING, Google Scholar, Sindex (Scientific Indexing Services), 2020 yılı Cilt 11, Sayı 1'den itibaren de ASOS İndeks, Türkiye Atıf Dizini, Index Copernicus, TR Dizin ve ve 2023 yılından itibaren ise SOBİAD indeksleri tarafından taranmaktadır. Bültenimizde yayınlanacak makalelere Cilt: 11, Sayı: 1'den itibaren DOI numarası verilmektedir.

Her Hakkı Saklıdır. Bülteinde yer alan yazılar kaynak gösterilerek alıntı yapılabilir. Yazıların her türlü sorumluluğu yazarlara aittir.

İletişim: vftdbulten@vetfarmatoks.org.tr





Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Cilt: 14 - Sayı: 3- 2023

30.12.2023

- 
1. İMPLANTASYON PENCERESİ  
*A WINDOW of IMPLANTATION*  
Aslınur KELEŞ, Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU.....108
  2. MAKİNE ÖĞRENMESİNDE REGRESYON ALGORİTMALARININ VETERİNER HEKİMLİĞİ ALANINDA UYGULAMALARI  
*APPLICATIONS of REGRESSION ALGORITHMS in MACHINE LEARNING in VETERINARY MEDICINE*  
Volkan TÜRKMEN, Doğukan ÖZEN.....118
  3. BALIN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ve *ESCHERİCHİA COLİ* ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİSİ: GÜNCEL DERLEME  
*INHIBITORY EFFECTS of HONEY on STAPHYLOCOCCUS AUREUS and ESCHERICHIA COLI: A CURRENT REVIEW*  
Ömer ÇAKMAK, Nuri TAŞ, Ulaş ACARÖZ, Damla ARSLAN-ACARÖZ, Fatih Ramazan İSTANBULLUGİL,  
Sezen EVRENKAYA, Zeki GÜRLER.....133
  4. BAL ARILARININ BAKTERİYEL HASTALIKLARI ve HASTALIKLARIN TEŞHİSİNE YÖNELİK GÜNCEL METOTLAR  
*BACTERIAL DISEASES of HONEY BEES and CURRENT METHODS for THE DIAGNOSIS of DISEASES*  
Saliha BEDİZ ŞAHİN, Barış SAREYYÜPOĞLU.....149
  5. BİYOREMEDİASYON UYGULAMALARININ TEK SAĞLIK YÖNÜYLE DEĞERLENDİRİLMESİ  
*EVALUATION of BIOREMEDIATION PRACTICES in ONE-HEALTH FRAMEWORK*  
Erdem DANYER.....162



# Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni

## Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

e-ISSN: 2667-8381

Aşlınur KELEŞ\*  
Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU<sup>b</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,  
Ankara

ORCID<sup>a</sup>: 0000-0003-3500-7942

ORCID<sup>b</sup>: 0000-0001-9248-8370

\*Sorumlu Yazar: Aşlınur KELEŞ  
E-Posta: aslikeles42@gmail.com

Geliş Tarihi: 09.05.2023

Kabul Tarihi: 02.10.2023

14 (3): 108-117, 2023

DOI: 10.38137/vftd.1294795

## İMLANTASYON PENCERESİ

**ÖZET.** İmplantasyon, gebelikte embriyo ile endometriyum epiteli arasında sürekli olarak temasın sağlanmasıdır. Endometriyumun implantasyona açık olduğu dönem, implantasyon penceresi olarak tanımlanmaktadır. İmplantasyon penceresi döneminde birçok molekül etkili olmaktadır. Hormonlar, sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri, büyüme faktörleri ve çeşitli genlerin etkisi ile bu süreç koordineli bir şekilde yönetilmektedir. İmplantasyon bu faktörlerin etkisi ile sırasıyla apozisyon, adezyon ve invazyon aşamalarından oluşmaktadır. Bu aşamalar sadece implantasyon penceresinde gerçekleşebilmektedir.

Başarılı bir implantasyon olmadan, embriyonun gebeliğin diğer dönemlerine geçişi mümkün değildir ve gebelik erken embriyonik ölümle sonuçlanmaktadır. Bu açıdan multifaktöriyel birçok molekülün koordinasyonu meydana gelen implantasyonda, implantasyon penceresi zaman aralığı gebelik sürecindeki kritik noktalardan biridir. -Bu derlemede sağlıklı bir gebeliğin oluşabilmesi için gerekli olan başarılı bir implantasyon ve implantasyon penceresi hakkında bilgi verilmeye çalışılmıştır. Fakat bilinmelidir ki, implantasyon mekanizmaları tüm bilinenlere rağmen hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Blastosist, embriyo, endometriyum, implantasyon, implantasyon penceresi.

## WINDOW of IMPLANTATION

**ABSTRACT.** Implantation is the establishment of continuous contact between the embryo and the endometrial epithelium of the uterus. The period when the endometrium is open to implantation; known as the implantation window. Many molecules are effective during the implantation window period. This process is managed with the effect of hormones, cytokines, chemokines, adhesion molecules, growth factors and various genes. Implantation consists of apposition, adhesion and invasion stages, respectively, with the effect of these factors. These stages can only be performed in the implantation window.

Without successful implantation, transition of the embryo to other stages of pregnancy is not possible and pregnancy results in early embryonic death. In this respect, implantation is one of the most critical moments in the reproductive process. In this review, it has been tried to give in-depth information about a successful implantation, which is necessary for a healthy pregnancy. However, it should be known that the mechanisms of implantation are still not fully elucidated despite all the known ones.

**Keywords:** Blastocyst, embryo, endometrium, implantation, windows of implantation.

### Makale atf

Keleş, A. ve Bayraktaroğlu, A.G. (2023). İmplantasyon Penceresi, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (3), 108-117. DOI: 10.38137/vftd.1294795.

## GİRİŞ

İmplantasyon, genetik açıdan farklı olan embriyonik ve maternal dokular arası birleşmedir (Gökçimen ve Temel, 2004). İmplantasyonun amacı, embriyonun, maternal dokuya nüfuz etmesi ve gelişimi için, gerekli besinlere erişmesidir. İmplantasyon için embriyo ve endometriyum arasında kapsamlı bir hazırlık, çift yönlü bir ilişki gerektiğinden implantasyon öncesi embriyo ve endometriyumun koordine olduğu bir süreç başlar (Carson ve ark., 2000). Reseptif (alıcı durumda) bir uterus ile kaliteli bir embriyo arasında bu karşılıklı ilişki yalnızca, “implantasyon penceresi” olarak bilinen bir zaman aralığında meydana gelmektedir. Bu kısıtlı zaman dışında endometriyum, embriyoya kayıtsız kalmakta hatta embriyoyu antijen olarak algılayabilmektedir (Psychoyos, 1986).

İmplantasyon penceresi döneminden önce uygun uterus epitelinin oluşumu ve embriyonal taslağın gelişim süreçlerinin senkronize olması ve implantasyon penceresinin oluşabilmesi için uygun yer, zaman ve aracı moleküllere ihtiyaç duyulmaktadır (Aplin, 2000). Bu derlemede sırasıyla blastosist gelişimi, uterusunun implantasyona uygun hale gelebilmesi için geçirdiği değişimler, implantasyon mekanizması ve aracı moleküller detaylandırılması amaçlanmıştır.

## BLASTOSİST GELİŞİMİ

Oosit ve spermatozoonun füzyonu sonucu oluşan zigot, arka arkaya mitoz bölünmeler geçirerek hücre sayısını arttırmaktadır. Bu olaya embriyonun segmentasyonu (yarıklanması) denir. Segmentasyon sonucunda oluşan her bir hücre blastomer olarak isimlendirilmektedir. İnsan ve farelerde 8, koyunlarda 16, sığırlarda 32 hücreli evrede blastomerler şekil değiştirir ve birbirlerine çeşitli moleküller ile sıkıca bağlanmış bir hücre topu oluştururlar. Bu yapı “kompaksiyon” olarak adlandırılmaktadır (Yılmaz, 2019).

Kompaksiyon yapısı ile hücrelerin birbirleriyle etkileşimi artmaktadır. İnsan ve farelerde blastomer sayısı 12-32'ye ulaştığında gelişen yapıya morula, morulanın içindeki sıvı dolu boşluğa ise blastosel denilir ve böylece blastula şekillenmektedir. Daha sonra blastomerler ikiye ayrılır; birincisi, trofoblast olarak adlandırılan dış hücre topluluğudur ve blastosistin uterus duvarına implante olmasına eşlik etmekte ve aynı zamanda plasenta oluşumuna da katkı

sağlamaktadır, ikincisi; embriyoblast denilen iç hücre kitlesidir (İHK) ve bu hücreler embriyonun başlangıcını oluşturur. Embriyonun gelişiminin bu aşamasındaki yapısına blastosist denilmektedir. Uterus içinde serbest şekilde yüzen blastosist, uterin bezlerin salgıları ile beslenir (histotrofik beslenme) ve iç hücre kitlesine yakın bölgeden (embriyonik kutup) endometriyum epiteline tutunur. Böylece implantasyon başlamış olur (Yılmaz, 2019).

## İMLANTASYON ÖNCESİ UTERUSTA MEYDANA GELEN DEĞİŞİKLİKLER

Uterinal siklus, ovaryum kaynaklı steroid hormonlar tarafından yönetilen bir uterus farklılaşması sürecidir. Bu süreç, uterus blastosisti kabul etmeye hazır olduğunda kritik bir aşamaya gelmelidir. Böyle bir farklılaşma meydana gelmedikçe, uterus implantasyona izin vermeye uygun değildir (Hafez, 1962).

İmplantasyon öncesinde endometriyumda progesteron salınımına bağlı “ön desidualizasyon” olarak isimlendirilen hücresel ve morfolojik değişiklikler gözlenmektedir. Blastosist, endometriyal moleküllerle bağlanma yeteneği kazanmaktadır (Egashira ve Hirota, 2013). Epitel dokuda yeni spesifik gap junction'lar meydana gelmekte, dezmozom yoğunluğu azalmaktadır. Progesteron salınımının artmasıyla musin tabaka azalarak, e- kaderin, integrin 4, 6, 1 molekülleri apikal yüzeyde eksprese olmaktadır (Poon ve ark., 2016; Yılmaz, 2019). Desidualizasyon reaksiyonuna giren stromal hücreler daha iri ve yuvarlak desidual hücrelere dönüşmektedir. Sitoplazmalarında embriyoyu beslemek için lipid ve glikojen birikimi gözlenmektedir (Harem, 2016). İmplantasyon penceresi döneminde, uterus epitelinde pinopod yapıları oluşmaktadır (Gökçimen ve Temel, 2004).

## PİNOPODLAR

İmplantasyon öncesinde endometriyum epitelinde birtakım değişiklikler meydana gelmektedir. Hücrelerin daha yassılaştığı ve mikrovillus sayısının azaldığı belirlenmiştir. Birçok türde mikrovillusların yerini pinopod denilen iri sitoplazmik çıkıntılar almaktadır. İnsanlarda endometriyum epitel hücrelerindeki mikrovillusların ovulasyondan sonra yaklaşık 6. günde yerlerini pinopod yapılarına bıraktığı gözlemlenmiştir. Düzenli biyopsileri içeren çalışmalar, bu pinopodların insan endometriyumunda 48 saatten daha az bir sürede varlığını sürdürdüğünü ve bireysel özellikler taşıdığını ortaya koymuştur. Pinopod yapılarının oluşumu beklenen implantasyon penceresine denk gelmektedir (Bentin-Ley ve

ark., 1999). Endometriyal reseptivitenin zamanını belirlemek için bazı araştırmacılar, pinopodların endometriyumda varlığının ve zamanlamasının incelenmesi gerektiğinden bahsetmektedirler (Quinn ve Casper, 2009).

Pinopodların amacı; blastosist yüzeyi ile yakın temas ve implantasyonu kolaylaştırıcı düzlemlerin oluşturulmasıdır. Kemirgenlerde pinopodların ayrıca uterus lümenindeki sıvının pinositotik alınımını da sağladığından söz edilmektedir (Ender ve Nelson, 1973; Quinn ve Casper, 2009).

Endometrial pinopodlar ve pinopod benzeri yapılar, kertenkele de dahil olmak üzere, deve (Abd-Elnacim ve ark., 1999), tavşan (Segalen ve ark., 1982), koyun (Guillomot ve ark., 1981), hamster (Blankenship ve ark., 1990), domuz (Keys ve King, 1990), geyik (Aitken, 1975), gerbil (Kress ve Mardi, 1990), maymun (Bhartiya ve Bajpai, 1995) gibi farklı türlerde belirlenmiştir (Hosie ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda infertilite problemi olan kadınlarda yetersiz pinopod oluşumunun saptanması, gebelik açısından pinopod oluşumunun önem arz ettiğini düşündürmektedir (Bahar ve ark., 2012).

## PİNOPOD OLUŞUMUNUN HORMONAL KONTROLÜ

Canlılarda endometriyumda pinopodların oluşumunun progesterona (P4) bağlı olduğu bildirilmiştir (Ljungkvist ve Nilsson, 1971). Östradiol (E2) uygulamasının ise pinopodların hızlı kaybına (uygulamadan sonraki 18 saat içinde) neden olduğu belirlenmiştir (Martel ve ark., 1991).

## İMLANTASYON ve EVRELERİ

Blastosistin endometriyum yüzeyine yaklaşım adezyon molekülleri vasıtasıyla tutunması şeklinde tanımlanan implantasyon 3 aşamada gerçekleşir. Bu adımlar sadece implantasyon penceresinde gerçekleşebilmektedir (Jabbour ve ark., 2006);

1) Apozisyon; blastosistin zona pellusidadan kurtularak uterusu ulaşmasıyla birlikte implantasyonun gerçekleşeceği uygun endometriyum bölgesine yaklaşarak stabil olmayan ilk tutunmasıdır. Apozisyon, trofoblastların apikal yüzeylerinin, uterus epitelinin apikal yüzeyine tutunması ile başlamaktadır (Gardner ve ark., 2010).

2) Adezyon; blastosistin endometrial epitel yüzeyine stabil olarak bağlanmasıdır. Reseptif fazın morfolojik belirteci olan ve endometriyum epitelinde sitoplazmik çıkıntılar olarak belirlenen pinopodlar bu aşamada embriyo için tutunma bölgeleri oluşturarak bu sürece katılmaktadırlar (Achache ve Revel, 2006). İnsanlarda adezyon (yapışma) fazı ovulasyondan 6-7 gün sonra meydana gelirken, koyun, keçi türlerinde fertilizasyondan sonra 15-16. güne denk gelmektedir. Adezyon fazı endometriyumda "implantasyon penceresi" olarak adlandırılan döneme tekabül etmektedir (Gardner ve ark., 2010).

3) İnvazyon; embriyonik trofoblastın endometriyuma penetre olması, anne ile vasküler bir ilişki kurmak için bazal membranı delerek stromaya ilerlemesidir (Yılmaz, 2019). Bu aşamada invaziv trofoblast hücreleri, uterus mukozası ve miyometriyumun iç üçte birine invaze olmaktadır (Prabhudas ve ark., 2015).

İmplantasyon, farklı memeliler arasında önemli farklılıklar gösteren moleküler bir olaydır (Dedeoğlu, 2020). İntersitisyel tip implantasyona sahip kemirgenler ve primatların blastosistleri, uterus mukozasına invaze olurken, evcil hayvanlarda implantasyon yüzeyseldir ve invaziv olmayan trofoblast-uterus epitel hücre apozisyonu ve adezyonu şeklinde gerçekleşir ve invazyon aşaması şekillenmez (Hafez, 1962).

## UTERUS RESEPTİVİTESİ ve İMLANTASYON PENCERESİ

İmplantasyon boyunca ovaryan steroidlere tepki olarak gelişen uterus duyarlılığı; prereseptif, reseptif ve nonreseptif olmak üzere 3 aşamada programlanır. Blastosist, endometriyumun morfolojik ve moleküler değişimiyle karakterize olan reseptif aşamasında implante olabilmektedir ki bu döneme implantasyon penceresi adı verilmektedir (Emiliani ve ark., 2005).

Endometriyal reseptivite, implante olabilecek bir embriyoya bariyer görevi görebilecek inhibitör bileşenlerin kaybı ve adezyon ligandlarının kazanılmasıyla saptanmaktadır (Aplin, 2000). Endometriyum östrojeninin küçük bir piki ile embriyoya karşı adezyon yeteneği kazanarak reseptif faza girer. İnsanlarda implantasyon penceresinin düzenli bir menstrual döngünün 20-24. günleri arasında başlayıp (ovulasyon sonrası LH pikinden 6-10 gün sonrası) (Lessey ve Castelbaum, 2002). Sığıçında ise çiftleşmeden 5 gün sonra, 24 saatlik bir dönemi kapsadığı tespit edilmiştir (Quinn ve Casper, 2009).

İmplantasyonun apozisyon aşaması; köpekte gebeliğin (fertilizasyon) 17-18. gününde (Holst ve Phemister, 1971), inekte 19. (Garcia-Isperto ve ark., 2006), koyunda 16. (Spencer ve ark., 2004), domuzlarda ise 13-14. gününde başladığı (Geisert ve ark., 2015), bildirilmiştir. Adezyon safhasının; inekte fertilizasyondan sonra yaklaşık 21-21. günde başladığı ve bu tutunma sürecinin 1-2 hafta sürdüğü (Garcia-Isperto ve ark., 2006), koyunda yaklaşık 22. günde (Spencer ve ark., 2004), domuzda ise 26. günde tutunmanın sağlandığı (Geisert ve ark., 2015) tespit edilmiştir.

Endometrial reseptivite veya implantasyon penceresi döneminin varlığını çeşitli yöntemlerle tayin etmek mümkündür. Bu amaçla immünohistokimya (integrin, p27, siklin E), EAD (Endometrial Alıcılık Dizisi) yöntemleri kullanılabilir (Yılmaz, 2019).

İmmünohistokimyasal olarak uterus glandüler ve bağdoku hücrelerinin sitoplazmasında P27 ve siklin E proteinlerinin saptanması, implantasyon penceresi için gerekli olan hücre döngüsünün yeterli olmadığını göstermektedir (Samoilov, 2011).

Endometrial Alıcılık Dizisi (EAD) ise kişiselleştirilmiş implantasyon penceresini belirleyen bir *in vitro* tanı kitidir (Robert, 2020). EAD, implantasyon penceresini öngörmedeki yüksek başarısı nedeniyle dünya çapında popüler olmaya devam etmektedir (Mahajan, 2015).

İmplantasyon penceresinin belirlenmesinde araştırmacılar pinopod yapılarının da önemli olabileceğini belirtmiştir (Quinn ve Casper, 2009).

Başarılı implantasyon için üç temel gerekmektedir; implantasyona izin veren değişkenlik potansiyeline sahip bir endometriyum (endometrial reseptivite), moleküler olarak programlanmış hücre büyümesi ve diferansiyasyona sahip kaliteli embriyo ve "cross-talk" diye isimlendirilen endometriyum ile embriyo arasındaki bilgi alışverişi. Bu etkileşime, çeşitli genler, hormonlar, adezyon molekülleri ve sitokinler dâhil olmak üzere birçok faktör aracılık etmektedir. Bu faktörlerden bir veya birkaçının eksikliği implantasyonun gerçekleşmemesine, dolayısıyla infertiliteye sebebiyet vermektedir (Yılmaz ve Tekmen, 2019).

Gebeliğin başarılı bir şekilde kurulabilmesi ve

sonlanabilmesi için hem blastosistin sağlıklı gelişimi hem de uterusun embriyo ile senkronize bir şekilde reseptif evreye ulaşması gerekmektedir (Li ve ark., 2015). Yetersiz uterin reseptivite, implantasyon başarısızlığının yaklaşık üçte ikisinden sorumludur (De los Santos ve ark., 2003).

## İMLANTASYON SIRASINDA MATERNAL TOLERANS

İmplantasyon penceresi sürecinde babaya ait gen taşıyan ve anne için antijen olarak değerlendirilen embriyonal hücre kümesi immun sistem hücreleri ile ilk kez karşılaşmaktadır. Başarılı bir implantasyon, maternal immun toleransın şekillenmesiyle elde edilir (Barnea, 2004). Maternal immün toleransın gelişimi başlangıçta anneye ait faktörlere bağlıdır. İmplantasyonu takiben uterus mukozası maternal toleransı sağlamak üzere hücresel yönden yeniden düzenlenmektedir (Hunt, 2006). Östrojen, testosteron, progesteron gibi steroid hormonların lökosit çoğalmasını baskılayıcı etkilerinin olduğu; mononükleer hücreleri apoptozise uğrattıkları bilinmektedir (Lutton ve Callard, 2006). Bunlara ek olarak plasentanın da hücre geçişini engelleyen anatomik bir immun bariyer görevi gördüğü hipotezi de mevcuttur (De Lemos, 2003; Trowsdale ve Betz, 2006).

Embriyo tarafında koryon kesesi epiteli faktörlerine bakıldığında insanlarda trofoblastlardan immunsupresif etkisi ile bilinmekte olan human lökosit antijen-G (HLA-G) antijeninin; CD8+ sitotoksik T-lenfositlerinin sitolitik aktivitesini, T-lenfositlerinin çoğalmasını ve doğal katil hücrelerinin neden olduğu sitolizi baskılayarak immun toleransın gelişmesine katkı sağladığı bildirilmektedir (Carosella ve ark., 1999; Hunt ve ark., 2005).

## İMLANTASYON PENCERESİNİN OLUŞUMUNDA ROL ALAN MOLEKÜLLER

### *İmplantasyon Penceresinin Hormonal Regülasyonu* *Östrojen ve Progesteron*

Başarılı implantasyon için uterus yapısal ve fonksiyonel değişimler geçirmelidir. Östrojen ve progesteron bu değişikliklere aracılık eden ana hormonlardır (Uenoyama ve ark., 2021). Farelerde ve sıçanlarda, uterus hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşmasını düzenleyen progesteron ve östrojenin koordineli eylemleri, implantasyon penceresini oluşturmaktadır (Huet-hudson ve ark., 1989). Östrojen uygulamasının implantasyon penceresini kısa süreli uzattığı, fizyolojik olarak belli bir miktardan daha yüksek seviyelerde uygulanmasının ise implantasyon penceresini hızlı bir şekilde



kapattığı tespit edilmiştir (Ma ve ark., 2003).

### **Prostaglandinler (PG)**

PG'lerin, embriyo implantasyonunda birçok önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. PG'lerin vasküler geçirgenlik, stromal desidualizasyon, blastosist büyümesi ve gelişimi, lökositlerin bölgeye diyapedezisi, embriyonun taşınması, trofoblast göçü ve implantasyon sırasında hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesindeki artışı sağlamak gibi birçok metabolik faaliyetlerde görev aldığı bildirilmiştir. Düzensiz PG sentezinin implantasyonun gecikmesine, implantasyon alanlarının sayısının azalmasına, implantasyon başarısızlığına neden olduğu tespit edilmiştir (Reese ve ark., 1999; Ma ve ark., 2003; Salleh, 2014).

### **İmplantasyon Penceresinde Transkripsiyon Faktörleri**

#### **Homeobox Genleri**

Hox genlerinden Hoxa-10 ve Hoxa-11 geni, ürogenital yollar ve yetişkin dişi üreme sisteminin gelişiminde yüksek oranda bahsedilmekte ve üreme olaylarında rolleri olduğu bildirilmektedir (Dey ve ark., 2004).

Hoxa-10 geninin embriyo implantasyonunu üç aşamada etkilediği düşünülmektedir. Bunlar;

- 1) endometriyal reseptivitenin kazanılması,
- 2) alıcı endometriyumu regüle etmek için blastosistten gelen sinyallere yanıt vermek,

3) desiduayı trofoblast invazyonu ve plasentasyon için uygun hale getirmek olarak sıralanabilir. Ayrıca Hoxa-10 geninin, pinopod gelişiminde önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Abd ElFattah, 2012). Endometrial reseptivite için gerekli olan Hoxa-10 genini bloke etmenin, pinopodların sayısını önemli derecede azalttığı belirlenmiştir (Bagot ve ark., 2001).

Hoxa-10 ve Hoxa-11 genlerinin anormal ekspresyonunun reseptivite üzerine olumsuz etkilerinden söz edilmektedir (Jana ve ark., 2013).

### **İmplantasyon Penceresinde Sitokinler Lösemi İnhibitör Faktörü (LIF)**

Glikoprotein yapısında bir sitokin olan LIF'in implantasyondaki rolüne dair kanıtlar, LIF geninden yoksun transgenik farelerde embriyo implantasyonunun gerçekleşmemesiyle anlaşılmıştır

(Stewart ve ark., 1992). Erken implantasyon penceresinde endometriyal reseptiviteyi etkileyen en önemli sitokinlerden biri olan LIF, plasentadaki trofoblast fonksiyonunu ve vaskülogenezisi düzenlemektedir (Xu ve ark., 2012). LIF, implantasyon için uygun bir ortam yaratmak üzere proteazların (Matriks Metalloproteinaz; (MMPs) ve MMPs enzimlerinin doğal doku inhibitörleri (TIMPs)) ve proteaz inhibitörlerinin üretimini ve aktivitesini düzenlemek için diğer sitokinlerin ekspresyonunu indükleyerek doğrudan ve dolaylı olarak implantasyona katkı sağlar (Harvey ve ark., 1995).

### **İnterlökinler (IL)**

İmplantasyon penceresinde çeşitli işlevleri olduğu tespit edilen IL-1'nin endometriyum tarafından LIF üretimini uyardığı (Kimber, 2005; Van Mourik ve ark., 2009), leptin ve reseptörünün üretimini sağladığı (Dimitriadis ve ark., 2005) belirlenmiştir. Embriyonun IL-1 stimülasyonuna yanıt olarak, trofoblastlarından hCG (human koriyonik gonadotropin-insan koriyonik gonadotropini) salgıladıkları gösterilmiştir (Dimitriadis ve ark., 2005). İmplantasyon sırasında endometriyal epitel ve mezenkimal kök hücreler tarafından üretilen proinflamatuvar bir sitokin olan IL-6'nın, blastosist gelişimi ve implantasyon oranlarını arttırdığı gösterilmiştir (Cork ve ark., 2002; Dominguez ve ark., 2010). Anti-enflamatuvar özellikteki bir sitokin olan IL-11'in ise desidualizasyonda rol aldığı bildirilmektedir (Cork ve ark., 2002).

### **Kemokinler**

Kemokinler, bağışıklık sistemindeki rolleri ile bilinen kemotaktik sitokinlerin büyük bir ailesidir (Hannan ve Salamonsen, 2007). Uterusta, kemokinlerin trofoblastı implantasyon bölgesine yönlendiren bir molekül olduğu düşünülmektedir (Red-Horse ve ark., 2001). Endometriyumda ekspresyonun implantasyon penceresi döneminde en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir (Salamonsen ve ark., 2007).

### **İmplantasyon Penceresinde Büyüme Faktörleri**

Dönüştürücü Büyüme Faktörü  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) türevi olduğu bilinen TGF- $\beta$ 1'in, embriyo implantasyonu için önemli bir adım olan desidualizasyona yol açtığı tespit edilmiştir (Gao ve ark., 2015).

Birçok çalışma dişi üreme döngüsü sırasında ifade edilen Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)'nün, oosit gelişimi,

gebe uterusun yeniden şekillenmesi esnasında hücrelerin çoğalması ve farklılaşması ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Chegini ve ark., 1986; Yarım ve Kazak, 2016).

Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü (HB-EGF), EGF ailesinin bir üyesidir. İmplantasyona hazır blastosistler ve endometriyum, HB-EGF'yi eksprese etmektedir. HB-EGF'nin implantasyon sırasında embriyo ve uterus arasında iki yönlü bir sinyal köprüsü (cross-talk) görevi gördüğü düşünülmektedir (Hamatani ve ark., 2004).

## İMLANTASYON PENCERESİNDE ADEZYON MOLEKÜLLERİ

### *Müsin-1 (MUC-1)*

MUC-1 uterus dahil olmak üzere farklı organlardaki salgı ve bez epitel hücreleri tarafından eksprese edilen bir membran glikoproteinidir (Inyawilert ve ark., 2014). MUC-1 endometriyuma embriyo bağlanmasını bloke eden anti-adezyon bir moleküldür. İmplantasyon penceresinde MUC-1 ekspresyonundaki azalmanın başarılı bir implantasyon için gerekli olduğunu bildirilmektedir. Adezyon fazı sırasında implantasyon bölgesinde en azından lokal olarak azalması gerekliliğinden söz edilmektedir (Inyawilert ve ark., 2015).

Farelerde yapılan çalışmalara göre; MUC-1 implantasyon sürecinde progesteron tarafından kontrollü şekilde yüzey epitelinde ekspresyonunun azaldığı ortaya koyulmuştur (Yılmaz, 2019).

### *İntegrinler*

Birçok dokuda ekspresyonu olan adezyon moleküllerinden integrinlerin implantasyon yetersizliklerinde ve infertilitede önemli rol oynadığından bahsedilmektedir.  $\alpha\beta3$  ve  $\alpha4\beta1$  integrinler implantasyon penceresinde uterus epitelinde birlikte eksprese olurlar. İkisinin koordineli çalışarak embriyo tutunmasına yardımcı oldukları düşünülmektedir (Yetkin, 2011).  $\alpha4\beta1$  integrinin kaybı implantasyon penceresinin kapandığının göstergesi olarak bildirilmektedir (Özcan, 2010).

### *L-Selektin*

Selektinler, E-, L- ve P-selektinleri içeren lektin benzeri proteinlerdir (Fouk ve ark., 2007). Son çalışmalar

blastosistin uterus duvarına tutunmasında, trofoblast hücreleri üzerindeki L-selektin'in ve onun uterus epiteli üzerindeki karbonhidrat reseptörlerinin aracılık ettiğini göstermektedir (Sadler, 1996).

### *Heparan Sülfat Proteoglikan (HSPG)*

HSPG'nin bir formu olan perlekan, blastosistin etrafını çevrelemektedir. mRNA ve protein ekspresyonu ile blastosistin adezyon yeterliliği kazanmasını sağladığı belirlenmiştir (Carson ve ark., 1993; Kimber, 2000).

### *E-Kadherin*

Çoğunlukla epitel dokulardan ifade edilen E-kadherin kalsiyum bağımlı hücre adezyon molekülüdür. Fare embriyolarında yapılan çalışmalarda, E-kadherin genlerinde oluşturulan mutasyonlar, preimplantasyon sürecinde defektler oluşturmaktadır. İlk aşamalarda, hücre yüzeyinde eksprese olmasının tutunmayı sağlamak için gerekli olduğu, daha sonraki evrelerde ise E-kadherin'in epitel hücrelerde ayrılma yaptığı ve blastosistin invazyonunu sağlamak için ekspresyonunun baskılandığı düşünülmektedir (Bahar ve ark., 2012).

## SONUÇ

İmplantasyon; birçok molekülün senkronize olarak uterus ve blastosisti etkilediği apozisyon, adezyon ve çeşitli türlerde invazyon aşamalarından oluşan komplike bir süreçtir. İmplantasyon penceresi terimi ise uterusun reseptif olduğu dönemi tanımlar. Fakat implantasyon penceresinin başarılı bir şekilde kurulabilmesi için uterusun reseptif olduğu süre içinde blastosistin de implantasyon yeterliliğine ulaşmış olması beklenir.

İnfertiliteye sebebiyet veren veya invitro fertilizasyon başarısızlıklarının nedeni olabilen yetersiz implantasyonun sebebi maternal kaynaklı veya embriyoya bağlı olabilmektedir. Maternal faktörler; uterusun anatomik anomalileri ve patolojileri, endometriyal reseptivitenin düşük olması veya maternal toleransın sağlanamaması gibi immünolojik sebepler olabilmektedir. Embriyoya bağlı faktörler ise blastosist gelişim aşamasında meydana gelen sorunlar, genetik anormallikler veya embriyonun moleküler mekanizmasına bağlı olabilen problemler olarak düşünülebilir. İmplantasyon penceresi döneminde annenin ve embriyonun senkronizasyonunun sağlanamaması da implantasyonun gerçekleşmemesine sebebiyet vermektedir.

Sonuçta infertilitenin en büyük sebeplerinden biri olan

ve henüz tam olarak çözümlenemeyen implantasyon başarısızlıklarının temelinde yatan birçok faktör mevcuttur ve sağlıklı üreme açısından implantasyonun mekanizmalarının derinlemesine incelenmesi önem arz etmektedir.

#### KAYNAKÇA

- Abd-Elnaeim, M., Pfarrer, C., Saber, A., Abou-Elmagd, A., Jones, C. & Leiser, R. (1999). Fetomaternal attachment and anchorage in the early diffuse epitheliochorial placenta of the camel (*Camelus dromedarius*). *Cells Tissues Organs*, 164, 141-154.
- Abd ElFattah, L. I. (2012). Pinopodes. *Egyptian Journal of Histology*, 35, 633-639.
- Achache, H., Revel, A., (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update*, 12, 731-46.
- Aitken, R. (1975). Ultrastructure of the blastocyst and endometrium of the roe deer (*Capreolus capreolus*) during delayed implantation. *Journal of Anatomy*, 119, 369.
- Aplin, J. D. (2000). The cell biological basis of human implantation. *Best Practice ve Research Clinical Obstetrics ve Gynaecology*, 14, 757-764.
- Bagot, C. N., Kliman, H. J. & Taylor, H. S. (2001). Maternal Hoxa10 is required for pinopod formation in the development of mouse uterine receptivity to embryo implantation. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 222, 538-544.
- Bahar, L., Kahraman, S., Akkuş, M. & Baykal, T. (2012). Fine structure and immunohistochemical evaluation of endometrium in fertile and infertile women with implantation failure. *Dicle Tıp Dergisi*, 39, 269-275.
- Barnea, E. R. (2004). Insight into early pregnancy events: the emerging role of the embryo. *American Journal of Reproductive Immunology*, 51, 319-322.
- Bentin-Ley, U., Sjögren, A., Nilsson, L., Hamberger, L., Larsen, J. & Horn, T. (1999). Presence of uterine pinopodes at the embryo–endometrial interface during human implantation in vitro. *Human Reproduction*, 14, 515-520.
- Bhartiya, D. & Bajpai, V. K. (1995). Cyclic alterations in rhesus monkey endometrium by scanning electron microscopy. *Reproduction, Fertility and Development*, 7, 1199-1207.
- Blankenship, T. N., Given, R. L. & Parkening, T. A. (1990). Blastocyst implantation in the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). *American Journal of Anatomy*, 187, 137-157.
- Carosella, E., Dausset, J. & Rouas-Freiss, N. (1999). Immunotolerant functions of HLA-G. *CMLS*, 55, 327-333.
- Carson, D. D., Bagchi, I., Dey, S. K., Enders, A. C., Fazleabas, A. T., Lessey, B. A. & Yoshinaga, K. (2000). Embryo implantation. *Developmental Biology*, 223, 217-237.
- Carson, D. D., Tang, J.-P. & Julian, J. (1993). Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. *Developmental Biology*, 155, 97-106.
- Chegini, N., Rao, C. V., Wakim, N. & Sanfilippo, J. (1986). Binding of 125I-epidermal growth factor in human uterus. *Cell and Tissue Research*, 246, 543-548.
- Cork, B., Tuckerman, E., Li, T. & Laird, S. (2002). Expression of interleukin (IL)-11 receptor by the human endometrium in vivo and effects of IL-11, IL-6 and LIF on the production of MMP and cytokines by human endometrial cells in vitro. *Molecular Human Reproduction*, 8, 841-848.
- De Lemos, M. A. (2003). How your mother tolerated you for nine months. *BioTeach J*, 1, 27-29.
- De los Santos, M., Mercader, A., Galan, A., Albert, C., Romero, J. & Pellicer, A. (2003). Implantation rates after two, three, or five days of embryo culture. *Placenta*, 24, S13-S19.
- Dedeoğlu, E. (2020). RNA based biomarkers for prediction of the endometrial window of implantation. Bilkent University.
- Dey, S., Lim, H., Das, S. K., Reese, J., Paria, B., Daikoku, T. & Wang, H., (2004). Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews*, 25, 341-73.
- Dimitriadis, E., White, C., Jones, R. & Salamonsen, L. (2005). Cytokines, chemokines and growth factors in

- endometrium related to implantation. *Human Reproduction Update*, 11, 613-630.
- Dominguez, F., Gadea, B., Mercader, A., Esteban, F. J., Pellicer, A. & Simón, C. (2010). Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system. *Fertility and Sterility*, 93, 774-782.
- Egashira, M. & Hirota, Y. (2013). Uterine receptivity and embryo-uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice. *Reproductive Medicine and Biology*, 12, 127-132.
- Emiliani, S., Delbaere, A., Devreker, F. & Englert, Y. (2005). Embryo-maternal interactive factors regulating the implantation process: implications in assisted reproductive treatment. *Reproductive BioMedicine Online*, 10, 527-540.
- Ender, A. C. & Nelson, D. M. (1973). Pinocytotic activity of the uterus of the rat. *Am J Anat*, 138, 277-299.
- Fouk, R. A., Zdravkovic, T., Genbacev, O. & Prakobphol, A. (2007). Expression of L-selectin ligand MECA-79 as a predictive marker of human uterine receptivity. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24, 316-21.
- Gao, Y., Duran, S., Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Burghardt, R. C., Bayless, K. J., Bartholin, L. & Li, Q. (2015). Constitutive activation of transforming growth factor Beta receptor 1 in the mouse uterus impairs uterine morphology and function. *Biology of Reproduction*, 92, 34.
- Garcia-Ispuerto, I., Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., Yaniz, J. L., Nogareda, C., Lopez-Bejar, M. & De Rensis, F. (2006). Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology*, 65, 799-807.
- Gardner, D., Weissman, A., Howles, C. & Shoham, Z. (2010). Yardımla üreme teknikleri temel kitabı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Geisert, R. D., Johnson, G. A. & Burghardt, R. C. (2015). Implantation and establishment of pregnancy in the pig. Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals: Tribute to 45 Year Anniversary of Roger V. Short's. *Maternal Recognition of Pregnancy*, 137-63.
- Gökçimen, A. & Temel, S. (2004). İmplantasyon ve moleküler etkileşimler. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 11.
- Guillomot, M., Flechon, J. & Wintenberger-Torres, S. (1981). Conceptus attachment in the ewe: an ultrastructural study. *Placenta*, 2, 169-182.
- Hafez, E. S. E. (1962). Reproduction in Farms Animals (E. S. E. Hafez Ed.). Sayfa 573.
- Hamatani, T., Daikoku, T., Wang, H., Matsumoto, H., Carter, M. G., Ko, M. S. & Dey, S. K. (2004). Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 10326-10331.
- Hannan, N. J. & Salamonsen, L. A. (2007). Role of chemokines in the endometrium and in embryo implantation. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 19, 266-72.
- Harem, İ. Ş. (2016). Desidual Hücreler. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 5, 202-207.
- Harvey, M., Leco, K., Arcellana-Panlilio, M., Zhang, X., Edwards, D. & Schultz, G. (1995). Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development*, 121, 1005-1014.
- Holst, P. A. & Plemister, R.D. (1971). The prenatal development of the dog: Preimplantation event. *Biology of Reproduction*, 5, 194-206
- Hosie, M. J., Adams, S. M., Thompson, M. B. & Murphy, C. R. (2003). Viviparous lizard, *Eulamprus tympanum*, shows changes in the uterine surface epithelium during early pregnancy that are similar to the plasma membrane transformation of mammals. *Journal of Morphology*, 258, 346-357.
- Huet-hudson, Y. M., Andrews, G. K. & Dey, S. K. (1989). Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology*, 125, 1683-1690.
- Hunt, J. S. (2006). Stranger in a strange land. *Immunological Reviews*, 213, 36-47.
- Hunt, J. S., Petroff, M. G., McIntire, R. H. & Ober, C. (2005). HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *The FASEB Journal*, 19, 681-693.

- Inyawilert, W., Fu, T. Y., Lin, C. T. & Tang, P. C. (2014). MicroRNA-199a mediates mucin 1 expression in mouse uterus during implantation. *Reproduction, Fertility and Development*, 26, 653-64.
- Inyawilert, W., Fu, T. Y., Lin, C. T. & Tang, P. C. (2015). Let-7-mediated suppression of mucin 1 expression in the mouse uterus during embryo implantation. *Journal of Reproduction and Development*, 2014-2106.
- Jabbour, H. N., Kelly, R. W., Fraser, H. M. & Critchley, H. O. (2006). Endocrine regulation of menstruation. *Endocrine Reviews*, 27, 17-46.
- Jana, S. K., Banerjee, P., Mukherjee, R., Chakravarty, B. & Chaudhury, K. (2013). HOXA-11 mediated dysregulation of matrix remodeling during implantation window in women with endometriosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30, 1505-12.
- Keys, J. & King, G. (1990). Microscopic examination of porcine conceptus-maternal interface between days 10 and 19 of pregnancy. *American Journal of Anatomy*, 188, 221-238.
- Kimber, S. J. (2000). Molecular interactions at the maternal-embryonic interface during the early phase of implantation. Paper presented at the Seminars in reproductive medicine.
- Kress, A. & Mardi, L. (1990). Postnatal development of the Mongolian gerbil uterus. *Cells Tissues Organs*, 137, 234-240.
- Lessey, B. A. & Castelbaum, A. J. (2002). Integrins and implantation in the human. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 3, 107-117.
- Li, Y., Sun, X. & Dey, S. K. (2015). Entosis allows timely elimination of the luminal epithelial barrier for embryo implantation. *Cell Reports*, 11, 358-365.
- Ljungkvist, I. & Nilsson, O. (1971). Ultrastructure of rat uterine luminal epithelium at functional states compatible with implantation. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 135, 101-107.
- Lutton, B. & Callard, I. (2006). Evolution of reproductive-immune interactions. *Integrative and Comparative Biology*, 46, 1060-1071.
- Ma, W.-g., Song, H., Das, S. K., Paria, B. C. & Dey, S. K. (2003). Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 2963-2968.
- Mahajan, N. (2015). Endometrial receptivity array: Clinical application. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 8, 121.
- Martel, D., Monier, M., Roche, D. & Psychoyos, A. (1991). Hormonal dependence of pinopode formation at the uterine luminal surface. *Human Reproduction*, 6, 597-603.
- Özcan, T. (2010). Diyabetin, implantasyon penceresi dönemindeki sıçan endometriyumunda Vβ3 integrin ekspresyonuna ve ince yapıya etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Poon, C. E., Madawala, R. J., Dowland, S. N. & Murphy, C. R. (2016). Nectin-3 is increased in the cell junctions of the uterine epithelium at implantation. *Reproductive Sciences*, 23, 1580-1592.
- PrabhuDas, M., Bonney, E., Caron, K., Dey, S., Erlebacher, A., Fazleabas, A., Fisher, S., Golos, T., Matzuk, M. & McCune, J. M. (2015). Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. *Nature Immunology*, 16, 328-34.
- Psychoyos, A. (1986). Uterine receptivity for nidation a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 476, 36-42.
- Quinn, C. & Casper, R. (2009). Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Human Reproduction Update*, 15, 229-236.
- Red-Horse, K., Drake, P. M., Gunn, M. D. & Fisher, S. J. (2001). Chemokine ligand and receptor expression in the pregnant uterus: reciprocal patterns in complementary cell subsets suggest functional roles. *The American Journal of Pathology*, 159, 2199-2213.
- Reese, J., Brown, N., Paria, B. C., Morrow, J. & Dey, S. K. (1999). COX-2 compensation in the uterus of COX-1 deficient mice during the pre-implantation period. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 150, 23-31.
- Robert, C. A. (2020). Endometrial receptivity array for individualized determination of endometrial receptivity. *Human Reproduction Open*, 2020, 2.
- Sadler, T. (1996). Langman's Medical Embryology, 338 9. In: Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık.

- Salamonsen, L. A., Hannan, N. J. & Dimitriadis, E. (2007). Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. Paper presented at the Seminars in reproductive medicine.
- Salleh, N. (2014). Diverse roles of prostaglandins in blastocyst implantation. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Samoïlov, M., Bessmertnaia, V., Serebrennikova, K. & Mishnev, O. (2011). Endometrial implantation window in infertility. *Arkhiv Patologii*, 73, 13-18.
- Segalen, J., Lescoat, D. & Chambon, Y. (1982). Ultrastructural aspects of uterine secretion during the establishment of pregnancy in the rabbit: role of the egg. *Journal of Anatomy*, 135, 281.
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W. & Burghardt, R. C. (2004). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction*, 12, 657-68.
- Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen, F. & Abbondanzo, S. J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359, 76-79.
- Trowsdale, J. & Betz, A. G. (2006). Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nature Immunology*, 7, 241-246.
- Uenoyama, Y., Inoue, N., Nakamura, S. & Tsukamura, H. (2021). Kisspeptin Neurons and Estrogen–Estrogen Receptor  $\alpha$  Signaling: Unraveling the Mystery of Steroid Feedback System Regulating Mammalian Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 9229.
- Xu, B., Sun, X., Li, L., Wu, L., Zhang, A. & Feng, Y. (2012). Pinopodes, leukemia inhibitory factor, integrin- $\beta$ 3, and mucin-1 expression in the peri-implantation endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 98, 389-395.
- Yarım, G. F. & KAZAK, F. (2016). Epidermal büyüme faktörü. *Kocatepe Veterinary Journal*, 9, 215-225.
- Yılmaz, F. (2019). Sıçanlarda prenatal kafein tüketimin implantasyon üzerine etkilerinin immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmesi.
- Yılmaz, F. & Tekmen, I. (2019). İmplantasyon Sürecinde Embriyo, Endometriyum Farklanması ve Moleküler Yolaklar. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 39, 212-220.



**Volkan TÜRKMEN<sup>1a\*</sup>**  
**Doğukan ÖZEN<sup>2b</sup>**

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara

**ORCID<sup>a</sup>:** 0000-0003-4215-4203  
**ORCID<sup>b</sup>:** 0000-0003-1943-2690

**\*Sorumlu Yazar:** Volkan TÜRKMEN  
**E-Posta:** volkantrkmen@yandex.com

**Geliş Tarihi:** 03.06.2023  
**Kabul Tarihi:** 30.11.2023

**14 (3): 118-132, 2023**  
**DOI: 10.38137/vftd.1307581**

#### **Makale atıf**

Türkmen, V. ve Özen, D. (2023). Makine Öğrenmesinde Regresyon Algoritmalarının Veteriner Hekimliği Alanında Uygulamaları, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (3), 118-132. DOI: 10.38137/vftd.1307581.

## **MAKİNE ÖĞRENMESİNDE REGRESYON ALGORİTMALARININ VETERİNER HEKİMLİĞİ ALANINDA UYGULAMALARI**

**ÖZET.** Hızla artan veriler, özellikle giyilebilir teknolojiler, sensörler ve internet bağlantılı akıllı ürünler (IoT) gibi yeni veri kaynaklarından akan daha büyük, daha karmaşık veri kümeleri makine öğrenmesi algoritmalarına olan ihtiyacı her geçen gün artırmaktadır. Geleneksel veri işleme yazılımlarının başa çıkamadığı büyük hacimli veri kümeleri her alanda olduğu gibi veteriner hekimlik alanında da yeni fırsatlar sunmakta ve daha önce üstesinden gelinemeyen sorunlar için yeni çözüm yolları üretebilme potansiyeline sahip olduğu görülmektedir. Bu derleme çalışmasında literatürde sıkça karşılaşılan makine öğrenmesi regresyon algoritmaları tanıtılmış ve veteriner hekimliği alanında uygulamalarına ilişkin kısa örnekler verilmiştir. Bunun yanında bu algoritmaların veteriner hekimliği alanındaki potansiyeline kısaca değinilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Makine öğrenmesi, regresyon algoritmaları, veteriner hekimlik.

## **APPLICATIONS of REGRESSION ALGORITHMS in MACHINE LEARNING in VETERINARY MEDICINE**

**ABSTRACT.** Machine learning algorithms are becoming more and more essential as a result of the exponential growth of data, particularly the larger, more complicated datasets coming from emerging data sources like wearables, sensors, and internet-connected smart devices (IoT). In the field of veterinary medicine, as in every discipline, large volumes of data sets that conventional data processing tools cannot handle present new opportunities and have the ability to generate novel solutions for issues that have previously been insurmountable. Machine learning regression methods, which are widely found in the literature, are described in this study along with a few brief examples of how they might be used in veterinary medicine. Also, a brief mention is made of how these algorithms could have applications in veterinary medicine.

**Keywords:** Machine learning, regression algorithms, veterinary medicine.

## GİRİŞ

Veteriner hekimliği; hayvan sağlığı, halk sağlığı, zoonotik hastalıklar gibi konuları içeren oldukça geniş ve büyüyen bir disiplindir. Benzer şekilde yapay zeka (AI, Artificial Intelligence.); felsefe, matematik, sinir bilimi, kontrol teorisi ve sibernetik, bilgisayar mühendisliği ve veri bilimleri dahil olmak üzere birçok bilim alanı ile ilişkilidir. Bu iki geniş ve büyüyen alanın kesişimi, birinin diğerini çarpıcı biçimde etkileme potansiyeline sahiptir. Dolayısıyla yapay zekanın veteriner hekimliği alanındaki uygulamaları neredeyse sınırsızdır. Benzer şekilde veteriner hekimliği alanındaki yapay zeka uygulamaları da diğer alanlardaki yapay zeka ilerlemelerine etki edebilme potansiyeline sahiptir (Basran ve Appleby, 2022).

Yapay zeka çalışmaları, konuşma tanımlama (speech recognition), bilgisayarla görme (computer vision) ve doğal dil işleme (natural language processing) olmak üzere genellikle üç büyük kategoriye ayrılırlar. Veteriner hekimlikte bu amaçlardan herhangi biri için yapay zekadan nasıl yararlanılabileceği, belirli göreve ve mevcut veri türlerine bağlıdır. Her çalışma alanı, veterinerlik tıbbında AI için sayısız uygulama sunma potansiyeline sahiptir (Basran ve Appleby, 2022).

Hayvan sağlığı alanında tanı, teşhis ve tedavide veteriner hekimlerin hızlı çözümler üretebilmesi veya doğru kararlar alabilmesi için yapay zekanın sunduğu teknolojik imkanlardan faydalanması gerekliliği görülmektedir. Zettabayt boyutlarında ciddi miktarlardaki verinin akmaya başladığı günümüzde büyük boyutlu veri setlerinden makine öğrenmesi algoritmaları ile öğrenilen desenler ve modeller ile küçük yapay zekalar oluşturup örneğin hayvan yetiştiriciliğinde verimi, maliyeti, kaliteyi, hastalıkları sıkı bir şekilde takip etmemizi sağlayabilir. Her koşulda veteriner hekimlerin daha hızlı karar almasına yardımcı olabilir (Cihan ve ark., 2017).

Yapay zekanın alt dallarından biri olan makine öğrenmesi (ML, Machine Learning), matematiksel ve istatistiksel yöntemler kullanarak mevcut verilerden çıkarımlar yapan, bu çıkarımlarla bilinmeyene dair tahminlerde bulunan modelleme ve algoritmalarından oluşmaktadır (Kıral Özkan, 2015). Bir başka ifade ile

ML, genellikle geleneksel veri işleme araçları ile analizi yapılamayan ve karmaşık bir yapıya sahip büyük miktardaki veri setlerini kullanarak anlamlı ilişkiler bulan model ve desenler geliştiren yöntemler ailesidir (Chen ve He, 2014). ML denetimli, yarı denetimli, denetimsiz ve takviyeli algoritmalar gibi yöntemleri kullanarak, belirli bir görev ve bununla ilişkili model desenlerini ortaya çıkarabilirler.

Denetimli ML algoritmaları, tüm veriler daha önce sınıflandırıldığında kullanılır. Burada amaç, yeni girdi verilerini bilinen çıktı yanıtlarına göre sınıflandırmaktır. Çıktılar kategorik, sıralı kategorik veya sürekli olabilir. Denetimsiz öğrenme algoritmaları ise, öncelikle veri çıkarımı için veya veri kümesinden makul sonuçlar veya potansiyel hipotezler çıkarmak için kullanılmaktadır. Burada amaç genellikle büyük veri kümelerini, anlamlı ve yorumlanabilir halde gruplamaktır. Denetimli ML'de olduğu gibi, veri türleri kesikli veya sürekli olabilir. Diğer ML örnekleri arasında yarı denetimli ML bulunur. Yarı denetimli ML, hem denetimli hem de denetimsiz ML'yi birleştiren ve etiketli ve etiketsiz veri kümelerinin bir kombinasyonu olduğunda kullanışlı olan yapay zeka dalıdır. Takviyeli (pekiştirmeli) öğrenme yöntemini kullanan algoritmalar öğrenme performansını artırmak için çevre ile etkileşim kuran bir sisteme dayanmaktadır. Bu öğrenme yöntemi veri setindeki mevcut bilgiyi kullanma ve deneme yanılma yoluyla keşfetme arasında bir denge kurmaya çalışır. Canlıların öğrenme yöntemlerini taklit eden bir yol izleyerek algoritmaların öğrenmesini sağlar. Pekiştirmeli öğrenmenin denetimli öğrenmeden ayrıldığı noktalar şunlardır; doğru etiket veya değer eşleşmesi verilmemekte, uygun olmayan eylemler için dışarıdan düzeltme yapılamamaktadır (Kıral Özkan, 2015).

Bu derleme çalışmasının temel amacı makine öğrenmesinde kullanılan regresyon algoritmalarının tanıtılması ve veteriner hekimliği alanında uygulamalarına ilişkin kısa örnekler ile bu algoritmaların veteriner hekimliği alanındaki potansiyelini göstermektir. Bu amaçlar doğrultusunda ilerleyen başlıklarda ilk etapta kısaca makine öğrenmesinin analiz kısmında yapılacak işlemler, veri ön işleme, öznelik seçimi, hiper parametre en iyilemesi, model performans değerlendirme yöntemleri ve ölçütler açıklanmıştır. Sonrasında ise gerçekleştirilen literatür taraması ile veteriner hekimliğinde makine öğrenimi regresyon algoritmaları kullanılan çalışma örnekleri kısaca izah edilerek çalışma bitirilmiştir.



## REGRESYONA DAYALI DENETİMLİ MAKİNE ÖĞRENMESİ ALGORİTMALARI

Regresyon çözümlenmesi genel olarak bağımlı değişken ile bağımsız değişken(ler) arasındaki ilişki yapısını en iyi matematiksel modeller ile açıklamaya çalışan yöntemler ailesidir. Makine öğrenmesi yapay zekayı oluşturan en önemli bileşenlerden birisidir. İstatistiksel öğrenme üzerine kurulu makine öğrenmesi, bir sistemin çevresine uyum sağlayabilmek için kendi kendini yeniden düzenlemesi olarak nitelendirilen öğrenme işinin bilgisayarlar tarafından gerçekleştirilmesini sağlamak için kullanılır (Kıral Özkan, 2015). Regresyon algoritmaları denetimli öğrenme yöntemi ile makinelerin eğitildiği makine öğrenmesi algoritmalarıdır.

Çalışmanın bu bölümünde literatürde sıklıkla kullanılan klasik makine öğrenmesi regresyon yöntemleri olan doğrusal regresyon, Ridge, LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator) ve Elastik Net (Elastic Net) gibi düzenleme algoritmaları ile hem sınıflandırma hem de regresyon problemleri için kullanılma imkanı bulunan yapay sinir ağları (YSA), Naïve Bayes, karar ağaçları, k-en yakın komşu (KNN, k-nearest neighbors), destek vektör makineleri (DVM) ve destek vektör regresyonu (DVR) algoritmaları tarihsel gelişim sürecine göre sırasıyla açıklanacaktır. Sonraki aşamada ise günümüzde yaygın olarak kullanılan topluluk öğrenme yöntemleri; Torbalama (Bagging), Güçlendirme-Hızlandırma (Boosting), Gradyan Arttırıcı (Gradient Boosting) ve Rastgele Orman (Random Forest) tanıtılmıştır (Ceylan, 2018).

## DOĞRUSAL REGRESYON

Basit ve çok değişkenli doğrusal regresyonun temel amacı, bağımlı ve bağımsız değişken(ler) arasındaki doğrusal ilişkiyi matematiksel modellerle açıklayan bağıntı(ları) bulmak ve bu model yardımıyla bağımlı değişken hakkında ileriye yönelik tahminlerde bulunmaktır. Regresyon çözümlenmesi geleneksel olarak istatistik paket programlarında en küçük kareler (EKK) yöntemi kullanılarak hata kareler toplamını en aza indirerek yapılır. Basit doğrusal regresyon, kullanışlı ve çok geniş kullanım alanı olan bir istatistiksel öğrenme metodudur (James ve ark., 2013).

Doğrusal regresyonun makine öğrenmesi algoritması olarak uygulamasında meyilli azalım (Gradient Descent-GD) yöntemi kullanılır. Makine öğrenmesinde hata oranını en aza indirmek için sıklıkla kullanılan en iyileme (optimizasyon) yöntemidir. Bu yöntem, rastgele alınan değişkenlerle başlayarak global minimum değerine ulaşmayı amaçlayan iteratif bir yöntemdir. Öğrenme oranının (learning rate) eklendiği kayıp fonksiyonu kullanılarak hatayı veya kaybı en aza indirmek için regresyon katsayıları güncellenir, bu süreç global minimum değerine ulaşmaya kadar devam eder. Farklı regresyon türleri için farklı kayıp fonksiyonları kullanılır. Doğrusal regresyon için ortalama hata kareler (MSE, Mean Squared Error) kayıp ya da maliyet fonksiyonu olarak kullanılır (Gandhi, 2018).

## DÜZENLİLEŞTİRME (REGULARIZATION) ALGORİTMALARI

Çok değişkenli doğrusal regresyon analizi sonucunda varyans artırıcı faktör (VIF, Variance Inflation Factor) 10'un üstünde ve koşul indeksi 30'un üstünde ise bağımsız değişkenler arasında kuvvetli bir ilişkinin varlığından söz edilebilir. Çoklu bağlantı sorunu olarak bilinen bu durum sebebi ile regresyon modeli hatalı tahminler üretir, katsayılar gerçekte anlamlı iken anlamsız çıkabilir. Bu durumun çözümü için literatürde en çok tercih edilen ve yanlış tahmin regresyonları olarak da bilinen Ridge, LASSO ve Elastik Net düzenleme algoritmaları kullanılır (Alpar, 2011).

Bu üç teknik karmaşıklıklarına göre modelleri cezalandıran ve aşırı uyum (over-fitting) sorununu önlemek için sıklıkla kullanılan basit düzenleme makine öğrenmesi algoritmalarıdır. Ridge regresyon Arthur Hoerl ve Robert Kennard (1970) tarafından önerilen L2 (Tikhonov düzenlemesi) türü bir düzenleme algoritmasıdır. Ridge regresyon yönteminde maliyet fonksiyonuna (cost function) düzenleme terimi olarak katsayıların karesi eklenir;

$$\hat{\beta}^{\text{ridge}} = \underset{\beta}{\operatorname{argmin}} \left\{ \sum_{i=1}^N (y_i - \beta_0 - \sum_{j=1}^p x_{ij} \beta_j)^2 + \lambda \sum_{j=1}^p \beta_j^2 \right\}.$$

Tibshirani tarafından 1996 yılında önerilen LASSO regresyon yönteminde maliyet fonksiyonuna düzenleme terimi olarak katsayıların mutlak değeri eklenir;

$$\hat{\beta}^{\text{lasso}} = \underset{\beta}{\operatorname{argmin}} \left\{ \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N (y_i - \beta_0 - \sum_{j=1}^p x_{ij} \beta_j)^2 + \lambda \sum_{j=1}^p |\beta_j| \right\}.$$

Elastik Net regresyon yöntemi Zou ve Hastie (2005) tarafından LASSO yönteminin bazı eksikliklerine çözüm bulmak için önerilmiştir. Elastik Net yönteminde maliyet fonksiyonuna düzenleme terimi olarak ise her ikisinin toplamı eklenir;

$$\lambda \sum_{j=1}^p (\alpha \beta_j^2 + (1 - \alpha) |\beta_j|)$$

ve sonra büzülme (shrinkage) ve cezalandırma (penalize) terimi olarak öğrenme oranı eklenerek model yeniden düzenlenir (Jason, 2019).

Kayıp fonksiyonundaki hata oranını en aza indirerek global minimum değerine ulaşmak için iteratif bir metot olan GD en iyileme (optimizasyon) yöntemi kullanılır.

### YAPAY SİNİR AĞLARI ALGORİTMASI

Yapay Sinir Ağları (YSA) Warren McCulloch ve Walter Pitts (1943) tarafından geliştirilmiştir. YSA insan beynindeki nöronlardan esinlenerek oluşturulmuştur. İnsan beyninin çalışma prensiplerinden faydalanılarak nöron isimli sinir hücrelerinin davranışları modellenerek geliştirilmiştir. Birbirlerine çoklu bağlantı yapmış nöronların oluşturduğu karmaşık bir yapı halinde paralel işlemciler gibi çalışan çok yönlü bir makine öğrenmesi tekniğidir (Balta, 2018). Sınıflandırma, regresyon, denetimsiz öğrenme, örüntü tanıma vb. alanlarda kullanılabilir.

YSA' yı oluşturan temel unsurlar şu şekildedir:

1. Bilgi işlemenin gerçekleştiği nöron adı verilen birçok temel birimden oluşur (mimari yapı).
2. Nöronlar arası bağlantı hatları boyunca sinyaller iletilir (algoritma, eğitme veya öğrenme).
3. Her bir bağlantı hattı bağlılık durumunu gösteren sayısal bir ağırlığa sahiptir. Bu ağırlık sinyal değeri ile çarpılır.
4. Her bir nöron, giriş sinyallerinin toplamını genellikle doğrusal olmayan bir aktivasyon fonksiyonuna giriş olarak kullanıp bir çıkış sinyali üretir (aktivasyon fonksiyonu).

Çok katmanlı ağlar, genellikle üç katmanlı bir yapıda veya daha fazla katman kullanılarak oluşturulan YSA modellemesidir. Giriş katmanı gerçek değerleri

giriş olarak alan nöronlardan oluşur. Gizli katman ise giriş katmanından gelen sinyaller ile beslenen nöronlardan oluşur. Çok katmanlı YSA' da kullanılan çeşitli aktivasyon fonksiyonları vardır. Bunlardan en yaygın olanı Sigmoid olarak adlandırılan fonksiyondur (Balta, 2018). Aktivasyon fonksiyonlarındaki amaç; ağırlık ve eşik değerlerini ayarlamaktır. Sigmoid, tanh, relu, leaky relu ve elu gibi birçok aktivasyon fonksiyonu bulunmaktadır. Günümüzün en popüler aktivasyon fonksiyonu relu fonksiyonudur.

### NAİVE BAYES ALGORİTMASI

18.yy'da olasılık üzerine çalışan Thomas Bayes'in tarafından geliştirilen Bayes teoremine dayanan algoritmadır. Naive Bayes algoritması 1961 yılında tanıtılmıştır (Maron, 1961). Naive Bayes geçmiş olaylara ait verileri kullanarak gelecekteki olayların olasılıklarını tahmin etmeyi amaçlayan yöntemdir. Naive Bayes algoritmasının, "Naive (naif, saf)" şeklinde isimlendirilmesinin nedeni, algoritmanın veri hakkında yapmış olduğu bir takım ön kabullerden kaynaklanmaktadır. Söz konusu algoritma, veri setindeki tüm özelliklerin eşit derecede önemli olduğunu ve özelliklerin birbirinden bağımsız olduğunu farz etmektedir (Bulut, 2019).

Bu algoritma frekans tabloları vasıtasıyla veri setini öğrenmekte, her bir özelliğin kategorik olması sayesinde sınıflar ve özellikler arasında kombinasyonlar yapılarak matris oluşturulabilmektedir. Ancak nümerik özellikler kategorik değerlere sahip olmadığından, algoritmanın sayısal verilerle doğrudan çalışması mümkün olmamaktadır. Bu sorunu aşmak için nümerik özellikler kategorik kümelere dönüştürülür. Verilerin dağılımına göre kesim noktaları belirlenir, böylelikle sayısal veriler için kategoriler oluşturulur (Bulut, 2019).

Naive Bayes algoritması, basit, hızlı ve efektiftir. Anlamsız ve kayıp verilerin bulunduğu veri setlerinde başarılıdır. Göreceli olarak eğitim aşamasında az sayıda örnek veriye ihtiyaç duyar. Öngörü yapılması için gerekli olan tahmini olasılığın elde edilmesi kolaydır. Özelliklerin birbirinden bağımsız olduğu ve eşit derecede önemli olduğu gibi genellikle yanlış bir ön kabul yapmaktadır. Sayısal verilerin fazla olduğu veri setleri için ideal bir yöntem değildir (Bulut, 2019).

### KARAR AĞAÇLARI ALGORİTMASI

Ağaç tabanlı öğrenme algoritmaları sınıflandırma ve regresyon problemlerinin çözümünde en çok kullanılan

denetimli öğrenme yöntemlerinden biridir. Doğrusal modellerin yanında, doğrusal olmayan ilişkileri de oldukça iyi gösterir. Parametrik olmayan örnek tabanlı (instance-based) makine öğrenmesi algoritmasıdır. Regresyon karar ağaçları Morgan ve Sonquist (1963) tarafından geliştirilmiştir.

Ağaç, dallardan ve düğümlerden oluşur. Karar Ağacı bölünmeye tüm gözlemleri barındıran kök (root) düğümden başlar. Yukarıdan aşağıya tekniği ile genellikle açgözlü veya iştahlı (greedy) yaklaşımla yapılır. Bu yöntem ile her aşamada opsiyonel bazı kriterlere göre ağaç dallara ayrılır. Bu yaklaşımla aşağıya doğru dallara ayırma yaparken en iyi bölünmeyi sağlayacak değişkeni seçmek için “Entropi” ve “Bilgi kazancı” ile “Gini indeksi” ve “Karışıklık ölçüsü (measure of impurity)” kriterleri kullanılmaktadır. Bilgi kazancı en yüksek değişken en iyi dallara ayırmayı sağlayacak değişken olarak seçilir ve bölünmeye o değişkenden başlanılır. Bu bölünme, en çok ağaç derinliği ve bir düğümden bölünme için ele alınan en küçük eleman sayısı gibi belirli durdurma kuralına kadar devam eder (Akman, 2010).

Karar ağaçları kurulma biçimlerine göre farklılıklar gösterirler. Kullanılan algoritmaya (ID3, C4.5, CART vb.) göre oluşturulan ağacın şekli değişebilir. Değişik ağaç yapıları da farklı sınıflandırma sonuçları verir (Yılmaz, 2014).

Karar ağacı regresyonu bağımsız değişkenleri bilgi kazancına göre aralıklara ayırır. Karar ağacı regresyonu diğer regresyon modellerinde olduğu gibi sürekli değil, kesikli sonuç üretir. Eğitim sırasında elde edilen regresyon modeli kesikli sonuç ürettiği için model test edilirken belirli bir aralıktaki değer tahmin edilmek istenildiğinde bu aralıktaki ortalamayı sonuç olarak üretir. Yani bu aralıktaki sonuçlar aynı sonucu (ortalamayı) verir (Şirin, 2017).

Oluşturulan karar ağacına budama (pruning) işlemi uygulanır. Budama işlemi, aşırı uyum problemini engellemek ve yanlış sınıflandırma hatasını en küçük yapmak için ağacın gerçek büyüklüğüne karar vermede kullanılır (Özgür, 2020).

### **K EN YAKIN KOMŞU (KNN, K NEAREST NEIGHBOUR) ALGORİTMASI**

KNN algoritması, 1967 yılında T. M. Cover ve P. E.

Hart tarafından önerilmiştir. Uygulaması basit ve esnek bir sınıflandırma ve regresyon yöntemidir. Genellikle öğrenme verilerinin sayısal olduğu durumlarda kullanılır. Öğrenmekten ziyade veri kümesini bütünüyle hafızaya alıp işlem yapar. Veriler hakkında herhangi bir parametre öğrenilmediğinden parametrik olmayan bellek tabanlı bir makine öğrenmesi yaklaşımı olarak bilinir. Bir model inşa etmediği için literatürde bu tarz öğrenme şekline tembel öğrenme "lazy learning" de denir. Kategorik özelliklerin olduğu durumlarda bu veriler, uygun şekilde kodlanıp sayısal hale getirilerek sınıflandırma işlemi yapılabilir (Balta, 2018). Bağımlı ve bağımsız değişken arasındaki ilişkinin doğrusal olmadığı durumlarda doğrusal regresyon analizinden daha iyi sonuçlar vermektedir (James ve ark., 2013).

KNN algoritmasında k (komşu noktalar) parametresinin seçimi, genelleştirme problemi açısından önemli bir yer tutmaktadır. K büyük seçilirse gürültülü verilerin etkisi azalır, küçük seçilirse anlamsız ve aykırı örneklerin model üzerindeki etkisi artar (Bulut, 2019).

KNN algoritması, k tane benzer örneği seçerken bir uzaklık (distance) fonksiyonu kullanmakta, bu fonksiyon vasıtasıyla iki örnek arasındaki uzaklığı hesaplamaktadır. Uzaklığı hesaplamak için farklı yaklaşımlar bulunmakla birlikte, geleneksel olarak kNN, Öklid mesafesini kullanmaktadır (Bulut, 2019).

### **DESTEK VEKTÖR MAKİNELERİ**

Destek Vektör Makinelerinin (DVM), teorik temelleri V. Vapnik tarafından 1960'lı yıllarda ortaya atılmıştır. DVM algoritması Boser, Guyo ve Vapnik tarafından 1992 yılında yayınlanan çalışma ile tanıtılmıştır. Sınıflandırma ve regresyon için uygulanabilir denetimli öğrenme tekniklerindedir. Bu yöntemin temeli istatistiksel öğrenme teorisine ve yapısal risk minimizasyonuna dayanmaktadır (Ceylan, 2018).

DVM, temel olarak iki sınıfı bir doğru veya düzlem ile birbirinden ayırmaya çalışır. Bu ayırmayı da sınırdaki elemanlara göre yapar. Sınıfların doğrusal ayrılabilirdiği ve ayrılamadığı durumlarda kullanılabilme, model karmaşıklığını ayarlayabilme ve genelleme yeteneği gibi özellikleri sayesinde birçok alanda kullanımı tercih edilen bir yöntem olmuştur. Sınıfların doğrusal ayrılamadığı durumlarda karar sınırlarını oluşturmak için çekirdek hilesi (kernel trick) kullanır (Ceylan, 2018).

DVM'ler farklı sınıf etiketlerini birbirinden ayıran çok

boyutlu alanda hiper düzlemler oluşturarak sınıflandırma problemlerinde kullanılmak üzere geliştirilen bir metottur. Optimal bir hiper düzlem oluşturmak için hata fonksiyonunu en aza indirmek ve marjini maksimuma çıkartmak amacı ile aşamalı bir eğitim algoritması kullanır (Ceylan, 2018).

DVM'ler sınıflandırma problemlerini çözmenin yanı sıra regresyon problemlerine de uygulanabilir. Destek vektör regresyonu (DVR), regresyon tahminleri için kullanılan bir tür destek vektör makinesidir. DVR'nin amacı veri noktalarının olabildiği kadar yakın olduğu hiper düzlem oluşturmaktır (Trafalis ve İnce, 2000). Sürekli değişken olan çıktı (output) değerini en iyi tahmin eden fonksiyonu bulmaya çalışır. En küçük kareler, Laplace, Huber ve  $\varepsilon$ -insensitive alan yazında en çok tercih edilen kayıp fonksiyonlarıdır. Kayıp (loss) fonksiyonu bir mesafe ölçüsü içerecek şekilde değiştirilir. DVR için en çok tercih edilen  $\varepsilon$ -insensitive ( $L_\varepsilon$ ) kayıp fonksiyonu şu şekilde gösterilir (Smola ve Scholkopf, 2004);

$$L_\varepsilon(f(x), y) = \begin{cases} |f(x) - y| - \varepsilon & \text{if } |f(x) - y| \geq \varepsilon \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

$\varepsilon$  pozitif bir sayıdır ve  $f(x)$  fonksiyonu etrafındaki mesafeyi simgeler.  $Y$  gerçek bir değerdir. Eğer  $f(x)$  ile  $y$  arasında mesafe  $\varepsilon$  ile belirtilen pozitif bir sayıyı geçmiyorsa  $f(x)$  ile  $y$  arasında bir kayıp yoktur. DVR algoritması doğrusal regresyon problemi şeklinde formüle edildiğinde aşağıdaki şekilde yazılır (Smola ve Scholkopf, 2004);

$$f(x) = \langle w, x \rangle + b \text{ with } w \in \mathcal{X}, b \in \mathbb{R}$$

$w$  ağırlık vektörünü,  $\langle \cdot, \cdot \rangle$  nokta çarpımı (dot product) gösterim şeklini ve  $b$  sabit bir sayıyı belirtir.  $\varepsilon$ -insensitive ( $L_\varepsilon$ ) kayıp fonksiyonu formülasyonu kullanılarak aşağıdaki düzenlenilmiş risk fonksiyonu elde edilir. Bu fonksiyon en küçüklenecek  $w$  ağırlık vektörü ve  $b$  sabit sayısı hesaplanabilir (Smola ve Scholkopf, 2004).

$$\begin{aligned} &\text{minimize} && \frac{1}{2} \|w\|^2 + C \sum_{i=1}^l (\xi_i + \xi_i^*) \\ &\text{subject to} && \begin{cases} y_i - \langle w, x_i \rangle - b \leq \varepsilon + \xi_i \\ \langle w, x_i \rangle + b - y_i \leq \varepsilon + \xi_i^* \\ \xi_i, \xi_i^* \geq 0 \end{cases} \end{aligned}$$

Vapnik (1995) tarafından belirtilen yukardaki formülasyonda  $\frac{1}{2} \|w\|^2$  ( $\|w\|^2 = \langle w, w \rangle$ ) güven aralığını,  $\xi_i, \xi_i^*$  gevşek (slack) değişkeni ve  $C$  düzenleme sabitini belirtir. Problemi çözmek için Lagrange çarpanı ve KKT (Karush-Kuhn-Tucker) durumu kullanılarak aşağıdaki Lagrange ikilemi (dual Lagrangian) problemi formülasyonu elde edilir (Wang ve ark. 2012).

$$\begin{aligned} &\min && \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^l (\alpha_i - \alpha_i^*)(\alpha_j^* - \alpha_j) K(x_i \cdot x_j) + \varepsilon \sum_{i=1}^l (\alpha_i + \alpha_i^*) - \sum_{i=1}^l y_i (\alpha_i^* - \alpha_i) \\ &\text{s.t.} && \sum_{i=1}^l (\alpha_i - \alpha_i^*) = 0 \\ &&& 0 \leq \alpha_i, \alpha_i^* \leq C, i = 1, 2, \dots, l \end{aligned}$$

Yukardaki problem çözüldüğünde  $\bar{\alpha} = (\bar{\alpha}_1, \bar{\alpha}_1^*, \dots, \bar{\alpha}_l, \bar{\alpha}_l^*)^T$  ve  $w = \sum_{i=1}^l (\alpha_i - \alpha_i^*) x_i$  için en iyi (optimal) ve ideal sonuç elde edilir. Doğrusal regresyon formu aşağıdaki şekilde yazılabilir (Wang ve ark. 2012).

$$f(x) = \sum_{i=1}^l (\alpha_i^* - \bar{\alpha}_i) K(x_i \cdot x) + \bar{b}$$

$K(x_i \cdot x)$  kernel fonksiyonunu gösterir. Bu formülasyon destek vektör açılımı (Support Vector expansion) olarak adlandırılır (Wang ve ark., 2012).

DVR hem doğrusal hem de doğrusal olmayan çekirdek fonksiyonlarını kullanabilir. Doğrusal bir çekirdek, iki giriş vektörü arasındaki basit bir nokta ürünüdür. Doğrusal olmayan çekirdek fonksiyonları ise verilerdeki daha karmaşık modelleri ortaya çıkarabilen karmaşık fonksiyonlardır. Çekirdekler görevin karmaşıklığına ve verinin özelliklerine göre seçilir (Salunke, 2023).

DVM'ler doğrusal olmayan sınıflandırma veya regresyon problemlerinde maksimum marjlı hiper düzlemi bulmak için elimizdeki koordinatları belirli çekirdek fonksiyonları ile çarparak çok daha anlamlı hale getirebiliriz. Düşük boyutlar karmaşık veri setlerini açıklamada yeterli olmayabilir. Çekirdek fonksiyonları yardımıyla girdiler daha yüksek boyutlu bir uzaya taşınır ve burada doğrusal olarak ayrılabilir hale gelir (Ceylan, 2018).

Çekirdek fonksiyonları çeşitli avantajlar sağlar. Veri dönüşümüne ihtiyaç duymadan doğrusal olmayan sınıflandırma veya regresyon görevlerini yerine getirebilirler. Bunun yanında, verilerin belirli özelliklerine göre seçilebilen ve çok çeşitli doğrusal olmayan dönüşüm türleri sağlayabilen

farklı çekirdek fonksiyonlarının kullanılmasına izin verirler (Salunke, 2023).

En yaygın kullanılan çekirdek fonksiyonları; doğrusal, polinom, Gauss, üstel (Exponential), radyal tabanlı fonksiyon (RBF, Radial Basis Function) ve Laplace RBF'dir. Doğrusal çekirdek doğrusal sınıflandırma veya regresyon tahminleri için, polinom çekirdeği doğrusal olmayan problemler için ve RBF çekirdeği genellikle çok sayıda özneliğe sahip sınıflandırma problemleri için kullanılır (Salunke, 2023).

### TOPLULUK (ENSEMBLE) ÖĞRENME ALGORİTMALARI

Topluluk öğrenme yöntemlerinde topluluk, çeşitli modeller oluşturularak ve tahminler birleştirilerek oluşturulur. Farklı birleştirme yöntemleri ile bir araya getirilen zayıf öğrencilerin bir araya getirilmesi ile oluşturulan güçlü öğrencilerin oluşturduğu topluluğun öğrenme yöntemidir. Tahmin ve sınıflandırma doğruluğunu arttırmak için karar ağacı gibi tek karar vericilerin bir araya getirilmesi ile oluşur. Tahmin varyansını ve yanlılığını azaltmak için tercih edilen algoritmaları içinde barındıran öğrenme yöntemidir. Kaggle gibi internet ortamında yapılan yarışmalarda problemi çözme hızından ve doğruluk oranının yüksekliğinden dolayı en çok tercih edilen algoritmaları içinde barındırır. Birden çok modelin tahminleri kullanıldığından algoritmaların doğruluk oranı daha yüksek ve başarılıdır. En yaygın olarak kullanılan topluluk öğrenme yöntemlerine Torbalama (Bagging), Güçlendirme-Hızlandırma (Boosting), Rastgele Orman (Random Forest) ve Gradyan Arttırıcı (Gradient Boosting) örnek verilebilir (Ceylan, 2018).

### GÜÇLENDİRME-HIZLANDIRMA ALGORİTMASI (BOOSTING)

Güçlendirme-hızlandırma veya yükseltme olarak adlandırılan algoritma Robert Schapire ve Yoav Freund tarafından geliştirilmiştir. İlk kanıtlanabilir ve etkili güçlendirme-hızlandırma algoritması Robert E. Schapire (1990) ve Yoav Freund (1995) tarafından sunulmuştur. Toplulukta zayıf sınıflandırıcıların veya tahmin edicilerin bir araya getirilmesi ile güçlü bir sınıflandırıcı ya da tahmin edici oluşturmayı amaçlayan

zayıf öğrenme varsayımına dayanan aşamalı bir yaklaşımdır (Polikar, 2012).

Güçlendirme-hızlandırma algoritması hata en iyilemesine (optimizasyonu) dayalı performans artırıcı makine öğrenmesi yöntemidir. Seri içerisindeki bir model serideki bir önceki modelin tahmin hatalarını en iyilemek için kurulur (Keskin, 2019). Bu yöntem çok sayıda oluşturulan karar ağaçlarının sonuçlarını ağırlıklı oylamaya tabi tutarak son sınıf tahminini yapmaktadır. Daha önceki oluşturulan ağaçlardan yanlış tahminde bulunan tahmin edicilere daha fazla ağırlık verilerek art arda yeni ağaçlar oluşturulmaktadır.

En yaygın kullanılan güçlendirme-hızlandırma yöntemleri; Adaboost, Gradyan Arttırıcı (Gradient Boosting), Aşırı Gradyan Arttırıcı (XGBoost, Extreme Gradient Boosting), Light Gradyan Yükseltme Makinesi (LightGBM, Light Gradient Boosted Machine) ve Kategorik Gradyan Yükseltme Makinesi'dir (CatBoost, Category Gradient Boosting).

### TORBALAMA ALGORİTMASI (BAGGING)

Breiman (1996) tarafından geliştirilmiştir. Torbalama (Bagging), "bootstrap aggregation" ifadesinin kısaltılmışıdır. Önyüklemeye (Bootstrap) yöntemiyle mevcut veri setindeki verilerden her defasında yerine koyarak farklı örnekler seçilir. Yeni veri setleri ile çok sayıda birbirinden bağımsız karar ağaçları oluşturulur. Tahminlerin birleştirilmesi aşamasında regresyon ağaçları için ortalama alınırken sınıflandırma ağaçlarında sonuçlar oylama ile belirlenir.

Torbalama algoritması tek bir öğrenci algoritmadan elde edilen modelin performansını arttırmak için ortaya çıkan yaklaşımdır. Karar ağaçları gibi algoritmalarda yaşanan aşırı öğrenme sorununa çözüm bulmak için geliştirilen topluluk öğrenme yöntemleridir. Karar ağaçları yüksek eğitim varyansına sahiptir. Torbalanmış karar ağaçları, varyansı düşürerek nihai modeli dengeler, bu durum doğruluğu (accuracy) artırır. Sınıflandırma problemlerinde en çok oyu alan sınıfı atayarak, Regresyon problemlerinde ise her bir karar ağacının tahminlerinin ortalamasını alarak en iyi modele ulaşmaya çalışır (Keskin, 2019).

### GRADYAN ARTTIRICI MAKİNE ALGORİTMASI (GBM, GRADIENT BOOSTING MACHINE)

Jerome H. Friedman tarafından "Greedy Function Approximation: A Gradient Boosting Machine" isimli makale ile 2001 yılında tanıtılmıştır. Güçlendirme-

hızlandırma (boosting) metodolojisini kullanarak karar ağacı temelli topluluk öğrenmesi yapan makine öğrenimi algoritmasıdır. Bu yöntem, topluluktaki zayıf sınıflandırıcıların veya tahmin edicilerin (genellikle karar ağaçları) bir araya getirilmesi ile güçlü bir sınıflandırıcı ya da tahmin edici oluşturmayı amaçlayan zayıf öğrenme varsayımına dayanan aşamalı bir yaklaşımdır (Polikar, 2012). Güçlendirme algoritması hata en iyilemesine dayalı performans artırıcı makine öğrenmesi yöntemidir.

Bu algoritmada ağaçlar seri bir şekilde eğitilir. Ağaçlar birbirine bağlı olup seri içerisindeki bir model serideki bir önceki modelin tahmin veya sınıflandırma hatasını en aza indirmek için çalışır (Muratlar, 2020).

Gradyan artırıcı algoritmasının çalışma mantığı şu şekildedir; ilk olarak tahminlenecek değişkenin (hedef değişken) ortalaması alınır. Bu sayı ilk tahmin girişimi olan ilk yapraktır (Muratlar, 2020). Bu değer ile bağımlı değişken karşılaştırılarak ne kadar hatalı tahmin yapıldığı gözlemlenir. İlk ağaç, ilk yaprak sonucunda elde edilen hataları tahmin eden bir model olarak kurulacaktır. İlk tahmin ve ilk ağaçtan çıkan sonuçlar toplanırsa bağımlı değişken %100 doğru tahmin edilebilir. Ancak bu durum aşırı öğrenme olarak ifade edilir. GBM, bu sorunu aşmak için ağaçlara öğrenme oranı (learning rate) ekler. Bu değer 0 ile 1 arasında değişmektedir. Bir sonraki adım olarak doğru tahmine daha çok yaklaşabilmek için bir önceki ağacın hataları baz alınarak yeni ağaç kurulur (Singh, 2018). Ağaç eklerken kaybı en aza indirmek için meyilli azalım yöntemi kullanılır. Hatayı veya kaybı en aza indirmek için ağırlıklar güncellenir. Yeni ağaç üretimi belirlenen ağaç sayısına ulaşıncaya ya da ağaç eklenmesi anlamlı olmayıncaya kadar devam eder.

GBM üç temel unsur içerir:

1. En iyilenecek (Optimize) “Kayıp-Maliyet Fonksiyonu”
2. Tahmin yapmak için “Zayıf Öğrenici”
3. Kayıp fonksiyonunu en aza indirgeyecek zayıf öğrenicileri eklemek için bir “Katkı Modeli”

### RASTGELE ORMAN (RO) ALGORİTMASI

Breiman (2001) tarafından geliştirilen Rastgele Orman algoritması, karar ağacı gibi tek karar vericilerin bir araya getirilmesiyle oluşturulur. Bu nedenle topluluk

öğrenme yöntemleri ailesine dahil edilirler. Farklı birleştirme yöntemleri ile bir araya getirilen zayıf öğrenicilerin bir araya getirilmesi ile oluşturulan güçlü öğrenicilerin oluşturduğu topluluğun öğrenme yöntemidir. Tahmin varyansını ve yanlılığını azaltmak için tercih edilen algoritmaları içinde barındıran öğrenme yöntemidir. Birden çok modelin tahminleri kullanıldığından algoritmaların doğruluk oranı daha yüksek ve başarılıdır.

RO algoritması, karar ağacı temelli çok sayıda karar ağacı ile oluşturulan en uygun ağacı oluşturmak için kullanılan topluluk öğrenme algoritmalarından en popüler olanıdır. Breiman ve ark. (1984) tarafından geliştirilen sınıflandırma ve regresyon karar ağaçlarına (CART, Classification and Regression Trees) benzer bir şekilde ağaçlar oluşturur. Torbalama (bagging) algoritması ve öznelik torbalama olarak da adlandırılan rastgele alt uzay (RS, Random Subspace) yönteminin bileşimidir.

Ormandaki ağaçların her biri rastgele seçilmiş farklı eğitim kümelerinde ve rastgele seçilmiş özellikler ile eğitilir. Böylece aşırı uyum (overfitting) engellenir. CART algoritmalarında olduğu gibi bir düğümü iki veya daha fazla alt düğüme bölmek için “Gini indeksini”, regresyon algoritmalarında ise “Varyans Azaltma Kriterini” kullanır. Sınıflandırma problemlerinde en çok oyu alan sınıfı atayarak, regresyon problemlerinde ise her bir karar ağacının tahminlerinin ortalamasını alarak en iyi modele ulaşmaya çalışır (Keskin, 2019).

RO yönteminde, model kurulurken, modeli test etmek için ayrı bir test veri seti yoksa veya orijinal veri setinden test veri seti ayrılmamışsa, sınıf dağılımına bağlı kalınarak orijinal veri setinin 2/3’ü öğrenme veri seti (inBag), 1/3’ü ise test veri seti (Out-Of-Bag (OOB)) olarak ayrılmaktadır. Eğer ayrı bir test veri seti varsa veya orijinal veri setinden test veri seti ayrılmışsa, modelin kurulması için ayrılan öğrenme veri seti, kendi içinde 2/3 oranında öğrenme veri seti (inBag), 1/3’ü ise test veri seti (OOB) olarak ayrılmaktadır. Karar ormanı kaç karar ağacı ile oluşturulacaksa o kadar sayıda önyükleme (bootstrap) tekniği ile örneklem oluşturulur ve her örneklem için inBag ve OOB verisi ayrılır. Kurulan ağacın, OOB verisi ile testi yapılarak hata oranı tahmini yapılır. Tüm ağaçlar için OOB hata oranlarının ortalaması alınarak, modelin OOB hata oranı kestirimi hesaplanır. OOB verisi ile yapılan teste modelin iç testi de denilmektedir. Modelin testi, ayrı bir test veri seti ile de yapılabilir (Akman, 2010).

Rastgele seçilen değişkenlerden en iyi bölünme

sağlayacak olan belirlenip, dallara ayrılmaya o değişkenden başlanılır. Uygulamada analistin belirlemesi gereken iki parametre vardır, bunlar oluşturulacak ağaç sayısı ve seçilecek değişken sayısıdır. Bununla birlikte, bu parametrelerin seçilecek değerlerin genellikle sonuca etkisi azdır (Akman, 2010).

## ALGORİTMA UYGULANMA ve PERFORMANS DEĞERLENDİRİLME AŞAMALARI

### VERİ ÖN İŞLEME SÜRECİ

Makine öğrenmesi algoritmaları büyük verilerin işlenmesi için geliştirilmiştir. Büyük veri, daha fazla çeşitlilik içeren ve hacmi hızlıca artan özellikle yeni veri kaynaklarından elde edilen daha büyük, daha karmaşık veri kümeleridir. Bu veri kümeleri içinde metin, ses ve video gibi yapılandırılmamış ve yarı yapılandırılmış veri türleri bulunduğu için bunlardan anlam türetmek ve meta verileri desteklemek için veri ön işleme gereklidir.

Verilerin önceden işlenmesi, makine öğrenme algoritmaları üzerindeki verileri değerlendirmeden önce iyi bir tahmin performansı elde etmek için önemli bir adımdır. Verilerden aykırı değerlerin silinmesi, eksik verilerle ilgilenilmesi, veri normalizasyonu ve ağırlıklandırma ile özellik (öznitelik) seçme işlemi gibi birtakım süreçlerden geçirilerek veri ön işleme gerçekleştirilmiş olur (Akay, 2018).

Veri normalizasyonu, birbirlerinden farklı birimlerle ifade edilen sayısal değerlerin ortak bir aralıkta dönüşümünü içeren önemli bir ön işleme aşamasıdır. Normalleştirme ham verilerin üzerinde, her bir özelliğin eşit bir katkısı olacak şekilde yeniden ölçeklendiren veya dönüştüren bir işlemdir. Tüm özellikler öğrenme sürecine eşit katkıda bulunur. Ham (normalleştirilmemiş) verilerden elde edilen istatistiksel önlemlere dayanarak verileri belirli bir aralıkta normalleştirmek için iki adet yöntemler ailesi önerilmiştir (Öztürk, 2020).

İlki ortalama ve standart sapmaya dayalı normalleştirme yöntemidir. Verileri normalleştirmek için ham verilerin istatistiksel ortalaması ve standart sapması kullanılır. Bu yaklaşımı kullanan birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Bunlar; merkezi ortalama,

Pareto ölçeklendirme, değişken kararlılık ölçekleme, güç dönüşümü ve z-değeri normalizasyonudur.

İkincisi, en küçük-en büyük (min-max) değer tabanlı normalleştirme yöntemidir. Normalleştirilmemiş verilerin en küçük ve / veya en büyük değerleri yeniden ölçeklendirme için kullanılır. Bu yöntemler şunlardır; en küçük-en büyük normalleştirme ve en büyük normalleştirme.

Veri ağırlıklandırma, özellik uzayındaki dağılımları doğrusal olarak ayırlamayan veri kümelerinin doğrusal olarak ayrılabilir hale getirilmesidir. Veri kümesi içerisindeki özelliklerin varyansını azaltarak bunu sağlar. Veri ağırlıklandırma yöntemlerine örnek olarak ortalama kayma kümeleme tabanlı ve ikili bulanık c-ortalama tabanlı veri ağırlıklandırma verilebilir (Singh, 2018).

### ÖZİNTELİK SEÇİM YÖNTEMLERİ

Özellik seçme işleminde veri kümelerindeki özelliklerden önem derecesi yüksek olanlar seçilir. Bir boyut azaltma işlemidir. Gereğinden fazla değişkenin olduğu bir modelin açıklanması ve yorumlanması oldukça zordur. Bu yüzden öznitelik seçimi ile modeli daha kolay anlaşılabilir hale dönüştürebiliriz.

Öznitelik seçimi ile modelde oluşabilecek aşırı öğrenme durumunun önüne geçilebilir. Modelin doğruluk oranı artmış olur. Bir veri setinde değişkenler arasında yüksek ilişki yani çoklu bağlantı (multicollinearity) olabilir. Eğitim aşaması hızlanmış olur. Model başarı oranları artırılabilir (Ünal, 2015).

### HİPER PARAMETRE AYARLAMASI (TUNİNG)

Hiper parametreler modelin sihirli sayılarıdır. Algoritmanın performansını ayarlayabilen parametrelerdir. Model eğitimine başlamadan önce kullanıcı tarafından karar verilen değerlerdir. Hiper parametre ayarlaması modellemenin en önemli aşamalarından biridir. Hiper parametre değerlerinde yapılan en ufak değişiklikler model performansında çok büyük etkiler oluşturur. Yapay sinir ağı algoritmaları için öğrenme oranı, momentum oranı, gizli katman sayısı, eğitim tur (epoch) sayısı ve gizli katmandaki nöron sayısı hiper parametrelere örnek olarak verilebilir (Johnson, 2017).

Model tasarımı yapılırken hiper parametrelere yönelik yaptığımız ilk seçimler genelde bizi doğru sonuçlara götürmez. İteratif bir şekilde ardı ardına hiper parametre değerleri değiştirilerek, modelin başarımı gözlenir ve model için en uygun hiper parametre grubu seçilmeye çalışılır. Bu

parametreler için en uygun değerleri bulma yöntemleri; sezgisel yolla, ızgara arama (grid search) ve rastgele arama ile parametre uydurmadır (Çarkacı, 2018).

Sezgisel parametre uydurma yöntemi ile probleme dair ön bilgilerimizi kullanarak hiper parametreler tahmin edilir, model bu hiper parametrelere göre tasarlanır ve sonuçlar gözlenir. Çıkan sonuçlara göre modelin başarısını artıracak yeni değerler ile model tekrar oluşturulup, eğitilir ve sonuçlar gözlenir (Çarkacı, 2018).

İzgara arama ile uygun parametre bulma yönteminde hiper parametrelerin bazıları sonsuz sayıda değer alabilecek konumda olduğu için biz problem hakkında sahip olduğumuz ön bilgileri kullanarak değer aralıkları belirleriz. Bu aralıklardan belirli ana noktalar seçilerek hiper parametreler için değer listeleri oluşturulur. Belirlenen aralıkta bulunan tüm değerlerin kombinasyonları için ağ eğitilip sonuçlar gözlenir duruma göre en iyi kombinasyon hiper parametre grubu olarak seçilir (Çarkacı, 2018).

Rastgele arama ile uygun parametreleri bulma yönteminde ızgara aramada olduğu gibi probleme dair ön bilgiler kullanılarak hiper parametre aralıkları belirlenir. Daha sonra bu aralıktaki değerlerin her birini denemek yerine rastgele değerler seçilerek hiper parametre grupları oluşturulur. En iyi sonucu bulana kadar devam edilir (Çarkacı, 2018).

## MODEL PERFORMANS DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

Model performans değerlendirme yöntemleri mevcut veri setinin eğitim ve test veri seti olarak nasıl bölüneceğini örneklemelerin nasıl elde edileceğini gösterir (Arat, 2021). Problemin türüne göre seçilen makine öğrenmesi algoritmaları ile veri setinden eğitim için ayrılan veriler ile öğrenilen model deseni elde edilir ve test veri setiyle de modelin performansı değerlendirilir.

Model performans değerlendirme yöntemleri şunlardır; dışarıda tutma (holdout), tekrarlı dışarıda tutma (repeated holdout), tabakalı örnekleme, üçlü ayırma, k-katmanlı çapraz doğrulama (k-fold cross validation), rastgele örnekleme yöntemi ve önyüklemeli (bootstrap) örneklemedir (Arat, 2021).

Makine öğrenme algoritmalarının eğitim veri

setinden öğrendiği modeli test etmek için kullanılan en yaygın model performans değerlendirme yöntemi k-katmanlı çapraz doğrulamadır. Çapraz doğrulama, yapılan bir istatistiksel analizin bağımsız bir veri setinde nasıl bir sonuç elde edeceğini sınavan bir model doğrulama tekniğidir (Karlı, 2019). Modelin doğru sınıflama performansını bağımsız bir veri setine gerek olmadan test etmek için kullanılan bir yöntemdir. Veri seti rastgele olarak k adet parçaya bölünür. Nedeni birbirine benzer homojen dağılım gösteren alt kümeler elde etmektir. K adet parçadan k-1 tanesi eğitim veri seti olarak birleştirilir. Geriye kalan parça ise test veri seti olarak kullanılır. K defa tekrarlanan bu süreçte her bir tekrarda k-1 adet eğitim veri setinden algoritma bir model öğrenir ve bu modelin tahmin ve doğruluk oranları test veri seti üzerinden sınanır (Özgür, 2020).

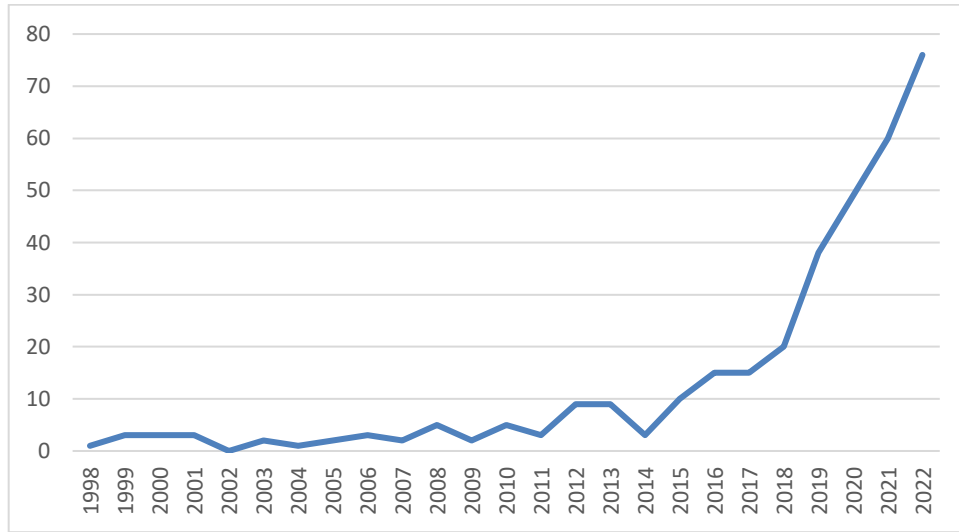
## MODEL PERFORMANS DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ

Makine öğrenmesi algoritmaları kullanılarak regresyon problemi çözümünün başarılı olup olmadığını değerlendirmek için performans değerlendirme kriterleri olarak bazı istatistiksel hata ölçütleri kullanılmaktadır. Bu ölçütler, ortalama mutlak yüzde hatası (MAPE, Mean Absolute Percentage Error), ortalama mutlak hata (MAE, Mean Absolute Error), ortalama kare tahmin hatası (MSE, Mean Square Error) ve ortalama tahmin hatasının karesinin karekökü (RMSE, Root Mean Square Error) olarak sıralanabilirler (Kwon, 2011).

## VETERİNER HEKİMLİĞİNDE MAKİNE ÖĞRENMESİ ALGORİTMALARI KULLANILARAK YAPILAN ÇALIŞMALAR

Veteriner hekimliği alanında makine öğrenmesi ile ilgili yayınlar her geçen gün artmaktadır. WOS'ta "Veteriner hekimlik" ve "Makine öğrenmesi" anahtar kelimeleri ile literatür taranmış 1998 ve 2022 yılları arasında toplam 362 makalenin yayınlanmış olduğu görülmüştür (Grafik 1.). Bunların 316'sı araştırma makalesi ve 46'sı derlemedir. Bu çalışmada, konuyla ilgili kapsamlı bir inceleme makalesi sağlamaktan ziyade makine öğrenmesi algoritmalarının veteriner hekimliği alanındaki potansiyelini göstermek amacıyla çeşitli örnekler derlenmiştir. Bu noktada, beşeri hekimlikte ML yaklaşımları ve veri bilimi hakkında daha fazla ayrıntı sağlayan pek çok araştırma makalesi de bulunmaktadır.





Grafik 1. 1998-2022 tarihleri arası yayınlanan makaleler

Aşağıdaki Tablo 1.'de veteriner hekimliği alanında makine öğrenmesi regresyon algoritmaları ile yapılan çalışma örnekleri gösterilmiştir.

Tablo 1. Regresyon algoritmalarının kullanıldığı bazı araştırma makaleleri

Yazar	Yıl	n	Metot (Algoritmalar)	Amaç
Takma ve arkadaşları	2012	305	Çoklu doğrusal regresyon ve yapay sinir ağı (YSA)	Siyah Alaca ineklerin laktasyon süt verimi tahmini
<b>Sonuç;</b> analizler sonucunda yapay sinir ağları modeli ile ilk beş laktasyona ait belirleme katsayı ( $R^2$ ) değerleri 0,62-0,85 arasında, hata kareler ortalamasının karekökü (RMSE) değerleri 480,9-1682,8 arasında, ortalama mutlak sapma (MAD) değerleri 325,2-1381,7 ve ortalama mutlak yüzde hata (MAPE) değerleri 6,1-20,2 arasında değişim göstermiştir. Çoklu doğrusal regresyonda ise bu değerler sırası ile $R^2$ için 0,30 ile 0,75 arasında, RMSE için 1964,8-3008,7 arasında, MAD değeri 1576,6-2458,3 arasında ve MAPE değeri 24,7-35,6 arasında bulunmuştur. Söz konusu kriterlere göre yapay sinir ağı modelinin çoklu doğrusal regresyon modelinden daha iyi uyum sağladığı gözlenmiştir.				
Ghazanfari	2014	72	Çok Katmanlı Algılayıcı (Multilayer Perceptron-MLP) tipi yapay sinir ağları geriye yayılım algoritması, Doğrusal Regresyon	Ağırlık artışına, yem tüketimi (feed intake) ve yem dönüşüm oranına (feed conversion ratio) etkisi sonuç değişkenleri olarak kullanılmıştır.
<b>Sonuç;</b> yapay sinir ağından elde edilen modelin eğitim ve test değerleri doğrusal regresyona göre daha iyi bulunmuştur.				
Akkol ve arkadaşlarının	2017	475	Yapay Sinir Ağları ve Çoklu doğrusal regresyon analizi	Kıl keçisine ait Morfolojik özellik ölçümlerinin canlı ağırlık üzerine etkileri
<b>Sonuç;</b> Levenberg-Marquart, Bayes düzeltmeli (Bayesian regularization) ve Scaled conjugate olmak üzere üç farklı geri yayılım algoritması kullanılmış Bayes düzeltmeli geriye yayılım algoritması kullanan yapay sinir ağlarının çoklu doğrusal regresyon analizine göre daha başarılı olduğu belirlenmiştir.				
Takma ve Gevrekçi	2018		Yapay Sinir Ağı	Yumurta verimi tahmini
<b>Sonuç;</b> ileri geribildirim algoritması tarafından eğitilen çok tabakalı yapay sinir ağı modeli, ileri beslemeli sinir ağı öğrenmesi için kullanılmıştır. Eğitim ve test seti için belirleme katsayı ( $R^2$ ) değeri sırasıyla 0,80 ve 0,82 olarak tahminlenmiştir. Çalışmada düşük hata kareler ortalamasının karekökü (RMSE) ve ortalama mutlak sapma (MAD) değerleri elde edilmiştir. Uygulama sonucuna göre yumurta üretiminin tahmininde yapay sinir ağı kullanılabilirliği belirlenmiştir.				

Tablo 1. Devamı.

Yazar	Yıl	n	Metot (Algoritmalar)	Amaç
Nguyen ve arkadaşları	2020	36	Çoklu doğrusal regresyon, Rastgele Orman, Destek Vektör Makinesi ve Yapay Sinir Ağı (YSA)	İnek süt verimi tahmini
<b>Sonuç;</b> analiz sonucunda Destek Vektör Makinesi ile elde edilen regresyon modelinin, süt verimine ilişkin en doğru tahmini en kısa sürede verdiği belirlenmiştir.				
Chen ve ark.	2022	951	Çoklu doğrusal regresyon (ÇDR), Yapay Sinir Ağı (YSA) Rastgele Orman (RO) ve Destek Vektör Makinesi (DVM)	Emziren süt ineklerinde gübre azotu atılımını tahmin etmek için çoklu doğrusal regresyon ve makine öğrenme algoritmalarının performansını karşılaştırmayı ve Gübre azotu atılımı için yeni makine öğrenimi tahmin modelleri geliştirmeyi amaçlamaktadır.
<b>Sonuç;</b> Gübredeki azotun tahmini için önerilen yeni YSA modeli on kat çapraz doğrulamada ÇDR, RO ve DVM modeline kıyasla daha düşük bir RMSE ve daha yüksek bir Konkordans uyum katsayısı (CCC) üretmiştir. YSA modellerinin performansının, özelliklerin seçimi ve öğrenme algoritmalarının döndürülmesi süreciyle büyük ölçüde iyileştirildiğini göstermiştir.				
Weleszczuk ve ark.	2022	2000	Çoklu doğrusal regresyon (ÇDR), Karar Ağacı, Yapay Sinir Ağı (YSA) Rastgele Orman (RO), K-en yakın komşunun (KNN), Gradyan Arttırıcı Makine (GAM), Aşırı gradyan arttırıcı regresyon (XGBoost)	Polonya Holstein sığırları için iki önemli ekonomik faktörü öngöreceği yeni bir yöntem önermektedir. Birincisi ekonomik endekstir (EI), İkinci faktör, doğum yapmak ile tarafından başka bir gebeliğe girmek arasındaki zaman dilimi olarak kabul edilen buzağılama aralığıdır (CI).
<b>Sonuç;</b> Elde edilen ortalama mutlak sapma (MAD) ve hata kareler ortalamasının karekökü (RMSE) sonuçları, EI'yi tahmin etmek için en iyi modelin YSA'ya dayalı olarak oluşturulan model ve GAM tabanlı CI modeli için oluşturulan model olduğunu göstermiştir. Belirleme katsayısı ve RMSE sonuçlarına dayanarak, önerilen XGBoost modelinin diğer modellerden daha iyi performans gösterdiği ortaya çıktı.				

RMSE: Root Mean Square Error, MAD: Mean Absolute Deviation, MAPE: Mean Absolute Percentage Error, CCC: Concordance correlation coefficient.

Tablo1.'deki çalışmalara ek olarak Slob ve ark. (2020) tarafından yapılan sistematik derlemede, mandıra sektöründe makine öğrenmesi uygulamaları Scopus, Web of Science, IEEE, Wiley, Springer Link veri tabanlarında taranmış, 427 makaleye ulaşılmış 98 tekrar eden çalışma çıkarılarak 329 çalışma elde edilmiştir. Dahil etme ve çıkartma kriterlerine göre 2010 ile 2020 tarih aralığında 38 çalışma araştırmaya dahil edilmiştir. Bunların %55'i hastalık araştırması, %26'sı ürün ve %19'u kalite tahmin araştırmasıdır. Meme iltihabı (mastitis) tahmini en çok kullanılan bağımlı değişken olmuş (%50). Diğer çok kullanılan değişkenler ise süt verimi ve kalitesidir. En çok kullanılan yöntemler sırasıyla, Ağaç temelli algoritmalar ve Yapay sinir ağlarıdır. 23 farklı algoritma kullanılmıştır. Performans değerlendirme ölçütü olarak %50'den fazla çalışmada duyarlılık, seçicilik ve RMSE kullanılmıştır. En çok sınıflandırma problemleri için sonra sırasıyla regresyon ve kümeleme problemleri için algoritmalar kullanılmıştır. 21 çalışmada dışarda tutma yöntemi ile 14 çalışmada ise

k-katmanlı çapraz doğrulama yöntemi ile eğitim ve test veri seti oluşturulmuştur. 17 çalışmada en iyi performansı ANN ve 15 çalışmada ise ağaç tabanlı algoritmalar göstermiştir.

## SONUÇ

Yapay zekanın diğer alanlarda olduğu gibi veteriner hekimlikte uygulanma amacı, farklı kaynaklardan elde edilen farklı yapıdaki (yapılandırılmış, yapılandırılmamış ve yarı yapılandırılmış) büyük ve daha karmaşık veri kümelerinden geleneksel istatistiksel yöntemler ile elde edilemeyen desenlerin ortaya çıkarılabilmesidir.

Veterinerlik alanında da artan veri sayısı ve büyük verilerin karmaşıklığı, makine öğrenimi ihtiyacını artırmıştır. Chen ve He (2014) makine öğrenmesini genellikle geleneksel veri işleme araçları ile analizi yapılamayan ve karmaşık bir yapıya sahip büyük miktardaki veri setlerini kullanarak anlamlı ilişkiler bulan model ve desenler geliştiren yöntemler ailesi olarak tanımlamışlardır. Veterinerlik alanındaki

sorunlar için farklı çözüm yolları teknolojinin yeni geliştirdiği araçlar ile bulunabilir.

Bu derleme çalışmasında literatürde çok sık kullanılan makine öğrenmesi regresyon algoritmalarından, veri ön işleme aşamalarından, özellik ya da öznelik seçme yöntemlerinden, hiper parametre en iyileme yöntemlerinden, model performans değerlendirme yöntemlerinden ve model performans değerlendirme ölçütlerinden kısaca bahsedilmiştir.

Çalışmada ilk olarak denetimli öğrenme yöntemi ile eğitilen makine öğrenmesi regresyon algoritmaları hakkında kısa bilgiler verilmiştir. Literatürde tahmin problemlerinin çözümünde sıklıkla kullanılan klasik makine öğrenmesi regresyon yöntemleri olan doğrusal regresyon, Ridge, LASSO ve Elastik Net düzenleme algoritmaları ile hem sınıflandırma hem de regresyon problemleri için kullanılabilecek bulunan YSA, Naïve Bayes, karar ağaçları, kNN, DVM ve DVR algoritmaları hakkında tarihsel gelişim sürecine göre genel bilgiler sunulmuştur. Sonraki aşamada ise günümüzde yaygın olarak kullanılan topluluk öğrenme yöntemleri olan Torbalama, Güçlendirme-Hızlandırma, Gradyan Arttırıcı ve Rastgele Orman algoritmaları tanıtılmıştır.

Çalışmanın ikinci bölümünde veri ön işleme sürecinde yapılan işlemler ve kullanılan yöntemler kısaca açıklanmıştır. Makine öğrenmesi regresyon algoritmalarının uygulanması sırasında amaca uygun bir biçimde toplanan verilerden aykırı değerlerin silinmesi, eksik verilerle ilgilenilmesi, veri normalizasyonu ve ağırlıklandırma gibi süreçlerden kısaca bahsedilmiştir. Bu aşamada yapılan her bir işlem için sunulan farklı yöntem (algoritma) seçeneklerinden en uygun olanı kullanılarak oluşturulan algoritma kombinasyonlarının uygunluğu ve doğruluğunun makine öğrenmesi regresyon algoritmalarının daha hızlı eğitilmesine olanak sağlayacağı belirtilmiştir.

İkinci bölümün devamında, seçim yöntemlerinden bahsedilmiş gereğinden fazla özneliğin olduğu bir modelin açıklanması ve yorumlanmasının oldukça zor olduğu; modelde oluşabilecek aşırı öğrenme durumunun önüne geçebilmek, eğitim aşamasını hızlandırmak ve model başarı oranlarını arttırmak için öznelik seçiminin

önemi anlatılmıştır.

Sonrasında; algoritmanın performansını ayarlayabilen, modelin performansını doğrudan etkileyebilen ve modelin sihirli sayıları olarak bilinen hiper parametrelerin ayarlanmasından kısaca bahsedilmiştir. Bu aşamanın modellemenin en önemli bölümlerinden biri olduğu, en ufak değişikliğin model performansında yarattığı etki ve en uygun hiper parametre değerleri bulununcaya kadar iteratif olarak algoritma eğitiminin devam edeceği vurgulanmıştır. Çarkacı (2018) "Sezgisel yolla", "Izgara arama" ve "Rastgele arama ile parametre uydurma" gibi isimler ile üç farklı yöntem (algoritma) grubundan en uygun olanın seçiminin modelin performansını artıracakını ifade etmiştir.

Bir sonraki aşamada veri setinin eğitim ve test veri seti olarak nasıl ayrılacağına karar vermek için kullanılan model performans değerlendirme yöntemlerinden bahsedilmiştir. Dışarıda tutma, tekrarlı dışarıda tutma, üçlü ayırma, k-katmanlı çapraz doğrulama, tabakalı, rastgele ve önyüklemeli örnekleme gibi yöntemlerin kullanıldığı ve bunlardan en yaygın kullanılan yöntemin k-katmanlı çapraz doğrulama olduğu belirtilmiştir. Eğitim ve test veri setlerini ayırmada kullanılan performans değerlendirme ölçütlerinin analiz sonuçlarına doğrudan etki edeceği belirtilmiştir.

İkinci kısmın son bölümünde algoritmanın eğitimi ile elde edilen modelin ve bu modelin test veri seti ile sınanması ile elde edilen model performans değerlendirme ölçütlerinden bahsedilmiştir. Regresyon problemi çözümünün başarısını değerlendirmek için kullanılan istatistiksel hata ölçütleri olan MAPE, MAE, MSE ve RMSE'nin en sık kullanılan değerlendirme kriterleri olduğu Kwon (2011) tarafından belirtilmiştir.

Üçüncü kısımda makine öğrenmesi regresyon algoritmalarının veterinerlik alanında uygulandığı çalışmalar incelenmiştir.

Sonuç olarak, hızla gelişen ve kendini çok hızlı yenileyen bu teknolojik sürece veteriner hekimlerin uzak kalması beklenemez. Veteriner hekimlerin ilerleyen yıllarda makine öğrenmesi algoritmaları ile elde edilen sonuçların sahaya uygulanması aşamasında en son karar verici olarak yapılan işlemleri çok iyi bilmeleri gerekliliği

görülmektedir.

Hayvan hastalıklarının teşhis, tanı ve tedavisinde başarılı küçük yapay zekalar geliştirilebilmek ve veteriner hekimlik alanında kullanılacak robotik zekaların bileşenlerinden olacak bu küçük yapay zekaların geliştirilmesinin multidisipliner bir alan olduğu görülmektedir. Bu yüzden, örneğin, veterinerlik alanında görev yapan patologların yapay zeka çalışmalarından en azami şekilde faydalanabilmeleri için klinisyen, moleküler biyolog ve biyomedikal mühendislerin yanında imaj ve bilgisayar bilimciler ile biyoinformatik uzmanlarına ihtiyaç duyulacağı La Perle (2019) tarafından öngörülmektedir.

Hayvan sağlığı için kullanılacak ve veteriner hekimlerin işini kolaylaştırmak için geliştirilecek Tele tıp teknolojisinin gelişim aşamasında veteriner hekimlerin yapay zekanın alt dalı olan makine öğrenmesi regresyon algoritmaları ve uygulamaları sırasında dikkat etmeleri gereken hususlar hakkında bilgi sahibi olmaları gereği gün geçtikçe artmaktadır.

Makine öğrenmesi tekniklerinin veteriner hekimlik araştırmalarında kullanılması, ileriye dönük tahminlerde bulunma ve istenmeyen durumlara karşı tedbir alma açılarından veteriner hekimlere büyük fırsatlar sunmaktadır. Veteriner hekimin işini kolaylaştırmak için veterinerlik alanında Makine öğrenmesi regresyon yöntemlerinin kullanımı oldukça önem arz etmektedir.

#### KAYNAKÇA

- Akay, E. Ç. (2018). Ekonometride Yeni Bir Ufuk: Büyük Veri ve Makine Öğrenmesi. *Sosyal Bilimler Araştırma Dergisi*, 7(2), 41-53.
- Akkol, S., Akıllı, A. & Cemal, İ. (2017). Kıl Keçilerinin Canlı Ağırlık Tahmininde Yapay Sinir Ağları ve Çoklu Doğrusal Regresyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27, 21-29.
- Akman, M. (2010). Veri Madenciliğine Genel Bakış ve Random Forest Yönteminin İncelenmesi: Sağlık Alanında Bir Uygulama. AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyoistatistik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Alpar, R. (2011). Uygulamalı Çok Değişkenli İstatistiksel Yöntemler. 3üncü Baskı. Ankara: Detay Yayıncılık.
- Arat, B. (2021). Makine Öğrenmesi Model Performans Değerlendirme Yöntemleri. Erişim Adresi: <https://berkarat.com/model-performans-degerlendirme-yontemleri/> Erişim Tarihi: 24.04.2021.
- Atalay, M. & Celik, E. (2017). Büyük Veri Analizinde Yapay Zekâ Ve Makine Öğrenmesi Uygulamaları - Artificial Intelligence and Machine Learning Applications in Big Data Analysis. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 9, 155-172.
- Balta, A. (2018). Makine Öğrenmesi Teknikleri İle Ekolojik Verilerin Değerlendirilmesi. FÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Ekobilişim Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Elazığ.
- Basran, P. S. & Appleby, R. B. (2022). The unmet potential of artificial intelligence in veterinary medicine. *American Journal of Veterinary Research*, 83, 385-392.
- Bhattacharyya, S. (2018). Ridge and Lasso Regression: L1 and L2 Regularization. Erişim Adresi: <https://medium.com/towards-data-science/ridge-and-lasso-regression-a-complete-guide-with-python-scikit-learn-e20e34bcbf0b/> Erişim Tarihi: 10.05.2023.
- Boser, E., Guyon, I. M. & Vapnik, V. (1992). A Training Algorithm for Optimal Margin Classifiers. In D. Haussler (Ed.), Proceedings of the 5th Annual ACM Workshop on Computational Learning Theory (pp. 144-152). Pittsburgh, PA: ACM Press.
- Breiman, L., Friedman, J. H., Olshen, R. A. & Stone, C. J. (1984). Classification and Regression Tree. 1st ed. New York: Routledge.
- Breiman, L. (1996). Bagging predictors. *Machine Learning*, 24, 123-140.
- Breiman, L. (2001). Random forests. *Machine Learning*, 45, 5-32.
- Bulut, M. A. (2019). Kredi Analizinde Makine Öğrenmesi Kullanımı: Tarımsal Kredilerde Uygulama Örneği. OÜ Sosyal Bilimler Enstitüsü İşletme Ana Bilim Dalı İşletme Bilim Dalı Doktora Tezi, Eskişehir.
- Ceylan, T. (2018). Perakende Sektöründe Makine Öğrenmesine Dayalı Yaklaşımlar. YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü İstatistik Ana Bilim Dalı İstatistik Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

- Chen, T. & He, T. (2014). Higgs Boson Discovery with Boosted Trees. Proceedings of the International Conference on High-Energy Physics and Machine Learning, Montreal, Canada, 2014, 69–80.
- Chen, X., Zheng, H., Wang, H. & Yan, T. (2022). Can machine learning algorithms perform better than multiple linear regression in predicting nitrogen excretion from lactating dairy cows. *Sci Rep*, 12, 12478.
- Cihan, P., Gökçe, E. & Kalıpsız, O. (2017). A Review of Machine Learning Applications in Veterinary Field. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23, 673-680.
- Cover, T. & Hart, P. (1967). Nearest neighbor pattern classification. *IEEE Transactions on Information Theory*, 13, 21-27.
- Çağlayan Akay, E. (2018). Ekonometride Yeni Bir Ufuk: Büyük Veri ve Makine Öğrenmesi. *Sosyal Bilimler Araştırma Dergisi*, 7, 41–53.
- Çarkacı, N. (2018). Derin Öğrenme Uygulamalarında Hiper Parametre Seçim Yöntemleri. Erişim Adresi: <https://medium.com/deep-learning-turkiye/derin-ogrenme-uygulamalarinda-model-dogrulama-ve-hiper-parametre-secim-yontemleri-823812d95f3/> Erişim Tarihi: 15.05.2021.
- Freund, Y. (1990). Boosting a weak learning algorithm by majority. In: Proceedings of the third annual workshop on computational learning theory, Morgan-Kaufmann, 1990, 202–216.
- Friedman, J. H. (2001). Greedy function approximation: a gradient boosting machine. *Annals of Statistics*, 1189-1232.
- Gandhi, R. (2018). Introduction to Machine Learning Algorithms: Linear Regression. Erişim Adresi: <https://towardsdatascience.com/introduction-to-machine-learning-algorithms-linear-regression-14c4e325882a> Erişim Tarihi: 21.12.2020.
- Ghazanfari, S. (2014). Application of linear regression and artificial neural network for broiler chicken growth performance prediction. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4, 411-416.
- Hoerl, A. E. & Kennard, R. W. (1970). Ridge Regression: Biased Estimation for Nonorthogonal Problems. *Technometrics*, 12, 55–67.
- Jason, B. (2019). A Tour of Machine Learning Algorithms. Erişim Adresi: <https://machinelearningmastery.com/a-tour-of-machine-learning-algorithms/> Erişim Tarihi: 20.03.2022.
- Johnson, A. (2017). Common Problems in Hyperparameter Optimization. Erişim Adresi: <https://sigopt.com/blog/common-problems-in-hyperparameter-optimization> Erişim Tarihi: 03.04.2021.
- James, G., Eitten, D., Hastie, T. & Tibshirani, R. (2013). An Introduction to Statistical Learning with Applications in R, 4th ed. New York, USA: Springer Science+Business Media.
- Karlı, Ö. B. (2019). Makine Öğrenme Yöntemleri ile Karaciğer Hastalığının Teşhisi. İÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Matematik Ana Bilim Dalı Bilgisayar Bilimleri Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ağrı.
- Keskin, M. V. (2019). Ağaca Dayalı Yöntemlerde Bagging ve Boosting Arasında Ne Fark Var? Erişim Adresi: <https://www.veribilimiokulu.com/agaca-dayali-yontemlerde-bagging-ve-boosting-arasinda-ne-fark-var/> Erişim Tarihi: 13.12.2020.
- Kıral Özkan, T. (2015). Makine Öğrenmesi Yöntemleri ile Vakıf Üniversiteleri Doluluk Tahminlemesi. MÜ Sosyal Bilimler Enstitüsü Ekonometri Ana Bilim Dalı Yöneyim Araştırması Bilim Dalı Doktora Tezi, İstanbul.
- Kwon, S. J. (2011). Artificial Neural Networks, UK ed. UK: Nova Science Publishers, Inc.
- La Perle, KMD. (2019). Machine Learning and Veterinary Pathology: Be Not Afraid!. *Veterinary Pathology*, 56, 506–507.
- Maron, M. E. (1961). Automatic indexing: an experimental inquiry. *JACM*, 8, 404-417.
- McCulloch, W. S. & Pitts, W. (1943). A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *The Bulletin of Mathematical Biophysics*, 5, 115-133.
- Muratlar, E. R. (2020). Gradient Boosted Regresyon Ağaçları. Erişim Adresi: <https://www.veribilimiokulu.com/gradient-boosted-regresyon-agaclari/> Erişim Tarihi: 09.04.2021.
- Morgan, J. N. & Sonquist, J. A. (1963). Some results from a non-symmetrical branching process that looks for interaction effects. *Young*, 8.
- Nguyen, Q. T., Fouchereau, R., Frénod, E., Gerard, C. & Sincholle, V. (2020). Comparison of forecast models

- of production of dairy cows combining animal and diet parameters. *Comput Electron Agric*, 170, 105258.
- Özgür, E. G. (2020). Rasch Modeline Uygun Yanıt Desenlerinde Bilgisayar Uyarlamalı Test Yöntemi ile Makine Öğrenmesi Yöntemlerinin Tahmin Performanslarının Benzetim Çalışması İle Karşılaştırılması. AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyoistatistik Ana Bilim Dalı Doktora Tezi, Ankara.
- Öztürk, S. (2020). Hızlı Moda Sektöründe Makine Öğrenmesi Yöntemleri ile Satış Miktarlarının Tahmin Edilmesi. İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Endüstri Mühendisliği Ana Bilim Dalı Endüstri Mühendisliği Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Polikar, R. (2012). Ensemble Learning. In, Zhang C., Ma Y. Editors. *Ensemble Machine Learning: Methods and Applications*. Boston, MA, USA: Springer; 2012. pp. 1-34.
- Salunke, D. (2023). Implementing SVM and Kernel SVM with Python's Scikit-Learn. Erişim Adresi: <https://www.geeksforgeeks.org/implementing-svm-and-kernel-svm-with-pythons-scikit-learn/> Erişim Tarihi: 21.11.2023.
- Schaphire, R. E. (1990). The Strength of Weak Learnability. *Machine Learning*, 5, 197-227.
- Singh, H. (2018). Understanding Gradient Boosting Machines. Erişim Adresi: <https://towardsdatascience.com/understanding-gradient-boosting-machines-9be756fe76ab/> Erişim Tarihi: 12.07.2021.
- Slob, N., Catal, C. & Kassahun, A. (2020). Application of Machine Learning to Improve Dairy Farm Management: A Systematic Literature Review. *Preventive Veterinary Medicine*, 187, 105237.
- Smola, A. & Scholkopf, B. (2004). A tutorial on support vector regression. *Statistics and Computing*, 14, 199-222.
- Şirin, E. (2017). Karar Ağacı ile Regresyon (Decision Tree Regression): Python Örnek Uygulama. Erişim Adresi: <https://www.veribilimiokulu.com/karar-agaci-ile-regresyon-decision-tree-regression-python-ornek-uygulama/#:~:text=Karar%20ağaçlarını%20sınıflandırmaya%20ve%20regresyon,eğitim%20esnasında%20öğrendiği%20ortalamay%20söyleyiyor/>
- Erişim Tarihi: 22.06.2022.
- Ünal, Y. (2015). Makine Öğrenmesi Yöntemleriyle Bel Bölgesi Rahatsızlıklarının Tanısı. SÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Bilgisayar Mühendisliği Ana Bilim Dalı Doktora Tezi, Konya.
- Yılmaz, H. (2014). Random Forests Yönteminde Kayıp Veri Probleminin İncelenmesi ve Sağlık Alanında Bir Uygulama. OÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyoistatistik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Takma, Ç., Atıl, H. & Aksakal, V. (2012). Çoklu doğrusal regresyon ve yapay sinir ağı modellerinin laktasyon süt verimlerine uyum yeteneklerinin karşılaştırılması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18, 941-944.
- Takma, Ç. & Gevrekçi, Y. (2018). Use of neural network model to predict of egg yield. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35, 147-151.
- Tibshirani, R. (1996). Regression Shrinkage and Selection via the Lasso. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 58, 267-288.
- Trafalis, T.B. & Ince, H. (2000). Support vector machine for regression and applications to financial forecasting. *Proceedings of the IEEE-INNS-ENNS International Joint Conference on Neural Networks. IJCNN 2000. Neural Computing: New Challenges and Perspectives for the New Millennium*, 6, 348-353 vol.6.
- Wang, Y., Wang, B. & Zhang, X. (2012). A new application of the support vector regression on the construction of financial conditions index to CPI prediction. *Proc Comput Sci*, 9, 1263-1272.
- Weleszczuk, J., Kosinska-Selbi, B. & Cholewińska, P. (2022). Prediction of Polish Holstein's economical index and calving interval using machine learning. *Livestock Science*, 265, 105039.
- Zou, H. & Hastie, T. (2005). Regularization and Variable Selection via the Elastic Net. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Statistical Methodology)*, 67, 301-320.



**Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni**  
**Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association**  
**e-ISSN: 2667-8381**

Omer CAKMAK<sup>1a\*</sup>  
Nuri TAS<sup>2b</sup>  
Ulas ACAR<sup>2,3,4c</sup>  
Damla ARSLAN-ACAR<sup>3,5,6d</sup>  
Fatih Ramazan ISTANBULLUGIL<sup>4e</sup>  
Sezen EVRENKAYA<sup>2f</sup>  
Zeki GURLER<sup>2g</sup>

<sup>1</sup>Istanbul Esenyurt University, School of Applied Sciences, Gastronomy and Culinary Arts Department, Istanbul, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Afyonkarahisar, TÜRKİYE

<sup>3</sup>ACR Bio Food and Biochemistry Research and Development, Afyonkarahisar, TÜRKİYE

<sup>4</sup>Kyrgyz-Turkish Manas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Bishkek, KYRGYZSTAN

<sup>5</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Afyonkarahisar, TÜRKİYE

<sup>6</sup>Kyrgyz-Turkish Manas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Bishkek, KYRGYZSTAN

ORCID<sup>a</sup>: 0000-0001-7658-1284  
ORCID<sup>b</sup>: 0009-0004-7035-1444  
ORCID<sup>c</sup>: 0000-0002-1533-4519  
ORCID<sup>d</sup>: 0000-0001-9230-6725  
ORCID<sup>e</sup>: 0000-0001-9610-2797  
ORCID<sup>f</sup>: 0000-0002-8689-234X  
ORCID<sup>g</sup>: 0000-0002-9037-2945

\*Sorumlu Yazar: Omer CAKMAK  
E-Posta: omercakmak@esenyurt.edu.tr

Geliş Tarihi: 04.11.2023

Kabul Tarihi: 19.12.2023

14 (3): 133-148, 2023

DOI: 10.38137/vftd.1385968

**Makale atf**

Cakmak, O. ve ark. (2023). Inhibitory Effects of Honey on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: A Current Review, *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 14 (3), 133-148. DOI: 10.38137/vftd.1385968.

**INHIBITORY EFFECTS of HONEY on  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* and *ESCHERICHIA COLI*: A  
CURRENT REVIEW**

**ABSTRACT.** Honey is a natural food that has been used since ancient times for its medicinal benefits. Thanks to its antimicrobial activity, which has a very important place among honey's medicinal effects, it can be used against various pathogens such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The antibacterial effect of honey depends on physical (high osmotic pressure, low water activity and low pH value), chemical (hydrogen peroxide, methylglycol, phenolic compounds, flavonoids, organic acids and proteins) and biological factors (enzymes secreted by bees, probiotic bacteria and pollen). The antibacterial effect of honey can be affected by the origin of the honey, the type of flower obtained, the season of harvest and processing methods. Therefore, more studies are required to clearly demonstrate the antimicrobial activity of honey and make it available for use in clinical treatments. In this review, it was aimed to better understand the antimicrobial effects of honey on *S. aureus* and *E. coli* by searching the current literature.

**Keywords:** Antimicrobial activity, *Escherichia coli*, honey, inhibitory effect, *Staphylococcus aureus*.

**BALIN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ve *ESCHERİCHİA  
COLİ* ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİSİ: GÜNCEL  
DERLEME**

**ÖZET.** Bal, tıbbi faydalarından dolayı eski dönemlerden beri kullanılan doğal bir gıdadır. Bal tıbbi etkileri arasında oldukça önemli yer tutan antimikrobiyal aktivitesi sayesinde, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* gibi çeşitli patojenlere karşı kullanılabilir. Balın antibakteriyel etkisi, fiziksel (yüksek osmotik basınç, düşük su aktivitesi ve düşük pH değeri), kimyasal (hidrojen peroksit, metilgliokal, fenolik bileşikler, flavonoidler, organik asitler ve proteinler) ve biyolojik faktörleri (arılar tarafından salgılanan enzimler, probiyotik bakteriler ve polen) sayesinde gerçekleşmektedir. Balın antibakteriyel etkisini balın kökeni, elde edilen çiçeğin türü, hasat yapılan mevsim ve işleme yöntemleri etkileyebilmektedir. Bundan dolayı, balın antimikrobiyal aktivitesini net bir şekilde ortaya koymak ve klinik tedavilerin kullanımına sunmak için daha fazla çalışma gerekmektedir. Bu derlemede, güncel literatür taraması yapılarak, balın *S. aureus* ve *E. coli* üzerine antimikrobiyal etkilerinin daha iyi anlaşılması hedeflendi.

**Anahtar Kelimeler:** Antimikrobiyal aktivite, bal, *Escherichia coli*, inhibitör etki, *Staphylococcus aureus*.

## INTRODUCTION

For many centuries, people have relied on honey as a healing agent for different kinds of wounds and diseases, because it can destroy many kinds of germs. But when antibiotics were invented, honey was mostly ignored as a treatment. However, with microorganisms progressively developing resistance to antibiotics, researchers have rekindled their interest in the antimicrobial and wound-healing potential of honey. Recent investigations have demonstrated that honey can effectively combat around 60 bacterial species, encompassing both gram-positive and gram-negative bacteria, as well as aerobes and anaerobes (Gambo et al., 2018).

Honey carries a minimal risk of microbial contamination and boasts a prolonged shelf life. Its primary constituent is carbohydrates, and its elevated carbohydrate content results in low water activity, typically within the range of 0.59 to 0.63. Water activity is a crucial factor affecting the viability and functionality of biological systems. Most bacteria find it challenging to proliferate when water activity levels drop below 0.9. The reduced water activity in honey significantly contributes to its antimicrobial properties. Furthermore, the presence of honey's proteins and enzymes serves to impede microbial growth. The most important enzymes in honey are invertase, diastase, and glucose oxidase. Of these, invertase is also thought to contribute to honey's antimicrobial properties by defending against harmful microorganisms and absorbing moisture to reduce bacterial invasion (Ro Me Busserolles et al., 2002). Honey is recognised as a natural food preservative mainly because of its antimicrobial properties. The pH of honey and the enzymatic production of hydrogen peroxide by glucose oxidase also influence the antimicrobial activity of honey (Mundo et al., 2004; Afroz et al., 2016). The bee enzyme glucose oxidase catalyzes the oxidation of glucose to produce hydrogen peroxide. This oxidative compound inhibits bacterial growth even in diluted honey by preventing bacteria from responding to normal proliferative signals (Shamala et al., 2000).

Studies have shown that other bee products, such as propolis, have antibacterial effects. For example, propolis can prevent lipid oxidation and extend the

shelf life of various foods, including meat, fish, poultry, vegetables, fruit, and beverages. It has both antibacterial and antioxidant properties. However, its unpleasant taste and odor may limit its use in food products by affecting sensory characteristics such as color, aroma, appearance, texture, and overall taste (Asma et al., 2022a; Segueni et al., 2023). In addition, Asma et al. (2022a) have illustrated that natural products derived from plants possess notable medicinal properties, rendering them a pragmatic approach for the control of biofilm-forming microorganisms. There is a growing consensus that antimicrobial compounds derived from plants can deliver effective antibiofilm activities. As for biofilm-forming microorganisms, they are increasingly becoming the focus of antibiofilm compounds sourced from both microorganisms and phytonanotechnology. These compounds have shown efficacy in the inhibition and eradication of biofilm development (Asma et al., 2022b).

Antibiotics are crucial for safeguarding the well-being of food-producing animals that hold nutritional significance. They are administered to treat afflicted animals and to mitigate and manage outbreaks of diseases. If antibiotics are not completely metabolised and eliminated from the body, residues may be found in the food obtained from these animals, posing a threat to public health by causing problems such as gastrointestinal disorders, antibiotic resistance, tissue damage, hypersensitivity reactions, neurological damage and anaphylactic shock in humans. In addition to acute illnesses associated with the consumption of animal-derived foods containing residues, carcinogenic and teratogenic effects may also be observed in humans (Küçükbüğrü and Acaröz, 2020; Çakmak et al., 2022).

This paper presents a thorough examination of honey's antimicrobial capabilities against the pathogenic microorganisms *S. aureus* and *E. coli*, presenting the most recent research discoveries from the existing literature. Increased knowledge of honey's antimicrobial properties could lead to new uses in the food and healthcare industries.

## STAPHYLOCOCCUS AUREUS

*Staphylococci* are gram-positive cocci. There are thirty-three different species within the genus *Staphylococcus*, with the most pathogenic species being *S. aureus*. Certain *Staphylococcus* species can cause opportunistic infections in people with weakened immune systems. *S. aureus* is known to cause bacterial infections in humans, affecting various sites



including the skin, bones, bloodstream, respiratory tract and soft tissues (David and Daum, 2017). The emergence of antimicrobial resistance in methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has created difficulties in the treatment of infections caused by this bacterium (Almasaudi et al., 2017; Yılmaz and Aslantaş, 2017).

*S. aureus* is responsible for causing food poisoning in humans. The aforementioned bacterium is not directly responsible for the foodborne illnesses; however, the toxins they secrete - *staphylococcal* enterotoxins - are. Hence, the severity of the impact of *S. aureus* on the ailment depends on the quantity of enterotoxin it generates (Zeaki et al., 2019). *Staphylococcal* poisoning has implications for health. Inadequate hygiene amongst food service workers may result in food contamination by *S. aureus*. This bacterium can lead to conditions such as septicaemia, foodborne illness, and toxic shock syndrome, all caused by the presence of enterotoxins produced by *S. aureus*. Over twenty distinctive types of *Staphylococcal* enterotoxins, proteins, have been identified. *S. aureus* can survive harsh conditions like low pH and heat. This bacterium can also withstand exposure to digestive enzymes. However, the fortitude of *S. aureus* may lead to increased likelihood of diseases. *S. aureus* can produce enterotoxins in perishable food without spoiling it. This can happen even when toxic concentrations are present. Certain enterotoxins produced by *S. aureus* have been discovered to possess emetic properties (Yılmaz and Aslantaş, 2017; Zhao et al., 2017; Ciupescu et al., 2018).

Recent research shows that honey can slow the growth of bacteria. This includes *S. aureus*. This segment provides a detailed critique of current scientific academic literature. It focuses on the antimicrobial properties of honey against *S. aureus*. The segment highlights honey's natural ability to fight against bacteria. Research studies have presented the effects of honey on *S. aureus*. Additionally, these outcomes are summarized in Table 1.

Tulay and Akyalcin, (2018) conducted a study. The study examined antimicrobial properties of various honey samples. Agar well diffusion technique was used on Mueller-Hinton agar. The research focuses on three strains of *S. aureus*: 29213, ATCC 6538P and ATCC 25923. The tested honey samples skillfully fight three

strains of *S. aureus*. The discoveries reveal this proficiency. The results imply that honey can be useful as a natural antibacterial agent. Honey, in various types, showed different levels of antibacterial activity. This activity led to inhibition zones with diameters ranging from 12 to 22mm. Among the honey samples tested, *S. aureus* ATCC 29213 was most susceptible. However, *S. aureus* ATCC 25923 was resistant to all the honey samples.

Russo et al. (2023) assessed antibacterial properties of honey samples. Honey collected from different regions of Sicily was used. The honey came from five floral sources: chestnut, eucalyptus, sulla, thyme, and citrus. Honey samples were then tested against *S. aureus* ATCC 29213. Only the chestnut-2 honey exhibited activity against *S. aureus* ATCC 29213 in both undiluted and diluted forms, with inhibition zones measuring approximately 15 mm. Conversely, the samples from Citrus-2 and Citrus-3 were found to possess no antimicrobial activity. The activity of the remaining honey samples varied. Sulla-1, eucalyptus-1, and eucalyptus-2 honey exhibited activity solely in the undiluted form, whereas citrus-1, thyme-1, thyme-2, and eucalyptus-3 honey demonstrated inhibition halos in both undiluted form and at 75% concentration. In contrast, Sulla-2, Sulla-3, thyme-3, chestnut-1, and chestnut-3 honey antagonized *S. aureus* ATCC 29213 in concentrations ranging from 100% to 50%. The study indicates that the honey samples tested have potential as natural antibacterial products and food preservatives, emphasizing the importance of further investigation on thyme honey as an effective natural antibacterial agent.

Postali et al. (2022) conducted a study examining the antibacterial properties of honey samples gathered from Samothrace Island in Greece, against *S. aureus*. The findings indicate that the growth of *S. aureus* was suppressed by honey and no collaborative antibacterial effects were detected among the tested honeys. All samples, except the lowest concentration (1.56% v/v), restricted *S. aureus* growth. A concentration of 75% v/v honey resulted in the most extensive inhibition zone (15.00 ± 1.00 mm), exceeding the zones produced by concentrations of 50%, 25%, and 12.5% v/v honey or by kanamycin (8.33 ± 1.12 mm).

Mahmood et al. (2021) investigated the antimicrobial properties of stingless honey derived from distinct multifloral sources against *S. aureus* during wet and dry seasons. Samples were collected from hives located in two multifloral areas - one comprising two flower types, including stevia, and

the other encompassing more than two types of flowers. Inhibitory effects of honey samples from both seasons were observed against all foodborne pathogens tested, with dry season samples exhibiting the most significant inhibition. The antimicrobial activity decreased during the rainy season. However, higher flower diversity and quantity increased it. Seasonal fluctuations and flowering plant distribution greatly impact multifloral stingless honey. These findings emphasize the antimicrobial attributes of the honey.

Oğur and Dayan, (2022) researched Bitlis natural honey. Its antimicrobial properties were evaluated at various concentrations (10%, 25%, 50%, and 100%). The study focused on its effectiveness against *S. aureus*. The results showed large zones of inhibition at 100% concentration. No zones formed at 10% concentration. Bitlis honey has the potential to help treat infectious diseases. It may also be used in apitherapy for practical purposes.

Adeyemo et al. (2017) conducted a study in Nigeria. The study aimed to assess the antibacterial effectiveness of various types of honey against *S. aureus*. The researchers also compared it to a standard antibiotic. This study confirms that honey is an affordable and effective natural antibacterial agent. The study showed that super dark amber honey has potent antimicrobial properties. These properties are comparable to streptomycin. This honey exhibited strong antibacterial activity against a wide variety of bacteria. However, more research is needed for its suitability for clinical practice.

Kalidasan et al. (2017) examined the antimicrobial activity of three honey samples (Commercial Honey, Malan Honey and Kombu honey) against *S. aureus* bacteria. All three types of honey showed antibacterial activity against *S. aureus* bacteria. The activity was observed at a concentration of 75 µL. Commercial honey had a 22 mm zone of inhibition. Malan honey had a 26 mm zone. Kombu honey had an impressive 34 mm zone.

Shalsh et al. (2021) conducted a study on Malaysian Kelulut honey. The effectiveness of honey against *S. aureus* was tested. The results indicate that the dilution results of different Kelulut honey concentrations were highly significant. Both types of Kelulut honey demonstrated antimicrobial properties,

notably in terms of minimum bactericidal concentration. Kelulut honey 1 did not exhibit any detectable zone of inhibition against *S. aureus* when tested at concentrations of 20%, 40%, and 60%. However, inhibition zones against *S. aureus* were observed at concentrations of %80 ( $3 \pm 0.5$ ) and %100 ( $3.4 \pm 0.6$ ) for Kelulut honey 1, and at concentrations of %80 ( $2.4 \pm 0.6$ ) and %100 ( $3.7 \pm 0.3$ ) for Kelulut honey 2. The study findings demonstrate that kelulut honey exhibits notable antibacterial properties when used at 100% concentration, indicating a viable option as an alternative treatment in veterinary medicine.

Akyalçın and Süerdem, (2017) investigated the antibacterial characteristics of six distinct types of honey from Kosovo in opposition to three strains of *S. aureus*. The outcomes showed that honey samples stopped *S. aureus* growth. The range was 10 to 38 millimeters. It was observed that all varieties of honey exhibited highly effective antibacterial attributes.

Shah et al. (2017) study was conducted on the antibacterial effects of honey samples. The honey samples were obtained from *Apis mellifera* and stingless bees. The study tested the effects of the honey samples against *S. aureus*. Samples from various regions in Pakistan were collected and analyzed. Examined in its original and processed forms. The results showed that all three honey samples had strong antibacterial properties. The inhibition zones ranged from 19 to 25 mm, which matches previous research.

Çakır and Dervişoğlu, (2022) aimed to investigate the antimicrobial properties of honey samples. The honey samples were obtained from Bingöl province, Turkey. The study focused on their effectiveness against *S. aureus*. The supplied honey was subjected to tests at various concentrations: 500 mg/mL, 250 mg/mL and 125 mg/mL. The findings showed that honey at 500 mg/mL and 250 mg/mL had antibacterial effects. However, honey at 125 mg/mL had no antibacterial properties. The findings showed that honey at 500 mg/mL and 250 mg/mL had antibacterial effects. Honey at 125 mg/mL did not have these effects.

Fратиanni et al. (2023) tested of Italian organic monofloral honeys. The honeys tested for antimicrobial properties were Strobl, indigo, and alfalfa. These honeys were tested against *S. aureus* at concentrations of 10 and 20 µg/ml. The results showed that all honey types affected *S. aureus*. The extent of inhibition ranged from 1 to 56 mm. It has been determined that carob honey is more effective than other honeys.

Gkoutzouvelidou et al. (2021) tested eight types of Lemnos honey from Greece. They compared its effectiveness to Manuka honey in combating *S. aureus*. Each honey type was applied at 25% and 12.5% concentrations. The results show that both Lemnos and Manuka honeys show antibacterial activity. Some Lemnos honey samples showed antibacterial activity comparable to Manuka honey. Certain samples showed stronger antibacterial activity at 12.5% concentration. Çakır et al. (2020) conducted an antimicrobial test. The test examined the impact of honey samples from different regions in Turkey. Honey samples from Rize (Anzer), Gümüşhane, and Sivas (Zara) were analysed

to observe their effect on *S. aureus*. At 500 mg/mL extract concentration of all honey samples, the inhibition zone was 10.0 mm in Rize honey, 8.5 mm in Gümüşhane honey and 8.0 mm in Sivas honey. The study reveals insights about honey's potential as a natural antimicrobial agent. Rize and Gümüşhane honeys, at a concentration of 250 mg/mL, showed antimicrobial activity against *S. aureus*. The inhibition zones measured 6.0-6.5 mm. However, the concentration of Sivas honey at 250 mg/mL did not create any inhibition zones. No inhibition zones were found for Rize, Gümüşhane, and Sivas honeys. The extract concentration of 125 mg/mL did not affect *S. aureus*.

**Table 1.** Antimicrobial activity of honey against *S. aureus*.

<i>S. aureus</i> Types	Honey Types	Concentration	Inhibition Zones (mm)	References
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Floral	100%	14	Suerdem and Akyalçın, 2018
	Highland	100%	18	
	Chestnut	100%	22	
	Oak	100%	18	
	Thyme	100%	14	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	Floral	100%	-	
	Highland	100%	16	
	Chestnut	100%	18	
	Oak	100%	12	
	Thyme	100%	18	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Floral	100%	-	
	Highland	100%	-	
	Chestnut	100%	-	
	Oak	100%	-	
	Thyme	100%	-	
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Chestnut-1	100%	18±0.00	Russo et al., 2023
		75%	18±0.58	
		50%	18±0.58	
		25%	0±0.00	
	Chestnut-2	100%	16±0.58	
		75%	16±1.00	
		50%	15±0.58	
		25%	15±0.58	
	Chestnut-3	100%	25±0.00	
		75%	10±0.00	
		50%	9±0.58	
		25%	0±0.00	
	Eucalyptus-1	100%	17±1.00	
		75%	0±0.00	
		50%	0±0.00	
		25%	0±0.00	
	Eucalyptus-2	100%	10±0.00	
		75%	0±0.00	
		50%	0±0.00	
		25%	0±0.00	
Eucalyptus-3	100%	11±0.60		
	75%	9±0.58		
	50%	0±0.00		
	25%	0±0.00		
Sulla-1	100%	17±1.70		
	75%	0±0.00		
	50%	0±0.00		
	25%	0±0.00		

Table 1. Continued.

<i>S. aureus</i> Types	Honey Types	Concentration	Inhibition Zones (mm)	References	
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Sulla-2	100%	27±1.63	Russo et al., 2023	
		75%	26±0.58		
		50%	23±2.08		
		25%	0±0.00		
	Sulla-3	100%	28±1.00		
		75%	28±1.53		
		50%	27±1.25		
		25%	0±0.00		
	Thyme-1	100%	24±0.00		
		75%	20±1.00		
		50%	0±0.00		
	Thyme-2	25%	0±0.00		
		100%	22±1.15		
		75%	20±0.00		
		50%	0±0.00		
	Thyme-3	25%	0±0.00		
		100%	23±1.73		
		75%	22±2.00		
		50%	19±0.58		
	Citrus-1	25%	0±0.00		
100%		18±1.00			
75%		17±1.00			
<i>S. aureus</i>	Citrus-2	50%	0±0.00	Russo et al., 2023	
		25%	0±0.00		
		100%	0±0.00		
		75%	0±0.00		
	Citrus-3	50%	0±0.00		
		25%	0±0.00		
		100%	0±0.00		
		75%	0±0.00		
<i>S. aureus</i>	Blossom honey ( <i>Arbutus andrachne</i> L. (Ericaceae)), Greek strawberry tree)	75%	15.00±1.00	Postali et al., 2022	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	Honey from stingless bee ( <i>Heterotrigona itama</i> )	100%	Dry Season		Mahmood et al., 2021
			two types of flowers	more than two types of flowers	
			16.33±1.15	19.33±1.15	
			Rainy Season		
two types of flowers	more than two types of flowers				
7.67±0.58	11.33±0.58				
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Bitlis-1	100%	15.50±0.55	Oğur and Dayan, 2022	
		50%	14.00±0.00		
	Bitlis-2	100%	9.00±0.00		
		50%	-		
	Bitlis-3	100%	10.50±0.55		
		50%	-		
	Bitlis-4	100%	11.50±0.55		
		50%	10.00±1.10		
	Bitlis-5	100%	10.00±1.00		
		50%	10.00±0.00		
	Bitlis-6	100%	8.50±0.55		
		50%	-		
	Bitlis-7	100%	14.50±0.55		
		50%	10.00±1.00		
	Bitlis-8	100%	11.00±1.10		
		50%	10.00±0.00		

Table 1. Continued.

<i>S. aureus</i> Types	Honey Types	Concentration	Inhibition Zones (mm)	References
<i>S. aureus</i> NCIB 8588	Dark amber	ND	8.0±0.0	Adeyemo et al., 2017
	Dark amber	ND	21.3±0.5	
	Super light amber	ND	18.7±1.2	
	Light amber	ND	24.3±0.6	
	Light amber	ND	7.7±0.6	
	Super dark amber	ND	24.3±0.6	
	Dark amber	ND	14.0±1.0	
	Super light amber	ND	7.0±1.5	
	Super dark amber	ND	27.3±1.2	
	Bitter	ND	18.7±1.2	
	Light amber	ND	21.7±0.6	
	Dark amber	ND	9.3±1.2	
Super dark amber	ND	8.3±0.6		
Super dark amber	ND	7.3±0.6		
<i>S. aureus</i>	Commercial	ND	22	Kalidasan et al., 2017
	Malan	ND	26	
	Kombu	ND	34	
<i>S. aureus</i>	Kelulut-1	100%	3.4±0.6	Shalsh et al., 2021
		80%	3±0.5	
		60%	-	
		40%	-	
	Kelulut-2	100%	3.7±0.3	
		80%	2.4±0.6	
		60%	-	
		40%	-	
<i>S. aureus</i>	Mountain	ND	-	Akyalçın and Süerdem, 2017
	Floral	ND	-	
	Meadow flowers	ND	10	
	Pinus	ND	18	
	Floral	ND	10	
	Floral	ND	-	
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Mountain	ND	-	
	Floral	ND	10	
	Meadow flowers	ND	12	
	Pinus	ND	18	
	Floral	ND	14	
	Floral	ND	12	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	Mountain	ND	-	
	Floral	ND	-	
	Meadow flowers	ND	12	
	Pinus	ND	14	
	Floral	ND	14	
	Floral	ND	10	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Mountain	ND	36	
	Floral	ND	34	
	Meadow flowers	ND	38	
	Pinus	ND	34	
	Floral	ND	34	
	Floral	ND	32	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	Dir Lower	ND	24.6	Shah et al., 2017
	Swat	ND	19.8	
	Oghi	ND	25.2	
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Yedisu	500 mg/mL	8.0±0.0	Çakır and Dervişoğlu, 2022
		250 mg/mL	6.0±0.0	
		125 mg/mL	-	
	Sancak	500 mg/mL	8.5±0.7	
		250 mg/mL	6.5±0.7	
		125 mg/mL	-	
	Kiğı	500 mg/mL	9.0±0.0	
		250 mg/mL	6.0±0.0	
		125 mg/mL	-	
	Genç	500 mg/mL	9.5±0.7	
		250 mg/mL	7.0±0.0	
		125 mg/mL	-	

Table 1. Continued.

<i>S. aureus</i> Types	Honey Types	Concentration	Inhibition Zones (mm)	References
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Sainfoin	10 µg/mL	40.03±2.16	Fratianni et al., 2023
		20 µg/mL	47.58±3.35	
	Carob	10 µg/mL	47.35±1.44	
		20 µg/mL	56.22±2.68	
	Astragalus	10 µg/mL	26.01±2.02	
		20 µg/mL	39.52±2.78	
	Indigo	10 µg/mL	1.02±0.06	
		20 µg/mL	28.06±2.04	
Alfalfa	10 µg/mL	8.68±0.52		
	20 µg/mL	28.85±1.45		
<i>S. aureus</i> DFSN_B26	Lemnos-1	25%	5.0±0.0	Gkoutzouvelidou et al., 2021
		12.5%	5.0±0.0	
	Lemnos-2	25%	5.0±0.0	
		12.5%	5.0±0.0	
	Lemnos-3	25%	5.0±0.0	
		12.5%	5.0±0.0	
	Lemnos-4	25%	5.0±0.0	
		12.5%	5.0±0.0	
	Lemnos-5	25%	5.0±0.0	
		12.5%	5.0±0.0	
	Lemnos-6	25%	5.0±0.0	
		12.5%	5.0±0.0	
	Lemnos-7	25%	30.0±0.0	
		12.5%	24.0±3.5	
Lemnos-8	25%	30.0±0.0		
	12.5%	26.7±2.3		
Manuka	25%	30.0±3.5		
	12.5%	25.3±4.2		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Rize (Anzer)	500 mg/mL	10.0±1.4	Çakır et al., 2020
		250 mg/mL	6.0±0.0	
		125 mg/mL	-	
	Gümüşhane	500 mg/mL	8.5±0.7	
		250 mg/mL	6.5±0.7	
		125 mg/mL	-	
	Sivas (Zara)	500 mg/mL	8.0±0.0	
		250 mg/mL	-	
		125 mg/mL	-	

ND: Not Determined

**ESCHERICHIA COLI**

*Escherichia coli* is extensively studied worldwide. It is a model organism for understanding biology. It usually lives in the gut microbiome. It can also harm humans and animals as a pathogen. The introduction of antibiotics in the 1940s marked a significant milestone in the realm of medicine. However, pathogenic bacteria have progressively developed resistance to multiple antibiotic agents. Antimicrobial resistance has now escalated into a worldwide peril to public health, with the growing resistance of *E. coli* to antibiotics emerging as a major point of concern. In 2018, more than half of the reported *E. coli* strains to the European Centre for Disease Prevention and Control demonstrated resistance to at least one of the assessed antimicrobial

groups, and a significant portion displayed resistance to multiple groups (Kara et al., 2019; Karaynir, 2021).

Taking into account all these considerations and the promising outcomes of recent research, it is of paramount importance to explore alternative natural antibacterial strategies to combat antibiotic-resistant infectious diseases. This section provides a thorough review of recent research findings. The research focuses on honey's antimicrobial properties against *E. coli*. The review highlights honey's potential as a natural antimicrobial agent. Additionally, studies conducted on honey against *E. coli* are summarized in Table 2.

Russo et al. (2023) conducted an evaluation of the antimicrobial potential of Sicilian honey samples from five botanical sources (chestnut, eucalyptus, sulla, thyme, and

citrus) against *E. coli*. All honey samples showed inhibitory activity against *E. coli* in the results. The most pronounced inhibitory effects were observed in Sulla-3, Citrus-3, Thyme-1, Thyme-2, Eucalyptus-1, Eucalyptus-3, Chestnut-2, and Chestnut-3. These particular honey varieties displayed inhibitory properties in both their concentrated and diluted forms. In contrast, Citrus-2 inhibited *E. coli* growth only in its undiluted form, with an inhibition rate of 40.95%. Citrus-1 and Eucalyptus-1 samples inhibited *E. coli* growth when diluted up to 75%, while Thyme-3 and Chestnut-1 honeys inhibited *E. coli* growth by up to 50% when diluted. Sulla-1 and Sulla-2 honeys were the only samples that showed no antagonistic activity against *E. coli* in either undiluted or diluted formulations. Just like in the case of *S. aureus*, it was observed that dark-colored honeys exhibited a higher inhibitory effect compared to their lighter-colored counterparts.

Mahmood et al. (2021) examined the antimicrobial characteristics of multifloral stingless honey acquired from two distinct multifloral areas in both dry and rainy seasons. One region had only two types of flowers, while the other had more than two. Pollen analysis confirmed that the honey samples varied depending on the season. Despite this, honey from both seasons exhibited antimicrobial activity against all foodborne pathogens tested, with dry season samples showing the strongest inhibition. Surprisingly, honey from the two-flower region did not show antimicrobial effects against *E. coli* during the rainy season. Multifloral stingless honey has antimicrobial properties, but these properties are greatly affected by seasonal changes and flowering plant diversity. This study highlights their important impact.

Oğur and Dayan, (2022) assessed the antimicrobial activity of natural honeys from Bitlis against *E. coli*. The antimicrobial activity of honey samples was tested using the hollow agar method. The concentrations tested were 10%, 25%, 50%, and 100%. The largest inhibition zones were observed in 100% concentrates, while no zones were formed in 10% concentrates. These findings suggest that the studied bee products have potential for use in apitherapy.

Adeyemo et al. (2017) evaluated the antibacterial activity of different honey types against *E. coli* in

southwest Nigeria. The inhibition zones ranged from  $6.7 \pm 1.2$  to  $28.7 \pm 1.2$  mm. Super dark amber honey exhibited the highest antimicrobial activity and potent broad-spectrum antibacterial activity. However, further research is needed to assess its clinical practicality.

Wadi, (2022) conducted an evaluation of the antibacterial activity of 32 different global raw natural and commercial honey samples against *E. coli*. Both raw natural and commercial honey samples showed inhibitory effects on *E. coli*. Commercial honey showed comparable efficacy to raw, unprocessed natural honey. Honey is highly recommended for wound management due to its broad-spectrum antibacterial activity against a wide range of microorganisms. Geographical and botanical sources significantly influence honey's antibacterial properties, which are also affected by other factors besides floral sources. Honey could be an alternative treatment for various microorganisms that are resistant to traditional antibiotics. The use of honey in a medical context can reduce financial costs and hospital stays. Further research efforts are encouraged to combat antibiotic resistant organisms that do not respond to conventional treatments. Furthermore, Kalidasan et al. (2017) assessed the antimicrobial activity of Kombu honey, Malan honey, and commercial honey against *E. coli*. The natural and commercial honey samples were collected from the Chetheri Malai region in Harur, Tamil Nadu, India. Kombu honey exhibited higher antimicrobial activity against bacterial pathogens than Malan honey and commercial honey.

Shalsh et al. (2021) conducted an investigation on the antimicrobial activity of local Malaysian Kelulut honey against the pathogenic *E. coli*. The results obtained emphasised the importance of different dilution levels of kelulut honey, as only the undiluted samples of both kelulut honey 1 and kelulut honey 2 were found to possess antimicrobial properties in terms of minimum bactericidal concentration. For Kelulut honey 1 and Kelulut honey 2 at concentrations of 20%, 40%, 60% and 80%, no inhibition zones were observed against *E. coli* in the agar well diffusion test. At 100% concentration, both Kelulut honey 1 and 2 showed inhibition zones against *E. coli*. This was only observed in undiluted samples.

Akyalçın and Süerdem, (2017) evaluated the antibacterial activity of six honey samples. The honey was collected from various regions in Kosovo. The study tested

the honey against *E. coli* bacteria. The results showed that none of the honey samples showed any efficacy against *E. coli*. Also, Çakır and Dervişoğlu (2022) evaluated the antimicrobial effects of honeys. The honeys were from districts in Bingöl province: Yedisu, Sancak, Kiğı, and Genç. Used the disc diffusion method for their assessment. Honey samples were tested for antimicrobial activity against *E. coli*. Three concentrations were used: 500, 250, and 125 mg mL<sup>-1</sup>. Honey samples from Yedisu and Genç showed antibacterial activity against *E. coli*. This activity was observed at a concentration of 500 mg/mL. However, no activity was seen at concentrations of 250 mg/mL and 125 mg/mL.

Fратиanni et al. (2023) examined five Italian organic commercial monofloral honeys. The honeys included sainfoin, carob, astragalus, indigo, and alfalfa. The ability of these honeys to inhibit *E. coli* biofilm formation was tested. The concentrations used were 10 and 20 µg/mL. Carob honey at 20 µg/mL inhibited *E. coli* biofilm development most effectively. All varieties of honey showed activity against *E. coli*, with inhibition zones ranging from 26 to 81 mm.

Gkoutzouvelidou et al. (2021) studied the antimicrobial properties of eight Lemnos honeys. The honeys were tested against *E. coli* at concentrations of 25% and 12.5%. Manuka honey was used for comparison. All Lemnos honey displayed antibacterial activity. Some samples surpassed Manuka honey's effectiveness. Lemnos honeys have great potential as natural antimicrobial agents.

Çakır et al. (2020) conducted a test on honey samples from different regions of Turkey. The purpose was to assess their antimicrobial properties against *E. coli*. Antibacterial activity was observed in Anzer honey at a concentration of 500 mg/mL. The measured inhibition zone was 6.0 ± 0.0 mm. It was determined that Gümüşhane and Zara honeys did not have any antibacterial activity at 500 mg/mL. No antibacterial activity was detected in all honey groups at a concentration of 125 or 250 mg/mL.

Zapata-Vahos et al. (2023) studied honey from two bee species. The antimicrobial properties of honey were evaluated in *Melipona eburnea* and *Apis mellifera*. The study found that both types of honey had

no antimicrobial activity against *E. coli*.

Bazaid et al. (2023) tested Saudi Sidr honey's antimicrobial effects. They evaluated its impact on *E. coli*. The results indicated promising antibacterial activity of Saudi Sidr honey. It was observed that it could inhibit the formation of biofilm by *E. coli* on glass slides by approximately 61.79%. Additionally, with the increasing challenges of antibiotic resistance and the growing number of bacteria resistant to these antibiotics, the need for alternative antimicrobial treatments has become critical. Therefore, McArdle et al. (2023) investigated the use of medical-grade honey altered to environments typically found in diabetic foot ulcers and post-surgical wounds, within the pH range of 6-8. The cell survival of *E. coli* and *S. aureus* decreased by at least 10<sup>10</sup> Coloni-Forming Units (CFU/ml), independent of the pH environment, and as much as 10<sup>12</sup> CFU/ml depending on the pH environment (p≤0.5). *S. aureus* and *E. coli* had some bacterial survival at pH 6, 7, and 8, respectively; however, these were extremely small quantities, with all final colony counts averaging less than 10<sup>2</sup> CFU/ml for each experiment. No correlation or statistical significance was found between the pH environments investigated and the colony counts with small amounts of bacterial survival. Furthermore, Skadins et al. (2023) evaluated the antibacterial activity of 40 monofloral honey samples obtained from beekeepers in Latvia. The antimicrobial activity of Latvian honey samples, with an 80% honey solution w/v, was compared with commercial Manuka honey and honey analogue sugar solutions-carbohydrate mixture and tested against *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*. The antibacterial effect of the samples was more pronounced on Gram-positive bacteria compared to Gram-negative bacteria. Latvian honey shows promising potential for use in wound healing biomaterials, offering the possibility of achieving long-term antibacterial effects.

The applications of honey are based on their chemical compositions, but these vary depending on geographical origins, plant sources, and bee nutrition. In this context, Kumari et al. (2023) aim to evaluate the quality of honey produced by *Apis mellifera* through stimulative diets. Initially, stimulative diets were provided to honey bees for one year, and sufficient honey samples were collected before and after the administration of stimulative diets. Subsequently, the antibacterial potential of honey samples was examined. The results indicate that post-feeding honey



samples exhibit high antibacterial activity at a concentration of 800 µg/mL against *E. coli*. The study found that supplement administration, in the form of syrup (a diet containing roasted chickpeas, defatted soy flour, protein hydrolysate powder, brewer's yeast, honey, and sugar), enhances the quality of honey in

terms of antioxidant and antimicrobial activities. Therefore, the possible reason for all these improvements in honey quality could be syrup supplements, which may have inductive activity to enhance the health of worker bees. Increased honey quality due to multiple ingredients might have elevated antibacterial activities.

**Table 2.** Antimicrobial activity of honey against *E. coli*.

<i>E. coli</i> Types	Honey Types	Concentration	Inhibition Zones (mm)	References
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Citrus-1	100%	9±0.00	Russo et al., 2023
		75%	9±2.08	
		50%	0±0.00	
		25%	0±0.00	
	Citrus-2	100%	9±1.00	
		75%	0±0.00	
		50%	0±0.00	
		25%	0±0.00	
	Citrus-3	100%	26±2.08	
		75%	26±1.00	
		50%	24±1.15	
		25%	10±1.00	
	Chestnut-1	100%	27±0.00	
		75%	24±0.58	
		50%	18±0.58	
		25%	0±0.00	
	Chestnut-2	100%	26±1.00	
		75%	24±0.58	
		50%	22±0.00	
		25%	15±0.58	
	Chestnut-3	100%	25±1.00	
		75%	23±0.58	
		50%	21±0.60	
		25%	18±0.58	
	Eucalyptus-1	100%	10±0.58	
		75%	9±0.00	
		50%	8±0.58	
		25%	7±0.00	
	Eucalyptus-2	100%	10±0.60	
		75%	10±0.00	
		50%	0±0.00	
		25%	0±0.00	
	Eucalyptus-3	100%	10±1.00	
		75%	9±0.00	
		50%	8±0.58	
		25%	8±0.58	
Sulla-1	100%	0±0.00		
	75%	0±0.00		
	50%	0±0.00		
	25%	0±0.00		
Sulla-2	100%	0±0.00		
	75%	0±0.00		
	50%	0±0.00		
	25%	0±0.00		
Sulla-3	100%	18±1.00		
	75%	17±1.00		
	50%	16±1.00		
	25%	13±1.53		

Table 2. Continued.

<i>E. coli</i> Types	Honey Types	Concentration	Inhibition Zones (mm)	References	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Honey from stingless bee ( <i>Heterotrigona</i> <i>itama</i> )	ND	Dry Season		Mahmood et al., 2021
			two types of flowers	more than two types of flowers	
			8.67±0.58	11.33±0.58	
			Rainy Season		
two types of flowers	more than two types of flowers				
0±0.00	7.33±0.58				
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Bitlis-1	100%	10.00±0.00		Oğur and Dayan, 2022
		50%	-		
	Bitlis-2	100%	14.00±1.10		
		50%	-		
	Bitlis-3	100%	-		
		50%	-		
	Bitlis-4	100%	13.50±0.55		
		50%	8.00±0.00		
	Bitlis-5	100%	7.00±1.00		
		50%	-		
	Bitlis-6	100%	7.50±0.55		
		50%	-		
	Bitlis-7	100%	15.00±0.00		
		50%	12.00±1.00		
	Bitlis-8	100%	9.50±2.73		
		50%	8.50±1.64		
<i>E. coli</i>	Dark amber	ND	12.7±1.2		Adeyemo et al., 2017
	Dark amber	ND	24.3±0.6		
	Super light amber	ND	18.7±0.6		
	Light amber	ND	22.7±1.2		
	Light amber	ND	14.0±1.7		
	Super dark amber	ND	26.3±0.6		
	Dark amber	ND	10.7±1.2		
	Super light amber	ND	6.7±1.2		
	Super dark amber	ND	28.7±1.2		
	Bitter	ND	20.0±1.0		
	Light amber	ND	26.7±1.2		
	Dark amber	ND	9.7±1.5		
	Super dark amber	ND	6.7±1.2		
	Super dark amber	ND	8.7±0.6		
<i>E. coli</i>	Neem	ND	22±0.5		Wadi, 2022
	Sidr	ND	20±0.5		
	Sidr	ND	24±0.5		
	Sidr	ND	19±0.5		
	Acacia	ND	20±0.5		
	Sidr	ND	19±0.5		
	Mountain	ND	20±0.5		
	Acacia	ND	25±0.4		
	Acacia	ND	22±0.5		
	Sun flower	ND	23±0.6		
	Sun flower	ND	22±0.5		
	Sun flower	ND	21±0.5		
	Sidr	ND	18±0.5		
	Sidr	ND	17±0.4		
	Unknown	ND	22±0.5		
	Sidr	ND	22±0.5		
	Orange	ND	23±0.5		
	Flowers	ND	20±0.5		
	Flowers	ND	21±0.5		
	Orange	ND	20±0.5		
	Orange	ND	21±0.5		
	Flowers	ND	22±0.5		
	Flowers	ND	20±0.5		
	Flowers	ND	21±0.5		
	Acacia	ND	22±0.6		
	Citrus	ND	21±0.4		
	Alfa	ND	22±0.5		

Table 2. Continued.

<i>E. coli</i> Types	Honey Types	Concentration	Inhibition Zones (mm)	References
<i>E. coli</i>	Alfa	ND	20±0.6	Wadi, 2022
	Citrus	ND	22±0.4	
	Sidr	ND	21±0.5	
	Sidr	ND	20±0.5	
	Sun flower	ND	22±0.4	
<i>E. coli</i>	Commercial	ND	17	Kalidasan et al., 2017
	Malan	ND	19	
	Kombu	ND	28	
<i>E. coli</i>	Kelulut-1	100%	9.3 ± 0.2	Shalsh et al., 2021
		80%	-	
		60%	-	
		40%	-	
		20%	-	
	Kelulut-2	100%	8.2 ± 0.3	
		80%	-	
		60%	-	
		40%	-	
		20%	-	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Mountain	ND	-	Akyalçın and Sürdem, 2017
	Floral	ND	-	
	Meadow flowers	ND	-	
	Pinus	ND	-	
	Floral	ND	-	
	Floral	ND	-	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Yedisu	500 mg/mL	6.0±0.0	Çakır and Dervişoğlu, 2022
		250 mg/mL	-	
		125 mg/mL	-	
	Sancak	500 mg/mL	-	
		250 mg/mL	-	
		125 mg/mL	-	
	Kiğı	500 mg/mL	-	
		250 mg/mL	-	
		125 mg/mL	-	
	Genç	500 mg/mL	6.0±0.0	
		250 mg/mL	-	
		125 mg/mL	-	
<i>E. coli</i> DSM 8579	Sainfoin	10 µg/mL	57.78±3.98	Fratianni et al., 2023
		20 µg/mL	60.06±2.08	
	Carob	10 µg/mL	37.69±1.57	
		20 µg/mL	81.71±1.44	
	Astragalus	10 µg/mL	32.38±1.22	
		20 µg/mL	35.70±2.45	
	Indigo	10 µg/mL	26.62±1.13	
		20 µg/mL	44.62±3.54	
	Alfalfa	10 µg/mL	45.61±2.52	
		20 µg/mL	49.91±3.45	
<i>E. coli</i> ATCC 43888	Lemnos-1	25%	22.0 0.0	Gkoutzouvelidou et al., 2021
		12.5%	19.3±1.2	
	Lemnos-2	25%	21.3±3.1	
		12.5%	18.7±3.1	
	Lemnos-3	25%	21.3±1.2	
		12.5%	19.3±1.2	
	Lemnos-4	25%	21.3±4.2	
		12.5%	18.3±3.5	
	Lemnos-5	25%	21.3±4.6	
		12.5%	21.0±1.4	
	Lemnos-6	25%	22.0±2.0	
		12.5%	20.0±2.0	
	Lemnos-7	25%	28.7±1.2	
		12.5%	26.0±0.0	
	Lemnos-8	25%	28.0±0.0	
		12.5%	24.7±1.2	
Manuka	25%	28.0±0.0		

Table 2. Continued.

<i>E. coli</i> Types	Honey Types	Concentration	Inhibition Zones (mm)	References
<i>E. coli</i> ATCC 43888	Manuka	12.5%	25.0±1.4	Gkoutzouvelidou et al., 2021
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Rize (Anzer)	500 mg/mL	6.0±0.0	Çakır et al., 2020
		250 mg/mL	-	
		125 mg/mL	-	
	Gümüşhane	500 mg/mL	-	
		250 mg/mL	-	
		125 mg/mL	-	
	Sivas (Zara)	500 mg/mL	-	
		250 mg/mL	-	
		125 mg/mL	-	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Monofloral and Multifloral	15 and 20 mg/mL	-	Zapata-Vahos et al., 2023

ND: Not Determined

## CONCLUSION

This review aimed to examine the antibacterial activity of honey against *S. aureus* and *E. coli* bacteria. The review collected evidence that honey is effective in preventing the growth and infection of these bacteria by scanning relevant recent studies in the literature. The review examined honey's antibacterial activity mechanism, influencing factors, and applications.

The main reason for honey's ability to kill bacteria such as hydrogen peroxide, methylglyoxal, phenolic acids and flavonoids is that it contains various substances. Thanks to these substances, the replication of genetic material is disrupted. The strength of honey's ability to kill bacteria can change depending on where the honey comes from, what kind of flowers it is made from, when it is collected and how it is treated. There are important differences in how well honey can kill bacteria among different kinds of honey that are made from different kinds of flowers.

Since honey can kill bacteria such as *S. aureus* and *E. coli* well, more studies are needed to be sure about how much honey should be used, how safe it is, and what side effects it might have. It should also be checked how well honey can kill different kinds of bacteria that may have different features or ways of resisting honey. The antibacterial activity of honey in combination with other antibiotics should also be examined. The dose-response relationship of honey's antibacterial activity, optimal application method and duration, possible allergic reactions and contraindications should also be determined.

This review examines recent studies that have

tested the antibacterial activity of honey against *S. aureus* and *E. coli*. It was concluded that more comprehensive and systematic studies should be carried out in order for honey to be used more in this field.

## REFERENCES

- Adeyemo, R. O., Torimiro, N., Akinola, S. A., Lawal, S. K., Abolarinwa, T. O. & Adewoye, W. O. (2017). Study on antibacterial efficacy of different honey types in South Western Nigeria against wound associated bacteria. *Journal of Apitherapy*, 2, 15-19.
- Afroz, R., Tanvir, E. M., Zheng, W. & Little, P. J. (2016). Molecular Pharmacology of Honey. *Clinical and Experimental Pharmacology*, 06.
- Akyalçın, H. & Süerdem, T. B. (2017). In Vitro Screening of Antibacterial Activity of Honey Samples Collected from Kosovo. *Journal of Scientific Perspectives*, 1, 31-40.
- Almasaudi, S. B., Al-Nahari, A. A. M., Abd El-Ghany, E. S. M., Barbour, E., Al Muhayawi, S. M., Al-Jaouni, S., Azhar, E., Qari, M., Qari, Y. A. & Harakeh, S. (2017). Antimicrobial effect of different types of honey on *Staphylococcus aureus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, 1255-1261.
- Asma, S. T., Bobiş, O., Bonta, V., Acaroz, U., Shah, S. R. A., Istanbulgil, F. R. & Arslan-Acaroz, D. (2022a). General Nutritional Profile of Bee Products and Their Potential Antiviral Properties against Mammalian Viruses. *Nutrients*, 14, 3579.
- Asma, S. T., Imre, K., Morar, A., Imre, M., Acaroz, U., Shah, S. R. A., Hussain, S. Z., Arslan-Acaroz, D., Istanbulgil, F. R., Madani, K., Athanassiou, C., Atanasoff, A., Morar, D., Herman, V. & Zhu, K. (2022b). Natural Strategies as

- Potential Weapons against Bacterial Biofilms. *Life*, 12.
- Bazaid, A. S., Alsolami, A., Patel, M., Khateb, A. M., Aldarhami, A., Snoussi, M., Almusheet, S. M. & Qanash, H. (2023). Antibiofilm, Antimicrobial, Anti-Quorum Sensing, and Antioxidant Activities of Saudi Sidr Honey: In Vitro and Molecular Docking Studies. *Pharmaceutics*, 15, 2177.
- Ciupescu, L. M., Auvray, F., Nicorescu, I. M., Meheut, T., Ciupescu, V., Lardeux, A. L., Tanasuica, R. & Hennekinne, J. A. (2018). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains and evidence for the involvement of non-classical enterotoxin genes in food poisoning outbreaks. *FEMS Microbiology Letters*, 365.
- Çakır, Y., Çobanoğlu, D. N., Dervişoğlu, G., Koçyiğit, S., Karahan, D. & Yelkovan, S. (2020). Determination of Antimicrobial Activity, Palynological Characteristics and Chemical Composition of Some Honey Samples from Turkey. *Mellifera*, 20, 41-60.
- Çakır, Y. & Dervişoğlu, G. (2022). Antimicrobial Effect of Honeys Collected in Bingöl Region. *MAS Journal of Applied Sciences*, 7, 537-544.
- Çakmak, Ö., Acaröz, U. & Gün, H. (2022). Halk Sağlığı Açısından Önemli Gıda Kaynaklı Viral Etkenler. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 13, 11-25.
- David, M. Z. & Daum, R. S. (2017). Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 409, 325-383.
- Fратиани, F., De Giulio, B., d'Acierno, A., Amato, G., De Feo, V., Coppola, R. & Nazzaro, F. (2023). In Vitro Prebiotic Effects and Antibacterial Activity of Five Leguminous Honeys. *Foods*, 12, 3338.
- Gambo, S. B., Ali, M., Diso, S. U. & Abubakar, N. S. (2018). Antibacterial Activity of Honey Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Infected Wound. *Archives of Pharmacy & Pharmacology Research*, 1, 1-6.
- Gkoutzouvelidou, M., Panos, G., Xanthou, M. N., Papachristoforou, A. & Giaouris, E. (2021). Comparing the Antimicrobial Actions of Greek Honeys from the Island of Lemnos and Manuka Honey from New Zealand against Clinically Important Bacteria. *Foods*, 10, 1402.
- Kalidasan, G., Saranraj, P., Ragul, V. & Sivasakthi, S. (2017). Antibacterial Activity of Natural and Commercial Honey-A Comparative Study. *Advances in Biological Research*, 11, 365-372.
- Kara, R., Acaröz, U., Gürler, Z., Soylu, A. & Küçük Kurt, O. (2019). Taze Marul Örneklerinde *Escherichia coli* O157 ve *Listeria monocytogenes* Varlığının Belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 16, 870-873.
- Karaynir, A. (2021). Çevresel Örneklerden *Escherichia coli* DH10B Suşuna Karşı Litik Bakteriyofaj İzolasyonu ve Klinik *Escherichia coli* Suşlarına Karşı Etkinliklerinin Belirlenmesi. Aydın, Turkey, Thesis of MSc, AMU, diss.
- Küçükbüğrü, N. & Acaröz, U. (2020). Gıdalarda Antibiyotik Kalıntıları ve Halk Sağlığına Etkileri. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 11, 161-167.
- Kumari, I., Hajam, Y. A., Thiyagarajan, K., Giri, A. & Kumar, R. (2023). Evaluation of antioxidant and antibacterial potential of honey produced from stimulative diet fed bee colonies. *Discover Sustainability*, 4.
- Mahmood, A. L., Lani, M. N., Hassan, Z., Razak, S. B. A. & Ahmad, F. T. (2021). Antioxidant and antimicrobial properties of Indo-Malayan stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey from different seasons and distribution of flowers. *Food Research*, 5, 498-507.
- McArdle, C., Coyle, S. & Santos, D. (2023). The impact of wound pH on the antibacterial properties of Medical Grade Honey when applied to bacterial isolates present in common foot and ankle wounds. An in vitro study. *Journal of Foot and Ankle Research*, 16.
- Mundo, M. A., Padilla-Zakour, O. I. & Worobo, R. W. (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 1-8.
- Oğur, S. & Dayan, Y. (2022). Antimicrobial activities of natural honeys and royal jellies on some pathogenic bacteria. *BAUN Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24, 672-689.
- Postali, E., Peroukidou, P., Giaouris, E. & Papachristoforou, A. (2022). Investigating Possible Synergism in the Antioxidant and Antibacterial Actions of Honey and Propolis from the Greek Island of Samothrace through Their Combined Application. *Foods*, 11, 2041.
- Ro Me Busserolles, J., Gueux, E., Rock, E., Mazur, A. & Rayssiguier, Y. (2002). Substituting Honey for Refined Carbohydrates Protects Rats from Hypertriglyceridemic

- and Prooxidative Effects of Fructose. *The Journal of Nutrition*, 132, 3379-3382.
- Russo, N., Di Rosa, A. R., Pino, A., Mazzeo, G., Liotta, L., Caggia, C. & Randazzo, C. L. (2023). Assessment of sensory properties and in vitro antimicrobial activity of monofloral Sicilian honey. *Food Bioscience*, 52, 102449.
- Segueni, N., Boutaghane, N., Asma, S. T., Tas, N., Acaroz, U., Arslan-Acaroz, D., Shah, S. R. A., Abdellatieff, H. A., Akkal, S., Peñalver, R. & Nieto, G. (2023). Review on Propolis Applications in Food Preservation and Active Packaging. *Plants*, 12.
- Shah, T., Ali, N., Shah, Z. & Hayat, A. (2017). Antibacterial Activity of Pakistani Honey. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series B: Biological Sciences*, 2, 97-100.
- Shalsh, F. J., Khalaf, A. M., Hafiz, M. & Al-Sultan, I. I. A. (2021). Antibacterial Properties of Local Malaysian *Trigona Sp.* Honey Towards Different of Pathogenic Bacteria in vitro. *Diyala Agricultural Sciences Journal*, 13, 1-9.
- Shamala, T. R., Shri Jyothi, Y. & Saibaba, P. (2000). Stimulatory effect of honey on multiplication of lactic acid bacteria under in vitro and in vivo conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 453-455.
- Skadins, I., Labsvardis, K. D., Grava, A., Amirian, J., Tomson, L. E., Ruško, J., Viksna, A., Bandere, D. & Brangule, A. (2023). Antimicrobial and Antibiofilm Properties of Latvian Honey against Causative Agents of Wound Infections. *Antibiotics*, 12, 816.
- Suerdem, T. B. & Akyalçın, H. (2018). Screening of antimicrobial and antioxidant activity of different types of honey samples obtained from Geyikli (Çanakkale) province. *Communications Faculty of Science University of Ankara Series C Biology Geological Engineering and Geophysical Engineering*, 27, 69-78.
- Wadi, M. A. (2022). In Vitro Antibacterial Activity of Different Honey Samples against Clinical Isolates. *BioMed Research International*, 2022, 1-8.
- Yılmaz, E. Ş. & Aslantaş, Ö. (2017). Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10, 1059-1064.
- Zapata-Vahos, I. C., Henao-Rojas, J. C., Yepes-Betancur, D. P., Marín-Henao, D., Giraldo Sánchez, C. E., Calvo-Cardona, S. J., David, D. & Quijano-Abril, M. (2023). Physicochemical Parameters, Antioxidant Capacity, and Antimicrobial Activity of Honeys from Tropical Forests of Colombia: *Apis mellifera* and *Melipona eburnea*. *Foods*, 12, 1001.
- Zeaki, N., Johler, S., Skandamis, P. N. & Schelin, J. (2019). The Role of Regulatory Mechanisms and Environmental Parameters in *Staphylococcal* Food Poisoning and Resulting Challenges to Risk Assessment. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1307.
- Zhao, Y., Zhu, A., Tang, J., Tang, C. & Chen, J. (2017). Identification and measurement of staphylococcal enterotoxin M from *Staphylococcus aureus* isolate associated with staphylococcal food poisoning. *Letters in Applied Microbiology*, 65, 27-34.



Saliha BEDİZ ŞAHİN<sup>1a\*</sup>  
Barış SAREYYÜPOĞLU<sup>2b</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri  
Enstitüsü Veterinerlik Mikrobiyolojisi  
Anabilim Dalı, Ankara

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

ORCID<sup>a</sup>: 0000-0002-1963-8958  
ORCID<sup>b</sup>: 0000-0002-2212-2610

\*Sorumlu Yazar: Saliha BEDİZ ŞAHİN  
E-Posta: salihabediz@gmail.com

Geliş Tarihi: 17.11.2023  
Kabul Tarihi: 26.12.2023

14 (3): 149-161, 2023  
DOI: 10.38137/vftd.1392294

#### Makale atf

Bediz Şahin, S. ve Sareyyüpoğlu, B. (2023). Bal Arılarının Bakteriyel Hastalıkları ve Hastalıkların Teşhisine Yönelik Güncel Metotlar, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (3), 149-161. DOI: 10.38137/vftd.1392294.

## BAL ARILARININ BAKTERİYEL HASTALIKLARI ve HASTALIKLARIN TEŞHİSİNE YÖNELİK GÜNCEL METOTLAR

**ÖZET.** Bal arıları, diğer hayvanlardan farklı olarak binlerce bireyden oluşan bir süper-organizma olarak kabul edilir ve içinde kraliçe, işçi ve erkek arılar bulunur. Bal arılarında yavru çürüklükleri, spiroplazmoz ve septisemi gibi bakteriyel hastalıklar görülmektedir. Bu hastalıklar arasında larvaları etkileyen *Paenibacillus larvae* ve *Melissococcus plutonius* 'un neden olduğu yavru çürüklükleri ekonomik açıdan diğer bakteriyel hastalık etkenlerine kıyasla daha fazla öneme sahiptir. Bal arıları, kovan içindeki yakınlıkları ve yiyecek arama alışkanlıkları nedeniyle infeksiyonların kolayca yayılmasına katkıda bulduklarından bu hastalıkların teşhisi ve kontrolü, arıcılık sektörünün sürdürülebilirliği için kritik bir öneme sahiptir. Bu bağlamda, arı hastalıklarının doğru ve hızlı bir şekilde tespiti için araştırmacılar yeni ve güvenilir teşhis yöntemleri geliştirmeye yönelmişlerdir. Bu derlemede, arıcılık sektörü için önem taşıyan bakteriyel arı hastalıklarının teşhisi ve teşhiste güncel gelişmeler üzerine odaklanılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Melissococcus plutonius*, *Paenibacillus larvae*, septisemi, *Spiroplasma* spp., tanı, yavru çürüklüğü.

## BACTERIAL DISEASES of HONEY BEES and CURRENT METHODS for THE DIAGNOSIS of DISEASES

**ABSTRACT.** Unlike other animals, honey bees are considered a super-organism consisting of thousands of individuals, including queen, worker and drones. Bacterial diseases such as foulbrood, spiroplasmosis and septicemia are observed in honey bees. In honey bees Among the bacterial diseases of honey bees, foulbroods caused by *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius*, which affect the larvae, are more economically important than others. Diagnosis and control of these diseases is critical for the sustainability of the beekeeping sector, as honey bees contribute to the easy spread of infections due to their proximity and foraging habits within the hive. In this context, researchers have been driven to develop new and reliable diagnostic methods for accurate and rapid detection of bee diseases. This review focuses on the diagnosis of bacterial bee diseases of importance for the beekeeping industry and current developments in diagnostics.

**Keywords:** Diagnosis, foulbrood, *Melissococcus plutonius*, *Paenibacillus larvae*, septicemia, *Spiroplasma* spp.

## GİRİŞ

Bir arı kovanı, veteriner hekimler için tek tek tedavi ettikleri diğer hayvanların aksine, gelişmekte olan larvalar ve yetişkin bal arıları ile birlikte binlerce bireyin oluşturduğu bir super organizma olarak ele alınmaktadır. İçerisinde kraliçe, işçi ve erkek arılar bulunan bu süper organizmada, genellikle en çok endişe edilen ve tedavi edilmesi gereken ise larvalardır (Applegate ve Petritz, 2020). *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Serratia marcescens*, *Spiroplasma apis* ve *Spiroplasma melliferum* bal arılarında bakteriyel hastalıkların birincil nedeni olarak gösterilen etkenlerdir (Burritt ve ark., 2016). Bunlar arasında, neden oldukları hastalıklara bağlı ekonomik kayıplar açısından en önemlileri ise daha çok larvaları etkileyen *P. larvae* ve *M. plutonius*'tur (Fünfhaus ve ark., 2018).

Arıların kovan içindeki yoğunluğu, birbirine yakın yerleşimi ve yiyecek arama alışkanlıkları nedeniyle enfeksiyonlar kovan içinde ve kovanlar arasında kolayca yayılır. İnfekte kovanlarda sosyal bağışıklık ile ilişkili davranışlar sergileyen ve iş birliği halinde olan yetişkin arılar bakteriyel hastalıkların göz ardı edilmesine neden olmaktadır. Bal arıları, patojenlere maruz kaldıklarında yetişkin işçiler, infekte arılara saldırmak veya dışlamak için kovan girişinin kontrolünü sağlarlar (Cremer ve ark., 2007). Bu davranış şekli ise infekte kolonilerdeki bakteriyel patojenlerin tespit edilmesini zorlaştırmaktadır (Raymann ve ark., 2018). Ayrıca, farklı patojenler genellikle aynı anda arı kovanını infekte ederek koloni sağlığını daha da azaltmakta ve diğer zorluklara karşı savunmasız hale getirmektedirler (Lannutti ve ark., 2022).

Arı ürünleri ve arıların tozlaşmadaki etkisi nedeniyle küresel düzeyde arıcılık önemli bir sektör konumundadır. Bal arılarının uluslararası ticareti, enfeksiyonların küresel olarak yayılmasına neden olmakta ve bunların birçoğu arıcılık için önemli kayıplara yol açmaktadır (Lannutti ve ark., 2022). Bu nedenle bal arılarında verim kayıplarına neden olarak görülen hastalıklar ciddi önem arz etmektedir. Dolayısı ile bu hastalıklardan en önemli olanların teşhisinin doğru bir şekilde yapılabilmesi gerekmektedir. Geçmiş yıllardan beri duyulan bu gereklilik arı hastalıkları üzerinde çalışan araştırmacıları hızlı, pratik ve yüksek

güvenirlikte metot ve araçların geliştirilmesi için teşvik etmiştir. Bu derlemede bakteriyel arı hastalıklarının tanı yöntemleri ve güncel gelişmeler üzerinde durulmuştur.

## AMERİKAN YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ

Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ) hastalığının etkeni ılıman ve subtropikal bölgelerdeki kolonilerde ciddi kayıplara neden olan Gram pozitif ve spor oluşturabilen *Paenibacillus larvae*'dir (Genersch, 2010). AYÇ, Avrupa Yavru Çürüklüğü (AvYÇ) ile birlikte Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (World Organisation for Animal Health; WOAAH)'nın Dünya Delegeler Meclisi (The World Assembly of Delegates) tarafından kabul edilen Karasal Kod (Terrestrial Code) içerisinde karasal hayvan hastalıkları listesinde yer alan bakteriyel hastalıklardır (WOAH, 2023a).

*P. larvae* sporları arı ürünlerinde (bal, balmumu, ölü larvalar) ve çevrede 3 ila 10 yıl, kurumuş larva kalıntılarında 35 yıl ve saflaştırılmış sporlar ise 70 yıldan fazla yaşayabilmektedirler (WOAH, 2023b). *P. larvae*'nin koloniler arasında doğal yayılımı, bakteriyel sporları taşıyan bal arılarının, koloniler arasında sürüklendiği veya zayıf kolonilerden kaynakları çaldığı, sporları topladığı ve kendi kolonilerine geri götürdüğü horizontal bulaşma yoluyla gerçekleşmektedir (Ingemar ve Scott, 2001). Bu nedenle hastalığın bulaşması koloni yoğunluğuna bağlı olmakta ve AYÇ salgınları arıcılığın fazla olduğu bölgelerde daha sık görülmektedir (Peters ve ark., 2006). Larvaların mevcut olduğu her dönemde görülebilen bu enfeksiyon özellikle yumurtlamanın yoğun olduğu dönemlerde daha fazla görülmektedir (Borum, 2014).

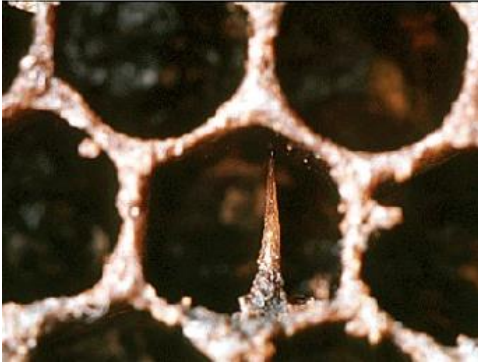
*P. larvae* sporları larvalar için patojen olduğundan yetişkin arılarda hastalık oluşturmamaktadır (Uygur ve Girişgin, 2008). Genç arı larvaları, *P. larvae* sporlarını hemşire arılar tarafından kendilerine verilen yiyeceklerle oral yoldan almakta ve yumurtadan çıktıktan sonraki ilk 12 ila 36 saat boyunca enfeksiyona daha yatkın olmaktadır (Hoage ve Rothenbuhler, 1966; Bamrick, 1967). *P. larvae* sporları orta bağırsak lümeninde vejetatif hale gelerek bağırsak epiteline nüfuz ettikten sonra epitel lokal olarak bozar ve hemoselde kitlesel olarak çoğalırlar. Spor üretmeye devam ettikçe hemoseli tamamen kaplar (Yue ve ark., 2008). İnfekte larva öldükten sonra *P. larvae* gelişmeye devam eder ve ölen larva tam olarak çürümüş hale dönüşene kadar ayrıştırılır. Hastalıklı bir petek gözündeki ölü tek bir larvada bir milyardan fazla endospor bulunabilmektedir. Koloni düzeyinde hastalığın seyri ilerledikçe daha fazla larva infekte



olur ve ölür. Böylece yavru sayısının azalmasıyla soyun devamı sağlanamaz ve bu durum koloninin sönmesine neden olur (Genersch, 2008; Genersch, 2010). Birçok farklı tanı yöntemlerinin geliştirilmesi için uğraşlar verilmesine rağmen AYÇ'nin arıcılık endüstrine büyük zararlar vermeye devam ettiği de bilinmektedir.

## AMERİKAN YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞININ TEŞHİSİ KLİNİK BULGULAR

AYÇ tanısı için birincil klinik bulgu, infekte olan larvanın öldükten sonra genellikle kahverengimsi, yarı akışkan tutkal benzeri bir kıvam almasıdır. İnfekte kolonilerin petek gözleri yamalı bir görüntü alır. Hastalıklı bal arısı larvalarını içeren kapalı yavru gözlerinde koyu-yagli bir görünüm ve içeri doğru çöküklük görülebilir (Forsgren ve ark., 2018). Yavru gözlerine bir kibrit çöpü batırılıp çekildiğinde iplik şeklinde uzayan kremi veya koyu kahverengi tutkal benzeri larva kalıntıları en belirgin klinik bulgu olarak arıcılar tarafından kolayca teşhis edilebilmektedir. Larva, pupal dönemde çürüdüğünde ise karakteristik olarak kuluçkanın tepesine kadar uzanmış pupal dil görünümü alabilir (De Graaf ve ark., 2006) (Şekil 1).



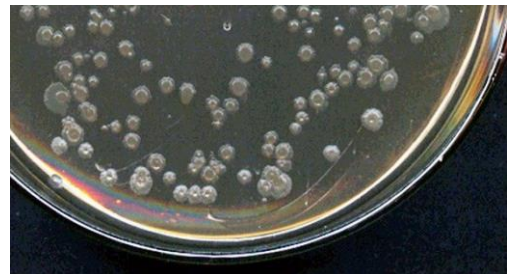
Şekil 1. Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığında karakteristik pupal dil görünümü (WOAH, 2023b).

Hastalık şüphesini doğrulamak veya *P. larvae* prevalansını izlemek için, bal arısı kovanından çeşitli ürünler (örneğin, bal, arılar, balmumu, polen) laboratuvar analizi için alınabilirler (De Graaf ve ark., 2006). Bal ve yetişkin arı örnekleri kullanılarak yapılan hastalık teşhisi balmumu, polen ve atık örneklerinde bakteri tespitine kıyasla daha yüksek bir teşhis değerine sahiptir (Adjlane ve ark., 2014; Forsgren ve Laugen, 2014).

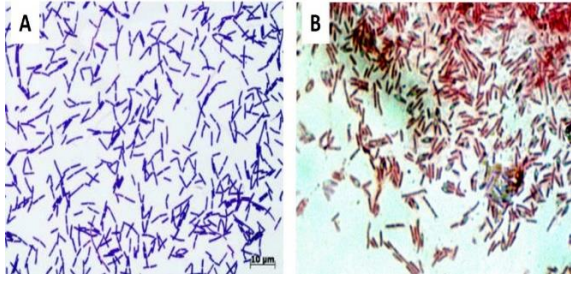
## LABORATUVAR TEŞHİSİ

**Direkt Mikroskopi:** Hastalıklı ölü larvaların arılıklarda lama yayılarak kurutulmasıyla elde edilen preparatlar direkt mikroskopi ve kültür için kullanılabilir (De Graaf ve ark., 2006). Sürüntü üzerine 1-2 damla steril su eklenerek yapılan Gram boyamada mikroskopta tek veya üzüm salkımı halinde elipsoidal pembe renkli, karbol fuksin ile boyama da ise kırmızı-mor renkli kalın kenarlı elipsoidal  $0.6 \times 1.3 \mu\text{m}$  boyutlarındaki sporlar görülür (WOAH, 2023b).

**Etken İzolasyonu:** *P. larvae* izolasyonu için *Paenibacillus larvae* agar (PLA), MYPGP (Mueller-Hinton broth, maya ekstraktı, potasyum fosfat, glukoz ve piruvat içeren besiyeri) agar, tiamin eklenmiş Beyin kalp infüzyon agar (BHIT), J-agar (tripton, maya ekstraktı,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , glikoz, agar içeren besiyeri) ve Columbia koyun kanlı agar (CSA) gibi katı besiyerleri önerilmektedir ve bu ortamlara mantar üremesini engellemek için amfoterisin B eklenebilir. Diğer bakterilerin vejetatif formlarını öldürmek için *P. larvae* sporlarını içeren homojenize edilen larval sulu çözeltiye  $80^\circ\text{C}$ 'de 10 dk veya  $95-96^\circ\text{C}$ 'de 3-5 dk ısı şoku uygulaması yapılabilir (Forsgren ve ark., 2008). Ekim yapılan agarlar  $37^\circ\text{C}$ 'de 2-4 gün boyunca %5-10  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakılırlar. PLA'da koloniler opak, pürüzlü yüzeyle, küçük yeşil-sarı renkli, MYPGP ve J-agarda ise küçük, düzenli, çoğunlukla pürüzlü, beyazımsı bej renklidir (Şekil 2). Üreyen kolonilerden yapılan Gram boyamada etken Gram pozitif çomaklar olarak görülür (Şekil 3A). Schaeffer & Fulton yöntemi kullanılarak yapılan boyamada ise bakteri kırmızı renkte endosporlar ise yeşil boyalı olarak görülürler (WOAH, 2023b) (Şekil 3B).



Şekil 2. MYPGP agar üzerinde *P. larvae*'nin koloni görünümü (WOAH, 2023b).



**Şekil 3.** *P. larvae*'nin Gram boyama yöntemi ile boyandığında Gram pozitif mikroskopik görüntüsü (Rieg ve ark., 2010) (A). *P. larvae*'nin Schaeffer & Fulton boyama yöntemi ile endosporların yeşil, etkenin kırmızı boyandığı mikroskopik görüntüsü (WOAH, 2023b) (B).

**Biyokimyasal Testler:** *P. larvae* genotipleri arasında farklılık göstermekle birlikte glukoz ve trehalozdan asit üretimi ile tipik bir karbonhidrat fermantasyon profiline sahiptirler ancak arabinoz ve ksilozdan asit üretmezler. Ayrıca katalaz negatif olup, etkenler kazein veya sütü hidrolize edebilirler (WOAH, 2023b) Holst süt testi, *P. larvae*'nin sporulasyonunda kazeini hidrolize eden proteolitik enzimlerinin saptanmasına dayanan basit laboratuvar testlerinden biridir (Schuch ve ark., 2001). Yaklaşık %5'lik süt çözeltisi hazırlanır, iki cam tüpe alınır ve birine hastalıklı larva eklenir. 1 saat bekletildikten sonra larva konulan sıvının berrak kahverengiye dönmesi pozitif olarak kabul edilir (López-Urbe, 2022).

**Antijen Saptanmasına Dayalı Testler:** AYÇ'nin hızlı tanısı için ticari olarak "The Vita American Foulbrood Diagnostic Test Kit" geliştirilmiştir. Şüpheli larva örneği ekstraksiyon şişesine konularak 20 saniye boyunca çalkalanır. Bakteri süspansiyonundan yatay olarak tutulan test aparatına 2 damla konur ve 1-3 dakika sonucunda görülen çift mavi çizgi pozitif olduğunu gösterir (Vita Bee Health, 2023a).

Geleneksel ELISA, bakterinin subklinik seviyelerinin tespiti için yeterince hassas değildir. Pastucha ve ark. (2021) tarafından *P. larvae* için spesifik bir antikor hazırlanmış ve bunu upconversion-linked immunosorbent assay (ULISA) geliştirmek için kullanmışlardır. Bu amaçla Foton-upconversion nanopartiküller (UCNP) bakır katalizli klik kimyası kullanılarak bir PEG-bağlayıcı aracılığıyla streptavidine konjuge edilmiştir. Geliştirilen bu yöntem düşük çapraz reaktivite göstermiş ve ELISA'ya kıyasla

22 kat daha duyarlı  $2,9 \times 10^3$  CFU (Colony-forming unit)/mL'lik bir tespit limiti sağlamıştır.

**Moleküler Tanı (PCR ve PCR Tabanlı Tanı Testleri):** *P. larvae*'nin tanımlanması için ilk PCR testi Govan ve ark. (1999) tarafından geliştirilmiştir ve 16S rRNA genine dayanmaktadır. Dobbelaere ve ark. (2001) benzer bir test tanımlamışlar ve ilkinde göre özgüllüğü daha iyi bulunmuştur. Sonraki yıllarda birçok PCR protokolü geliştirilmiştir (De Graaf ve ark., 2006). Lauro ve ark. (2003)'nin geliştirdiği nested PCR protokolü, bal ve kovan örneklerinin doğrudan analizine izin vermekte ve patojenik seviyenin altındaki *P. larvae* seviyelerini de tespit edebilmektedir.

Beims ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada *P. larvae* genotipleri ERIC I ve ERIC II'yi ayırt etmek için yeni bir çoklu tanı yöntemi olan multipleks qPCR'ı geliştirmişlerdir. CSA agar üzerindeki kültür ve multipleks qPCR birleştirilerek 4 gün içinde genotipler tespit edilmiştir. Bu yöntemle DNA'nın saflaştırılması, jel elektroforezi ve fragman paternlerinin yorumlanması gibi zaman alıcı yöntemler gerekli olmadığından, mevcut çalışma süresi yarıya indirilerek daha hızlı müdahalede bulunma ve daha fazla örnek işlenmesine katkı sağlanmaktadır.

Kuşar ve ark. (2021)'nin geliştirdiği TaqMan tabanlı qPCR ise dijital PCR kullanılarak kalibre edilmiştir. Alınan örneklerin tespit ve kantifikasyon sınırları sırasıyla bal için 8-58 spor/g ve kovan döküntüleri için 188-707 spor/mL bulunmuştur.

Erbay ve ark. (2017) 16S rRNA metabarkodlama analizi kullanarak bal arılarının total vücut mikrobiyotasındaki *P. larvae*'nin rölatif oranlarını değerlendirmişlerdir. Bu değerlendirme sonucunda AYÇ'nin öncelikli olarak işçi arıların patojenik/çevresel bakteri topluluklarını etkilediğini göstermişlerdir.

**Diğer Tanı Yöntemleri:** Stamereilers ve ark. (2018) *P. larvae*'nin 48 adet faj genomunun tamamını sekanslamışlardır ve tüm fajların endolizin görevi gören N-asetilmuramoil-l-alanin amidazı kodladığını bildirmişlerdir. *P. larvae* saha suşundan izole edilen PPL1c fajı *P. larvae* suşlarını lize etmektedir. *Bacillus*, *Brevibacillus* ve *Paenibacillus* (*P. larvae* hariç) cinsinden türlerin PPL1c ile indüklenen lizise dirençli olduğu kanıtlandığından, PPL1c'ye karşı faj duyarlılığı *P. larvae*'nin tanımlanması için kullanılan tamamlayıcı bir araç olduğu bulunmuştur. (Stahly ve ark., 1999).

Lee ve ark. (2020) infekte larvalarda gaz kromatografisi - kütle spektrometresi aracılığı ile tespit edilen propiyonik asit, valerik asit ve 2-nonanone adlı bileşiklerin volatil hastalık belirteçleri (Volatil disease markers, VHB) olarak kullanılabilmesini belirtmişlerdir. Bu VHB'lerin kovandaki işçi arılar tarafından infekte larva tespitinde etkili olduğunu ve hastalığın belirlenerek koloni kayıplarının önüne geçilebilmesi için yeni yöntemlerin geliştirilmesi adına umut vadettiği vurgulanmıştır.

Bikaun ve ark. (2022) kovan havasında katı faz mikroekstraksiyonu ve gaz kromatografisi Kütle Spektrometresi kullanarak AYÇ infeksiyonları için biyosensör olarak 40 uçucu bileşik belirlemişlerdir. Bunlar arasında en hassas uçucu biyosensör olan 2,5-dimetilpirazini yalnızca *P. larvae* ile infekte kovanlarda tespit etmişlerdir. Bu biyosensörlerin AYÇ'nin hızlı teşhisi için taşınabilir sensör cihazları ile tespitinde uygun parametreler olacağını bildirmişlerdir.

### AVRUPA YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ

AvYÇ bal arısı kolonilerinin ekonomik olarak önemli bir hastalığıdır ve ciddi vakalar arı kovanlarında ağır hasarlara, hatta tamamen kaybına neden olabilmektedir (Tomkies ve ark., 2009). Hastalığın etkeni *Melissococcus plutonius* Gram-pozitif, genelde mekik şekilli bazen de pleomorfik ve çomak benzeri görünümündedir. Mikroskopta tek tek, çiftler halinde veya çeşitli uzunluktaki zincirler şeklinde görünürler. Optimum üreme sıcaklığı 35°C olup anaerobik olarak da üreyebilen mikroaerofilik bir bakteri olup üremek için karbondioksit ihtiyacı duymaktadır. (Bailey ve Collins, 1982; Forsgren, 2010). AvYÇ mühürlenmemiş yavru gözlerinde bulunan genellikle 4-5 günlük bal arısı larvalarını etkileyerek ölümüne sebep olmaktadır (Forsgren, 2010). Larva, *Enterococcus faecalis* ve *Paenibacillus alvei* gibi sekonder etkenlerden dolayı kötü veya ekşi bir koku yaymaktadır (Arai ve ark., 2012).

Hastalığın görülme sıklığı kış ve ilkbahar aylarında düşüken, yaz aylarında artmaktadır. İnfeksiyondaki ilk adım asemptomatik kolonizasyondur. Kontamine yiyeceklerle alınan *M. plutonius* larvaların orta bağırsağında çoğalmaktadır. Bulaşma sonrası *M. plutonius*'la infekte larvalar yavru gözleri kapatılmadan tespit edilerek hemşire arılarca

uzaklaştırılırlar. Yavru gözleri kapatılmadan önce hemşire arılarca tespit edilemeyen infekte larvalar ölümler ve sekonder etkenler hızla çoğalırlar. Mühürlenmiş yavru gözlerindeki pupaya dönüşen larvalar ise bağırsak içeriğinde etken bulduran güçsüz veya normal erişkinlere dönüşebilirler. Bu durumda *M. plutonius* dışkı ile atılarak yavru gözünde birirmektedir (Bailey ve Ball, 1991).

Rutin arıcılık uygulamaları da *M. plutonius*'un koloniler arasında kolayca taşınmasına neden olur. Bu nedenle AvYÇ genellikle hızlı bir şekilde yayılmakta ve acil bir önlem alınmadıkça ortadan kaldırılması zor olmaktadır (Thompson ve Brown, 2001).

### AVRUPA YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞININ TEŞHİSİ

#### KLİNİK BULGULAR

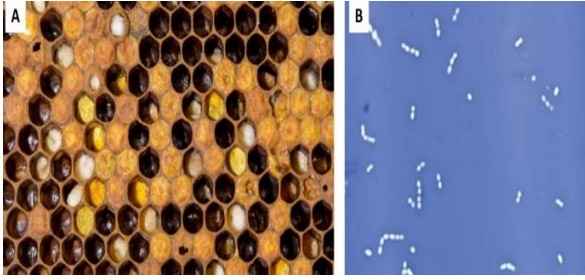
AvYÇ'nin saha tanısı, peteğin görsel muayenesine ve hastalıklı larvaların tespitine dayanmaktadır. Kolonideki genel belirtiler kuluçkadaki kapaklı ve kapaksız gözlerin düzensiz bir şekilde dağılmış olmasıdır. Semptomatik yavru gözlerinin bulunduğu alandan kesilen 10x10 cm'lik parça, yavru gözlerinden sorumlu hemşire arılar, bal ve polen gibi materyaller teşhis için kullanılabilirler (Forsgren ve ark., 2013).

İnfeksiyondan ölen genç larvalar hücrenin dibini kaplar ve neredeyse trakea görünecek kadar şeffaf görünümündedirler (Forsgren ve ark., 2013). Yaşlı larvalar ise yavru gözlerinde larvanın normal olan sarmal pozisyonu yerine, duvarlar etrafında bükülmüş veya uzanmış bir şekil alarak ölmektedirler. Larvanın rengi inci beyazından sarıya daha sonra kahverengiye ve en sonunda siyaha dönüşmektedir. Bazı larvalar yavru gözü mühürlendikten sonra ölebilmektedir ve AYÇ semptomlarına benzer şekilde kapak içeri doğru çökük bir görünümde olmaktadır. Larvaların büyük çoğunluğunda ölüm gerçekleşmiş ise petek düzensiz görünür ve bazen kötü ekşi bir koku hissedilmektedir (Forsgren, 2010; Forsgren ve ark., 2013) (Şekil 4A).

#### LABORATUVAR TEŞHİSİ

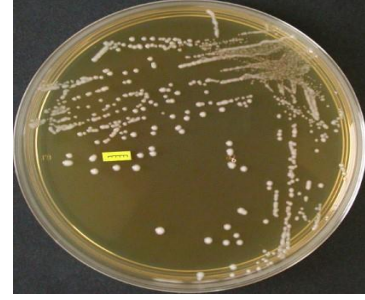
**Direkt Mikroskopik:** Mikroskopik muayenede infekte larvaların orta bağırsak içeriğinden hazırlanan sulu süspansiyon lam üzerine alınır ve %5 sulu nigrosin ile karıştırılır. Lam üzerine yayıldıktan sonra ateşte kurutularak mikroskopta direk incelenir. Yaklaşık 0,5 × 1,0 µm boyutlarında, tek tek veya kümeler halinde meydana gelen ve çiftler veya kısa zincirler halinde uç uca dizilmiş çok sayıda

mekik şeklinde koklar AvYÇ'nin tanısıdır (WOAH, 2023c) (Şekil 4B). Bir diğer boyama yönteminde lamda hazırlanan smear % 0,2'lik karbol fuksin ile 30 saniye boyanır ve yaklaşık 0,5x1,0 µm büyüklüğündeki boyayı eşit şekilde almış mekik şeklinde koklar *M. plutonius* şüpheli olarak kabul edilir (Forsgren ve ark., 2013).



Şekil 4. Yavru gözlerinin düzensiz, delikli kapaklanması ve infekte larvaların görünümü (WOAH, 2023c) (A). Basal mediumda üreyen etkenin %5 nigrosin boyama ile görüntülenmesi (Arculeo ve ark., 2005) (B).

**Etken İzolasyonu:** *M. plutonius* baldan ve hastalıklı kuluçkadan örnekleme yoluyla izole edilebilse de, bakteri kültürü yöntemleri mikroskopik olarak sayılan bakterilerin % 0.2'sinden daha azını tespit ettiği için çok düşük duyarlılığa sahiptirler (Hornitzky ve Smith, 1998). Etken izolasyonu için Bailey (1957)'den modifiye edilmiş Basal medium (maya ekstraktı, L-sistein, glukoz, çözünür nişasta, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, agar içeren besiyeri), M110 agar (pepton, glukoz, çözünür nişasta, maya ekstraktı, neopepton, triptikaz, fosfat tamponu, agar içeren besiyeri) (Forsgren ve ark., 2013) ve KSBHI agar (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, çözünür nişasta, BHI broth ve agar içeren besiyeri) (Arai ve ark., 2012) kullanılabilir. Bu besiyerlerine ikincil bakterilerin büyümesini önlemek için isteğe bağlı olarak otoklavlamadan sonra ml başına 3 µg nihai konsantrasyona kadar filtre ile sterilize edilmiş nalidiksik asit (0,1 M NaOH içinde çözülmüş) eklenebilir. Anaerobik koşullarda 35°C'de 7 gün inkübe edilir (Forsgren ve ark., 2013) (Şekil 5).



Şekil 5. Basal mediumda üreyen 1 mm boyutundaki *M. plutonius* kolonilerinin görüntüsü (Forsgren ve ark., 2013).

**Antijen Saptanmasına Dayalı Testler:** İmmunoloji bazlı metot olarak Tomkies ve ark. (2009) tarafından AvYÇ'nin sahada tanısı için infekte doku ekstraktlarındaki biyolojik antijenleri saptayan Yanal Akış Cihazı (Lateral Flow Device, LFD)'na *M. plutonius* için spesifik olan bir monoklonal antikor üretilerek optimize edilmiştir. Böylece optimize edilen bu antikorlar ile yeni bir AvYÇ LFD geliştirilmiştir. Spesifik ve hassas olan bu saha kitlerinin hem hastalık olmayan hem de semptomatik arı kovanlarında latent infeksiyonların araştırılmasında etkili bir araştırma aracı olma potansiyeli taşıdıkları belirtilmiştir. AvYÇ'nin hızlı tanısı için ticari "The Vita European Foulbrood Diagnostic Test Kit" olarak kullanıma sunulmuştur. Uygulanması AYÇ'de uygulanan test kiti ile aynı şekildedir (Vita Bee Health, 2023b). Dezavantaj olarak tek bir larva ile test yapıldığından doğru numune seçimi saha bilgisi gerektirmektedir (Forsgren ve ark., 2013).

ELISA, antikor bazlı bakteri tespiti için kullanılan en iyi yöntemlerden biri olmasına rağmen erken dönemdeki AvYÇ infeksiyonunu ortaya çıkaracak kadar yüksek duyarlılığa sahip değildir. ELISA yöntemindeki bu eksikliğin giderilmesi adına Poláčková ve ark. (2019) Foton-upconversion nanopartiküllerinin (UCNPs) spesifik biyolojik tanıma molekülleri ile konjügasyonundan sonra immünoanalizlerde ultrasensitif etiketler olarak kullanılabilirliği bir yöntem geliştirmişlerdir. Araştırmacılar ULISA adı verilen bu yöntemin geleneksel ELISA

yöntemine göre 400 kat daha duyarlı olduğunu ve hem hastalığın erken dönemde teşhisi hem de yayılmasının engellenmesi için büyük bir potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir.

**Moleküler Tanı (PCR ve PCR Tabanlı Tanı Testleri):** AvYÇ'nin tanısı için klasik PCR (Govan ve ark., 1998), hem nested PCR (Djordjevic ve ark., 1998), real-time PCR (Roetschi ve ark., 2008) gibi moleküler yöntemler kullanılabilmektedir (WOAH, 2023c). Arai ve ark. (2014) tarafından geliştirilen dubleks PCR ise tipik ve atipik suşlar arasındaki ayrımı sağlamaktadır. Milbrath ve ark. (2021) mikroskopik inceleme ve qPCR ile saha teşhisi için geliştirilen yanıl akış cihazını (Lateral Flow Device, LFD) saha örneklerinde karşılaştırmışlardır. Bu üç teşhis tekniği arasında yüksek düzeyde uyum bulmuşlardır.

**Diğer Tanı Yöntemleri:** Mikušová ve ark. (2019) tarafından geliştirilen amperometrik immunosensörün ELISA veya PCR'a göre daha hızlı olduğu ve 2 saat gibi kısa bir sürede teşhis sağladığını bildirmişlerdir. Anti-*Melissococcus* antikoru yüksek affinite ve düşük çapraz reaktiviteye sahip olması için horseradish peroksidaz (HRP) ile etiketlenerek hazırlanmıştır. Böylece diğer bakterilerin elektrot yüzeyine bağlanması engellenerek elektrokimyasal dönüştürücüye dayalı hızlı bir test geliştirmişlerdir. Bu yöntemin tespit limiti  $6.6 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> olup,  $10^5$ - $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> aralığında geniş bir tespit imkânı sunmaktadır.

## SPİROPLASMOZ

*Spiroplasma apis* ve *Spiroplasma melliferum* bal arısı patojenleridir. Spiroplasmalar küçük, sarmal, hareketli, hücre duvarından yoksun Gram-pozitif bakterilerdir. Bağırsak bariyerini geçerek çoğalırlar ve hemolenfe ulaşarak arının ölümüne neden olurlar (Regassa ve Gasparich, 2006). Bu hastalık mayıs ve haziran aylarında görülmesi nedeniyle "Mayıs hastalığı" olarak da adlandırılmaktadır. Hastalığa neden olan etken *S. apis* Mouches ve ark. (1983) tarafından izole edilerek tanımlanmıştır. *S. melliferum* ise Clark ve ark. (1985) tarafından bir tarama çalışması sırasında bal arılarının bağırsak ve hemolenfinden izole edilerek tanımlanmıştır. Nörolojik semptomlarla

seyreden spiroplazmoz, özellikle ilkbahar aylarında görülmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar *S. apis* ve *S. melliferum*'un tipik bal arısı mikrobiyotasının bir parçası olmayan fakültatif simbiyotlar olduğunu ancak geçici ve bölgesel olarak yaygın olması nedeniyle bal arısı sağlığını etkilediğini göstermektedir (Schwarz ve ark., 2014). Bazı spiroplasma suşları arıların temas ettiği çiçeklerden izole edilmiş ve bunlar yetişkin arılara injeksiyon veya gıda yoluyla verildiğinde patojenik oldukları gözlemlenmiştir (Mouches ve ark., 1984).

Spiroplazma infeksiyonları, bal arılarını tek başına etkileyebilir veya parazitler, virüsler, yetersiz beslenme ve kimyasal kalıntılar gibi diğer faktörlerle etkileşimi veya kombinasyonu ile savunmasızlığını artırabilir (Zheng ve Chen, 2014). *S. apis* infeksiyonlarının, *S. melliferum* infeksiyonlarından daha yüksek ölüm oranlarıyla ilişkili olduğu deneysel olarak gösterilmiştir, ancak ikincisi coğrafi olarak daha yaygın görünmektedir (Schwarz ve ark., 2014).

## SPİROPLASMOZ HASTALIĞININ TEŞHİSİ

### KLİNİK BULGULAR

İşçi arıların etkilendiği *S. apis* infeksiyonunda kovan içerisinde birçok can çekişen ya da ölmüş arı bulunmaktadır ve infekte arıların uçamadıkları yalnızca kovan önünde titreşme hareketi yapabildikleri gözlemlenmiştir (Mouches ve ark., 1984). Karınları sert ve şişkin, bağırsaklar ise sindirilmemiş polen ile doludur. Bireysel olarak arılar ölümlerinde, koloni zamanla kendiliğinden iyileşmektedir (Bailey ve Ball, 1991).

### LABORATUVAR TEŞHİSİ

**Direkt Mikroskopik ve Etkin İzolasyonu:** Diğer bakteriyel bal arısı patojenlerinin aksine *Spiroplasma* spp. ile infekte arıların klinik belirtiler ile tanımlanması imkansızdır (Schwarz ve ark., 2014). İnspektlerde spiroplazmaları tespit etmek için mevcut teknikler, hemolenf veya yumuşatılmış dokuların kültürüne bağlı olmaktadır (Meeus ve ark., 2012). Spiroplasmalar sindirim sistemi içeriğinde ve hemolenfte karanlık saha mikroskopisi ile kolayca saptanabilirler (Daniels, 1983). Spiroplasmaların kültürasyonu için SP4 agar (Trypton, maya ekstraktı, pepton, karbon kaynağı olarak glukoz, PPLO broth temeli, yeastolate içeren besiyeri) hızlı izolasyon sağlaması açısından önerilmektedir (Whitcomb, 1983).

**Moleküler Tanı:** Meeus ve ark. (2012) tarafından *S.*

*melliferum* spiralinin ve *S. apis* rpoB genlerini çoğaltmak için türe özgü primerlere dayalı multipleks PCR tasarlanmış ve bunlar *Spiroplasma* spp.'ye karşı evrensel primerlerle birleştirilerek bakterilerin izolasyonu sonrası her iki türün tespit edilmesine olanak sağlamıştır. Bu yöntem spiroplasmayı DNA ekstraksiyonuna ihtiyaç duyulmadan kültürlerden ve 3 saat gibi kısa bir sürede tanımlayabilmektedir. Böylelikle hemolenfin doğrudan kültürlenmesi ile DNA ekstraksiyonu adımı ortadan kalktığından daha düşük maliyetli olmaktadır. Schwarz ve ark. (2014) ise *S. melliferum* spiralinin primerleri ve *S. apis* 16S rRNA primerleri kullanılarak yapılan bir qPCR testi ile türe özgü yüksek hassasiyette tespit yapılmasına olanak sağlamışlardır.

## SEPTİSEMİ

Hastalığın etkeni *Serratia marcescens*, insanlar ve böcekler de dahil olmak üzere çeşitli hayvanların Gram-negatif fırsatçı bir patojendir. Çoğu hayvanda, *S. marcescens* sadece kan dolaşımında bulunduğu öldürücü olmaktadır (Grimont ve Grimont, 1978). *Serratia* generusu genellikle karakteristik kırmızı veya pembe pigment olan prodigiosin üreten çomaklardır. Ayrıca *S. marcescens*, hastalıklı bal arısı larvalarından da izole edilmiştir (El Sanousi ve ark., 1987). Diğer *Enterobacteriaceae* ile birlikte, arılardaki atipik mikrobiyom bileşiminin bir göstergesi olarak kabul edilen *S. marcescens*, bal arısı bağırsaklarında düşük frekanslarda yaygın olarak bulunmaktadır. Bal arılarından izole edilmiş *S. marcescens* kz11 suşu tetrasikline yüksek direnç gösterdiğinden tetrasiklin ile tedavi edilen arılarda mortalitenin artmasına neden olduğu gözlemlenmiştir (Raymann ve ark., 2017).

*S. marcescens* infeksiyonlarının insektlerdeki patogenezi, bakterilerin bitkilerden alınmasını takiben hemosele penetrasyonu ve hemolenfte proliferasyonun ölümcül bir şekilde ortaya çıkmasını içermektedir (Grimont ve Grimont, 2006).

## SEPTİSEMİ HASTALIĞININ TEŞHİSİ

### KLİNİK BULGULAR

Semptom gösteren işçi arılar ve erkek arıların hareketlerinde azalma ve aktif olan diğer kovan üyelerinden ayrı kaldığı görülmüştür. Aralık ve Ocak aylarında, semptom gösteren işçiler canlılıklarını

sürdüremelerine rağmen iç kapağın üstünde hareketsiz bir şekilde bulunmuşlardır. Ayrıca, semptom gösteren erkek arılar ise sıcak aylarda uçmamışlardır. İnfeksiyona rağmen infekte arıların gardiyanlar ve kovan temizliğinden sorumlu işçiler tarafından zorla uzaklaştırıldığı gözlenmemiştir. Ancak kendilerini serbest bırakarak kovandan ayrılmaları, hastalık bulaşmasını sınırlandırdığı düşünülen hijyenik davranışı desteklemektedir (Burritt ve ark., 2016).

### LABORATUVAR TEŞHİSİ

**Etken İzolasyonu:** Bakterinin kültürasyonu seyreltilmiş hemolenf kültürü steril LB broth'ta seri seyreltmeye tabi tutulduktan sonra LB agar (sodyum klorür, pepton, agar, maya ekstraktı içeren besiyeri) üzerine ekim yapılarak 3 gün boyunca 22°C'de inkübe edilerek yapılabilir (Burritt ve ark., 2016).

### Moleküler Tanı (PCR ve PCR Tabanlı Tanı Testleri):

Burritt ve ark. (2016) işçi arıların hemolenfinden izole edilen Gram-negatif bir bakterinin 16S rRNA sekansının yorumlanması ve tam genom dizisi analizi ile yeni bir suş olan *S. marcescens* sicaria suşu (Ss1)'nü tanımlamışlardır. Bu yeni suş daha önce *Serratia* genomlarında bulunmayan 65 gen dahil çeşitli fenotipik ve genotipik farklılıklar göstermiştir. *S. marcescens* Ss1 suşu özellikle kışlak kovanlardaki Varroa akarlarından ve hareketsiz ya da ölü arıların hemolenfinden izole edilmiştir. Raymann ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada *S. marcescens* Ss1'in sadece bal arılarının hemolenfinden bulunduğu virülans sergilediği gözlemlenmiştir. Bu durumda bağırsak izolatlarından farklı virülans ve infeksiyon mekanizmalarına sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca *S. marcescens*'in bal arılarının bağışıklık mekanizmalarını indüklediğini ve bu sonuçlara dayanarak etkenin gözden kaçan bir tehdit olduğu gösterilmiştir.

**Diğer Tanı Yöntemleri:** Son yıllarda kütle spektrometresinde, matris destekli lazer desorpsiyonu/iyonizasyonu (MALDI-MS) profili rutin mikrobiyolojik organizmaların identifikasyonunda gerçek zamanlı klinik teşhiste oldukça kullanışlı bir yöntem olarak uygulanmaktadır. *Apis mellifera*'nın bakteriyel infeksiyonlardaki sağlık durumunu takip etmek ve hemolenfteki önemli moleküler değişiklikleri izlemek için MALDI BeeTyping geliştirilmiştir. Bu yöntemde bal arılarından elde edilen ve yaygın bir patojen olduğu bilinen

*S. marcescens* suşu kullanılarak deneysel bir model geliştirilmiş ve doğrulanmıştır (Arafah ve ark., 2019).

## ÇOKLU TANI İÇİN GELİŞTİRİLEN BAZI YÖNTEMLER

Garrido-Bailón ve ark. (2013) tarafından *P. larvae* ve *M. plutonius*'un 16S rRNA genini ve de *A. apis*'in 5.8S rRNA genini eş zamanlı tanısı için çoklu patojeniteleri tespit edebilen multipleks PCR yöntemi geliştirilmiştir.

Lim ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada hem bakteriyel hem de fungal hastalıkların multipleks tespiti için PCR-chip tabanlı ultra hızlı PCR sistemi geliştirilmiştir. Bal arısının başlıca infeksiyöz patojenleri *P. larvae*, *M. plutonius*, *Ascosphaera apis*, *Aspergillus flavus*, *Nosema apis* ve *Nosema ceranae*'yi içeren 6 patojenin tespiti için spesifik primer çiftleri seçilmiştir. Ultra hızlı PCR sistemi ile tek PCR-chip'te sırasıyla *P. larvae* 10<sup>3</sup>, *M. plutonius* 10<sup>3</sup>-10<sup>2</sup>, *A. apis* 10<sup>2</sup>, *A. flavus* 10<sup>3</sup>, *N. ceranae* 10<sup>2</sup>, *N. apis* 10<sup>1</sup>'e kadar çoğaltılmış ve minimum çalışma süresi 10 dakika kadar sürmüştür. Lim ve ark. (2017) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise geliştirilen PCR-chip tabanlı ultra hızlı multipleks PCR 'da da aynı etkenlerin tüm PCR saptaması 12 dakika 57 saniye olarak hesaplanmıştır. Standart DNA substratlarının kullanıldığı bu yöntem % 100'e yakın doğruluk göstermiştir. Bu yöntemlerin yalnızca laboratuvarda değil arılıklarda da patojenlerin hızlı bir şekilde tespit edilmesi için uygulanması beklenmektedir.

Dainat ve ark. (2018), *P. larvae*, *M. plutonius* ve bal arısı *Apis mellifera*'nın genomunu aynı anda tespit etmek için ilk DNA tabanlı yöntem olan Tripleks RT-PCR geliştirmişlerdir.

Okamoto ve ark. (2022) ise tek bir reaksiyonda ana yavru çürüklüğü patojen tipleri hem *P. larvae* ERIC I ve II'yi hem de tipik ve atipik *M. plutonius*'u kesin olarak ayırt eden yeni bir multipleks PCR testi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada ilk kez ERIC II tipi *P.larvae* suşları için spesifik hedef dizi seçmişlerdir.

Ehrenberg (2022) tarafından ise iki ana *P. larvae* genotipinin (ERIC I ve ERIC II) dahil olduğu, Amerikan ve Avrupa yavru çürüklükleri etkenleri farelere verilmesiyle spesifik monoklonal antikolar elde edilerek bu etkenlerin tespiti ve ayırımı için tanısallık bir sandviç ELISA ve bir yanıl akış cihazı (Lateral

Flow Device) geliştirilmiştir.

## SONUÇ

Bakteriyel arı hastalıklarının teşhisi, geleneksel mikroskopik incelemeler, kültür yöntemleri ve moleküler teknikler gibi çeşitli yöntemler kullanılarak yapılır. Ancak, bu yöntemlerin bazıları koloni içindeki arıların davranışları nedeniyle veya alınan numunelerin laboratuvar koşullarında analiz edilmesinin zorluğu nedeniyle pratikte uygulanabilirliği sınırlı olabilmektedir. Bu nedenle, sahada kullanılabilir hızlı teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi, hastalıkların erken teşhisi ve kontrolü için kritik öneme sahiptir. Sonuç olarak, bal arısı bakteriyel hastalıklarının teşhisinde ve kontrolünde çalışmaların artırılması arı hastalıklarının daha etkili bir şekilde yönetilmesine ve arı kolonilerinin sağlığının korunmasına yardımcı olabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bal arısı bakteriyel hastalıklarının teşhisi konusunda ilginin arttığını göstermektedir. Araştırılan yöntemlerin öncelikle sahada uygulanabilirliği konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Özellikle hijyenik davranış nedeniyle tespit zorlaştığı bu hastalıklarda yeni yöntemlerin geliştirilmesi hastalıkların önlenmesi için yapılacak çalışmalara veri sağlayabilecektir.

## KAYNAKÇA

- Adjlane, N., Haddad, N. & Kechih, S. (2014). Comparative study between techniques for the diagnosis of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honeybee colony. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 13, 970-973.
- Applegate, J. R. Jr. & Petritz, O. A. (2020). Common and emerging infectious diseases of honeybees (*Apis mellifera*). *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 23, 285-297.
- Arafah, K., Voisin, S. N., Masson, V., Alaux, C., Le Conte, Y., Bocquet, M. & Bulet, P. (2019). MALDI-MS profiling to address honey bee health status under bacterial challenge through computational modeling. *Proteomics*, 19, 1900268.
- Arai, R., Miyoshi-Akiyama, T., Okumura, K., Morinaga, Y., Wu, M., Sugimura, Y., Yoshiyama, M., Okura, M., Kirikae, T. & Takamatsu, D. (2014). Development of duplex pcr assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76, 491-498.
- Arai, R., Tominaga, K., Wu, M., Okura, M., Ito, K., Okamura, N., Onishi, H., Osaki, M., Sugimura, Y.,

- Yoshiyama, M. & Takamatsu, D. (2012). Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. *Plos One*, 7, e33708.
- Arculeo, P., Carpana, E., Di Noto, A. M. & Ferro, A. (2005). *Melissococcus plutonius* isolation from honeybee brood samples with European foulbrood in some Italian regions. Paper presented at the Apimondia 2005, Dublin.
- Bailey, L. (1957). The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* and further observations on *Bacterium eurydice*. *Microbiology*, 17, 39-48.
- Bailey, L. & Ball, B. V. (1991). Bacteria. In, L. Bailey & B. V. Ball Eds. Honey Bee Pathology (Second Edition). London: Academic Press; 1991. pp. 35-52.
- Bailey, L. & Collins, M. D. (1982). Reclassification of 'Streptococcus pluton' (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov. *Journal of Applied Bacteriology*, 53, 215-217.
- Bamrick, J. F. (1967). Resistance to American foulbrood in honey bees: VI. Spore germination in larvae of different ages. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9, 30-34.
- Beims, H., Janke, M., Von der Ohe, W. & Steinert, M. (2020). Rapid identification and genotyping of the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae* by combining culturing and multiplex quantitative PCR. *Open Veterinary Journal*, 10, 53-58-53-58.
- Bikaun, J. M., Bates, T., Bollen, M., Flematti, G. R., Melonek, J., Praveen, P. & Grassl, J. (2022). Volatile biomarkers for non-invasive detection of American foulbrood, a threat to honey bee pollination services. *Science of The Total Environment*, 845, 157123.
- Borum, E. (2014). Arıların yavru çürüklüğü infeksiyonlarında doğru teşhis, mücadele ve korunma yöntemleri. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 14, 44-55.
- Burritt, N. L., Foss, N. J., Neeno-Eckwall, E. C., Church, J. O., Hilger, A. M., Hildebrand, J. A., Warshauer, D. M., Perna, N. T. & Burritt, J. B. (2016). Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Serratia marcescens* strain sicaria. *Plos One*, 11, e0167752.
- Clark, T. B., Whitcomb, R. F., Tully, J. G., Mouches, C., Saillard, C., Bové, J. M., Wróblewski, H., Carle, P., Rose, D. L., Henegar, R. B. & Williamson, D. L. (1985). *Spiroplasma melliferum*, a new species from the honeybee (*Apis mellifera*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35, 296-308.
- Cremer, S., Armitage, S. A. & Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Current Biology*, 17, R693-R702.
- Dainat, B., Grossar, D., Ecoffey, B. & Haldemann, C. (2018). Triplex real-time PCR method for the qualitative detection of European and American foulbrood in honeybee. *Journal of Microbiological Methods*, 146, 61-63.
- Daniels, M. (1983). Mechanisms of *Spiroplasma* pathogenicity. *Annual Review of Phytopathology*, 21, 29-43.
- De Graaf, D. C., Alippi, A. M., Brown, M., Evans, J. D., Feldlaufer, M., Gregorc, A., Hornitzky, M., Pernal, S. F., Schuch, D. M. T., Titěra, D., Tomkies, V. & Ritter, W. (2006). Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 583-590.
- Djordjevic, S. P., Noone, K., Smith, L. & Hornitzky, M. A. Z. (1998). Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *Journal of Apicultural Research*, 37, 165-174.
- Dobbelaere, W., C. de Graaf, D. & E. Peeters, J. (2001). Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie*, 32, 363-370.
- Ehrenberg, S. (2022). Establishment of an ELISA and a lateral flow device for detection of European and American foulbrood including genotype-differentiation of the American foulbrood causing agent (ERIC I & ERIC II) in honey bees. Greifswald, Germany. Thesis of PhD, UG.
- El Sanousi, S. M., El Sarag, M. S. A. & Mohamed, S. E. (1987). Properties of *Serratia marcescens* isolated from diseased honeybee (*Apis mellifera*) larvae. *Microbiology*, 133, 215-219.



- Erban, T., Ledvinka, O., Kamler, M., Nesvorna, M., Hortova, B., Tyl, J., Titera, D., Markovic, M. & Hubert, J. (2017). Honeybee (*Apis mellifera*)-associated bacterial community affected by American foulbrood: detection of *Paenibacillus larvae* via microbiome analysis. *Scientific Reports*, 7, 5084.
- Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S5-S9.
- Forsgren, E., Budge, G. E., Charrière, J.-D. & Hornitzky, M. A. Z. (2013). Standard methods for European foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1-14.
- Forsgren, E. & Laugen, A. T. (2014). Prognostic value of using bee and hive debris samples for the detection of American foulbrood disease in honey bee colonies. *Apidologie*, 45, 10-20.
- Forsgren, E., Locke, B., Sircoulomb, F. & Schäfer, M. O. (2018). Bacterial diseases in honeybees. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5, 18-25.
- Forsgren, E., Stevanovic, J. & Fries, I. (2008). Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes. *Veterinary Microbiology*, 129, 342-349.
- Fünfhaus, A., Ebeling, J. & Genersch, E. (2018). Bacterial pathogens of bees. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 89-96.
- Garrido-Bailón, E., Higes, M., Martínez-Salvador, A., Antúnez, K., Botías, C., Meana, A., Prieto, L. & Martín-Hernández, R. (2013). The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microbial Biotechnology*, 6, 731-739.
- Genersch, E. (2008). *Paenibacillus larvae* and American foulbrood – long since known and still surprising. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3, 429-434.
- Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S10-S19.
- Govan, V. A., Allsopp, M. H. & Davison, S. (1999). A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2243-2245.
- Govan, V. A., Brözel, V., Allsopp, M. H. & Davison, S. (1998). A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1983-1985.
- Grimont, F. & Grimont, P. A. D. (2006). The Genus *Serratia*. In, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt Eds. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. New York, NY: Springer New York; 2006. pp. 219-244.
- Grimont, P. A. & Grimont, F. (1978). The genus *Serratia*. *Annual Reviews in Microbiology*, 32, 221-248.
- Hoage, T. R. & Rothenbuhler, W. C. (1966). Larval honey bee response to various doses of *Bacillus larvae* spores. *Journal of Economic Entomology*, 59, 42-45.
- Hornitzky, M. A. & Smith, L. (1998). Procedures for the culture of *Melissococcus pluton* from diseased brood and bulk honey samples. *Journal of Apicultural Research*, 37, 293-294.
- Ingemar, F. & Scott, C. (2001). Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*, 32, 199-214.
- Kušar, D., Papić, B., Zajc, U., Zdovc, I., Golob, M., Žvokelj, L., Knific, T., Avberšek, J., Očepek, M. & Pislak Očepek, M. (2021). Novel TaqMan PCR assay for the quantification of *Paenibacillus larvae* spores in bee-related samples. *Insects*, 12.
- Lannutti, L., Gonzales, F. N., Dus Santos, M. J., Florin-Christensen, M. & Schnittger, L. (2022). Molecular detection and differentiation of arthropod, fungal, protozoan, bacterial and viral pathogens of honeybees. *Veterinary Sciences*, 9, 221.
- Lauro, F. M., Favaretto, M., Covolo, L., Rassa, M. & Bertoloni, G. (2003). Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 195-201.
- Lee, S., Lim, S., Choi, Y.-S., Lee, M.-I. & Kwon, H. W. (2020). Volatile disease markers of American foulbrood-infected larvae in *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 122, 104040.

- Lim, S.-J., Min, S.-H., Wang, J.-H. & Yoon, B.-S. (2016). The development of ultra-rapid multiplex detection method for 6 species major pathogens of honeybee. Proceedings of the Korean society of apiculture conference, 102-102.
- Lim, S., Kim, J., Lee, C. & Yoon, B. (2017). Development of ultra-rapid multiplex PCR detection against 6 major pathogens in honeybee. *Korean Journal of Apiculture*.
- López-Urbe, M. & Robyn, U. (2022). Honey bee diseases: American foulbrood Retrieved 19.10.2023 <https://extension.psu.edu/honey-bee-diseases-american-foulbrood>.
- Meeus, I., Vercruyse, V. & Smaghe, G. (2012). Molecular detection of *Spiroplasma apis* and *Spiroplasma melliferum* in bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109, 172-174.
- Mikušová, Z., Farka, Z., Pastucha, M., Poláková, V., Obořilová, R. & Skládal, P. (2019). Amperometric immunosensor for rapid detection of honeybee pathogen *Melissococcus plutonius*. *Electroanalysis*, 31, 1969-1976.
- Milbrath, M. O. G., Fowler, P. D., Abban, S. K., Lopez, D. & Evans, J. D. (2021). Validation of diagnostic methods for European foulbrood on commercial honey bee colonies in the united states. *Journal of Insect Science*, 21, 6.
- Mouches, C., Bové, J. M. & Albisetti, J. (1984). Pathogenicity of *Spiroplasma apis* and other spiroplasmas for honey-bees in Southwestern France. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*, 135, 151-155.
- Mouches, C., Bové, J. M., Tully, J. G., Rose, D. L., McCoy, R. E., Carle-Junca, P., Garnier, M. & Saillard, C. (1983). *Spiroplasma apis*, a new species from the honey-bee *Apis mellifera*. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*, 134, 383-397.
- Okamoto, M., Furuya, H., Sugimoto, I., Kusumoto, M. & Takamatsu, D. (2022). A novel multiplex PCR assay to detect and distinguish between different types of *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius*, and a survey of foulbrood pathogen contamination in Japanese honey. *Journal of Veterinary Medical Science*, 84, 390-399.
- Pastucha, M., Odstrčilíková, E., Hlaváček, A., Brandmeier, J. C., Vykoukal, V., Weisová, J., Gorris, H. H., Skládal, P. & Farka, Z. (2021). Upconversion-linked immunoassay for the diagnosis of honeybee disease American foulbrood. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 27, 1-11.
- Peters, M., Kilwinski, J., Beringhoff, A., Reckling, D. & Genersch, E. (2006). American foulbrood of the honey bee: Occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia). *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 53, 100-104.
- Poláková, V., Pastucha, M., Mikušová, Z., Mickert, M. J., Hlaváček, A., Gorris, H. H., Skládal, P. & Farka, Z. (2019). Click-conjugated photon-upconversion nanoparticles in an immunoassay for honeybee pathogen *Melissococcus plutonius*. *Nanoscale*, 11, 8343-8351.
- Raymann, K., Coon Kerri, L., Shaffer, Z., Salisbury, S. & Moran Nancy, A. (2018). Pathogenicity of *Serratia marcescens* strains in honey bees. *mBio*, 9.
- Raymann, K., Shaffer, Z. & Moran, N. A. (2017). Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *Plos Biology*, 15, e2001861.
- Regassa, L. B. & Gasparich, G. E. (2006). Spiroplasmas: Evolutionary relationships and biodiversity. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 11, 2983-3002.
- Rieg, S., Bauer, T. M., Peyerl-Hoffmann, G., Held, J., Ritter, W., Wagner, D., Kern, W. V. & Serr, A. (2010). *Paenibacillus larvae* bacteremia in injection drug users. *Emerging Infectious Disease Journal*, 16, 487.
- Roetschi, A., Berthoud, H., Kuhn, R. & Imdorf, A. (2008). Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*, 39, 362-371.
- Schuch, D. M. T., Madden, R. H. & Sattler, A. (2001). An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey. *Journal of Apicultural Research*, 40, 59-64.
- Schwarz, R. S., Teixeira, É. W., Tauber, J. P., Birke, J. M.,

- Martins, M. F., Fonseca, I. & Evans, J. D. (2014). Honey bee colonies act as reservoirs for two *Spiroplasma* facultative symbionts and incur complex, multiyear infection dynamics. *Microbiology Open*, 3, 341-355.
- Stahly, D. P., Alippi, A. M., Bakhiet, N., Campana, C. F., Novak, C. C. & Cox, R. (1999). PPL1C, a virulent mutant bacteriophage useful for identification of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74, 295-296.
- Stamereilers, C., Fajardo, C. P., Walker, J. K., Mendez, K. N., Castro-Nallar, E., Grose, J. H., Hope, S. & Tsourkas, P. K. (2018). Genomic analysis of 48 *Paenibacillus larvae* bacteriophages. *Viruses*, 10, 377.
- Thompson, H. M. & Brown, M. A. (2001). Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood? *Bee World*, 82, 130-138.
- Tomkies, V., Flint, J., Johnson, G., Waite, R., Wilkins, S., Danks, C., Watkins, M., Cuthbertson, A. G. S., Carpana, E., Marris, G., Budge, G. & Brown, M. A. (2009). Development and validation of a novel field test kit for European foulbrood. *Apidologie*, 40, 63-72.
- Uygur, Ş. Ö. & Girişgin, A. O. (2008). Bal arısı hastalık ve zararlıları. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 8, 130-142.
- Vita Bee Health (2023a). AFB Diagnostic Test Kit. Retrieved 19.10.2023. <https://www.vita-europe.com/beehealth/products/afb-diagnostic-test-kit/>.
- Vita Bee Health (2023b). EFB Diagnostic Test Kit. Retrieved 25.10.2023. <https://www.vita-europe.com/beehealth/products/efb-diagnostic-test-kit/>.
- Whitcomb R.F. (1983). Culture Media for Spiroplasma. In, S. Razin, Tully, J.G., Ed. *Methods in Mycoplasma*. New York: Academic Press; 1983. pp. 147-158.
- WOAH (2023a). Chapter 1.3. Diseases, infections and infestations listed by WOA. Retrieved 16.10.2023. [https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre\\_oie\\_listed\\_disease.htm](https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre_oie_listed_disease.htm).
- WOAH. (2023b). Chapter 3.2.2. American foulbrood of honey bees (Infection of honey bees with *Paenibacillus larvae*). Retrieved 18.10.2023 [https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.02.02\\_AMERICAN\\_FOULBROOD.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf)
- WOAH. (2023c). Chapter 3.2.3. European foulbrood of honey bees (Infection of honey bees with *Melissococcus plutonius*). Retrieved 24.10.2023 [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/3.02.03\\_EUROPEAN\\_FOULBROOD.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.02.03_EUROPEAN_FOULBROOD.pdf)
- Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L. H., & Genersch, E. (2008). Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology*, 10, 1612-1620.
- Zheng, H.-Q., & Chen, Y. P. (2014). Detection of *Spiroplasma melliferum* in honey bee colonies in the US. *Journal of invertebrate pathology*, 119, 47-49.



## Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni

### Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

e-ISSN: 2667-8381

Erdem DANYER

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma  
Enstitüsü Müdürlüğü Ankara

ORCID#: 0000-0002-1963-8958

\*Sorumlu Yazar: Erdem DANYER  
E-Posta: erdemdanyer@gmail.com

Geliş Tarihi: 17.11.2023

Kabul Tarihi: 26.12.2023

14 (3): 162-171, 2023

DOI: 10.38137/vftd.1366883

### BIYOREMEDIASYON UYGULAMALARININ TEK SAĞLIK YÖNÜYLE DEĞERLENDİRİLMESİ

**ÖZET.** Biyoremediasyon biyolojik dengenin bozulduğu ortamların yeniden biyoteknolojik yöntemler ile dengelenmesi olarak tanımlanabilir. Çevreci, az maliyetli, sürdürülebilir bir çevre temizlik yöntemi olarak öne çıkmaktadır. Yaban hayatını barındıran tüm ekosistemler insan etkileşimi ile birçok kirleticinin etkisi altındadır. Petrol sızıntısı, tarım ilaçları ve ağır metal kirliliği, habitat bozulması gibi tehditler yaban hayatının sürdürülebilirliğini tehdit etmekte ve yaban hayatı ekosistemlerinin onarımı için biyoremediasyon uygulamaları ile birçok iyileştirme çalışması yapılmaktadır. Bunun yanında vektör kontrolü ile hastalıkların yayılmasının azaltılmasında da biyoremediasyon uygulamaları kullanılmaktadır. Biyoremediasyon uygulamalarının etkileri çevre, veteriner ve halk sağlığını beraber etkilediği için tek sağlık kavramı altında da değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Bu derlemede mikrobiyolojinin ve nanobiyoteknolojinin yeni bir alanı olan biyoremediasyon uygulamaları, kullanım alanları ve ekosistemleri dengeye getirme çalışmaları hakkında bilgi verilerek tek sağlık kavramı ile açıklanacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Ağır metal kirliliği, biyoremediasyon, etkin mikroorganizma, petrol kirliliği, tek sağlık.

### EVALUATION of BIOREMEDIATION PRACTICES in ONE-HEALTH FRAMEWORK

**ABSTRACT.** Bioremediation can be defined as the rebalancing of environments where biological balance is disturbed by biotechnological methods. It stands out as an environmentally friendly, low-cost, sustainable environmental cleaning method. All ecosystems homeland for wildlife are under the influence of many pollutants with human interaction. Threats such as oil spillage, pesticides, and heavy metal pollution, habitat degradation threaten the sustainability of wildlife, and many improvement studies are carried out with bioremediation practices for the restoration of wildlife ecosystems. In addition, bioremediation applications are also used to reduce the spread of diseases by vector control. Since the effects of bioremediation applications affect environmental, veterinary and public health together, it is thought that they can be evaluated under the concept of single health. In this review, information about bioremediation applications, which is a new field of microbiology and nanobiotechnology, and the cleaning and by giving information about the areas of use and efforts to bring ecosystems into balance, it will be explained together with the concept of one health.

**Keywords:** Active microorganism, bioremediation, heavy metal pollution, oil pollution, one health.

#### Makale atf

Danyer, E. (2023). Biyoremediasyon Uygulamalarının Tek Sağlık Yönüyle Değerlendirilmesi, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (3), 162-171. DOI: 10.38137/vftd.1366883.

## GİRİŞ

Biyoremediasyon kelimesi, biyo-re-mediasyon olarak kelime anlamının biyolojik yeniden uzlaşma olarak Türkçeye çevrilebilir. Diğer bir ifadeyle biyolojik olarak çevrenin yeniden dengelerinin sağlanmasıdır. Burada arabulucu rolünü bakteriler üstelenerek oluşan kirlilik doğal yollarla giderilmeye çalışılmaktadır. Kullanılan teknik, bazen yavaş kalsa da çevreci, az maliyetli, sürdürülebilir bir temizlik yöntemi olarak öne çıkmaktadır (Chen ve Chen, 2001).

Genel kullanım alanlarının daha iyi anlaşılabilmesi için kimyasal kirleticiler örnek olarak ifade edilebilir. Vektör kontrolünde ve tarımda kullanılan organik fosforlu birleşikler, farklı dozlar ile kimyasal silahlarda da kullanılabilir. Tarım ürünlerinin yetiştirilmesinde kullanılan ilaçların yanlış dozlarda kullanılması ya da biyolojik silah olarak tarım ilaçlarının kullanılması sonucunda toprakta birikim olabilmekte ve ilaç kalıntıları topraktan bitkilere, bitkileri yiyen hayvanlara geçebilmektedir (Navarro ve ark., 2007). Topraktaki organik fosforlu birleşiklerin eliminasyonu için en iyi yollardan biri, birleşiklerin fosfotriesteraz enzimiyle hidrolize edilmesidir (Cardozo ve ark., 2020). *Alcaligenes* sp., *Arthrobacter* sp., *Aspergillus* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Talaromyces* sp. ve *Trichoderma* sp. mikroorganizmalarının bu tür uygulamalarda kullanıldığı; *Archaea* sp., *Natrialba* sp. ve *Haloferax* sp. mikroorganizmalarının ise biyoremediasyon uygulamalarında kullanılabileceği belirtilmektedir (Kour ve ark., 2021).

Toprak, su ve hava kirliliği temel olarak ekosistemi ve besin zincirini bozarak kanserojen etkileri ile canlıları olumsuz etkilemektedir. Sanayi gelişmelerle birlikte işlenen ürünlerin değişmesi ve çeşitlenmesi, işlem sonrası atıkların ve yan ürünlerin değişmesine neden olmuştur. Antropojenik aktiviteler sonucunda birçok toksik madde toprağı, suyu ve havayı kirlilemektedir. Ağır metallerden kadmiyum (Cd), krom (Cr), cıva (Hg), kurşun (Pb), bakır (Cu) ve çinko (Zn) topraktan bitkilere geçerek besin zincirine girmektedir. Bu ağır metaller, insanlara hayvansal gıdalar yolu ile aktarılmaktadır. Aynı şekilde denizlerde de bu bulaşımı balıklar aracılığı ile olmaktadır. Bu sebeple ağır metallerin çevreci bir şekilde kontrol altına alınması

önem arz etmektedir. Ekosistemde oluşacak her türlü etki ve bu etkilerin düzeltilmesi için yapılacak her iyileştirme yaban hayatını yakından etkilediğinden, konunun birçok açıdan ele alınması gerekmektedir.

İnsan, hayvan ve çevreyi bütün olarak tek sağlık kapsamında değerlendirmek mümkündür. Günümüzde insanlar ve hayvanları ortak olarak etkileyen, yaban hayvanları ve evcil hayvanlardan insanlara geçen ve hastalık yapan etkenler tek sağlık konsepti ile incelenmektedir (Sandøe ve ark., 2014). Tek Sağlık, farklı düzeylerde insanların, hayvanların ve çevrenin sağlık ve refahını sağlamak için koordineli çalışmaları teşvik ederek, bütüncül sağlık uygulamalarını hedeflemektedir (Li ve ark., 2022). Günümüzde tek sağlık anlayışı bulaşan hastalıklardan ziyade, çevrenin, hayvanların ve insanların zarar gördüğü etkenler olarak değerlendirilmeye başlanmıştır.

Bu derlemede mikrobiyolojinin ve nanobiyoteknolojinin yeni bir alanı olan biyoremediasyon uygulamaları hakkında bilgi verilecek ve tek sağlık açısından değerlendirilecektir.

## TOPRAKTA BİYOREMİDİASYON UYGULAMALARI

Toprak çok fazla antropojenik aktiviteye maruz kalmaktadır. Bazı ağır metal sanayi ürünlerinin işlenmesinden sonra meydana gelen artıklar ve bunların doğaya kontrolsüzce salınması ile oluşan bulaşmalar sonrasında biyoremediasyona ihtiyaç duyulabilmektedir.

Fitoremediasyon uygun bitkilerin kirlenmiş bölgeye ekilerek daha sonra kurutma, gazifikasyon, piroliz, asit ekstraksiyonları gibi yöntemlerle yeterli ağır metali toplayan bitkilerin bertaraf edilmesi temeline dayanır (Gökmen, 2019). Bunun yanında toprağın yıkanması, mekanik olarak ayrılması, katılaştırılması yöntemleri de ek olarak kullanılabilir. Fitoremediasyon uygulamalarına örnek olarak Cd ile kirlenmiş bir toprağın temizlenmesi gösterilebilir (Rizwan ve ark., 2018).

Doğa için çok toksik olan Cd, insan aktiviteleri sonucunda oluşan bir ağır metaldir (Rizwan ve ark., 2018). Hardal bitkisi uygun iklim ve büyüme koşullarında önemli bir miktarda Cd akümüülasyonu sağlayabilir ancak, fazla miktarlarda strese girebileceği için Cd toleransı olan hardal bitkilerinin seçilmesi önerilmektedir (Rizwan ve ark., 2018). Bitkilerle yapılan biyoremediasyon uygulamalarında biyoakümüülasyon, translokasyon ve temizleme kapasiteleri önemlidir (Anning ve Akoto, 2018). Örnek vermek gerekirse, bu konuda, hardal otu (*Brassica* sp.), su kamışı (*Typha latifolia*) ve güve otu (*Chrysopogon zizanioides*)

kullanılabilir (Anning ve Akoto, 2018; Rizwan ve ark., 2018). Rhizobacter ve bitki simbiosizi de topraktan Cr (VI) ve Cd (II) kirliliğinde kullanılan biyoremediasyon yöntemlerdendir (Luminit ve ark., 2017).

Bitkilerle yapılan fitomediasyon uygulamasında en önemli dezavantajı çalışmanın uzun zaman almasıdır. Bu nedenle remediasyon işlemini hızlandırmak için toprak solucanları kullanılabilir. Ağır metallerin temizlenmesi için yapılan uygulamalarda solucanlar ile topraktaki ağır metallerin bitkiye yönlendirilmesi sağlanırken, metal toksisitesine karşı dirençli olduklarından bir kısmını bünyelerinde barındırabilirler ancak günümüzde henüz pratik olarak uygulanabilir bir yöntem değildir (Kara ve ark., 2016).

Toprak solucanı kullanımına petrol yayılmaları sonucu oluşan toprak kirliliğinin giderilmesi örnek olarak gösterilebilir. Bu biyoremediasyon metodunda solucanlar floralarında bulunan mikroorganizmalar ile toprağın bakteri yükünü değiştirerek hareketleriyle toprağın havalanmasını sağlamaktadır (Martinkosky ve ark., 2017). Bir solucan türü olan *Eisenia fetida* ile yapılan çalışmada 30000 mg/kg ham petrol dökülmüş toprağın rehabilitasyonunda biyoremediasyon tekniği olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir (Martinkosky ve ark., 2017).

Mikrobiyal ortamın elektro kimyasal yöntemlerle işlenmesi de toprak kirliliğinde kullanılan başka bir biyoremediasyon uygulamasıdır. Fiziksel ve kimyasal temizleme yöntemlerine göre biyoremediasyon uygulamaları, çevre dostu ve sürdürülebilir olması en önemli özelliklerindedir. Topraktaki bakterilerin organik substratı bozmasıyla anot bölgesine elektron salınır, salınan elektronlar elektrik devresinde katoda doğru yol alır ve oksijen veya oksijenle birleşik oluşturmuş metaller tarafından alınması ile biyoremediasyon uygulaması sırasında elektrik elde edilerek, çalışılan sahada kullanılabilir (Wu ve ark., 2018).

Fitoremediasyon uygulamalarında yararlı mikroorganizmalardan oluşan etkin mikroorganizmalar (EM) da kullanılarak aynı zamanda bitki üretimine katkı sağlanmaktadır (Romeh, 2020).

## SULARDA BİYOREMEDIASYON UYGULAMALARI

Dünyamızın  $\frac{3}{4}$ 'ünü sularla kaplı olmasıyla birlikte denizlerde ve iç sularda insan tüketimi için deniz canlılarının yetiştiriciliğinin artması, suların herhangi bir şekilde kirlenmesini önlememizi zorunlu kılmaktadır. Sucul ekoloji, dünyamızdaki karbon salınımını regüle ettiği için korunması çok önemli olan bir ekosistemdir. Çevredeki ve endüstriyel atık sularındaki mevcut ağır metaller, gelişmekte olan ülkelerde ekosistemleri giderek daha fazla kirletmekte ve insan sağlığını tehdit etmektedir (Medfu Tarekegn ve ark., 2020).

Fenol ile kirlenmiş atık sulara endüstriyel atıkların deşarj edildiği noktalarda rastlanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü fenolün içme sularındaki miktarını 1µg/l'den az olarak belirlemiştir (Nuhoglu ve Yalcin, 2005). Fenol toksik, kanserojenik bir kirlenmedir. Fenol maruziyeti, deri ve dokularda harabiyete, karaciğer hasarına, ishal ve görme kaybına neden olmaktadır (El Gaidoumi ve ark., 2019). Fenolün temizlenmesi için fiziksel, kimyasal, biyolojik yollar bulunmakla birlikte, absorpsiyon, ekstraksiyon, kimyasal oksidasyon ile bertaraf etme yöntemleri pahalı olmalarının yanında zararlı başka ikincil metabolitler ortaya çıkartmaktadır (Liu ve ark., 2020). Fenolün biyoremediasyon yöntemleriyle temizlenebilmesi için yapılan bir çalışmada *Acinetobacter radioresistens* APh1 suşunun 30°C'de, 6 pH'da 500 mg/l fenol konsantrasyonunu cis, cis-mukonik asit, kateşol ve süksinit asit metabolitlerine ayırarak bertaraf edebildiği görülmüştür (Liu ve ark., 2020). 450 mg/kg fenol ile kontamine toprak üç gün içinde %99 oranında fenolden arındırılmış ve mikrobiyal florada *Chungangia*, *Bacillus*, *Nitrospira*, *Lysinibacillus* ve *Planomicrobium* bakterilerinde artış belirlenmiş ve 23. günde *Acinetobacter radioresistens* APh1 suşunun azaldığı ve floranın normale döndüğü görülmüştür (Liu ve ark., 2020). M ürünleri de yine suların temizlenmesi, tekrar ekosistemin sağlanması, özellikle nitrat dengelerinin yeniden sağlanması için kullanılabilir (Sitarek ve ark., 2017).

Petrol kirliliği ekosistemi çok derinden etkileyen, uzun yıllar etkisi devam eden ve etki alanı özellikle sucul ekosistemlerde çok hızlı büyüeyebilen bir kirliliktir. Petrol yüklü tankerler ve platformlarda yaşanan kazalar uzun yıllar kirliliğe sebep olabilmektedir. Özellikle denizlerde yaşanan petrol sızıntılarını meydana getiren kazalar, yangınlar beraber seyrettiği için belli bir süre sızıntıyı engellemek için

çalışma ikinci plana atılabilmektedir. Ekosisteme verdiği zararlar, bazen geri dönüşümsüz noktalara gelebilmektedir. Birincil etkilenen canlılar deniz kuşlarıdır. Deniz kuşlarının petrole bulunması sonrasında petrolün tüylerinin arasından girerek derinin su geçirmez özelliğini bozarak, hayvanın ıslanmasının, vücut sıcaklığının düşmesine ve petrolün cilde teması ile dermal iritasyonlara sebep olur. Petrolün kuşların solunum sistemine girmesi, solunum yolu problemlerine neden olurken küçük boyutlu kuşlar petrolden temizlenene kadar hareket kabiliyetlerini yitirerek ölebilirler (Horemans ve ark., 2017).

Petrol sızıntısının fiziksel, kimyasal ve biyoremediasyon ile temizleme yöntemleri bulunmaktadır (Horemans ve ark., 2017). Bu

derlemede sadece biyoremediasyon ile bertaraf edilmesi yöntemleri üstünde durulacaktır. Petrol kirliliğinde biyoremediasyon uygulamaları doğal yolla (natural attenuation), biyobüyüme (bioaugmentation), biyostimülasyon (biostimulation) olarak üç grupta toplanmaktadır. Diğer metotlara göre en fazla fayda maliyet oranına sahip, insan gücünü az gerektiren ve sürdürülebilir metot olarak öne çıkar, ancak bu metot kıyıya yakın alanlarda kullanılabilir ve nispeten uzun süren uygulamalar ihtiyaç duymaktadır (Horemans ve ark., 2017). Petrol sızıntısından sonra petrolün yayılmasını önleyen bariyerler ile maruziyet sahası sınırlandırıldıktan sonra, fiziksel ve kimyasal olarak temizlik yapılır ve akabinde biyoremediasyon uygulamalarına başvurulur. Petrol temizlenmesi sırasında başvurulan seçilmiş biyoremediasyon uygulamaları Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Petrol kirliliğinde kullanılan bazı biyoremediasyon etkenleri (Sayed ve ark., 2021).

Sıra No	Kirletici	Kullanılan Mikroorganizma	Kirlenme oranı (%)	İşlem süresi	stimülötör	Kaynak
1	%0,05 (v/v) Ham petrol deniz suyu bulaşması	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	%60	15 gün	Kitin ve kitosan (karides artığı)	(Gentili ve ark., 2006)
2	%0,1 (v/v) bozulmuş ham petrol deniz suyu arışımı	<i>Thalassolituus</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Cycloclasticus</i>	%85	30 gün	Besin 20 mg/L NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> and 10 mg/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Mckew ve ark., 2007)
3	nC15-nC35 10 g/l Toplam petrol hidrokarbonu ihtivası	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AspH2	%80	30 gün	Mısır suyu	(El-gendy ve ark., 2014)
4	%10 (v/v) Ham petrol	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Alcanivorax borkumensis</i>	%94,4	8 hafta	NPK 15:15:15	(Amenaghawon ve ark., 2014)
5	100 ppm kirli deniz suyu	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	%95	20 gün	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,077 g/L, NH <sub>4</sub> Cl 0,2 g/L and NaNO <sub>3</sub> 0,1 g/L	(Hassanshahian ve ark., 2014)
6	%0,5 (w/v) Ham petrol	<i>Pseudomonas</i>	%97	28 gün	Atık suyu	(Mahdi ve ark., 2016)
7	%0,5 (w/v) Ham petrol	<i>Pseudomonas</i>	%91	28 gün	Mısır suyu	(Mahdi ve ark., 2016)
8	%2 (v/v) kargo yakıtı bulaşmış deniz suyu	<i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Alcanivorax dieselolei</i> , <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> , <i>Cycloclasticus</i> sp. 78-ME, <i>Thalassolituusoleivorans</i>	%73 ± 2,4	14 gün	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,077 g/L, NH <sub>4</sub> Cl 0,2 g/L and NaNO <sub>3</sub> 0,1 g/L	(Crisa ve ark., 2016)
9	%1 (v/v) ham petrol	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> , <i>Thalassolituus</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Cycloclasticus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AspH2, <i>Aspergillus niger</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2, <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Alcanivorax dieselolei</i> , <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> , <i>Cycloclasticus</i> sp., <i>Thalassolituusoleivorans</i> , <i>Bacillus algicola</i> (003-Phe1), <i>Rhodococcus soli</i> (102-Na5), <i>Isoptericola chiaiyensis</i> (103-Na4), <i>Pseudoalteromonas agar-ivorans</i> (SDRB-Py1)	>%85	14 gün	Biyosüpfaktan	(Pacwa-Płociniczak ve ark., 2019)
10	%1 (v/v) motorin	Proteobacteria	%20-99	7 gün	Tween-80 ve rhamnolipids	(Ławniczak ve ark., 2020)(Staninska-Pięta ve ark., 2019)

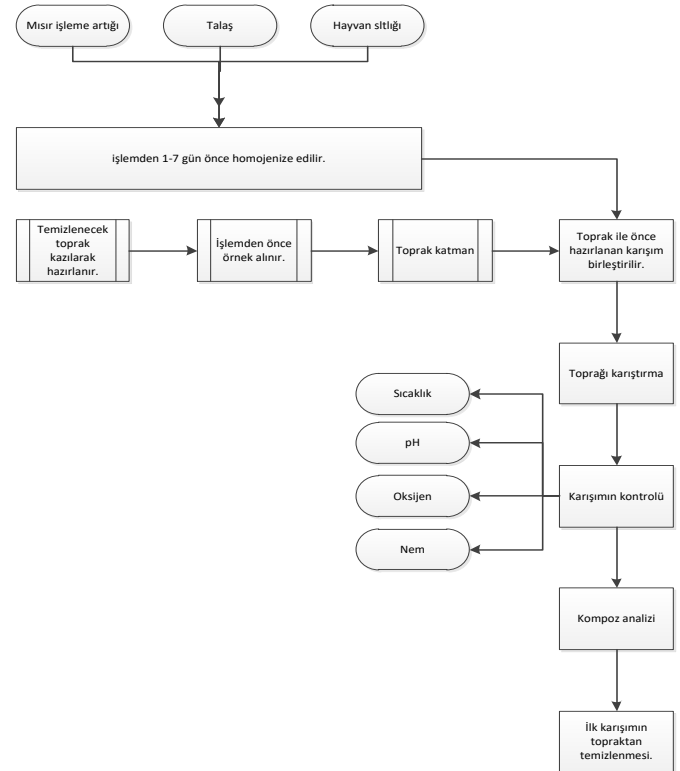
## ASKERİ ALANDA BİYOREMİDİASYON UYGULAMALARI

TNT, sülfirik asidin kataliziyle, tolüen ve nitrik asidin reaksiyonundan elde edilir (Özcan ve Türkdoğan, 2014). Patlayıcılarda kullanılan nitraminler Royal Tahrip Patlayıcıları (RDX, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine) ve Yüksek Erime Patlayıcılarıdır (HMX, octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine) (Lewis ve ark., 2004). RDX ve HMX TNT'ye göre daha 1,5 kat daha fazla patlayıcı gücünde olmalarına karşın, suda düşük çözünürlükte olması sebebiyle maruz kalmış alanlarda TNT'ye göre daha az bulunur ve daha düşük toksisite gösterirler (Özcan ve Türkdoğan, 2014).

Askeri alanda patlayıcı ve bomba yapımında da kullanılan 2,4,6-trinitrotoluene (TNT,  $C_6H_2(NO_2)_3CH_3$ ) ve 2,4,6-trinitrophenol (pikrit asit,  $(O_2N)_3C_6H_2OH$ ) üretimi ve kullanımı sonrasında hava, su, toprak kirliliğine uzun yıllar neden olmaktadır. 1830'larda keşfedilen TNT Birinci Dünya Savaşı sırasında tüm ordular tarafından kullanılmıştır (Lewis ve ark., 2004). United States Environmental Protection Agency (USEPA) TNT ile kirlenmiş alanların temizlenmesinin bir zorunluluk olduğunu 2001 yılında bildirmiştir (Esteve-nu ve ark., 2001). Mühimmat artıklarının imha edilmesi için derin denize bırakma, özel depolama alanlarına gömme ve insinerasyon (yüksek sıcaklık ve oksijen ile atık içindeki organik maddelerin yakılması) yöntemleri kullanılmasına karşın daha sonra bu yöntemlerin çevre için uygun olmayan sonuçlar doğurabildiği ifade edilmiştir. (Özcan ve Türkdoğan, 2014).

Patlayıcılar ile kontamine olmuş toprakların arıtma tekniklerinden ilki kompostlama olarak belirtilebilir. Bu teknikle hayvan atığı olan gübre ve bitki artıkları kontamine olmuş toprak ile karıştırılarak hem topraktaki patlayıcı oranı azaltılır hem de mikrobiyel üremeyi arttırmak amaçlanır (Özcan ve Türkdoğan, 2014). Bu yöntem de mikrobiyel üreme ile sıcaklık ve nem artışı görüleceği için toprağın havalandırılmasına ihtiyaç vardır (Özcan ve Türkdoğan, 2014). Biyolojik yöntemlerle yapılan remediasyon yani biyoremediasyon patlayıcılarla kirlenmiş topraklar için en iyi temizlik yöntemlerindedir (Scalzo ve ark., 1998). Yapılan bir

çalışmada %35 oranında TNT ile kontamine olmuş toprak karışımının, %5 sığır dışkısı, %5 mikrobiyel süspansiyon ile 15 gün içinde %99 oranında elemine edilebileceği bildirilmektedir (Rezaei ve ark., 2010). Kompostlama yöntemiyle patlayıcılar ile kontamine toprağın temizlenmesi Şekil 1'de açıklanmıştır.

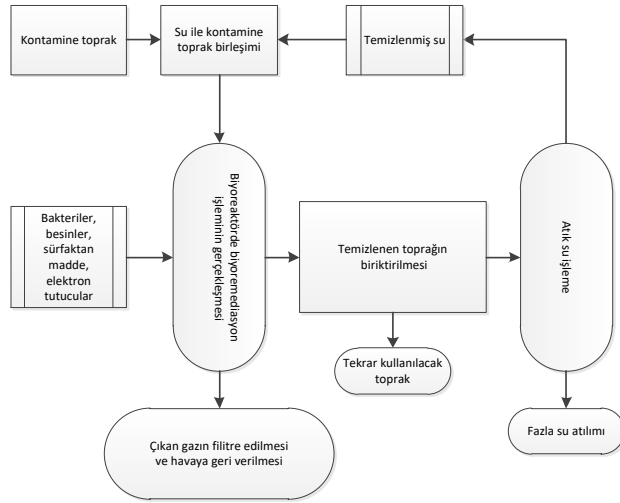


**Şekil 1.** Kompostlama yöntemiyle patlayıcılar ile kontamine toprağın temizlenmesi (Scalzo ve ark., 1998).

Biyoreaktörler yardımıyla da bahsedilen patlayıcıların dekontaminasyonu gerçekleştirilebilir. Biyoreaktör çeşitli malzemelerden yapılmış varil, bidon gibi kapalı alanlar olabilir ve bu alanlarda malzemeler birleştirildiği için biyoreaktör olarak tanımlanmaktadır (Şekil-2). Biyoreaktörlerde TNT bertaraf edilmesi 75000 litre hacmindeki çelik tanklara, 23 m<sup>3</sup>, %50 sulu kısım ve toprak karışımı olan TNT ile kontamine toprağın muamele edilmesiyle yaklaşık 1-2 gün içinde aerob bakteriler oksijeni tüketerek, anerobik ortamda yaklaşık 11 haftada bertaraf işlemi tamamlanmıştır (Funk ve ark., 1995). TNT konsantrasyonu 1000 mg/kg olan 3 kg toprak çözünürlüğünü arttırmak için kullanılan 60 mg/l ramnolipit ile 154 gün muamele edildiğinde %73 oranında TNT'ni azaldığı, ramnolipitlin ise ortamda %58 oranında tespit edildiği bildirilmiştir (Bina ve ark., 2018). Bu çalışmada ramnolipit



varlığında toprakta, *Pseudomonas stutzeri* ve *Sphingomonadaceae* sp.; ramnolipit bulunmadığında ise *Rhodococcus* sp. bakterilerinin ürediği bildirilmiştir (Bina ve ark., 2018). Bir diğer uygulamada sularda TNT kirliliği için spirulina ile biyoremediasyon uygulaması yapılmış ve 22,5 ppm TNT 15 gün içinde %87 oranında detoksifiye edilmiştir (Adamia ve ark., 2018).



**Şekil 2.** Biyoreaktörlerde biyoremediasyon işlemini şematize edilmiş hali (Tekere (2013)'den modifiye edilmiştir).

Fitodetoksifikasyon, diğer bir ifadeyle bitkilerin kullanılarak patlayıcı hammaddeleri ile kirlenmiş alanların temizlenmesi mümkün olabilmektedir. Bitkilerin kullanılması, daha önce de değinildiği gibi, daha az maliyetle temizlik işleminin yapılabilmesine olanak sağlayabilmektedir. Bir diğer avantajı ise fitodetoksifikasyon sırasında dikilen bitkilerin halk tarafından hoş karşılanmasıdır (Lewis ve ark., 2004) *Enterobacter cloacae* bakterisinden elde edilen nitroredüktaz geni nfsI transforme edilmiş tütün bitkisi (*Nicotiana tabacum* L.) TNT detoksifikasyonunda kullanılabilir (Manorama Thampatti ve ark., 2020). Mikorizal bir diğer tanımla mutalist mantarların da fitoremediasyon alanında önemli bir yeri bulunmaktadır. Çalışmaların büyük bir kısmında varyasyonu yüksek veriler elde edilmiş olsa da bu yöntemin gelecek için umut vadeden sonuçları bulunmaktadır (Coninx ve ark., 2017).

Askeri alanların patlayıcı ham maddelerinden temizlenmesi zor ve maliyetli bir işidir. *Bacillus* sp., *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter* sp., *Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescen*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus erythropolis*, *Serratia marcensens*, *Staphylococcus* sp., *Stenotrophomonas maltophilia* bakterileri TNT'nin detoksifikasyonunda kullanılabilir (Esteve-nu ve ark., 2001). Savaş bittikten sonra kalan alanlardaki toprağın kullanımı hem gıda sağlanması hem de ekonomik açıdan çok büyük önem arz etmektedir. Savaş sonrası, sosyal, kültürel, ekonomik, sağlık, barınma gibi ihtiyaçların düzeltilmesi ve giderilmesi içinde bu alanlar kullanılmaktadır. Bu sebeple, halkı da içine alacak şekilde yapılmış bir planlama ile söz konusu toprakların temizlenmesi için çalışmalar yapılmalıdır.

## BİYOREMEDIASYON UYGULAMALARI ve TEK SAĞLIK

Hayvansal üretim geçmişe oranla çok daha büyük çiftliklerde yapılmaya başlanmış, denizlerde, göllerde, akarsularda büyük miktarda sucul canlı barındıran çiftlikler kurulmuştur. Bu çiftliklerin atıkları birikerek çevre ve halk sağlığı için sorun oluşturmaktadır. Bu atıkların bertaraf edilmesi için de biyoremediasyon uygulamalarının kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu uygulamalarla çiftliklerden çıkan dışkı ve organik atıklar, atık sular mikro algler ile muamele edilerek hem CO<sub>2</sub> emiliminin arttırmakta hem de kozmetik, kimya, biyoyakıt, yem ve gıda sektörü gibi alanlarda ham madde olarak kullanılabilir (Lu ve ark., 2020). Atıkların içindeki besleyici maddeler mikro algler tarafından depolanmakta ve tekrar kullanıma sunulabilmektedir (Lu ve ark., 2020). Sığırcılık işletmelerinde ortaya çıkan atık sular kullanılarak bir mikroalg çeşidi olan *Scenedesmus obliquus* üretimi yapılmış ve on iki gün sonra atık ortamda kimyasal oksijen ihtiyacında %65-70, %98-99 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ve %69-77,5 PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> azalma görülmüş ve üretilen mikroalglerin hayvan beslemede yeniden kullanılabilirliği değerlendirilmiştir (de Mendonça ve ark., 2018). Bir başka çalışmada da yine hayvan gübresinden 10 g *Scenedesmus* sp. üretimi yapılırken %92,5 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ve %51,9 PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> azalması ile sonuçlanmıştır (Scherer ve ark., 2017). *Bacillus* sp. kökenli probiyotiklerin hayvan beslemede kullanımı hayvan için büyüme, hayatta kalma, yemden yararlanmayı artırırken, nitrojen atıkları azalttığı için bir biyoremediasyon uygulaması olarak kabul edilebilir (Mingmongkolchai ve Panbangred, 2018).

Sucul ortamların dengesinin sağlanması için de biyoremediasyon uygulamalarının kullanımı yaygınlaşmaktadır. Tüketilmeyen yemler, fitoplanktonlar, ölü

bitki parçaları, ilaç artıkları, dışkı, parazitler, üretilen diğer toksik maddeler hem çevre hem de hayvan sağlığını olumsuz etkilemektedir. *Scenedesmus* sp. ile yapılan biyoremediasyon uygulamasında atık suda %12,42 Zn, %49,25 Fe azaldığı ifade edilmiştir (Talip ve ark., 2019). *Marichromatium gracile* YL28 ile yapılan çalışmada yedi gün içinde balık havuzundaki nitritin %99.6'sı temizlenmiş (Zhu ve ark., 2019), *Bacillus pumilus* ve *Lactobacillus delbrueckii*'nin birlikte kullanıldığı çalışmada yedi hafta sonunda amonyum nitrojen oranının azaldığı belirtilmiştir (Jasmin ve ark., 2020), *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. laterosporus* ve *B. circulans* ile yapılan çalışmada amonyum nitrat seviyesi ve toplam bakteri sayısının düştüğü tespit edilmiştir (Samani ve ark., 2016), *Bacillus vietnamensis* ve *Gordonia bronchialis* ile yapılan çalışmada invitro ortamda amonyak ve nitrit seviyesinin azaldığı (Malaysiana ve ark., 2015); *Bacillus* sp. karışımında amonyak, nitrat ve nitrit seviyesi *Litopenaeus vannamei* çiftliğinde azaldığı (Elizondo-González ve ark., 2018); *Bacillus amyloquefaciens* 24 saat içinde amonyanın %93'ünü temizlediği (Yu ve ark., 2012); *Bacillus* sp *Macrobrachium rosenbergii* yetiştiriciliğinde 60 gün içinde amonyak, nitrit ve pH seviyelerini düşürdüğü (Rahiman ve ark., 2010); *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides* ve *Bacillus licheniformis* türlerinin birlikte kullanıldığı çalışmada ise amonyak, nitrit, nitrat ve fosfat iyonları sirkülasyon tanklarında azaldığı (Laloo ve ark., 2007); *Bacillus subtilis* ve *Bacillus megaterium* türlerinin birlikte kırmızı papağan balığı sirkülasyon tanklarında kullanıldığında toplam amonyak, kimyasal oksijen ihtiyacı azalttığı (Chen ve Chen, 2001) belirlenmiştir.

Hayvancılık sektöründe kullanılan antibiyotikler et, süt, yumurta gibi ürünlerle insana geçebilmekte, dışkıları ile toprağa ve yeraltı sularına karışabilmekte, buradan bitkilere geçmekte ve nihayetinde tekrar bu bitkileri hayvanların tüketmesi ile hayvana bulaşabilmektedir (Tasho ve Cho, 2016). Antibiyotik kullanımının azaltılması ve daha biyolojik olarak ekosisteme uyumlu yollar ile hayvan tedavisi gelecekte daha çok önem kazanacak alanlardan olacaktır.

Biyoremediasyon uygulamaları savaş sonucunda ortaya çıkan kirliliğin giderilmesi, hayvan beslemenin sonucu oluşan atıkların tekrar doğaya dönüşümü gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Çevresel kirlilikteki

artışlar, çevresel kalitenin giderek bozulmasına yol açmakta; insan ve çevre sağlığını ciddi şekilde tehdit eden olumsuz koşulları iyileştirmek için etkili yöntemler bulmaya zorlamaktadır. Biyoremediasyon, atıkların ve çevresel kirliticilerin yönetiminde kimyasal ve fiziksel yöntemlere ek olarak uygun maliyetli ve faydalı bir yöntem olduğunu şimdiden kanıtlamıştır (Bonaventura ve Johnson, 1997). Bu nedenle biyoremediasyon uygulamalarının tek sağlık açısından da olumlu etkilerinin bulunduğu değerlendirilmektedir.

## SONUÇ

Biyoremediasyon uygulamaları hemen her gün yaşadığımız çevre felaketlerinin ve bunların olumsuz sonuçlarının bertarafında kullanılan yöntemler olarak görülmelidir. Biyoremediasyon yöntemleri, doğanın genellikle insan etkisiyle bozulmuş düzeninin, yeniden, uyum içinde, belki biraz uzun sürede; ancak daha az maliyetle, onarılma yöntemlerinden biridir. Sadece kirlenmiş alanların temizlenmesi açısından değil, bitki büyümesine katkısı, hayvanlarda yemden yararlanmayı artırması, nitrojen kökenli atığın temizlenmesi, CO<sub>2</sub> emisyonunun regüle edilmesi gibi yararları vardır. Sürdürülebilir, çevre dostu, ucuz ve doğaya salınan mikroorganizmalar tarafından insan gücü gerektirmeden kendi kendine çalışan bir sistemdir. Bu uygulamalar değerlendirildiğinde çevre, hayvan ve halk sağlığını bir bütün olarak ele aldığı için de tek sağlık kavramıyla oldukça uyumlu bir alandır. Gelecek yıllarda biyoremediasyon ve tek sağlık alanında daha çok çalışma yapılacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKÇA

- Adamia, G., Chogovadze, M., Chokheli, L., Gigolashvili, G., Gordeziani, M., Khatishashvili, G., Kurashvili, M., Pruidze, M. & Varazi, T. (2018). About possibility of alga *Spirulina* application for phytoremediation of water polluted with 2,4,6-trinitrotoluene. *Annals of Agrarian Science*, 16, 348–351.
- Amenaghawon, A. N., Osunbor, O. & Obahiagbon, K. O. (2014). Impact of Nutrients , Aeration and Agitation on the Bioremediation of Crude Oil Polluted Water Using Mixed Microbial Culture Full Length Research Paper Impact of Nutrients , Aeration and Agitation on the Bioremediation of Crude Oil Polluted Water Using Mi. *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*, 2, 43–48.

- Anning, A. K. & Akoto, R. (2018). Assisted phytoremediation of heavy metal contaminated soil from a mined site with *Typha latifolia* and *Chrysopogon zizanioides*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 97–104.
- Bina, B., Amin, M. M., Kamarehie, B., Jafari, A., Ghaderpoori, M., Karami, M. A., Teimouri, F. & Sadani, M. (2018). Data on biosurfactant assisted removal of TNT from contaminated soil. *Data in Brief*, 19, 1600–1604.
- Cardozo, M., De Almeida, J. S. F. D., De A Cavalcante, S. F., Salgado, J. R. S., Gonçalves, A. S., França, T. C. C., Kuca, K. & Bizzo, H. R. (2020). Biodegradation of organophosphorus compounds predicted by enzymatic process using molecular modelling and observed in soil samples through analytical techniques and microbiological analysis: A comparison. *Molecules*, 25, 1–21.
- Chen, C. C. & Chen, S.-N. (2001). Water Quality Management with *Bacillus* spp. in the High-Density Culture of Red-Parrot Fish *Cichlasoma citrinellum* x *C. synspilum*. *North American Journal of Aquaculture*, 63, 66–73.
- Coninx, L., Martinova, V. & Rineau, F. (2017). Mycorrhiza-Assisted Phytoremediation. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 83, pp. 127–188). Elsevier Ltd.
- Crisa, F., Genovese, M., Smedile, F., Russo, D., Catalfamo, M., Yakimov, M., Giuliano, L. & Denaro, R. (2016). Bioremediation technologies for polluted seawater sampled after an oil-spill in Taranto Gulf (Italy): A comparison of biostimulation, bioaugmentation and use of a washing agent in microcosm studies. *Marine Pollution Bulletin*, 106, 119–126.
- de Mendonça, H. V., Ometto, J. P. H. B., Otenio, M. H., Marques, I. P. R. & dos Reis, A. J. D. (2018). Microalgae-mediated bioremediation and valorization of cattle wastewater previously digested in a hybrid anaerobic reactor using a photobioreactor: Comparison between batch and continuous operation. *Science of the Total Environment*, 633, 1–11.
- El-gendy, N. S., Ali, H. R., El-Nady, M. M., Deriase, S. F., Yasser, M. M. & Roushdy, M. I. (2014). Effect of different bioremediation techniques on petroleum biomarkers and asphaltene fraction in oil-polluted sea water. *Desalination and Water Treatment*, 52, 7484–7494.
- El Gaidoumi, A., Doña-Rodríguez, J. M., Pulido Melián, E., González-Díaz, O. M., El Bali, B., Navío, J. A. & Kherbeche, A. (2019). Mesoporous pyrophyllite-titania nanocomposites: synthesis and activity in phenol photocatalytic degradation. *Research on Chemical Intermediates*, 45, 333–353.
- Elizondo-González, R., Quiroz-Guzmán, E., Escobedo-Fregoso, C., Magallón-Servín, P. & Peña-Rodríguez, A. (2018). Use of seaweed *Ulva lactuca* for water bioremediation and as feed additive for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *PeerJ*, 2018, 1–16.
- Esteve-nu, A., Caballero, A. & Ramos, J. L. (2001). Biological Degradation of 2, 4, 6-Trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 335–352.
- Funk, S. B., Crawford, D. L., Crawford, R. L., Mead, G. & Davis-Hoover, W. (1995). Full-scale anaerobic bioremediation of trinitrotoluene (TNT) contaminated soil - A US EPA SITE program demonstration. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 51–52, 625–633.
- Gentili, A. R., Cubitto, M. A., Ferrero, M. & Z, M. S. R. (2006). Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57, 222–228.
- Gökmen, F. (2019). toprak solucanı kullanımının ağır metal giderimine etkisi. *Journal of Agriculture*, 2, 92–99.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Caruso, G. & Cappello, S. (2014). Bioremediation (bioaugmentation/biostimulation) trials of oil polluted seawater: A mesocosm simulation study. *Marine Environmental Research*, 95, 28–38.
- Horemans, B., Breugelmans, P., Saeys, W. & Springael, D. (2017). Soil-Bacterium Compatibility Model as a Decision-Making Tool for Soil Bioremediation.
- Jasmin, M. Y., Syukri, F., Kamarudin, M. S. & Karim, M. (2020). Potential of bioremediation in treating aquaculture sludge: Review article. *Aquaculture*, 519, 734905.
- Kara, E. E., Taciroğlu, B. & Sak, T. (2016). Toprakta Ağır

- Metal Gideriminde Solucanların Kullanımı. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 19, 201–206.
- Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A., Singh, M., Joshi, D., Singh, J., Suyal, D. C., Kumar, A., Rajput, V. D., Yadav, A. N., Singh, K., Singh, J., Sayyed, R. Z., Arora, N. K. & Saxena, A. K. (2021). Beneficial microbiomes for bioremediation of diverse contaminated environments for environmental sustainability: present status and future challenges. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Laloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Görgens, J. & Gardiner, N. (2007). Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1471–1479.
- Ławniczak, Ł., Wo, M., Heipieper, H. J. & Łukasz C. (2020). Microbial Degradation of Hydrocarbons — Basic Principles for Bioremediation: A Review. *Molecules Review*, 25, 1–19.
- Lewis, T. A., Newcombe, D. A. & Crawford, R. L. (2004). Bioremediation of soils contaminated with explosives. *Journal of Environmental Management*, 70, 291–307.
- Li, Q., Guo, C., Hu, H. & Lu, J. (2022). Towards One Health: Reflections and practices on the different fields of One Health in China. *Biosafety and Health*, 4, 23–29.
- Liu, Y., Wang, W., Shah, S. B., Zanaroli, G., Xu, P. & Tang, H. (2020). Phenol biodegradation by *Acinetobacter radioresistens* APH1 and its application in soil bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 427–437.
- Lu, W., Asraful Alam, M., Liu, S., Xu, J. & Parra Saldivar, R. (2020). Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO<sub>2</sub> from livestock farms: A review. *Science of the Total Environment*, 716, 135247.
- Luminit, D., Sobariu, S., Ionela, D., Fertu, T., Diaconu, M., Vasile, L., Curteanu, S., Lenz, M., Hlihor, R., Niculina, E., Corvini, P. F. & Gavrilesu, M. (2017). Rhizobacteria and plant symbiosis in heavy metal uptake and its implications for soil bioremediation. *New Biotechnology*, 39, 125–134.
- Mahdi, A. M. El, Aziz, H. A., Amr, S. S. A., Sh, N. & Nassar, E. H. N. (2016). Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. NAF1 and its application in biodegradation of crude oil. *Environmental Earth Sciences*, 75, 1–11.
- Malaysiana, S., Bakteria, P., Dipencilkan, A., Sisa, A., Akuakultur, U., Pemulihan, A. B., Nitrogen, J. A., Nitrit, P., Fantroussi, E. & Fantroussi, E. (2015). Identification of Indigenous Bacteria Isolated from Shrimp Aquaculture Wastewater with Bioremediation Application: Total Ammoniacal Nitrogen (TAN) and Nitrite Removal. *Sains Malaysiana*, 44, 1103–1110.
- Manorama Thampatti, K. C., Beena, V. I., Meera, A. V. & Ajayan, A. S. (2020). *Phytoremediation of Metals by Aquatic Macrophytes*.
- Martinkosky, L., Barkley, J., Sabadell, G., Gough, H. & Davidson, S. (2017). Science of the Total Environment Earthworms (*Eisenia fetida*) demonstrate potential for use in soil bioremediation by increasing the degradation rates of heavy crude oil hydrocarbons. *Science of the Total Environment*, 580, 734–743.
- Mckew, B. A., Coulon, F., Yakimov, M. M., Denaro, R., Genovese, M., Smith, C. J., Osborn, A. M., Timmis, K. N. & Mcgenity, T. J. (2007). Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environmental Microbiology*, 9, 1562–1571.
- Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W. (2018). *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of Applied Microbiology*, 124, 1334–1346.
- Nuhoglu, A., & Yalcin, B. (2005). Modelling of phenol removal in a batch reactor. *Process Biochemistry*, 40, 1233–1239.
- Özcan, G. & Türkdoğan, İ. (2014). Askeri Alanlardaki Kirliliklerin Gideriminde Biyoremediasyon Teknikleri. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17, 31–36.
- Pacwa-Płociniczak, M., Czapla, J., Płociniczak, T. & Piotrowska-Seget, Z. (2019). The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of

- petroleum from soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 615–622.
- Rahiman, K. M. M., Jesmi, Y., Thomas, A. P. & Hatha, A. A. M. (2010). Probiotic effect of Bacillus NL110 and Vibrio NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 2010, 120–134.
- Rezaei, M. R., Abdoli, M. A., Karbassi, A., Baghvand, A. & Khalilzadeh, R. (2010). Bioremediation of TNT contaminated soil by composting with municipal solid wastes. *Soil and Sediment Contamination*, 19, 504–514.
- Rizwan, M., Ali, S., Zia ur Rehman, M., Rinklebe, J., Tsang, D. C. W., Bashir, A., Maqbool, A., Tack, F. M. G. & Ok, Y. S. (2018). Cadmium phytoremediation potential of Brassica crop species: A review. *Science of the Total Environment*, 631–632, 1175–1191.
- Romeh, A. A. (2020). Synergistic use of Plantago major and effective microorganisms, EM1 to clean up the soil polluted with imidacloprid under laboratory and field condition. *International Journal of Phytoremediation*, 22, 1515–1523.
- Samani, M. N., Jafaryan, H., Gholipour, H., Harsij, M. & Farhangi, M. (2016). Effect of different concentration of profitable Bacillus on bioremediation of common carp (*Cyprinus carpio*) pond discharge. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*, 2, 44–54.
- Sandøe, P., Palmer, C., Corr, S., Astrup, A. & Bjørnvad, C. R. (2014). Canine and feline obesity: A One Health perspective. *Veterinary Record*, 175, 610–616.
- Sayed, K., Baloo, L. & Sharma, N. K. (2021). Bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by Bioaugmentation and Biostimulation in Water with Floating Oil Spill Containment Booms as Bioreactor Basin. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 2226.
- Scalzo, A. M., Thompson, M. A., Holz, A. & Murray, W. (1998). Remediation of Explosives Contaminated Soils At Joliet Army Ammunition Plant via Windrow Composting. In US Army Corps of Engineers.
- Scherer, M. D., de Oliveira, A. C., Filho, F. J. C. M., Ugaya, C. M. L., Mariano, A. B. & Vargas, J. V. C. (2017). Environmental study of producing microalgal biomass and bioremediation of cattle manure effluents by microalgae cultivation. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 19, 1745–1759.
- Sitarek, M., Napiórkowska-Krzebietke, A., Mazur, R., Czarnecki, B., Pyka, J. P., Stawecki, K., Olech, M., Sołtysiak, S. & Kapusta, A. (2017). Application of effective microorganisms technology as a lake restoration tool a case study of muchawka reservoir. *Journal of Elementology*, 22, 529–543.
- Staninska-Pięta, J., Piotrowska-Cyplik, A., Juzwa, W., Zgoła-Grzeškowiak, A., Wolko, Ł., Sydow, Z., Kaczorowski, Ł., Powierska-Czarny, J. & Cyplik, P. (2019). The impact of natural and synthetic surfactants on bacterial community during hydrocarbon biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 142, 191–199.
- Talip, B. A., Zing, N. Z., Hairuddin, N. D., Mohamed, R. M. S. R., Muhammad, N., Basri, H., Abdullah, N., Kahar, E. E. M., Al-Gheethi, A. A. S. & Abdullah, S. (2019). Determination of physicochemical properties of formulated fish feed supplemented with microalgae from bioremediation process. *Jurnal Teknologi*, 81, 151–157.
- Tasho, R. P. & Cho, J. Y. (2016). Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. *Science of the Total Environment*, 563–564, 366–376.
- Tekere, M. (2013). Microbial Bioremediation and Different Bioreactors Designs Applied. *IntechOpen*, 32, 1–19.
- Wu, Y., Jing, X., Gao, C., Huang, Q. & Cai, P. (2018). Chemosphere Recent advances in microbial electrochemical system for soil bioremediation. *Chemosphere*, 211, 156–163.
- Yu, C., Wang, Y., Guo, T., Shen, W. & Gu, M. (2012). Isolation and Identification of Ammonia Nitrogen Degradation Strains from Industrial Wastewater. *Engineering*, 2012, 790–793.
- Zhu, B., Chen, S., Zhao, C., Zhong, W., Zeng, R. & Yang, S. (2019). Effects of *Marichromatium gracile* YL28 on the nitrogen management in the aquaculture pond water. *Bioresource Technology*, 292, 121917.