

## HAZIR VE ESKİ PETEKLERİN BAKTERİYOLOJİK VE MİKOLOJİK YÖNDEN İNCELENMESİ

### Isolation of Bacteria and Fungi from Combs and Foundations

Cüneyt ÖZAKIN<sup>1</sup>, Levent AYDIN<sup>2</sup>, İbrahim ÇAKMAK<sup>3</sup> ve Ender GÜLEĞEN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Uludağ Üniversitesi, Tıp Fak. Mikrobiyoloji A.D., Bursa-Turkey

<sup>2</sup> Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fak.Parazitoloji A.D., Bursa-Turkey

<sup>3</sup> Uludağ Üniversitesi, Mustafakemalpaşa MYO, Bursa-Turkey

**Özet:** Bu çalışmada Bursa ve Yalova yörelerinde yavru çürüklüğü şüpheli 24 farklı arılıktan alınan eski petek ile ticari firmalar tarafından üretilen 11 değişik marka hazır petekte insan ve arı sağlığına zararlı bakteriyel ve fungal mantar etkenlerin araştırılması amaçlanmıştır. Eski peteklerin tamamında şüpheli gözeneklerden alınan örnekler ve ticari temel peteklerin yıkama solüsyonları, Amerikan yavru çürüğü ve Avrupa yavru çürüğü etkenleri ve olası diğer etkenlerin izolasyonu açısından uygun ortamlarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üreyen farklı morfolojideki mikroorganizmalar gram boyama yöntemi ile incelendikten sonra CRYSTAL Sistemi (Becton Dickinson, Aalst, Belgium) ile teşhis edilmiştir. Eski peteklerin tamamında bir veya birden fazla bakteriyel ve fungal etkene rastlanırken, ticari peteklerin 6'sında (%54,5) etken izolasyonu yapılmış 5'inde (%45,5) herhangi bir etken tespit edilmemiştir. Etken izole edilen ticari temel peteklerin 5'inin (%83,3) bakteriler birinin (%16,7) fungal etkenler ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Eski peteklerde 14 bakteri türü (*Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megatarium*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium jekium*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus vitulus*, *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus vestibularis*) ve 4 mantar cins ve türü (*Aspergillus fumigatus*, *Candida spp.*, *Cladosporium corroni*, *Penicillium spp.*) teşhis edilmiştir. Bu etkenlerden *C. jekium* 9 örnekte rastlanmıştır. Ticari temel peteklerde 4 bakteri türü (*Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus epidermidis*) ve bir fungus cinsi (*Candida spp.*) saptanmış ve *B. subtilis* 2 örnekte tespit edilmiştir. İncelenen tüm örneklerde Amerikan yavru çürüğü etkeni *P.l alvei* ve Avrupa yavru çürüğü etkeni *M. Pluton* saptanmamıştır. Sonuçlar insan ve arı sağlığı yönünden değerlendirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Hazır petek, Eski petek, Bakteri, Mantar

**Abstract:** The goal of this study was to isolate bacteria and fungi sp. from 24 combs taken from different apiaries, and 11 commercial foundations and their effects on honeybee and human health in Bursa-Yalova provinces. Washing solutions, taken from suspected comb cells and commercial foundations for AFB, EFB causative agents *Paenibacillus alvei* and *Melissococcus pluton* and other agents, were incubated. After incubation, growing colonies with different morphologies were gram stained and diagnosed by CRYSTAL System (Becton Dickinson, Aalst, Belgium). All of the combs were contaminated with bacteria and fungi, only 6 (54.5%) of commercial foundations were contaminated, 5 of them, (45.5%) were not contaminated. From commercial foundations, 5 (83.3%) were with bacteria, and 1 (16.7%) were contaminated with fungi, 14 bacteria sp. (*Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megatarium*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium jekium*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus vitulus*, *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus vestibularis*) and 4 fungi sp. (*Aspergillus fumigatus*, *Candida spp.*, *Cladosporium corroni*, *Penicillium spp.*) isolated from combs and diagnosed. *C. jekium* was found in 9 samples, 4 bacteria sp. (*Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus epidermidis*) and 1 fungus genus (*Candida spp.*) was detected, *B. subtilis* was found in two samples. AFB causative agent *P.l alvei* and EFB *M.pluton* were not detected in any sample examined. The results were evaluated for honeybee and human health.

**Keywords:** Comb, Foundation, Bacteria, Fungi

### GİRİŞ

Balarılarının yavru hastalıkları arasında bakteriyel ve fungal (mantar) etkenlerden kaynaklananlar önemli bir yer tutmaktadır. Bu etkenlerden bazıları eski petek yada yeterince hijyene ve sterilizasyona dikkat edilmeden hazırlanan temel petekler yolu ile salgınlar oluşturabilmektedir (Zeybek 1991, Akkaya 1996). Özellikle bakteriyel hastalıklar içinde Amerikan ve Avrupa yavru çürüklüğü etkenleri arıcılıkta önemli

kayıplara yol açmakta ekonomiye ve arıcılığa büyük zarar vermektedir (Morse ve Nowogrodzki 1990, Bailey ve Ball 1991, Graham 1992, Hornitzky ve ark. 1996, Chantawannakul ve ark. 1998, Hornitzky 1998, Hansen ve Brodsgaard 1999). Şimşek ve Özcan (2001) Elazığ yöresinde 250 kovan örneğinde Avrupa yavru çürüğüne (EFB) sekonder etkenleri arasında yer alan *Paenibacillus alvei*'ye %3,2 olarak saptamışlar ancak özellikle EFB'nin ülkemizde varlığı iyi bilinmesine karşın konu

ile ilgili kapsamlı araştırma sonuçları bulunmadığına dikkat çekmişlerdir. Aydın ve ark. (1998) markalı ve markasız bal örneklerinde Amerikan yavru çürüklüğünü (AFB) izole etmişlerdir. Özkırım ve Keskin (2002) Ankara ili ve çevresindeki arılıklardan alınan petek örneklerinde AFB ve EFB'nin sekonder etkenleri ile Kireç hastalığı ve Taş hastalığının etkenlerini rapor etmişlerdir.

Bugüne kadar ülkemizde yavru hastalıklarının tespitine yönelik araştırmalar sınırlı sayıda bulunmakta diğer taraftan özellikle peteklerde bulunabilen sekonder etkenler gözardı edilmektedir. Sınırlı sayıda yapılan çalışmaların hemen hemen tamamı arıcılık ve arı sağlığı açısından ele alınmaktadır. Ülkemizde bal, süzme olduğu kadar petekli olarak insanlar tarafından tüketilmektedir. Bu nedenle bu çalışma ile arıcılık ve arı sağlığını tehdit eden bakteriyel ve fungus etkenlerinin araştırılması yanında insan sağlığı açısından zararlı olabilecek etkenlerin ortaya konması hedeflenmiştir.

#### ARAÇ VE YÖNTEM

Sahada yapılan incelemelerde klinik olarak yavru çürüğü hastalığı şüphesi olan 24 petek ile 11 ticari temel petek Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda mikrobiyolojik açıdan incelenmiştir. Hastalık belirtilerinin görüldüğü petek gözenekleri Tripticase Soy Broth (TSB) (BBL, BD, USA) ile yıkanarak elde edilen 3 ml'lik karışım steril olarak eşit hacimde üçe bölünmüştür (Bailey ve Ball, 1991).

Ticari olarak hazırlanmış olan ham petekler orijinal ambalajlarından steriliteye dikkat edilerek çıkarılmış ve 2x2 cm ebatında bir parça steril şartlarda kesilerek steril beher glass içinde 3 ml kadar TSB ile yıkanmış ve çalkalanarak TSB'un peteğin tüm yüzeyi ile temas etmesi sağlanmıştır. Elde edilen 3 ml'lik karışım steril olarak eşit hacimde üçe bölünmüştür.

Karışımın birinci bölümü BACTEC PLUS+Aerobic/F şişelerine inoküle edilerek BACTEC 9240 system (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) ile üreme açısından takibe alınmıştır. Üreme saptanan şişelerden %5 Koyun Kanlı Agar içeren plaklara (Bio Merieux, Fransa) azaltma yöntemi ile pasaj yapılmış ve 35°C'de normal atmosfer şartlarında inkübe edilmiş, ve üreme açısından 24., 48. ve 72. saatlerde değerlendirilmiştir.

Karışımın ikinci bölümü Benmari'de 80°C'de 30 dakika bekletildikten sonra mevcut sporlu bakterilerin yoğunlaşmasını sağlamak amacı ile 2500g de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra dipteki pellet TSB (BBL, BD, USA) besiyerine aktarılmıştır. Besiyeri 48 saat 36°C'de ve %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edilmiştir. Üreme besiyerinin bulanıklaşması ile tespit

edilmiş ve takiben %5 Koyun Kanlı Agar (Bio-Merieux, Fransa) besiyerine pasaj yapılmıştır. Besiyeri 36°C'de, %10 CO<sub>2</sub> de 48-72 saat inkübe edilmiştir. Oluşan bakteriler kolonisinden hazırlanan Gram boyalı preparatlar incelenmiştir. Gram boyalı preparatlarda gram pozitif basil olarak görülen mikro-organizmalar oluşturdukları hemoliz, nalidiksik asid duyarlılığı, katalaz, nitrat reduksiyonu, Voges-Proskauer, nişasta hidrolizi, jelatinin parçalanması, sitrat kullanımı ve manнитolden asit üretimi testleri de yapılarak AFB etkeni olan *P.I. larvae* açısından değerlendirilmiştir (Chantawannakul ve Dancer 2001, Schuch ve ark. 2001).

Karışımın üçüncü bölümü ise direkt %5 Koyun Kanlı Agara (Bio Merieux, Fransa) azaltma yöntemi kullanılarak ekilmiş ve plaklar jar içine yerleştirilmiştir. Jarda Campypack (Oxoid, USA) ile mikroareofilik ortam oluşturulmuş ve 35°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir.

%5 Koyun Kanlı Agar plakları inkübasyon süresinin sonunda üreme açısından gözle değerlendirilmiş. Plaklarda üreyen farklı morfolojideki koloniler hazırlanan preparatlar garm boyama yöntemiyle boyanarak incelenmiştir, BBL CRYSTAL Sistemi (Becton Dickinson, Aalst, Belgium) ile teşhisleri yapılmıştır (Dobbelaere ve ark. 2001).

Fungal etkenler, üredikleri besiyeri, koloni ve mikroskopik morfolojileri değerlendirilerek isimlendirilmiştir (Mitchell 1995).

#### BULGULAR

Ticari temel peteklerin 6'sında (%54,5) üreme saptanmış olup, 5'inde (%45,5) herhangi bir etken tespit edilmemiştir (Tablo 1). Etken izole edilen ticari temel peteklerin 5'i (%83,3) bakteri ile 1'i (%16,7) fungal etken ile bulaşık olarak bulunmuştur. *B. subtilis* 2 örnekte (%33,3) tespit edilmiştir.

Çalışmada incelenen eski peteklerin tamamında (%100) bir veya birden fazla bakteri ve fungal etkenlere rastlanmıştır olup Tablo 2. de sunulmuştur. Tespit edilen 14 bakteriden gram pozitif basil morfolojisinde 7, gram negatif basil morfolojisinde 1, gram pozitif kok morfolojisinde 6 farklı tür izole edilmiştir.

**Tablo 1: Ticari Temel Peteklerde (Ham) İzole edilen Etkenlerin Dağılımı**

Bakteri ve Fungus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>B. pumilus</i>	+										
<i>B. subtilis</i>							+			+	
<i>Stap. auricularis</i>					+						
<i>Stap. epidermidis</i>			+								
<i>Candida spp. *</i>									+		

\* Fungus

Tablo. 2: Kovanlardan Alman Eski Peteklerde İzole Edilen Etkenlerin Dağılımı

Bakteri ve Fungus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<i>B. brevis</i>							+																	+
<i>B. cereus</i>			+																		+		+	
<i>B. megatarium</i>																			+					
<i>B. sphaericus</i>						+																+		
<i>B. subtilis</i>																								
<i>C. bovis</i>																								
<i>C. jekium</i>	+				+			+	+	+	+		+	+	+			+						
<i>E. faecalis</i>																				+				
<i>M. luteus</i>				+																				
<i>P. mirabilis</i>																								+
<i>Stap. epidermidis</i>																		+						
<i>Stap. vitulus</i>																+								
<i>Stap. warneri</i>												+						+						
<i>Strep. vestibularis</i>		+																						
<i>A. fumigatus</i> *											+	+				+								
<i>Candida spp.</i> *																			+					
<i>C. corioni</i> *																								+
<i>Penicillium spp.</i> *																		+						

\* Fungus

İzole edilen 4 farklı fungal etkenden maya formunda 1, küf formunda 3 tür belirlenmiştir. Fungal etkenler arasında *Candida spp.* 3 petekte (%12,5) izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerden *E. faecalis* EFB'nin sekonder etkeni olarak sadece bir petekte saptanmıştır. *C. jekium* ise 10 ayrı petekte görülerek en sık izole edilen bakteri olmuştur (%41,6). Taş hastalığının etkenlerinden biri olan *A. fumigatus*'da sadece bir petekte saptanmıştır.

Bu çalışmada AFB ve EFB'nin asıl etkenleri olan *Paenibacillus larvae subsp. larvae* ve *Melissococcus pluton* tespit edilmemiştir.

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Eski peteklerden izole edilen mikro-organizmalar arasında AFB ve EFB'nin primer etkenlerine rastlanmamasına rağmen eski bir petekte EFB'nin sekonder etkenlerinden *E. faecalis*'in izole edilmiş olması bölgemizde EFB varlığını desteklemektedir (Hornitzky ve Smith 1998).

Eski peteklerden izole edilen etkenler gözden geçirildiğinde *B. cereus* ve *B. subtilis* (Zeybek 1991) tarafından sekonder EFB etkenleri arasında gösterilmesine karşın bu konuda başkaca bir yayına

rastlanmamıştır. Üç petekten izole edilen *B. cereus*, insan sağlığı açısından besin içindeki miktarı belirli bir düzeyin üzerine çıktığında ( $10^5$  cfu/ml) besin zehirlenmesine yol açmaktadır (Loga, Turnbull, 1999).

Eski peteklerden izole edilen *B. brevis*, *B. megatarium*, *B. sphaericus*, *B. subtilis* ve *C. bovis* doğada sıklıkla rastlanabilen etkenlerdir. Peteklere bulaşmaları tarlacı bal arıları tarafından gerçekleştirilmekte ancak enfeksiyona neden olmamaktadır. Eski peteklerden en sık izole edilen etken olan *C. jekium* özellikle bağışıklık sistemi zayıflamış insanlarda ciddi enfeksiyonlara yol açabilen bir etkidir. Normalde insan florasında bulunmayan bu etken dışarıdan alındığında; endokardit, osteomyelit, karaciğer absesi, peritonit, deri enfeksiyonları, pnömoni ve yara enfeksiyonlarına yol açar. Çok sayıda antibiyotiğe dirençli olması da tedaviyi güçleştirmektedir. *M. luteus*, *S. epidermidis*, *S. vitulus*, *S. warneri* ve *S. vestibularis* daha ziyade doğa kaynaklı olup elle de peteklere bulaştırılabilmektedir (Koneman ve ark. 1997).

Fungal etkenler arasında yer alan *A. fumigatus*, Taş hastalığı etkenlerinden biridir. Salgıladığı mikotoksinler arasında yer alan Aflatoksin (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> gibi çeşitler) hepatotoksik bir madde olup insan ve hayvanlar

için aynı zamanda kanserojendir (Zeybek 1991, Akkaya ve Vuruşaner 1996.). *Cladosporium corriani*, derideki çatlak ve yaralardan girdiğinde cilt altı mantar enfeksiyonlarına sebep olur. *Aspergillus spp.*, *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.* ve *Candida spp.* doğada bulunan mantarlardır. Bu etkenler kovanlara kolayca bulaşabilirler (Koneman ve ark. 1997). Ticari temel peteklerden izole edilen etkenler değerlendirildiğinde hepsinin doğada sık rastlanan ve elle bulaşabilen mikro-organizmalar olduğu görülmektedir (Funke ve Bernard 1999, Loga ve Turnbull 1999).

Elde edilen bulgular ışığında ticari temel peteklerde saptanan bakteriyel ve fungal etkenlerin eski peteklere göre sayıca daha az olması önemli bir sonuçtur. Ancak, saptanan etkenlerin elle bulaşmayı işaret etmesi, bu peteklerin hazırlanması ve paketlenmesi sırasında hijyenik tedbirlerin alınmasının ve işletmeye alınan ham balmumunun sterilizasyonuna dikkat edilmesinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Eski peteklerde, bu kadar çok bakteriyel ve fungal etkene rastlanması düşündürücüdür. AFB ve EFB'nin asıl etkenlerine rastlanmaması bunların yok olduğu anlamına gelmemeli ve bu konuda Türkiye genelinde çalışmalara devam edilmelidir. Özellikle arıcılar gerek kovan çalışmaları, gerekse petek nakilleri sırasında temizliğe dikkat etmelidir. Her kovan incelemesinden sonra arıcılar eldivenlerini ve el demirlerini sodalı su yada dezenfektan içeren solusyonlarla mutlaka muamele etmelidirler.

Peteklerden insan sağlığı açısından risk oluşturan mikro-organizmaların izole edilmiş olması dikkate alındığında şüpheli peteklerin bal hasadında kullanılmaması ve mümkünse her yıl veya iki yılda bir eski peteklerin değiştirilerek yeni petekler ile üretime gidilmesinin uygun olacağı ve sorunun çözümünde önemli olacağını belirtmekte yarar görülmektedir.

### Teşekkür

Bu çalışmada gerek hazır petek sağlamada ve gerekse şüpheli petekler konusunda arıcıların taleplerini bize ileterek yardımcı olan Uludağ Arıcılık Derneği Başkanı Mustafa Civan'a teşekkürü bir borç biliyoruz.

### KAYNAKLAR

- Akkaya, H., Vuruşaner, C. 1996. *Balarısı hastalıkları ve Zararlıları*. Teknik Yayınları, 131 p, İstanbul.
- Aydın, N., Bülbul, H., Bıyıkoğlu, G., Yaralı, C., Yavuz, MK. 1999 Kovanlardan ve Tüketime Sunulan Bal

Örneklerinde *Paenibacillus larvae*'nin İzolasyonu *Etlik Vet. Mikrob. Derg.* 10 (1): 93-100.

- Bailey, L., Ball, BV. 1991. *Honey Bee Pathology*, Academic Pres, 53-62.
- Chantawannakul, P., and Dancer, B.N. 2001. American foulbrood in honey bees. *Bee World* 82(4):168-180.
- Dobbelaere, W., De Graaf, DC., Peeters, JE., Jacobs, FJ. 2001. Comparison of two commercial kits for biochemical characterization of *Paenibacillus larvae* larvae in diagnosis of AFB. *Journal of Apicultural Research* 40(1):37-40.
- Funke, G., Bernard, KA. 1999. Coryneform Gram-Positive Rods. In *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC. Eds: Murray, PR., Barron, E.J., Ptaller, M.A., Tenover, F.C., Yolkan, R.H.
- Graham, J.M.1992. The Hive and The Honey Bee. Dadant and Sons, Hamilton, Illinois.
- Hansen, H., and Brodsgaard, C.J. 1999. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World* 80(1):5-23.
- Hornitzky, M.A.Z. 1998. The spread of *Paenibacillus larvae subsp. larvae* infections in an apiary. *Journal of Apicultural Research* 37(4) 261-265.
- Hornitzky, M.A.Z., and Smith, L. 1998. Procedures for the culture of *Melissococcus pluton* from diseased brood and bulk honey samples. *Journal of Apicultural Research*. 37(4):293-294.
- Hornitzky, M., Oldroyd, B.P., and Somerville, D. 1996. *Bacillus larvae* carrier status of swarms and feral colonies of honeybees (*Apis mellifera*) in Australia. *Australian Veterinary Journal*. 73(3):116-117.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C. 1997. *Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5. Ed. Lippincott Philadelphia.
- Loga, N.A., Turnbull, P.C. 1999. *Bacillus and Recently Derived*. Eds. Murray, PR., Barron, E.J., Ptaller, M.A., Tenover, F.C., Yolkan, R.H. Manual of clinical microbiology. American society for microbiology.
- Mitchell T.G. 1995. Medical Mycology. In *Medical Microbiology* 22th ed. McGraw-Hill North America Eds: Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A.
- Morse, R.A., Nowogrodzki 1990. *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*, 2nd Ed: Cornell University Press 64-91
- Özkırım, A., Keskin, N. 2002. Ankara İli ve Çevresindeki Arılıklarda Teşhis Edilen Başlıca Yavru Hastalıklarının Dağılımı. *Mellifera*, 2-4: 8-12.
- Schuch, D.M.T., Madden, R.H., and Statler, A. 2001. An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey. *Journal of Apicultural Research* 40(2):59-64.
- Şimşek, H., Özcan, C. 2001. Elazığ ve Yöresinde Bulunan Arı işletmelerinde Avrupa Yavru Çürüklüğü Hastalığının Araştırılması. *Türk J. Vet. Anim. Sci.* (25):929-932.
- Zeybek, H. 1991. *Arı Hastalıkları ve Zararlıları*. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü s. 96, Ankara.