T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BAL ARISINDAN (*Apis mellifera*) İZOLE EDİLEN BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN VE POTANSİYEL PROBİYOTİK ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Şeyma SUYABATMAZ

Danışman
Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

RİZE
2022

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında, Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU danışmanlığında, Şeyma SUYABATMAZ tarafından hazırlanan *Bal Arısından (Apis mellifera) İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Özelliklerinin ve Potansiyel Probiyotik Etkinliklerinin Belirlenmesi* adlı bu tez çalışması, 07/07/2022 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği/oy çokluğuyla başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**Unvanı, Adı SOYADI**	**İmza**
Başkan	: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU	
Üye	: Doç. Dr. Meral KEKEÇOĞLU	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Yeşim AKTÜRK DİZMAN	

ETİK BEYAN

Biyoloji Yüksek Lisans Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim "Bal Arısından (*Apis mellifera*) İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Özelliklerinin ve Potansiyel Probiyotik Etkinliklerinin Belirlenmesi" adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılacak bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.
07/07/2022

Şeyma SUYABATMAZ

ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasında sağlıklı bal arısı mikroflorası ile ilişkili bakteri toplulukları ve bu topluluklar içinde önemli bir yer kaplayan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, geleneksel ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu, hem arı sağlığı üzerindeki etkinliği hem de insan kullanımına sunulabilecek potansiyel probiyotik nitelikleri araştırılmış ve çalışma sonuçları ikisi SCIE olmak üzere üç adet yayınla literatüre kazandırılmıştır.

Öğrenimim boyunca her konuda yardımcı olan, deneyimlerini ve bilgisini hiçbir koşulda esirgemeyen, inancını, varlığını ve güçlü karakterini her daim yanı başımda hissettiğim, birlikte çalışmaktan onur duyduğum, öğrenme ve öğretme sevdalısı değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yeşim AKTÜRK DİZMAN'a ihtiyaç duyduğumuz her an verdiği destek ve öğretilerinden ötürü teşekkür ederim. Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü, Arı Laboratuvarı sorumlusu Sayın Vet. Dr. Rahşan AKPINAR'a ve ekibine numune temini ve tüm değerli katkılarından dolayı çok teşekkür ederim. Larva deneyi aşamasında her türlü yardım, ekipman ve metodu bizlerle paylaşan Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Zootekni Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Ahmet GÜLER'e ve ekibine teşekkürlerimi sunarım. Keyifle ekip ruhuyla çalıştığımız anlar için sevgili arkadaşlarım Dr. Arif BOZDEVECİ ve Sinem VATANDAŞLAR'a teşekkür ederim.

Tüm yaşantım boyunca olduğu gibi bu süreçte de benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her daim arkamda olan sevgili annem "Fatma", babam "Sultan" ve biricik kardeşim "Serra" ya sonsuz teşekkürler...

"Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü birimince desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2019-1058"

Şeyma SUYABATMAZ

2022/Rize

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY I
ETİK BEYAN II
ÖN SÖZ III
İÇİNDEKİLER IV
ÖZET VIII
ABSTRACT IX
KISALTMALAR X
TABLOLAR LİSTESİ XI
ŞEKİLLER LİSTESİ XII
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 3
1.1. Literatür Özeti 4
1.2. Bal Arısı (*Apis mellifera*) 9
1.2.1. Genel Özellikleri 9
1.2.2. Bal Arısı Gastrointestinal Sistemi 11
1.2.2.1. Kursak (Bal Midesi) 11
1.2.2.2. Orta Bağırsak (Gerçek Mide/Ventrikulus) 12
1.2.2.3. Arka Bağırsak (İnce Bağırsak ve Rektum) 12
1.2.3. Bal Arısı Mikrobiyotası 13
1.2.3.1. Genel Özellikleri 13
1.2.3.2. Mikrobiyota Edinim Yolları 15
1.2.3.3. Mikrobiyotanın Arı Sağlığındaki Önemi 17
1.2.3.4. Mikrobiyotada Laktik Asit Bakterilerinin Kolonizasyonu 18
1.2.4. Bal Arısı Hastalıkları 19
1.3. Laktik Asit Bakterileri 23
1.3.1. Genel Özellikleri 25
1.3.2. Taksonomik Sınıflandırılması 26
1.3.3. Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriyofaj Varlığı 28
1.3.3.1. Bakteriyofajların Genel Özellikleri 28
1.3.3.2. LAB Bakteriyofajları 29

1.3.4. Probiyotik Olarak Laktik Asit Bakterileri 30
1.4. Probiyotik Mikroorganizmalar 31
1.4.1. Genel Özellikleri 31
1.4.2. Probiyotiklerin Seçilim Kriterleri 34
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR 38
2.1. Materyal 38
2.1.1. Çalışma Grubu 38
2.1.2. Araçlar ve Gereçler 38
2.1.3. Kimyasallar ve Besiyerleri 39
2.1.3.1. De Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) Agar ve Sıvı Besiyeri 39
2.1.3.2. MYPGP Agar ve Sıvı Besiyeri 39
2.1.3.3. Mueller-Hinton Agar (MHA) ve Sıvı Besiyeri 40
2.1.3.4. Potato Dextrose (PDA) Agar ve Sıvı Besiyeri 40
2.1.3.5. Brucella Agar ve Sıvı Besiyeri 40
2.1.3.6. Brain Heart Infusion (BHI) Kanlı Agar 40
2.1.3.7. Kromojenik Selektif Besiyerleri 41
2.1.3.7.1. Proteaz Besiyeri 41
2.1.3.7.2. Lipaz Besiyeri 41
2.1.3.7.3. Amilaz Besiyeri 41
2.1.3.7.4. Jelatinaz Besiyeri 42
2.1.3.7.5. Sitrat Besiyeri 42
2.1.3.7.6. Selülaz Besiyeri 42
2.1.3.7.7. Lesitinaz Besiyeri 43
2.1.3.7.8. Eskülin Sıvı Besiyeri 43
2.1.3.7.9. Fermentasyon Besiyeri 43
2.1.3.7.10. TMB-Plus Besiyeri 44
2.1.4. Kullanılan Solüsyonlar ve Ayraçlar 45
2.1.4.1. Gram Boyama Solüsyonları 45
2.1.4.2. Katalaz Testi 45
2.1.4.3. Oksidaz Testi 45
2.1.4.4. PBS Solüsyonu 46

2.1.5. İndikatör Bakteri Suşları 46
2.2. Metod 47
2.2.1. Numunelerin Temini ve Kültürasyonu 47
2.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Saflaştırılması ve Stoklanması 47
2.2.3. Bakteriyofaj İçeriklerinin Belirlenmesi 48
2.2.3.1. Bakteriyofaj İndüksiyonu 48
2.2.3.2. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması 48
2.2.4. Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi 49
2.2.4.1. Gram Boyama 49
2.2.4.2. Katalaz Testi 49
2.2.4.3. Oksidaz Testi 49
2.2.4.4. Proteaz Üretimi 50
2.2.4.5. Lipaz Üretimi 50
2.2.4.6. Amilaz Üretimi 50
2.2.4.7. Selülaz Üretimi 50
2.2.4.8. Lesitinaz Üretimi 51
2.2.4.9. Jelatinaz Üretimi 51
2.2.4.10. Sitrat Testi 51
2.2.4.11. Eskulin Hidrolizi 52
2.2.4.12. Hidrojen Peroksit Üretimi 52
2.2.4.13. Karbonhidrat Fermantasyonu 52
2.2.4.14. Düşük ve Yüksek Sıcaklıkta Üreme 53
2.2.5. Moleküler Tanımlama 53
2.2.5.1. Genomik DNA İzolasyonu 53
2.2.5.2. Genomik DNA'nın Agaroz Jelde Yürütülmesi 54
2.2.5.3. 16S rRNA Geninin PZR ile Amplifikasyonu 54
2.2.5.4. Verilerin Biyoinformatik Analizi 55
2.2.6. Antimikrobiyal Aktivite 55
2.2.6.1. İndikatör Patojenlerin Kültürasyonu 55
2.2.6.2. Agar Plug Difüzyon Metodu 56
2.2.6.3. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu 56

2.2.6.4. *P. larvae*'ya Karşı Sporisidal Etkinlik 57
2.2.7. Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi 58
2.2.7.1. Safra Toleransı 58
2.2.7.2. pH Toleransı 59
2.2.7.3. Otoagregasyon Yeteneği 59
2.2.7.4. Koagregasyon Yeteneği 60
2.2.7.5. Hemolitik Aktivite 61
2.2.7.6. Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi 61
2.2.8. Profilaktik Etkinliğin Belirlenmesi 62
2.3. Bulgular 64
2.3.1. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri 64
2.3.2. İzolatlarda Bakteriyofaj Taraması 70
2.3.3. İzolatların Moleküler Tanımlanması 71
2.3.3.1. *Apilactobacillus* Suşlarının Tanımlanması 73
2.3.3.2. *Fructobacillus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus* Suşlarının Tanımlanması 75
2.3.4. İzolatlarda *in vitro* Antimikrobiyal Etkinliğin Belirlenmesi 75
2.3.5. İzolatların Probiyotik Özelliklerinin Değerlendirilmesi 81
2.3.5.1. İzolatların Safra ve Asidik pH Direnci 81
2.3.5.2. İzolatların Agregasyon Özellikleri 86
2.3.5.3. İzolatların Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi 87
2.3.6. İzolatların *in vivo* Profilaktik Etkinliğinin Değerlendirilmesi 89
3. TARTIŞMA ve SONUÇLAR 91
KAYNAKÇA 113

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Ana Bilim Dalı : Biyoloji
Tez Türü : Tezli Yüksek Lisans
Danışman : Prof. Dr. Şengül Alpay Karaoğlu
Hazırlayan : Şeyma Suyabatmaz
Yıl : 2022
Sayfa Sayısı : 147

ÖZET

BAL ARISINDAN (*Apis mellifera*) İZOLE EDİLEN BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN VE POTANSİYEL PROBİYOTİK ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışma, bal arısı *Apis mellifera* işçileri ve larvalarından izole edilen *Apilactobacillus kunkeei, Fructobacillus fructosus, Leuconostoc mesenteroides* ve *Enterococcus faecium* suşlarının detaylı olarak karakterizasyonunu ve fonksiyonel probiyotik özelliklerinin belirlenmesini amaçlamaktadır. İzole edilen toplam 16 suş morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre ve 16S rRNA gen analizi ile tanımlanmıştır. Suşların sindirim koşullarına tolerans, agregasyon yeteneği, antibiyotik direnç profili, profilaktik aktivite gibi ön probiyotik özellikleri araştırıldı. Probiyotik canlı hücre ve postbiyotik kaynaklı antimikrobiyal özellikler, çok çeşitli insan-gıda patojenlerine ve bal arısı hastalık etkeni bakterilere karşı test edildi. Elde edilen 72 saatlik hücresiz supernatantların *Paenibacillus larvae*'nin endospor çimlenmesi üzerine inhibisyon etkisi Bioscreen C tekniği kullanılarak belirlendi. γ-hemoliz gösteren ve bakteriyofaj içermeyen tüm suşlar güvenli kabul edildi. %0.3 safra ve pH 3.0 ve 7.8 ortamında suşların hayatta kalma oranları ve 4 saatlik otoagregasyon değerleri umut vericiydi. Test edilen suşlar, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ve *P. larvae* ile belirgin bir şekilde koagregasyon sergiledi. Larvada (900 adet) kontrollü olarak *P. larvae* spor formuna karşı profilaktik etkisi test edilen suşların enfeksiyonu büyük ölçüde önleyemediği gözlendi.

Test edilen bakteriler patojenlere karşı önemli antagonistik etkiler ve *in vitro* gastrointestinal sistem koşullarıyla uyumlu pozitif probiyotik özellikler sergilemiştir. Sonuçlar, laktik asit bakterilerinin *Apis mellifera* ortakyaşarları olarak probiyotik potansiyele sahip olabileceğini ve ayrıca insan kullanımına etkili ve güvenli adaylar olarak önerilebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Apis mellifera*, bal arısı larvası, laktik asit bakterileri, antimikrobiyal aktivite, probiyotik özellikler

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies
Department : Biology
Thesis Type : Master Thesis
Supervisor : Prof. Şengül Alpay Karaoğlu
Author : Şeyma Suyabatmaz
Year : 2022
Pages : 147

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL PROPERTIES AND POTENTIAL PROBIOTIC ACTIVITIES OF SOME LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM HONEY BEE (*Apis mellifera*)

This study aims to identify *Apilactobacillus kunkeei*, *Fructobacillus fructosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus faecium* strains isolated from honeybees (*Apis mellifera* workers and larvae) in detail and to determine their functional probiotic properties. A total of 16 strains were identified according to their morphological and biochemical characteristics and by 16S rRNA gene analysis. Preliminary probiotic properties of the strains such as tolerance to digestive conditions, aggregation ability, antibiotic resistance profile, and prophylactic activity were investigated. Probiotic live cell and derived postbiotic antimicrobial properties were tested against a wide range of human-food pathogens and honeybee disease-causing bacteria. Several human-food pathogens as well as bacteria causing honey bee disease have been tested for antimicrobial properties of probiotic live-cell extracts and postbiotics. The inhibition effect of the obtained 72 h cell-free supernatants on endospore germination of *Paenibacillus larvae* was ascertained using the Bioscreen C technique. All strains that showed γ-hemolysis and did not contain bacteriophages were considered safe. The survival rates in 0.3% bile and pH 3.0 and 7.8 medium and 4-hour autoaggregation values of the strains were promising. There was a marked coaggregation between the strains and *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *P. larvae*. It was observed that the strains whose prophylactic effect was tested against the spore form of *P. larvae* in 900 larvae could not prevent infection.

The tested bacteria showed significant antagonistic effects against pathogens and positive probiotic properties consistent with *in vitro* gastrointestinal tract conditions. The results present that lactic acid bacteria may have probiotic potential as *Apis mellifera* symbionts and also be recommended as effective and safe candidates for human use.

Keywords: *Apis mellifera*, honeybee larvae, lactic acid bacteria, antimicrobial activity, probiotic properties

KISALTMALAR

µg	:	Mikrogram
AvYÇ	:	Avrupa Yavru Çürüklüğü
AYÇ	:	Amerikan Yavru Çürüklüğü
BHI	:	Brain-Heart Infusion
BLAST	:	Basic Local Alignment Search Tool
CFS	:	Cell Free Supernatant
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
ERIC	:	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
FAO	:	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FLAB	:	Fruktofilik Laktik Asit Bakterisi
GİS	:	Gastrointestinal Sistem
GRAS	:	Generally Recognized As Safe
KOB	:	Koloni Oluşturan Birim
LAB	:	Laktik Asit Bakterisi
MEGA	:	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MHA	:	Müeller Hinton Agar
MRS	:	De Man, Rogosa, Sharpe
MYPGP	:	Malt Yeast Peptone Glucose
NCBI	:	Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi
PDA	:	Potato Dextrose Agar
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	:	Ribonükleik asit
rRNA	:	Ribozomal Ribonükleik Asit
SOB	:	Spor Oluşturan Birim
TAE	:	Tris-Asetat-EDTA
TE	:	Tris-EDTA
TMB	:	Tetrametilbenzidin

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Bilinen en yaygın bal arısı hastalıkları ve etkenleri 20
Tablo 2. Laktik asit bakterileri 27
Tablo 3. Probiyotik olarak belirtilen mikroorganizmalar 33
Tablo 4. Çalışma süresince kullanılan mikroorganizmalar 47
Tablo 5. Test edilen antibiyotikler, kısaltmaları, doz içerikleri ve direnç aralıkları . 62
Tablo 6. Larva üzerinde profilaktik etkilerin değerlendirildiği deneme modeli 63
Tablo 7. Çalışılan örneklerin nihai sayısı, kodları, alındıkları yerler ve orijinleri 64
Tablo 8. İzolatların morfolojik, biyokimyasal ve üreme özellikleri 69
Tablo 9. Karbonhidrat fermentasyon özellikleri 70
Tablo 10. *Apilactobacillus* suşlarının 16S rRNA gen benzerlikleri 74
Tablo 11. *Fructobacillus, Leuconostoc* ve *Enterococcus* suşlarının 16S rRNA gen benzerlikleri 75
Tablo 12. Agar plug difüzyon metodu ile antimikrobiyal etkinlik 77
Tablo 13. CFS'lerin agar kuyucuk difüzyon metodu ile antimikrobiyal etkinliği 78
Tablo 14. LAB suşlarının 48 saat sonunda üreme miktarı, ... 82
Tablo 15. LAB suşlarının otoagregasyon değerleri 86
Tablo 16. LAB suşlarının koagregasyon değerleri 87
Tablo 17. Suşların disk difüzyon metoduna göre antibiyotik direnç profilleri 88
Tablo 18. LAB suşlarının larval sağlığa ve *P. larvae* enfeksiyonuna etkileri 90

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Bal arısı yaşam döngüsü 10
Şekil 2 .Petek hücresinde yumurta, larva ve pupa görünümü 11
Şekil 3. Ergin bal arılarında bakterilerle etkileşim yolları 16
Şekil 4. Laktik asit bakterilerinin bulunduğu ortamlar ve sağlık üzerine etkileri 24
Şekil 5. Liçi ve mangosteen meyvesi orijinli ticarileştirilmiş probiyotik maya *S. boulardii* 36
Şekil 6. Agar plug kesimi yapılan petri örnekleri 56
Şekil 7. CFS dağıtılan Bioscreen C petek plak görünümü 58
Şekil 8. *Enterococcus, Fructobacillus, Leuconostoc* ve *Apilactobacillus* suşlarının mikroskop görüntüleri 65
Şekil 9. Laktik asit bakterilerinin petri görüntüleri 65
Şekil 10. Çeşitli kromojenik testler ve hemolitik aktivite görüntüsü 66
Şekil 11. Karbonhidrat fermentasyon, nişasta ve eskülin hidroliz testleri 67
Şekil 12. 48 s LAB kültivasyonu sonunda MRS besiyerindeki pH değişimi 68
Şekil 13. Bakteriyofaj plak görüntüsü 71
Şekil 14. LAB DNA'larından PZR ile spesifik bölgelerin çoğaltılması ve jel elektroforezinde moleküler markır ile görünümleri 72
Şekil 15. LAB suşlarının filogenetik ağacı 73
Şekil 16. *P. larvae* ve *P. alvei*'ye karşı LAB suşlarının antagonist etkinlikleri 76
Şekil 17. Suşların bazı antimikrobiyal etkinlik zon çapları 79
Şekil 18. *P. larvae* sporlarının CFS varlığında 18 s'lik çimlenme aktivitesi 80
Şekil 19. LAB lizatlarının agar kuyucuk metoduyla sporosidal etkinlikleri ve *P. larvae*'nin makroskobik ve mikroskobik görünümleri 81
Şekil 20. Suşların 48 s sonunda asidik ve alkali pH ile safra ortamında üreme aktivitelerinin grafiksel görünümleri 83
Şekil 21. Suşların %0.3 safra ortamında kontrol grupları ile üreme aktiviteleri-1 84
Şekil 22. Suşların %0.3 safra ortamında kontrol grupları ile üreme aktiviteleri-2 85
Şekil 23. Deneme modeli üzerinde AYÇ hastalık tanısı konulan larva örneği 90

GİRİŞ

Son yıllarda bal arısı popülasyonlarındaki düşüş bal arısını birçok bilimsel araştırmaya tabi kılmıştır. Antibiyotiğe dirençli bakterilerden parazitik Varroa akarlarına kadar çeşitli patojenler ve çevresel stres faktörleri arı sağlığını ciddi ölçüde tehdit etmektedir (Mudroňová vd., 2011). Hastalıklara karşı antibiyotikler ile desteklenmiş uygulamalar bakteri direncine ve arı ürünlerinde kalıntıya yol açmaktadır (Mutinelli, 2003). Bu nedenle arıcılıkta antibiyotiklerin kullanımı başta Avrupa Birliği olmak üzere yasal olarak pek çok ülkede yasaklanmıştır. Türkiye'de de özellikle *Paenibacillus larvae*'ya karşı bakanlık tarafından ruhsat verilmiş bir preparat henüz bulunmamaktadır. Bu durum, hastalıklara karşı mücadelede gıda güvenliğini ve koloni sağlığını güvence altına alacak alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılmasını zorunlu hale getirmektedir.

İlaç kullanmadan uygulanabilecek en verimli tedavi olanaklarından biri, probiyotiklerin veya diğer doğal maddelerin uygulanmasıdır. Yararlı simbiyontların, biyolojik etkilerinin organizma veya çevresel riskler üzerinde bilinen bir yan etkisi yoktur. Bu bilgiler, simbiyontların özellikleri ve genel işleyişleri hakkında geniş araştırmalar yapılabileceğinin bir göstergesidir.

Bu tezin nihai hedefi, bal arısındaki koruma mekanizmalarından ve değeri giderek artan üstün probiyotik özelliklere sahip suşların araştırılma ihtiyacından yola çıkarak, toksin üretmeyen, test edilen pH aralığında üreyebilen, safra tuzlarına dirençli, bakteriyofajlara karşı dirençli, patojenik bakterilere karşı antagonist etkili, güçlü antibakteriyel etkili potansiyel probiyotik suşların belirlenmesidir. Bu bağlamda bal arısı mikroflora üyesi laktik asit bakterilerinin geleneksel ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, potansiyel probiyotik işlevlerinin safraya, mide pH'sına ve ince bağırsak pH'sına tolerans, non-hemolitik aktivite, etkili agregasyon ve patojen mikroorganizmalarla koagregasyon yeteneği bakımından araştırılması, çeşitli enzimatik testlerinin kromojenik yöntemlerle araştırılması ve antimikrobiyal etkinlik düzeylerinin geniş ölçekli şekilde bir dizi insan patojeni ve arı patojenine karşı agar difüzyon testleri ve Bioscreen mikrobiyal gelişim izleme teknikleriyle test edilmesi buna ilaveten üstün bir koruma niteliği vadediyorsa arı hastalıklarının önlenmesinde veya tedavisinde etkili bir profilaktif veya biyoterapötik ajan olarak

kullanılabilirliğinin kontrol edilmesi açısından *in vivo* koşullarda yetiştirilen canlı larva üzerinde bakteriyel preparatların takviye gıda olarak uygulanması bu tezin araştırma sahasını oluşturmaktadır.

1. GENEL BİLGİLER

Doğada tozlaşma olayı (polinasyon) bitki çeşitliliğine bağlı olarak su, rüzgar gibi abiyotik faktörler ile veya başta arılar olmak üzere çeşitli böcekler, kuşlar, yarasalar gibi canlılar aracılığıyla biyotik faktörler aracılığıyla sürdürülmektedir. Dünya genelinde yetiştirilen mahsullerin bir çoğu, böcek tozlaşmasına bağlıdır. Binlerce yıldır doğada özel bir rol oynayan bal arıları biyolojik çeşitliliğin sürekliliğini sağlayarak temel tozlaşma aracı görevini üstlenir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), dünya çapında gıdanın %90'ını sağlayan 100 mahsul türünden 71'inin sadece arılar tarafından tozlaştırıldığını belirtmektedir. Bununla birlikte, bal arıları denilince akla ilk gelen işlevlerden biri, bal üretimidir. Toplanan ve kovana taşınan nektarlardan üretilen bal, arılar için önemli bir ana besin kaynağı olmakla birlikte insanlar da bu değerli besini eski zamanlardan beri tüketmiş, geleneksel tıpta balı ve diğer arı mahsullerini çeşitli uygulamalara tabi tutmuştur. Bu mucizevi besinin üretiminde ve arı sağlığında bal arısı mikroflorasında ve kovanda bulunan laktobasil ve bifidobakteri türlerinin varlığı etkin rol oynamaktadır (Olofsson ve Vásquez, 2008; Bonilla-Rosso vd., 2018; Karaman, 2018).

Canlılarda mikrobiyal flora, konağın fizyolojisi ve sağlığında son derece önemli bir rol oynar. Hayvan bağırsakları birçok mikroorganizma tarafından kolonize edilir ve bu mikroorganizmalar hem tür hem de sayı bakımından farklılık gösterir. Bu mikroorganizmalar arasında baskın bağırsak florası olan laktik asit bakterileri (LAB) ve bifidobakteriler dünya çapında ilgi odağı olmuş durumdadır. Çalışmalar, LAB ve bifidobakterilerin normal bağırsak florasını düzenleyebildiğini ve canlının savunma mekanizmasına çeşitli katkıları olduğunu göstermiştir. Araştırmalar bal arısı mikroflorasında bulunan simbiyotik bakterilerin, bal arılarını patojenlere karşı koruyan antimikrobiyal özellikli ve terapötik açıdan oldukça önemli sayısız biyoaktif metabolit ürettiklerini ortaya koymaktadır. Belirtilen özelliklerin arkasındaki etki mekanizmalarının çalışmalar yoluyla anlaşılması, mevcut antibiyotiklere ve probiyotiklere alternatif oluşturacak yeni mikroorganizma türlerinin bilime kazandırılması açısından oldukça önemlidir (Olofsson ve Vásquez, 2008; Gaggìa vd., 2017; Muñoz vd., 2011).

1.1. Literatür Özeti

Laktik asit bakterilerinin arı mikroflorasındaki varlığına ve insan sağlığındaki önemine odaklanan çok sayıda çalışma vardır.

Vergalito vd. (2020), bir çalışmada probiyotik olarak kullanımda güvenli statüleri ile tanınan laktik asit bakterilerinin (LAB) bir alt grubu olan fruktofilik laktik asit bakterisi (FLAB) *Apilactobacillus (Lactobacillus) kunkeei*'yi, bal arılarının sağlığı üzerinde kanıtlanmış faydalı etkileri olan bir böcek simbiyotu olarak ele almıştır. Bu bakterinin geleneksel olarak insan beslenmesinin bir parçası olduğu ve kovan ürünlerinden tekrarlayan izolasyonu olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle *A. kunkeei* insan probiyotiği olarak kullanımı araştırılmıştır. Arı ekmeği ve bal arısı bağırsağından izole edilen üç *A. kunkeei* suşu ile ilgili veriler; faydalı enzimlerin (β-glukozidaz, β-galaktosidaz ve lösin arilamidaz) varlığı, düşük antibiyotik direnci, şeker şurubunun probiyotikasyonu ve *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* gibi patojenleri inhibe edilme yeteneği gibi bazı önemli özellikleri vurgulamaktadır.

Mudroňová vd. (2011), sağlıklı bal arısı sindirim kanalından laktobasilleri izole etmek ve bunları *Paenibacillus larvae*'ya karşı kullanmak amacıyla farklı sindirim sistemi örnekleri (bağırsak, mide ve rektal kese) üzerinde bir çalışma yürütmüştür. Laktobasil izolatlarının büyüme özellikleri incelenmiş, *P. larvae*'ya karşı antibakteriyel aktiviteleri ve organik asitlerin üretimi test edilmiştir. Agar kuyucuk difüzyon testinin sonucunda 17 izolat zayıf inhibisyon etkisi, 7 izolat orta inhibisyon etkisi, 3 izolat kuvvetli inhibisyon etkisi göstermiştir. Kuvvetli inhibisyon etki gösteren suşlardan ikisi *Lactobacillus brevis* bir tanesi *Lactobacillus plantarum* olarak tanımlanmıştır. Homofermentatif *L. plantarum*'un, yüksek konsantrasyonda laktik asit, düşük konsantrasyonda asetik asit, asetoasetik asit ve propiyonik asit ürettiği; heterofermentatif *L. brevis*'in asetik asit, laktik asit ve asetoasetik asit ürettiği gösterilmiş olup tüm bu özellikler, bal arılarındaki *P. larvae* enfeksiyonunun önlenmesi açısından laktobasillerin kullanımının uygun olduğunu desteklemiştir.

Audisio vd. (2011), tarafından işçi bal arıları üzerinde yapılan çalışmada sekiz adet *Lactobacillus* spp. ve beş adet *Enterococcus* spp. suşu bağırsaklardan izole edilmiştir. 16S rRNA dizilimine dayalı çalışmalar dört suşun *Lactobacillus johnsonii* ile %99 benzerliğe sahip olduğunu, SM21 suşunun ise *E. faecium* ile %99 benzerlik

gösterdiğini ortaya koymuştur. *L. johnsonii* suşlarının yüksek laktik asit üreticisi oldukları, %77 ila %93 arasında otoagregasyon gösterdikleri ve *in vitro* olarak insan ve gıda kaynaklı patojenleri (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* C1, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*) ve Amerikan Yavru Çürüklüğü ajanı *P. larvae*'yı inhibe ettikleri saptanmıştır. Ayrıca *E. faecium* SM21 suşu, anti-Listeria etkisine sahip bakteriyosin benzeri bileşikler üretmiştir. Bu çalışma ile arı bağırsağıyla ilişkili *L. johnsonii* ve *E. faecium* suşları ilk kez izole edilip tanımlanmış ve fonksiyonel özelliklerinden bazıları belirlenmiştir.

Tajabadi vd. (2011) bir çalışmada dev bal arısı *Apis dorsata*'nın bal midesinden izole ettikleri *Lactobacillus* suşlarını tanımlamıştır. 92 izolat Gram boyanmış ve katalaz reaksiyonu için test edilmiştir. Gram pozitif, katalaz negatif, basil morfolojiye sahip 49 bakteri suşu seçilmiştir. Filogenetik analiz sonucu izolatların ikisinin *L. plantarum* türleriyle yakından ilişkili olduğu, diğer iki filotipin *L. pentosus* ile ilişkili olduğu ve bir filotipin de *L. fermentum* ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma ile bal arısı bal midesinden laktik asit bakterilerinin sıklıkla izole edilebildiği gösterilmiştir.

Raghavan vd. (2013), sağlıklı bal arısı (*Apis cerana indica*) bağırsağından izole ettikleri laktik asit bakterilerini karakterize ederek probiyotik potansiyellerini değerlendirmiştir. Altı izolat başlangıçta LAB olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların asidik pH'ya, safra tuzlarına karşı toleranslı oldukları ve simüle edilmiş mide suyunda yaşayabildikleri gösterilmiştir. LAB suşlarının, gıda uygulamalarında ürün üretimi sırasında önem arzeden sütte canlılığını sürdürme özelliğine sahip oldukları ve tüm izolatların seçilen patojenlere karşı (*Salmonella typhi, S. paratyphi A, E. coli, Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *S. aureus, Klebsiella* spp. ve *Bacillus subtilis*) inhibe edici etki gösterdiği belirtilmiştir. LAB suşlarının otoagregasyon özelliğine sahip oldukları ve *S. typhi*'yi baskıladıkları belirtilmiştir. Bu bulgular ışığında bal arısı bağırsak florasının insan veya hayvan probiyotikleri olarak özelliklerinin ve yararlarının üzerinde durulması gerektiği anlaşılmaktadır.

Filannino vd. (2019)'nin yaptıkları çalışmada 77 adet LAB kolonisi, İtalya'nın beş farklı coğrafi konumundan toplanan sağlıklı *A. mellifera* işçi arılarının gastrointestinal sisteminden (GİS) izole edilmiştir. İzolatların neredeyse tamamı fruktofilik laktik asit bakterisi (FLAB), (%69) *Lactobacillus kunkeei* ve (%31)

Fructobacillus fructosus, olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma ile FLAB'ın, *A. mellifera* GİS'si ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu ve normal mikroflora üyesi olarak belirtilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca FLAB suşlarının hekzoz metabolizmasının ürünlere sağladığı katkı sayesinde kovan gıdalarının fermantasyonunda pratik açıdan önemli oldukları düşünülmektedir.

Killer vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada bal arılarının midesinden izole edilen Gram pozitif, katalaz negatif, zincir basil şeklindeki bakteri suşları (R4BT ve R4C) 16S rRNA gen dizisi analizi ile filogenetik olarak tanımlanmıştır. R4BT suşunun *Lactobacillus acidophilus* BCRC 10695T (%93.6) ile benzerlik gösterdiği ve *P. larvae* ve *Melissococcus plutonius*'ya karşı *in vitro* olarak bakteriyostatik etki gösterdiği bulunmuştur. Çalışma sonunda *Lactobacillus apis sp. nov.* R4BT ismi bu yeni takson için önerilmiştir.

Lamei (2019), *A. mellifera* üzerinde yaptığı LAB izolasyonu çalışmasında dokuz farklı laktobasil türünü (*Lactobacillus apinorum, L. mellifer, L. kunkeei, L. apis, L. helsingborgensis, L. mellis, L. melliventris* ve *L. kimbladii, L. kullabergensis*) ve iki farklı bifidobakter türünü (*Bifidobacterium asteroides* ve *B. coryneforme*) bal arısı özgü laktik asit bakterileri olarak tanımlamıştır. Bu suşların fruktoz ve L-sistein ile zenginleştirilen besiyerinde daha kolay üredikleri, çeşitli metabolitler ürettikleri ve arı larvalarının diyetinde gıda katkısı olarak kullanıldıklarında *P. larvae*'nin vejetatif üremesini yavaşlatan ve larvalar üzerinde mortalite etkisini azaltan fakat spor çimlenmesi üzerine herhangi bir etki göstermeyen nitelikte oldukları belirtilmiştir.

Baffoni vd. (2016) tarafından, sağlıklı mikrofloradan izole edilen *Lactobacillus kunkeei, L. helsingborgensis, L. kimbladii, L. kullabergensis, L. johnsonii, L. plantarum* ve *Bifidobacterium asteroides* suşlarını içeren bir besin takviyesinin koruyucu (profilaktif) ve iyileştirici (terapötik) etkinliği *Nosema ceranae* paraziti ile yapay olarak enfekte edilen arılarda ve doğadan toplanan hafif enfeksiyonlu arılarda laboratuvar koşullarında test edilmiştir. Arılar şeker şurubu ile beslenenler (CTR); probiyotik bakterileri içeren şeker şurubu ile beslenenler (PRO); *N. ceranae* sporları ile enfekte olan ve şeker şurubu ile beslenenler (NOS) ve *N. ceranae* sporları ile enfekte olan ve probiyotikli şeker şurubu ile beslenenler (NP) olarak gruplandırılmıştır. Enfeksiyondan sekiz gün sonra, hem NP hem de PRO

grubunda real-time PZR ile anlamlı derecede ($P<0.05$) daha düşük *N. ceranae* enfeksiyonu tespit edilmiş, bu da probiyotik mikroorganizma takviyesinin bal arılarında enfeksiyonu kontrol etmede olumlu bir etkisi olduğunu göstermiştir.

Al-Ghamdi vd. (2018)'nin Suudi Arabistan'da yaptıkları bir çalışmada bal arılarının bağırsak mikroflorasından *L. kunkeei* ve *F. fructosus*'un da içinde olduğu yedi bakteri türü izole edilmiştir. Bakterilerin bal arısı larvalarında profilaktif probiyotik etkileri üzerine yürütülen çalışmada; negatif kontrol (normal diyet) ve pozitif kontrol (*P. larvae* sporları eklenmiş normal diyet) ile birlikte *P. larvae* sporları ile enfekte olmuş bal arısı larvalarının ölüm yüzdeleri analiz edilmiştir. Yapılan *in vivo* biyoanalizler sonucunda *L. kunkeei* ile tedavi edilen grup en düşük mortaliteyi (%56.67) göstermiştir. Sonuç olarak larvaların normal beslenme rutinine LAB eklenmesinin, tedavi edilen grupların ölüm yüzdesini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir.

Elzeini vd. (2021)'nin yaptıkları çalışmada *A. mellifera*'nın bağırsak mikrobiyotasından izole edilen LAB suşlarının insanlarda probiyotik olarak kullanıma uygunluğu araştırılmıştır. Bağırsak tolerans koşulları (düşük pH ve safra tuzu), ekzopolisakkarit üretimi, antibiyotiklere direnci test edilmiş, hemolitik, proteolitik, antioksidan ve starter kültür aktiviteleri incelenmiştir. Beş izolat (*E. faecalis* HBE1, *L. brevis* HBE2, *E. faecalis* HBE3, *E. faecalis* HBE4 ve *L. casei* HBE5) probiyotik olarak uygulamaya uygun potansiyele işaret ederek GİS koşulları altında yüksek hayatta kalma oranı (>%95) göstermiştir. Bu sonuçlar, bal arısı işçilerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin, başlangıç kültürleri olarak gelecekteki uygulamalar için umut verici adaylar olarak kabul edilebileceğini ve sağlık yararlarını destekleyen fonksiyonel beslenme ürünlerinin üretimi için yeni potansiyel probiyotikler olabileceğini ortaya koymaktadır.

Olofsson ve Vásquez (2008) iki yıllık bir periyotta arıların farklı anatomik kısımlarında, larvalarda ve farklı çiçek içeriğine sahip ballarda bulunan mikroflora bakterileri üzerinde çalışmıştır. Özellikle bal midesinin, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait özgün bir LAB mikroflorası içerdiği ve balın, üretime dahil olan çeşitli laktik asit bakterileri sayesinde fermente edilmiş bir gıda ürünü olduğu ifade edilmiştir.

Olofsson vd. (2014) tarafından yapılan bir diğer çalışmada incelenen laktik asit bakterilerinin parazitik ve bakteriyel hastalıklara karşı koruma oluşturabilecek metabolitleri saptanmıştır. *Lactobacillus apinorum* Fohn13, *L. melliventris* Hma8 ve *L. kimbladii* Hma2 suşlarının, Varroa akarlarını ve balmumu güvesi larvalarını bal arıları tarafından ısırıldığında felç eden 2-heptanon alarm feromonu ürettiği bulunmuştur. Ayrıca çeşitli bakterilere karşı geniş spektrumlu bir inhibisyona sahip olan hidrojen peroksitin beş suş (*Lactobacillus helsingborgensis* Bma5, *L. apis* Hma11, *L. melliventris* Hma8, *L. kimbladii* Hma2 ve *L. kullabergensis* Biut2) tarafından üretilen başka bir antimikrobiyal metabolit olduğu keşfedilmiştir.

Ebrahimi vd. (2020) tarafından İran'da yapılan çalışmada doğal yerel baldan izole edilen LAB'lerin probiyotik, postbiyotik ve anti-aflatoksijenik özellikleri araştırılmıştır. Seçilen *L. kunkeei* suşlarının pH ve safra tuzu ortamlarına toleransı, antibiyotik duyarlılık profili, otoagregasyon yeteneği ve hücresiz süpernatantının (CFS) *in vitro* antibakteriyel ve antifungal aktivitesi (*E. coli, Aspergillus niger* ve *Candida albicans* için) test edilmiştir. *L. kunkeei* ENH01 suşunun sonuçları diğer suşlara göre anlamlı derecede ($P < 0.05$) daha etkili çıkmıştır. *L. kunkeei* ENH01 izolatının kullanım güvenliği ise izolatla beslenen farelerde kan biyokimyası ve hematolojik parametrelerin negatif kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmesiyle doğrulanmıştır.

Pachla vd. (2021) tarafından bal arılarının GİS'inden izole edilen *L. kunkeei* ve *F. fructosus* bakterilerinin fenotipik özellikleri, gastrointestinal sistem toleransı, antibiyotik duyarlılığı, hücre yüzeyi hidrofobikliği, otoagregasyon-koagregasyon ve biyofilm oluşturma özelliği incelenmiştir. Test edilen FLAB suşlarının probiyotik adayların taranmasında önemli kriterlerden olan yüksek antibiyotik duyarlılığı sergilediği belirtilmiştir. Tüm suşların yüksek hücre yüzeyi hidrofobikliğine sahip olduğu, biyofilm oluşumu, otoagregasyon ve koagregasyon özelliği taşıdığı saptanmıştır. Ayrıca *in vivo* analizlerde besin olarak kullanılan şeker şurubunun ilave FLAB ile desteklenmesiyle bal arılarında mortalitenin azaldığı ve yaşam süresinin önemli ölçüde iyileştiği gözlemlenmiştir.

Iorizzo vd. (2020) tarafından Avrupa Yavru Çürüklüğü hastalığına yeni biyokontrol stratejileri geliştirme üzerine yaptıkları bir çalışmada, *P. larvae* ATCC 9545 suşuna karşı *Lactiplantibacillus plantarum* suşlarının *in vitro* antimikrobiyal

aktivitesini incelemişlerdir. Saptanan en etkili beş suşun hidrofobiklik, otoagregasyon, EPS üretimi, ozmotik tolerans, enzimatik aktivite ve karbonhidrat fermentasyonu özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmayla *L. plantarum* suşlarının, bal arısı beslenmesinde probiyotik olarak kullanımları için uygun fiziksel, biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir.

1.2. Bal Arısı (*Apis mellifera*)

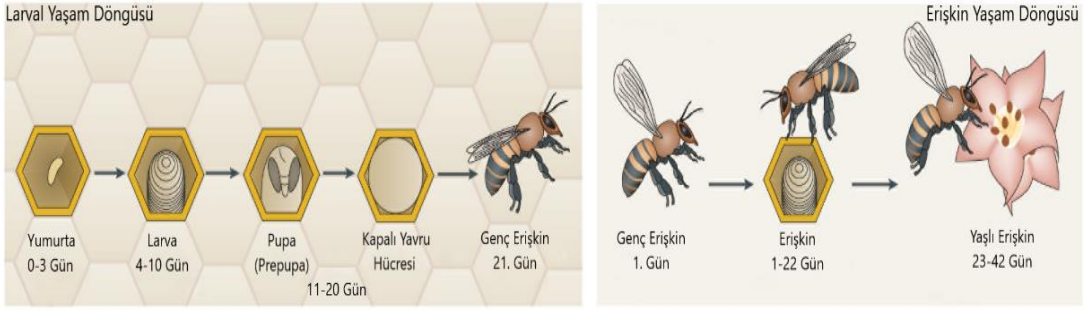
1.2.1. Genel Özellikleri

Bal arıları, Eklembacaklılar şubesi, Antenliler alt şubesi, Böcekler sınıfı, Zar Kanatlılar takımı, Arılar familyası, *Apis* cinsi içinde sınıflandırılan uçabilen sosyal böceklerdir (Bonilla-Rosso ve Engel, 2018). Balmumundan yaptıkları çok yıllık koloni yuvalarında, özellikle bal porsuğu, ayılar ve insanlar dahil olmak üzere birçok canlı için değerli bir yiyecek olan bal üretimleri ile tanınırlar. Bal arıları, bilinen yaklaşık 20.000 arı türünün yalnızca küçük bir bölümünü temsil eder. Günümüzde neslini sürdüren yalnızca sekiz bal arısı türü, toplam 43 alttür vardır (URL- 1).

Bal arıları, onbinlerce üreme yapmayan dişi işçiden, sadece çiftleşme görevi olan birkaç yüz drondan (iğnesiz erkek arı) ve tek bir üreme kraliçesinden oluşan büyük koloniler şeklinde yaşar (Kwong ve Moran, 2016). Kolonide yaşlı işçi arılar, balmumundan petekleri inşa edip muhafaza eder, koloniyi savunur ve toplayıcı arılar tarafından toplanan mahsülleri işler. Toplayıcı arılar, uzman işçi arılardır ve görevleri mevsiminde ziyaret ettikleri farklı çiçeklerden en iyi nektarı ve poleni kovana getirmektir (Linjordet, 2016). Genç arılar, protein ve lipit bakımından zengin arı ekmeği (işlenmiş polen ve bal karışımı) ile beslenir ve yavru yetiştiriciliğine katılırlar (Rokop vd., 2015).

İşçi bal arısı, yumurta olarak doğduğu andan itibaren larva haline gelmesine ve ardından erişkin işçi arıya dönüşmesine kadar bir dizi yaşamsal aşama geçirmektedir (Şekil 1). Koloniyi güçlü ve işlevsel tutmak için koloninin içinde ve dışında yapılması gereken bir iş görevi hiyerarşisi vardır (Davis, 2004). Yavru arılar önce larvaları besleyen hemşire arı görevini üstlenir, daha sonra kovanı temizleyen, kraliçeye ve gıda kaynaklarına dikkat eden temizlikçi arılarına dönüşürler. Bir sonraki aşama arı kovanının bakımını ve gıda rezervlerinin korunmasını içerir. Koruyucu arılar, davetsiz misafirlerin kovanın açıklığından geçmelerini önler ve

daha sonra koloninin geri kalanıyla paylaşılan polen ve nektarı toplayan toplayıcı (yemci, tarlacı) görevini üstlenirler (Rangberg vd., 2012).



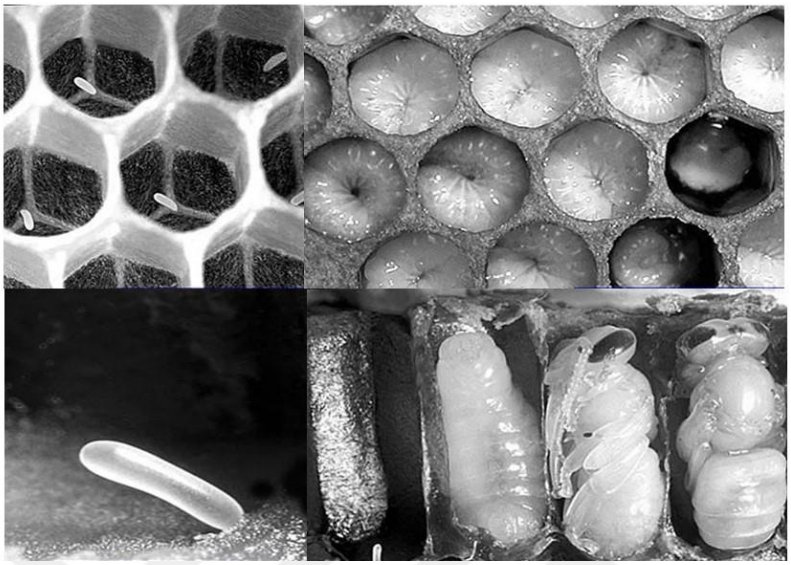
Şekil 1. Bal arısı yaşam döngüsü

Kaynak: Kwong ve Moran, 2016

Kraliçe arı, işçiler tarafından temizlenen ve yeni kuluçka yetiştirmek için hazırlanan her petek hücresine tek bir yumurta bırakır. Yumurtlama aşamasında kraliçe eğer işçi arı boyutuna uygun standart bir hücre seçerse bu hücreye döllenmiş bir yumurta bırakır ve bu yumurta bir işçi arı (dişi) olarak gelişim gösterir. Ancak kraliçe daha geniş bir erkek arı hücresi seçerse, o hücreye döllenmemiş bir yumurta bırakır. Bu yumurta, bir erkek arıya (dron) dönüşür. Hücreleri inşa eden erişkin işçi arılar, koloniye yeni katılacak olan genç işçi arıların dron arılara oranını düzenlerler. Bunu dişi işçi arılar için daha küçük hücreler ve erkek dron arılar için daha büyük hücreler inşa ederek yaparlar, kraliçe arı da yumurtlama esnasında bu düzene uyar (Bir Bal Arısının Yaşam Döngüsünü İzleme, 2021).

Kraliçe yumurtayı hücreye bıraktıktan üç gün sonra, yumurtadan bir larva çıkar. Bazen birden fazla larva çıkabilir. Sağlıklı larvalar kar beyazıdır ve hücrelerde kıvrılmış küçük kurtçuklara benzer (Şekil 2). İlk başta küçücük olan larvalar hızla büyür ve derilerini beş kez dökerler. Hemşire arılar larvaları önce arı sütü ile, bazen arı ekmeği ile besler ve daha sonra sütten kesilirler. Larvalar yalnızca beş gün içinde, ilk boyutlarından 1570 kat daha büyük boyutlara ulaşır. Bu sırada işçi arılar, gözenekli bir balmumu kapağıyla hücre içindeki larvaları kapatırlar. Bir kez mühürlendikten sonra, larvalar vücutlarının etrafında bir koza örerek pupaya dönüşür. Pupa evresinin ilerleyen aşamalarında gözler, bacaklar ve kanatlar şekillenir. Gözler önce pembe, sonra mor, en son siyah renge ulaşır. Arının tüm

vücudunu kaplayan ince tüyler gelişir. 12 gün sonra, genç erişkin arı koloniye katılmak üzere balmumu kapağını çiğner ve kendisini serbest bırakır (URL-2).



Şekil 2. Petek hücresinde yumurta, larva ve pupa görünümü
Kaynak: URL-2

1.2.2. Bal Arısı Gastrointestinal Sistemi

Erişkin bir bal arısının vücudu baş, göğüs (toraks) ve karın (abdomen) olmak üzere üç ana bölüme ayrılmıştır. Gastroinstestinal sistem (GİS) esas olarak karın bölgesinde yer almakta olup katabolizmada farklı işlevleri ve gıda emilimini gerçekleştirebilen, çeşitli bakteriyel simbiyontları içeren ve farklı ortam koşulları sağlayabilen kursak, orta bağırsak ve arka bağırsak şeklinde üç ana organa ayrılmıştır (Lamei, 2019). Bir arıda GİS ağızdan anüse uzanan özelleşmiş bir tüp şeklindedir ve her bölmesi, spesifik mikroorganizmaları destekleyen ayrı bir ortama sahip olup her bir bölme bir dizi kommensal (ne yarar ne de zarar veren) veya faydalı bakteri topluluğunu barındırmaktadır (Martinson vd., 2012).

1.2.2.1. Kursak (Bal Midesi)

Bal midesi olarak da adlandırılan kursak, arıların kovana geri götürmek için topladığı nektarı sindirmeksizin biriktirdiği yer olarak ön bağırsağın özelleşmiş bir parçasıdır. Kapasitesine bağlı olarak genişleyebilen balon benzeri esnek bir yapıya sahiptir. Bal midesinin duvarı, epitel ve iki kat kas tabakası olmak üzere üç katmandan oluşur. En içteki epitel, kütikül ile kaplıdır ve ihtiyaç halinde kursak

hacminin artmasına izin verecek şekilde katlanmıştır. Gıda ile doldurulduğu sırada bal midesinin hacmi yaklaşık on kat artabilir (Sammataro ve Cicero, 2010; Serrão vd., 2014).

Anatomik olarak, bal midesi arının sosyal beslenme aracıdır. Bal midesinin ana işlevi sıvı gıdaların (su, nektar ve tatlısu) dış ortamdan kovana taşınması ve vücut içinde depolanmasıdır. Bal midesi depolanan nektarın gerçek mideye (orta bağırsak) geçmesini önleyen, proventrikulus adı verilen kaslı bir kapakçık içerir. Arı kovana geri döndükten sonra, kursak içerikleri bir petek gözünde depolanmak için veya diğer arılarla paylaşmak için ağızdan geri çıkarılabilir (Blatt ve Roces, 2002).

Bal midesinin bir diğer işlevi lümende depolanan fazla suyun geri alınmasıdır. Bu işlem, bal midesinin duvar epitelinde bulunan, suyun zar boyunca iletilmesini sağlayan proteinler olan aquaporinler sayesinde gerçekleşir. Bal midesine suyun geri alınımı, nektarın (veya tatlı özsu) işlenmesi ve bal üretimi açısından önemlidir. Nektarın işlenmesinde rol oynayan bir diğer önemli faktör olan laktik asit bakterileri bal midesinde yoğunlukla kolonize olmaktadır (Blatt ve Roces, 2002; Olofsson ve Vásquez, 2008).

1.2.2.2. Orta Bağırsak (Gerçek Mide/Ventrikulus)

Gerçek mide (ventrikülüs, orta bağırsak), polen ve nektar için birincil sindirim alanıdır. Karın etrafında sarılı şekilde bulunur. Arı vücudunun yaklaşık iki katı uzunluğundadır. Orta bağırsak, muhtemelen epitel duvarının korunması için peritrofik bir zar ile örtülüdür ve çözünür maddelerin bu zardan hemolenfe (dolaşım sistemi) aktarımı, orta bağırsağın önemli işlevlerinden biridir. Mide duvarını örten epitel hücreleri, mikrosporidian bir parazit cinsi olan Nosema'nın istila bölgesidir (Crailsheim, 1988; Davis, 2004).

1.2.2.3. Arka Bağırsak (İnce Bağırsak ve Rektum)

Arka bağırsak, metabolik ürünlerin geri kazanıldığı ve fazla suyun vücuda geri emildiği ince bağırsak (ileum) ve rektumdan oluşur. Omurgalıların böbrekleri gibi işlev gören malpighi tübülleri de arka bağırsağın bazal ucuna bağlı olarak karın boşluğunda serbestçe yüzer. Malpighi tübülleri fazla tuzları ve metabolik atıkları kandan uzaklaştırır ve arı dışkısını dışarı atılmadan önce konsantre eder (Davis, 2004; Suyabatmaz vd., 2020).

Rektum gerektiğinde şişerek, büyük miktarda atık madde tutabilir. Bal arıları yuvalarını titizlikle temiz tutarlar ve kovanın dışında bir temizlik uçuşu (boşaltım) yapana kadar atıklarını rektumda biriktirirler. Uzun ve soğuk kışları olan iklimlerde, bal arıları bu görevi gerçekleştirmek için haftalarca hatta aylarca bekleyebilir. Bu durumun mikroorganizmalar için eşsiz bir üreme ortamı yarattığı ve rektum pH'sını özellikle asidik bakteriler için optimal duruma getirdiği düşünülmektedir (Davis, 2004; Suyabatmaz vd., 2020). Erişkin işçi arıların bağırsağı büyük bir bakteri topluluğuna sahiptir ve yaşlı bir işçi arıda kabaca 1 milyar bakteri hücresi bulunmaktadır. Bu bakterilerin yaklaşık %95'i arka bağırsakta kolonizedir (Martinson vd., 2012; Powell vd., 2014).

1.2.3. Bal Arısı Mikrobiyotası

1.2.3.1. Genel Özellikleri

Canlılarda vücut içinde (sindirim kanalı) ya da dışında (deri florası) simbiyont halinde yaşayan mikroorganizmaların meydana getirdiği topluluğa mikroflora ya da mikrobiyota adı verilir. Mikroflora, canlıların vücudunda kolonileşen ortak mikroorganizma havuzudur ve bakteri, arkea, virüsler ve tek hücreli ökaryotları içerebilmektedir (Sanford, 2012).

Bal arıları (*Apis mellifera*) gastrointestinal sistemlerinde özgün bir mikroorganizma koleksiyonu bulunur. Bağışıklık sisteminde önemli ve dikkat çekici etki mekanizmalarına sahip olan bu mikrobiyal koleksiyon, bal arısını çeşitli mikrobiyal tehditlere karşı korur, metabolik faaliyetlerde ve arı mahsullerinin üretiminde etkin rol oynar. Özellikle erişkin bal arıları oldukça zengin bir mikrofloraya sahiptir (Bendel, 2002; Bonilla-Rosso ve Engel, 2018).

Bal arıları toplu halde yaşayan ve kovanda yaşamın devamlılığını sağlamak için iş birliği içinde çalışan canlılardır. Üretken kolonilerde mikrobiyotadaki çeşitlilik artışı, arının gelişim aşamasından beslenmesine, kovanın bulunduğu coğrafi konumdan iklim değişikliğine kadar çok çeşitli faktörlere bağlıdır. Bal arılarında bulunan bakteri topluluklarının kovandan kovana, mevsimden mevsime ve yemden yeme farklı olabileceğinin keşfedilmesinin yanında her daim kalıcı bir çekirdek (temel) mikrobiyal topluluğun bulunduğu belirtilmektedir (Anderson ve Sheehan, 2011). Kalıcı mikrobiyal flora, genç işçi arılar kovandan ayrılmadan önce

oluşturulmakta ve bu durum mikrobiyal bulaşın kolonilerdeki yaşlı arılardan veya balmumu yüzeyi gibi kovan bileşenlerinden meydana geldiğini göstermektedir (Moran, 2015).

Arılarla ilişkili mikrobiyal topluluklar ilk olarak kültüre dayalı teknikler kullanılarak araştırılmış ve analiz edilmiştir (Gilliam ve Valentine, 1976; Gilliam ve Morton, 1978). Gram değişken pleomorfik bakteriler, *Bacillus* sp. ve Enterobacteriaceae ile birlikte küf ve mayalar; polen, nektar, arılar, bal, balmumu ve arı sütünde tanımlanmıştır (Snowdon ve Cliver, 1996; Gilliam, 1997). Küfler, özellikle Penicillium ve Aspergillus cinsleri, işçi bal arılarının sindirim kanalında yaygın olarak bulunmuştur (Gilliam ve Perst, 1972; Gilliam vd., 1974). Bağırsak mayalarına en sık, hastalıklı, besin eksikliği olan diyetlerle veya antibiyotiklerle beslenen veya pestisitlere maruz kalan kolonilerden gelen işçi arılarda rastlanılmış; maya varlığı bal arılarındaki stres koşullarının bir göstergesi olarak bildirilmiştir (Gilliam, 1997).

Moleküler çalışmalar ile elde edilen verilere göre, arı bağırsağı mikrobiyotasının ~%95'ini oluşturan bakterilerin arının çeşitli vücut bölgelerinden, kovan ve arı materyallerinden karakterize edilebildikleri bildirilmektedir (Jeyaprakash vd., 2003; Kwong ve Moran, 2016; Martinson vd., 2011; Moran vd., 2012).

Arıların gastrointestinal sistemi; *Gilliamella apicola*, *Snodgrassella alvi*, *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, *Lactobacillus* Firm-4 ve Firm-5 ve *Bifidobacterium asteroides* üyelerinden oluşan büyük bir mikrobiyal topluluk tarafından kolonize edilir ve bu bakteri türleri bal arısı bağırsağının çekirdek mikrobiyotasını oluşturmaktadır (Kwong ve Moran, 2016; Rokop vd. 2015; Yun vd. 2018).

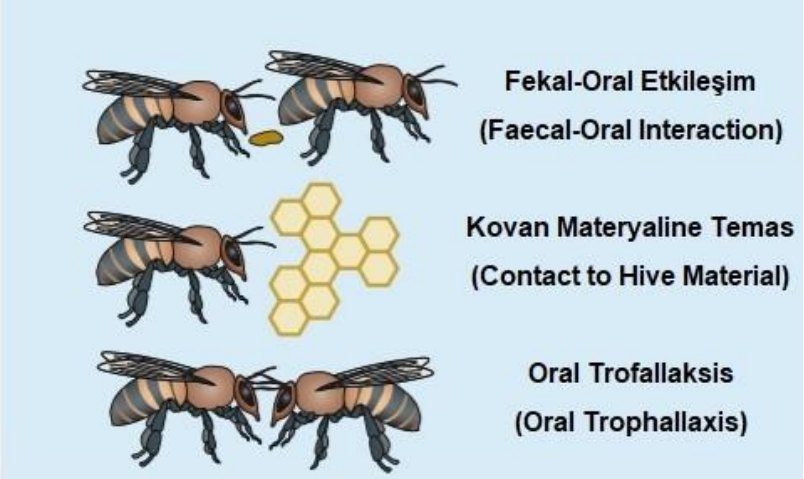
Her bir çekirdek bakteri türü, sindirim sistemi içinde karakteristik bir dağılım gösterir. Üç ana proteobakteriyel tür olan *Gilliamella apicola*, *Frischella perrara* ve *Snodgrassella alvi*, ileumda baskındır ve malpighi borularından itibaren ileum duvarı boyunca devam eden yoğun bir biyofilm tabakası oluşturur. *S. alvi*'nin doğrudan bağırsağı kaplayan kütikül üzerinde sürekli bir tabaka oluşturmaktadır. *G. apicola* bağırsak epitelinin lümene karşı en üst katmanında kolonize olur. *F. perrara*, tipik olarak daha az miktarda bulunur ve pylorus başlangıcında ileuma yakın bir yerde

melanize bir kabuk oluşturur. Gram pozitif türler olan diğer bakteriler ise, arka bağırsağın rektum bölgesinde en fazla miktarda bulunmaktadır. *Lactobacillus* Firm-5, lümen içinde küçük kümeler halinde kolonize olmaktadır. Baskın Gram pozitif suşlar olan *Lactobacillus* Firm 4, Firm 5 ve *B. asteroides*, yoğun olarak rektumda kolonizedir (Moran, 2015; Raymann ve Moran, 2018).

Bal arısı mikrobiyotasındaki çekirdek türlerin varlığı oldukça tutarlı olsa da, bağırsak segmentlerinde, sosyal sınıflarda, kovanlarda önemli varyasyonlar görülmektedir (Martinson vd., 2011; Moran vd., 2012; Corby-Harris vd., 2014; Powell vd., 2014; Ludvigsen vd., 2015; Yun vd., 2018). Bakterilerin büyük çoğunluğunun bal arısı arka bağırsağında yaşadığı (Martinson vd., 2012) ve arka bağırsak mikrobiyotasının, bal midesi ve orta bağırsağa göre geçici/değişken mikrobiyotaya sahip olduğu belirtilmektedir (Corby-Harris vd., 2014; Ludvigsen vd., 2015). Larvalardaki bakteriyel dağılımı araştıran moleküler metodolojileri kullanan daha yakın tarihli çalışmalarda, mikroflorada bazı yeni çekirdek dışı türlerin varlığı bildirilmektedir (Mohr ve Tebbe, 2006; Ahn vd., 2012; Martinson vd., 2012; Vojvodic vd., 2013).

1.2.3.2. Mikrobiyota Edinim Yolları

Bal arılarında mikrobiyal aşılama ve bağırsakta kolonileşme, polen tüketiminin bir sonucu olarak, yavru arı ortaya çıktıktan sonraki ortalama dört gün içinde yoğunlaşır ve kolonideki yaşlı arılarla sosyal etkileşimler sırasında devam eder (Gilliam 1997; Martinson vd., 2012; Raghavan, 2013; Powell vd., 2014). Yeni ortaya çıkan işçi arılar, önceden depolanan kovandaki yiyecekler ile veya böceklerde ağızdan ağıza bir besin transfer mekanizması olan oral trofallaksis yoluyla beslenir. Bu yolla çeşitli simbiyotik bakteriler koloni içerisinde paylaşılır (Rokop vd., 2015). Oral trofallaksis dışında koloni üyeleri tarafından oral-fekal iletim, depolanmış polen veya arı ekmeği tüketimi, kovan içindeki eski arılarla çeşitli etkileşimler ve erken erişkin aşamasında kovan materyali ile temas arılar için diğer mikroflora kazanım yollarıdır (Şekil 3) (Martinson vd., 2012; Powell vd., 2014; Kwong ve Moran, 2016).



Şekil 3. Ergin bal arılarında bakterilerle etkileşim yolları

Kaynak: Kwong ve Moran, 2016

Yumurtalar, prepupalar, pupalar ve yeni doğan işçi arılar genellikle mikroorganizma içermezler (Gilliam, 1997). Ancak bu steril durum gelişim esnasında değişir. Larvalar, hemşire arıların sağladığı polenler ve arı sütüyle beslenerek pupa evresinden önce bakteriyel floraya tabi tutulur. Larvalardaki bakteriyel topluluk esas olarak Acetobacteraceae (Alpha2.2) familyası üyelerinden ve *Lactobacillus* türlerinden oluşmaktadır (Vojvodic vd., 2013). Bu gruplar nektar ve polende de bulunduğundan, larvalardaki mikrobiyota varlığı, besleme yoluyla bulaşan bakterilerin ana göstergesidir (Anderson vd., 2013)

Arılar polen ve nektar toplama, tozlaşma ortamında bulunma ve gıda paylaşımı sırasında yararlı ya da zararlı birçok mikroorganizma ile temas ederek mikroflora kazanır. Arı kolonileri yıl boyunca çeşitli tarımsal ekosistemlere, kovanın mikrobiyal dengesini etkileyebilecek çok sayıda çevresel değişkenlere maruz kalmaktadır. Bu mikrobiyal topluluğun değişimi; mevsimsel ve coğrafi değişimler gibi faktörlere (Mrazek vd., 2008; Mattila vd., 2012), döllenmiş yumurtadan, olgun forma ulaşıncaya dek izlenilen gelişim süreci (ontogenetik) evrelerine (Mohr ve Tebbe, 2006; Yoshiyama ve Kimura, 2009; Martinson vd., 2012), bal arısının yaşına, beslenmesine ve sosyal yaşam tarzına bağlıdır (Ludvigsen, 2013; Corby-Harris vd., 2014; Linjordet, 2016). Aynı kovan içindeki işçi arıların çoğunun benzer mikrobiyotaya sahip olması gerektiği ve bu durumun taksonomide farklılıkları tetiklediği belirtilmektedir (Martinson vd., 2011, 2012; Moran vd., 2012). İşçi arılar

yaşlandıkça ve yiyecek arama sürecine geçtiklerinde, mikrobiyota bileşimlerinin hafifçe farklı türlere kaydığı bilinmektedir. Mikrobiyotada bulunan kalıcı mikroorganizmaların sayısı da mevsimsel olarak artabilir ve bu durum beslenmedeki değişikliklerin muhtemel etkisini yansıtmaktadır (Blatt ve Roces, 2002; Rayymann ve Moran, 2018).

1.2.3.3. Mikrobiyotanın Arı Sağlığındaki Önemi

Bal arısı bağırsak mikrobiyotasının konakçı üzerinde belirgin etkileri vardır. Çeşitli çalışmalarda, zengin bir bağırsak mikrobiyotasına sahip konakçılarda ağırlık artışı ve hormon sinyallerinin teşvik edildiği ve konakçının bağışıklık sisteminin uyarıldığı belirtilmiştir (Kesnerova vd., 2017).

Mikroflora için bir başka potansiyel rol, parazitlere ve patojenlere karşı korumadır. Kwong vd. (2017) yaptıkları çalışmada mikrobiyota varlığında arıların bağırsak dokusunda antimikrobiyal peptit bileşikleri olan apidaekin ve himenoptaesin peptitlerinin gen ekspresyonunun yüksek olduğu, ayrıca normal bağırsak mikrobiyotasına sahip olan arılarda hem bağırsak lümeni hem de hemolenfin içinde daha yüksek apidaekin bulunduğunu bildirmişlerdir. Dong vd. (2019) arı çekirdek mikrobiyotasındaki devamlılığın ve artışın, *Acinetobacter, Cyanobacteria, Peptostreptococcaceae, Bacteroidales, Bacteroides* ve *Escherichia-Shigella* gibi fırsatçı patojen cinslerin varlığında önemli bir azalmaya sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Mantar hastalıklarına ve taş hastalığına dirençli bal arısı kolonilerinde mikrofloranın önemi üzerinde özellikle durulmaktadır (Kwong ve Moran, 2016). Bal arıları ve bombus arılarıyla ilişkili bazı mikrofloral bakteri türleri antimikrobiyal özelliklere sahiptir, bu da potansiyel patojenlerin inhibisyonuna zemin hazırlamaktadır (Forsgren vd., 2010; Vásquez vd., 2012; Raghavan vd., 2013). Laktik asit bakterileri (LAB) bal arısı bağırsağında keşfedildiğinden beri, bu bakterilerin bal arısını patojenlere karşı koruduğuna ve arı sağlığı için büyük önem taşıdığına inanılmaktadır (Linjordet, 2016). Ayrıca yakın zamanda *A. kunkeei*'nin arı sağlığı üzerine antifungal aktivite sergileyebildiği gösterilmiştir (Janashia vd., 2018).

LAB türlerinin probiyotik etkisinin, bal arılarının bağışıklığını arttırdığı, patojenlerin etkisine karşı hayatta kalmalarına yardımcı olduğu, koloninin polen ve nektardan yararlanmalarını arttırdığı (fermentasyon, sindirim ve emilim) ve balın

antimikrobiyal özelliklerine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (Evans ve Lopez, 2004; Forsgren vd., 2010; Linjordet, 2016).

Yapılan çalışmalarla, arılarda yetersiz beslenmenin normal mikroflorayı bozduğu (disbiyoz) ve daha yüksek mortalite ve hastalık duyarlılığına neden olduğu gösterilmiştir. Mikrofloranın bozulmasının işçi arı gelişimi için birçok olumsuz sonucu vardır: Genç dönemde bu tür bir bozulma, vitellogenin dahil olmak üzere önemli gelişimsel genlerin ekspresyonunu etkilemektedir ve bu durum bal arısı mikrobiyotasının bağışıklık yollarını uyarması nedeniyle immün sistem fonksiyonunun etkilenmesine de yol açmaktadır (Raymann ve Moran, 2018). Enterobacteriaceae sınıfının birçok üyesi, şeker fermantasyonu ve azot metabolizmasında yer alan fakültatif anaeroblardır ve bu nedenle bu taksonların nispi bolluğundaki değişiklikler bal arısı metabolizmasını bozabilir ve genel sağlığını etkileyebilir (Anderson ve Sheehan, 2011; Engel vd., 2012).

1.2.3.4. Mikrobiyotada Laktik Asit Bakterilerinin Kolonizasyonu

Bal arısı sindirim sisteminin laboratuvar kültürüne dayanan tekniklerle yapılan çalışmalarda, mikroaerofilik (atmosferik oksijen seviyeleri altında) veya anaerobik bir dizi mikroorganizmaya sahip olduğu belirtilmektedir. Son zamanlarda, metagenomik yaklaşımlar kullanılarak, bu bakterilerin potansiyel metabolizması ve faydalı fonksiyonları araştırılmaktadır (Ahn vd., 2012; Sabree vd., 2012).

Lactobacillus türleri, bal arısı bağırsağında ve aynı zamanda diğer hayvanların ve insanların bağırsaklarında ortak olarak bulunan laktik asit bakterilerinin (LAB) en önemli ve en baskın cinsi olarak kabul edilmektedir (Rada vd., 1997; Killer vd., 2010). Genellikle Bifidobakter ile birlikte bulunurlar ve sağlığın teşviki için, bağırsak homeostazının korunmasında insan ve hayvan probiyotikleri olarak yaygın şekilde kullanım potansiyelleri vardır (Tajabadi vd., 2011).

Erişkin işçi bal arısı GİS'inde kabaca 10^8-10^9 KOB (koloni oluşturan birim) bakteri hücresi bulunmaktadır ve bu kolonizasyon genç işçi kovandan ayrılmadan önceki dört gün içerisinde kazanılır. Bu bakterilerin büyük çoğunluğu *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* üyelerinden oluşmaktadır ve yaklaşık % 95'i arka bağırsağa yerleşmiştir (Powell vd., 2014; Martinson vd., 2012). *Lactobacillus* ve

Bifidobacterium türleri karbonhidrat katabolizmasında ve dolayısıyla arının beslenmesinde merkezi bir işlev görmektedir (Lee vd,. 2015).

Bal arılarında laktik asit bakterileri özellikle bal midesinde ve arka bağırsakta ileumda ve rektumda kolonize olmaktadır (Olofsson ve Vásquez, 2008; Killer vd., 2014; Kwong ve Moran, 2016). Bu durum, bu bakterilerin asitli ortamlara ve fermente şekerlere toleranslı olduğunun göstergesidir (Anjum vd., 2017). Bal midesi mikroaerobik bir ortama sahiptir ve kovan içerisinde optimum sıcaklığı 35°C'dir. Dolayısıyla, laktik asit bakterileri için optimal bir nişi temsil eder (Jones vd., 2004). Bununla birlikte bal arılarında, arka bağırsaktan da çoğunlukla *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Enterococcus* cinsine ait bakterilerin izole edilebildiği belirtilmiştir (Tajabadi vd., 2011; Corby-Harris vd., 2014; Killer vd., 2014; Hroncova vd., 2015).

Bal midesinin ve polen kesesinin özellikle *Lactobacillus (Apilactobacillus) kunkeei*'yi bol miktarda içerdiği ayrıca kovanda, nektarda, seyreltilmiş balda ve arı ekmeğinde yüksek osmotolerant ve aside dirençli çeşitli bakteri taksonlarının varlığı bildirilmektedir (Olofsson ve Vásquez, 2008; Endo ve Salminen, 2013).

1.2.4. Bal Arısı Hastalıkları

Tüm canlılar gibi bal arıları da çeşitli patojen bakterilere, virüslere ve parazitlere karşı oldukça hassastır. Optimum sağlık ve beslenme durumundayken, olumsuz faktörlere karşı bal arılarının dirençleri daha yüksektir. Mahsulleri böceklerden ve yabani otlardan korumak için kullanılan pestisitler, herbisitler gibi kimyasal ürünler, patojenlere karşı direnci düşürerek bal arısı sağlığı üzerinde zararlı etkiler gösterebilir. Arıcının kovandaki ilk hastalık veya istila belirtilerini tanıyabilmesi ve nasıl ilerleyeceğini bilmesi bu bağlamda çok önemlidir (FAO, 2018; World Organisation for Animal Health, 2021).

Bal arılarında hastalık oluşumu üç faktöre bağlıdır: Genetik yatkınlık, patojenler ve çevresel etmenler. Çeşitli hastalıklara ve istilalara karşı bal arılarındaki koloniden koloniye değişen temizleme davranışı, koruma ve direnç gücü ana arıların yavrulara bıraktığı genetik mirasına dayanır. Bir kolonide enfeksiyon hastalığın kendini göstermesi için virüs, bakteri, mantar, protozoa gibi sorumlu en az bir ajanın varlığı tespit edilmelidir ancak patojenin miktarı ve yayılma yeteneği de bu hususta çok önemlidir. Sıcaklık, nem, nektar bitkilerinin varlığı gibi çevresel koşullar ve

mevsimsel faktörler de kolonide hastalıkların başlangıcını güçlü bir şekilde etkiler. Çoğu durumda çevresel stres etmenleri bal arısı sağlığının bozulmasında ana tetikleyicidir (FAO, 2018; World Organisation for Animal Health, 2021).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) yayınladığı başlıca bal arısı hastalıkları ve etkenleri Tablo 1'de verilmiştir. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) tarafından en sık görülen bal arısı hastalıkları ve zararlıları; Amerikan Yavru Çürüklüğü, Avrupa Yavru Çürüklüğü, Küçük Kovan Böceği (*Aethina tumida*) İstilası, Trake Akarı (*Acarapis woodi*) İstilası, *Tropilaelaps clareae* Akar İstilası ve Varroosis (*Varroa destructor*) olarak belirtilmiştir. Bu hastalıkların varlığının OIE'ye üye ülke ve bölgeler tarafından bildirilmesi zorunludur (FAO, 2018; World Organisation for Animal Health, 2021).

Tablo 1. Bilinen en yaygın bal arısı hastalıkları ve etkenleri

Hastalık	**Etken**	**Tip**
Trake Akarı (Acariasis)	*Acarapis woodi*	Parazitik
Varroasis	*Varroa destructor*	Parazitik
Küçük Kovan Böceği İstilası (Aethinosis)	*Aethina tumida*	Parazitik
Tropilaelaps Akar İstilası (Tropilaelapsosis)	*Tropilaelaps* spp.	Parazitik
Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ)	*Paenibacillus larvae*	Bakteriyel
Avrupa Yavru Çürüklüğü (AvYÇ)	*Melissococcus plutonius*	Bakteriyel
Kireç Hastalığı (Chalkbrood)	*Ascosphera apis*	Fungal
Taş Hastalığı (Stonebrood)	*Aspergillus flavus*	Fungal
Nosemosis	*Nosema apis, N. ceranae*	Fungal
Amebiasis	*Malpighamoeba mellificae*	Protozoa
Sacbrood Virüsü (SBV)	Pikornavirüs benzeri	Viral
Kronik Arı Felci Virüsü (CBPV)	*Cripaviridae*	Viral
Akut Arı Felç Virüsü (ABPV)	*Dicistroviridae*	Viral
Deforme Olmuş Kanat Virüsü (DWV)	*Iflaviridae*	Viral
Kara Kraliçe Hücre Virüsü (BQCV)	*Dicistroviridae*	Viral
İsrail Akut Arı Felç Virüsü (IAPV)	*Dicistroviridae*	Viral
Kaşmir Arı Virüsü (KBV)	*Dicistroviridae*	Viral
Kakugo Virüsü	*Iflaviridae*	Viral
Omurgasız Yanardöner Virüsü Tip 6	*Iridoviridae*	Viral
Tütün Halkalı Leke Virüsü	*Secoviridae*	Viral

Kaynak: FAO, 2018

Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ) ciddi bir bal arısı hastalığıdır. Hastalık etkeni *Paenibacillus larvae* adı verilen spor oluşturan Gram pozitif bir bakteridir. AYÇ, çok dirençli ve uzun yıllar hayatta kalan bakteriyel sporlar tarafından yayılır.

Endosporlar olarak da adlandırılan *P. larvae* sporları, bakterinin dormanside olan formudur. *P. larvae*, kuluçka hücresindeki larvaları öldürür, ergin arıda hastalık yapmaz. Bir ila üç günlük larvalar, *P. larvae* sporlarını içeren bal veya polenle beslendiklerinde enfekte olurlar. Enfeksiyon başladığında, sporlar koloninin yavrularına ve yiyecek depolarına hızla yayılır. Enfekte olan larvalar petek hücrelerinde mühürlendiğinde, bakteriler bağırsaklarında çoğalır ve onları hızla öldürür. Enfekte larvaların rengi kahverengidir, yapıları sümüksüdür. Enfekte kovanlarda petek gözleri benekli ve içe çökük bir görünüme sahiptir, tipik bir koku olabilir. Larvalar ölürken ve enfeksiyon nedeniyle renk değiştirirken, bakteriler potansiyel olarak 100 milyon ve hatta daha fazla spor oluşturur (Honey Bee Diseases and Pests, 2021). *P. larvae* sporları, aktif üreyen veya vejetatif durumdaki bakterileri öldüren neredeyse bütün koşullarda uzun yıllar hayatta kalabilir. Sporlar, 90°C sıcaklığa 120 dk, 100°C sıcaklığa ise 30 dk kadar direnç gösterebilmektedir. Sporlar arıcılık ekipmanında ve kontamine balda 40 yıl veya daha uzun süre hayatta kalabilir. Antibiyotiklerle tedavi bakterileri yok eder ancak sporları öldürmez, bu nedenle hastalık tekrar eder. Sporları yok etmenin bilinen tek yolu kovanı ve bulaş olduğu belirlenen tüm ekipmanı yakmaktır (Uygur ve Girişgin, 2008; World Organisation for Animal Health, 2021)

Enterobakteriyel tekrarlayan intergenik konsensüs dizisi (ERIC) primerleri kullanılarak yapılan analizlerin sonucunda *P. larvae*'nin dört farklı genotipe (ERIC I, II, III ve IV) sahip olduğu tanımlanmıştır. Ortaya çıkan genotipik sınıflandırmanın fenotipik farklılıklar ile korele olduğu bildirilmektedir (Beims vd., 2020). Beims vd. tarafından 2020 yılında İspanya'da bir bal örneğinden yeni bir genotipin, ERIC V, keşfedildiği bildirilmiştir. Genotip ERIC I ve II, eski alt tür *P. larvae larvae*'ya, genotip ERIC III ve IV ise eski alt tür *P. larvae pulvifaciens*'e karşılık gelir. Dört genotipin tümü koloni ve spor morfolojisi, karbon kaynakları metabolizmaları ve en önemlisi virülans açısından farklılık gösterir. Letalite süresi açısından ERIC II, III ve IV üyelerinin, larvalara karşı oldukça öldürücüdür. Bu genotiplerle enfekte olan tüm larvalar yaklaşık 7 gün içinde ölmektedir. ERIC I genotipi enfekte olmuş tüm larvaları öldürmek için yaklaşık 12 güne ihtiyaç duyar. Bu nedenle ERIC I'in larvalar için ERIC II, III ve IV'ten daha az virülan olduğu kabul edilir. Bunun yanında epidemiyolojik çalışmalar ERIC I'in salgınlarda en sık görülen genotip olduğunu,

bireysel düzeyde daha öldürücü olan ERIC II'nin ise ERIC I'e göre daha kısıtlı görüldüğünü, koloni düzeyinde daha az öldürücü olduğunu göstermektedir. Bunun sebebi, ERIC II enfeksiyonunda larvalar mühürlenmeden önce öldüğü için ergin arılar tarafından enfekte olanlar kolayca tespit edilip kovandan uzaklaştırılarak enfeksiyonun yayılımı engellenmeye çalışılmaktadır. ERIC I enfeksiyonunda ise enfekte larvalar daha uzun süre hayatta kalarak hücrelerinde mühürlenir. Kapalı kuluçka hücresinde *P. larvae* ERIC I, erken tespit ve sosyal hijyen davranışından kaçabildiği için spor üretimine devam eder ve nihayetinde koloni düzeyinde daha yüksek virülansla çoğalır. ERIC III ve IV genotipleri nadiren sahada tanımlanmıştır (Forsgen vd., 2018; OIE Terrestrial Manual, 2018; Beims vd., 2020).

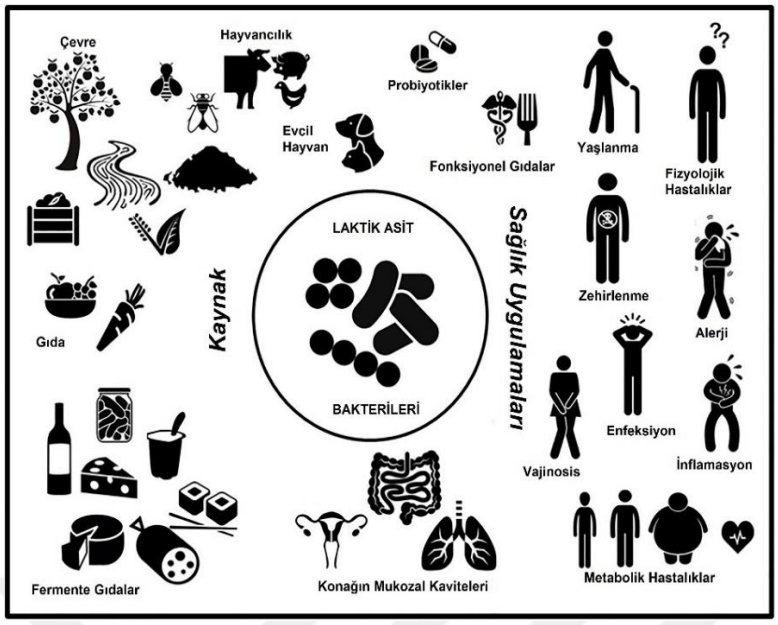
Bal arılarında Avrupa Yavru Çürüklüğü veya kısaca AvYÇ hastalığının ana etkeni *Melissococcus plutonius* adlı spor oluşturmayan, Gram pozitif bir bakteridir. Hastalığın sekonder etkeni olarak *Paenibacillus alvei, Bacillus laterosporus, Achromobacter euridice, Enterococcus faecalis ve Enterococcus faecium* bakterileri gösterilir. Hastalığın dağılımı, ismine rağmen Kuzey ve Güney Amerika, Orta Doğu ve Asya'da görülmektedir. AYÇ'ye benzer şekilde, yaşamlarının ilk birkaç gününde (genellikle 3-4 günlük) kontamine yiyeceklerle beslendiklerinde larvalar AvYÇ ile enfekte olurlar. AvYÇ patojenlerinin, bir kolonide akarlar yoluyla da bulaştırılabileceğine dair kanıtlar vardır. AYÇ'den farklı olarak, AvYÇ'ye yenik düşen larvalar, hücreleri kapatılmadan önce tipik olarak enfeksiyondan ölürler. Bakteri, kontamine petekler ile yayılır. Ayrıca larva olarak enfeksiyondan kurtulan fakat taşıyıcı olan ergin arılar tarafından da özellikle dışkı yoluyla enfeksiyon yayılabilmektedir. *M. plutonius,* arı dışkısında 3 yıl, bal, petek ve diğer ekipmanlar üzerinde birkaç yıla kadar varlığını sürdürme eğilimindedir. 100°C'de 15-20 dk hayatta kalabildiği bildirilmektedir. Sağlıklı, kalabalık bir koloniye ve bolca besin kaynağına sahip kovanlar AvYÇ'yi kolaylıkla bertaraf etmektedir. Fakat hastalık sonraki sert mevsimlerde veya gıdanın ve temiz suyun kıtlaştığı yıllarda strese bağlı olarak yeniden ortaya çıkabilir. AvYÇ tespit edildiğinde öncelikle enfekte petekler imha edilmeli, gerekirse kovan değiştirilmelidir. Sağlıklı kolonilerden taze ballı ve yavrulu çerçeve takviye etmek, genç kraliçe ile döllemek gibi direnç arttırıcı önlemler alınarak koloniyi strese sokabilecek durumlar olabildiğince engellenmeye

çalışılmalıdır (Uygur ve Girişgen, 2008; Honey Bee Diseases and Pests, 2021; World Organisation for Animal Health, 2021).

Son yıllarda bal arısı kolonilerinin kesin olarak belirlenemeyen bir nedenle aniden ortadan kaybolmasını veya ölümünü tanımlamak için Koloni Çöküş Bozukluğu terimi üzerinde durulmaktadır. Koloni Çöküş Bozukluğu ilk kez 2006 yılında tanımlanmıştır. Bu olayın tanımlayıcı özelliği, bal arısı kolonilerindeki özellikle dişi işçilerin on binlercesinin bir ila birkaç hafta gibi çok kısa bir zaman dilimi içinde birkaç yüz veya daha az bir sayıya kadar hızlı bir şekilde kaybedilmesidir. Pek çok koloni kaybı olayından farklı olarak Koloni Çöküş Bozukluğu'nda kovanda aktif bir kraliçe arı, sağlıklı gelişen (larva ve pupa) arılar vardır ve parazitik akarların veya mikroorganizmaların neden olduğu belirgin bir hastalık belirtisi de yoktur. Koloni Çöküş Bozukluğu'nun esrarengiz doğasını, altında yatan fizyolojik yolları, arı bağışıklığını düşürerek sağlığını etkileyen faktörleri, arıların yaşamlarını kısaltan ve kolonileri riske atan stres unsurlarını anlamak için deneysel çabalar mevcuttur (vanEngelsdorp vd., 2017)

1.3. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) terimi, laktik asit (şekerlerin bakteriler tarafından fermantasyonu sırasında üretilen ana metabolit) üreticileri olarak 20. yüzyılın başında ortaya çıkmıştır. Laktik asit bakterilerinin çoğu, insan ve hayvanların normal bağırsak mikrobiyotasının önemli bileşenleridir. Beslenme ve sağlık yararına büyük öneme sahip olan mikroorganizmalardır. Edinimleri ve sayıları genellikle konakçının beslenmesine ve bulunduğu çevreye bağlıdır. LAB, hayvanlarda özellikle ağız ve gastrointestinal sistemde, insanlarda ise bağırsak, ağız boşluğu, solunum yolu, vajina gibi çeşitli bölgelerde bulunur. Birçok LAB bitkiler, işlenmiş süt ürünleri, et ve sebze ürünleri gibi çevresel nişlere de sahiptir (Şekil 4). LAB'ler, süt endüstrisindeki başlangıç kültürlerinden besin takviyelerindeki probiyotiklere ve biyodönüşüm ajanlarına kadar çok sayıda endüstriyel uygulamada ve biyoteknolojik çalışmada kullanılmaktadır (Zhang ve Chai, 2014).



Şekil 4. Laktik asit bakterilerinin bulunduğu ortamlar ve sağlık üzerine etkileri
Kaynak: George vd., 2018

Özellikle son yıllarda gıda endüstrisinde bozulmaları engellemek ve raf ömrünü uzatmak için laktik asit bakterileri potansiyel koruyucu olarak kullanılmaktadır. Bu koruyucu etkinlik; LAB'ler tarafından üretilen laktik asit, asetik asit, süksinik asit gibi organik asitlerin ve antimikrobiyal etkiye sahip çeşitli metabolitlerin (hidrojen peroksit H_2O_2, diasetil, alkol, karbondioksit CO_2, ekstraselüler polimerik maddeler ve protein yapılı bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler) patojen adezyonunu engellemesi ile gerçekleşir (Çon ve Gökalp, 2000).

Laktik asit bakterileri aktiviteleri birbirine benzeyen birçok farklı bakteriyosin üretmektedir. Yan metabolitlerin ve bakteriyosin oluşturan mikroorganizmaların, doğal gıda koruyucu ajanlar olarak tıpta ve çeşitli uygulamalarda kullanımı yaygınlaştığı için LAB bakteriyosinlerine olan ilgi de giderek artmaktadır. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosin ve asitler dışında bir diğer önemli metabolit hidrojen peroksittir (H_2O_2). Oksijen varlığında üretilen hidrojen peroksit ortamda birikerek patojen mikroorganizmaların membran yapısını bozar ve inhibisyon etkisi gösterir. Katalaz hidrojen peroksiti, su ve oksijene parçalayarak toksik etkisini gideren bir enzimdir. Bu nedenle H_2O_2 üretimiyle özellikle katalaz enziminden yoksun patojen mikrorganizmaların üremesi inhibe

edilmektedir (Alpay, 1999; Sezer, 2007; Karpiński ve Szkaradkiewicz, 2016; Öncül ve Yıldırım, 2020).

1.3.1. Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri (LAB) Gram-pozitif, çubuk, kok veya kokobasil formda, spor oluşturmayan (*Sporolactobacillus* hariç), hareketsiz, aside toleranslı, majör veya tek fermantasyon ürünü olarak laktik asit üreten, katalaz negatif, nitrat redüksiyonu negatif, mikroaerofilik mikroorganizmalar olarak tanımlanırlar (Gomes ve Malcata, 1999; Zhang ve Chai, 2014; Wedajo, 2015).

Laktik asit bakterilerinin temel karakterizasyon çalışmaları agar plak kültüründe, küçük, yuvarlak, opak, gri/beyaz renkli koloni dokusunun ve hareketsizliğin gözlenmesine, biyokimyasal karakteristik özelliklerinin, özellikle katalaz ve nitrat negatifliğinin, karbonhidrat fermentasyon testlerinin gösterilmesine dayanmaktadır. Ek olarak CO_2 üretimi, arjinin ve eskülin hidrolizi, farklı sıcaklık, şeker ve tuz konsantrasyonlarında üreme gibi fenotipik gelişme özelliklerine göre ön tanımlamaları yapılabilmektedir (Carr vd. 2002; Okcu, 2011).

Laktik asit bakterileri porfirin ve sitokrom içermedikleri için elektron taşımasına bağlı fosforilasyon yapamazlar. Dolayısıyla sadece substrat düzeyinde fosforilasyon ile enerji elde ederler. Üremek için şekerlere, aminoasitlere, nükleik asit türevlerine, mineraller ve vitaminler açısından zengin ortamlara gereksinim duyarlar. Üreme ısı aralıkları 2-53°C olup genellikle 30-40°C'de optimum ürerler (Madigan ve Martinko, 2010; Linjordet, 2016).

Laktik asit fermantasyonu, çok sayıda gıda ürününün üretimi sırasında meydana gelen bakteriyel bir süreçtir. Nihai ürünlere karakteristik aromalar ve dokular sağlar. Gıda güvenliği ve hijyeninde çok önemli bir rol oynar. Laktik asit fermantasyonundan sorumlu bakteriler yüksek morfolojik ve fizyolojik çeşitlilik gösteren laktik asit bakterileridir. Louis Pasteur 1886'da, mikrobiyal büyümenin tüm fermantasyon süreçlerinde ortak bir özellik olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar ile fermentasyon sürecinin sonunda mevcut olan baskın organik ürünlere göre farklı fermentasyon tipleri tanımlanmış ve her biri belirli bir LAB türü ile ilişkilendirilmiştir (Muñoz vd., 2011).

Fermentasyon özellikleri sayesinde LAB'lar, süt endüstrisindeki starter kültürlerden, probiyotikler gibi besin takviyeleri ve biyokoruyucu ajanlara kadar çok

sayıda endüstriyel uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Laktik asit, şeker fermantasyonunun en önemli son ürünüdür (Zhang ve Chai, 2014; Wedajo, 2015).

LAB'ler fermentasyon sonucu oluşturdukları son ürünlere göre gruplandırılırlar. Standart koşullar altında, zorunlu homofermentatif grup laktik asit bakterileri, tek fermentasyon ürünü olarak laktik asit (laktat) üretir. Diğer grup olan zorunlu heterofermentatif laktik asit bakterileri, laktik asitin yanı sıra etanol, asetik asit gibi organik asitler ve CO_2 oluşturur. Heterofermentatifler fermentasyon ürünü olarak CO_2 oluşturdukları halde, homofermentatifler ya çok az CO_2 oluştururlar ya da hiç oluşturmazlar. Bu nedenle laktik asit bakterilerinde fermentasyon ayırımını saptamanın en kolay yolu, laboratuvar kültürlerindeki CO_2 üretiminin gözlenmesidir. En büyük LAB grubu her iki metabolik yola da sahiptir; heksozlarda homofermentatif, pentozlarda ve glukonatta ise heterofermentatif yolu kullanırlar. Bu nedenle fakültatif heterofermentatif olarak tanımlanırlar (Madigan ve Martinko, 2010).

Karbonhidrat fermantasyon yetenekleri, LAB türlerini karekterize etmek için standart fenotipik testlerde kullanılmaktadır. Bu önemli identifikasyon özelliği, substrat olarak kullanılan şekerin spesifikliğinden kaynaklanmaktadır. Örneğin; fruktofilik laktik asit bakterileri (FLAB), büyüme substratı olarak glukoz yerine fruktozu tercih eden ve sadece fruktoz bakımından zengin nişlerde bulunan özel bir LAB grubudur. *Fructobacillus* spp. ve *A. kunkeei* fruktofilik laktik asit bakterilerindendir. *A. kunkeei*'nin bal arılarında en baskın LAB'lardan biri olduğu bildirilmektedir (Axelsson ve Ahrné, 2000; Linjordet, 2016).

Fermantasyon yeteneklerine göre sınıflandırmanın, özellikle türler içinde çeşitlilik derecesi, laboratuvarlar arası varyasyon, zayıf tekrarlanabilirlik ve kullanılan metod nedeniyle sonuçlarda belirgin farklılıklar olması açısından bazı sınırlamaları mevcuttur. Bununla birlikte, ticari olarak satılan mevcut kit sistemleri (örn. API 50 CH; API Sistemi, la Balme les Grottes, Montalieu-Vercieu, Fransa) kullanılarak hazırlanan veritabanları, bu tür yöntemlerin güvenilirliğini ve standardizasyonunu sağlamaya çalışmaktadır (Linjordet, 2016).

1.3.2. Taksonomik Sınıflandırılması

Taksonomik olarak, LAB türleri Firmicutes ve Actinobacteria olmak üzere iki farklı filumda sınıflandırılır. Firmicutes filumunda yer alan LAB'ler,

Sporolactobacillus hariç, Bacilli sınıfı üyelerinin ikinci takımı olan Lactobacillales'te yer almaktadır (Wedajo, 2015; URL 5).

Tablo 2. Laktik asit bakterileri

Cins	Familya	Cins	Familya
Abiotrophia	*Aerococcaceae*	*Isobaculum*	*Carnobacteriaceae*
Acetilactobacillus	*Lactobacillaceae*	*Jeotgalibaca*	*Carnobacteriaceae*
Aerococcus	*Aerococcaceae*	*Lacticaseibacillus*	*Lactobacillaceae*
Aerosphaera	Lactobacillales incertae sedis	*Lacticigenium*	*Carnobacteriaceae*
Agitococcus	*Carnobacteriaceae*	*Lactiplantibacillus*	*Lactobacillaceae*
Agrilactobacillus	*Lactobacillaceae*	*Lactobacillus*	*Lactobacillaceae*
Alkalibacterium	*Carnobacteriaceae*	*Lactococcus*	*Streptococcaceae*
Allofustis	*Carnobacteriaceae*	*Lactovum*	*Streptococcaceae*
Alloiococcus	*Carnobacteriaceae*	*Lapidilactobacillus*	*Lactobacillaceae*
Amylolactobacillus	*Lactobacillaceae*	*Latilactobacillus*	*Lactobacillaceae*
Apilactobacillus	*Lactobacillaceae*	*Lentilactobacillus*	*Lactobacillaceae*
Atopobacter	*Carnobacteriaceae*	*Leuconostoc*	*Lactobacillaceae*
Atopococcus	*Carnobacteriaceae*	*Levilactobacillus*	*Lactobacillaceae*
Atopostipes	*Carnobacteriaceae*	*Ligilactobacillus*	*Lactobacillaceae*
Bavariicoccus	*Enterococcaceae*	*Limosilactobacillus*	*Lactobacillaceae*
Bombilactobacillus	*Lactobacillaceae*	*Liquorilactobacillus*	*Lactobacillaceae*
Carnobacterium	*Carnobacteriaceae*	*Loigolactobacillus*	*Lactobacillaceae*
Carnococcus	Lactobacillales incertae sedis	*Marinilactibacillus*	*Carnobacteriaceae*
Catellicoccus	*Enterococcaceae*	*Melissococcus*	*Enterococcaceae*
Chungangia	Lactobacillales incertae sedis	*Oenococcus*	*Lactobacillaceae*
Companilactobacillus	*Lactobacillaceae*	*Okadaella*	*Streptococcaceae*
Convivina	*Lactobacillaceae*	*Paralactobacillus*	*Lactobacillaceae*
Dellaglioa	*Lactobacillaceae*	*Paucilactobacillus*	*Lactobacillaceae*
Desemzia	*Carnobacteriaceae*	*Pediococcus*	*Lactobacillaceae*
Dolosicoccus	*Aerococcaceae*	*Pilibacter*	*Enterococcaceae*
Dolosigranulum	*Carnobacteriaceae*	*Pisciglobus*	*Carnobacteriaceae*
Enterococcus	*Enterococcaceae*	*Schleiferilactobacillus*	*Lactobacillaceae*
Eremococcus	*Aerococcaceae*	*Secundilactobacillus*	*Lactobacillaceae*
Facklamia	*Aerococcaceae*	*Sharpea*	*Coprobacillaceae*
Floricoccus	*Streptococcaceae*	*Sporolactobacillus*	*Sporolactobacillaceae*
Fructobacillus	*Lactobacillaceae*	*Streptococcus*	*Streptococcaceae*
Fructilactobacillus	*Lactobacillaceae*	*Symbiobacterium*	*Symbiobacteriaceae*
Furfurilactobacillus	*Lactobacillaceae*	*Tetragenococcus*	*Enterococcaceae*
Globicatella	*Aerococcaceae*	*Trichococcus*	*Carnobacteriaceae*
Granulicatella	*Carnobacteriaceae*	*Vagococcus*	*Enterococcaceae*
Holzapfelia	*Lactobacillaceae*	*Weissella*	*Lactobacillaceae*
Ignavigranum	*Aerococcaceae*		

Kaynak: Zheng vd., 2020; Sporolactobacillus, 2021

Lactobacillales; *Lactobacillaceae, Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae* ve *Streptococaceae* olarak altı familyaya ayrılmaktadır. Bu familyalara ait *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Enterococcus, Tetragenococcus, Aerococcus, Carnobacterium, Weissella* ve *Alloiococcus* cinsleri en önemli LAB türlerini içermektedir. Actinobacteria filumundaki LAB'lar ise *Atopobium* ve *Bifidobacterium* cinslerine aittir (Wedajo, 2015; URL 5). Bugüne kadar toplam 73 cins laktik asit bakterisi olarak tanımlanmıştır (Tablo 2). Tüm bu cinslerden *Lactobacillus* cinsi, 2015'te 214 türün tanımlandığı LAB'nin en çeşitli cinsi olarak bildirilmiştir (Sporolactobacillus, 2021).

1.3.3. Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriyofaj Varlığı

1.3.3.1. Bakteriyofajların Genel Özellikleri

Bakteriyofajlar, bakterileri ve arkeleri enfekte eden bir virüs grubudur. Bakteriyofaj terimi "bakteri yiyen" anlamına gelmektedir. Faj ya da bakteri virüsü olarak da adlandırılır (Ackermann, 2003; Bacteriophage, 2022; Britannica, 2022). Tüm virüsler gibi, bakteriyofajlar da bir protein kılıfla (kapsid) çevrili genetik materyalden (nükleik asit) oluşan, üremek için konak canlıya ihtiyaç duyan basit parazitik organizmalardır. Nükleik asit içerikleri çift sarmallı veya tek sarmallı DNA ya da RNA'dan oluşabilir**.** Bakteriyofajlar, bakteriyel konakların bulunabileceği tüm kara ve su habitatlarında bulunabilirler. Her biri, bir veya birkaç bakteri türünü enfekte edebilen 5500'den fazla farklı bakteriyofaj tanımlanmıştır (Drulis-Kawa vd., 2012; Britannica, 2022).

Bir bakteriyofaj ile bakteriyel konakçı arasındaki ilk temas, fajın konakçı hücreye bağlanmasıdır. Bu bağlanmaya, bakteri yüzeyindeki bir reseptörü tanıyan ve ona bağlanan faj reseptör bağlanma proteini (konakçı spesifik protein, konak determinantı) aracılık eder. Bakteriyofajlar enfeksiyon sırasında, konakçı yüzeyindeki dış zar proteinleri, lipopolisakkaritler, oligosakkarikler, teikoik asitler, flagella ve kapsül gibi türe özgü reseptörlere bağlandığı için konağa spesifik olarak adsorbe olur. Adsorbsiyondan sonra genetik materyalini veya kendisini hücre içine enjekte eder. Bu penetrasyon işleminin ardından, bakteriyofaj hücre içerisinde litik (virülent), lizojenik (ılımlı), pseudolizojenik veya kronik dönem şeklinde dört yaşam

döngüsünden birini izler. Bazı fajlar hem litik hem lizojenik döngünün ikisini de gerçekleştirebilir (Hanlon, 2007; Drulis-Kawa vd., 2012; Bacteriophage, 2022).

Litik bakteriyofajlar, yeni virionlar ve hücre lizizinde rol oynayan viral proteinler sentezlemek için konak hücrenin mekanizmasını ele geçirirler. Konağın normal protein ve nükleik asit sentezi bozulur ve bunun yerine viral mRNA'yı proteine çevirmeye başlar. Yeni virionlar dakikalar içerisinde hücreyi parçalayarak yeni bir konak hücre bulmak üzere dışa salınır. Lizojenik bakteriyofajlar, hücreye girdikten sonra nükleik asitlerini konak hücrenin kromozomuna entegre eder ve hücreyi öldürmeden onunla birlikte replike olur. Profaj adı verilen entegre viral genom aktif değildir; yeni virionlar oluşturmaz. Bunun yerine, konak hücre her bölündüğünde profaj da bölünerek, konakçı genomu ile birlikte yeni hücreye kopyalanır. Belli koşullar altında lizojenik fajlar, litik döngü geçirmeye teşvik edilebilir (Drulis-Kawa vd., 2015; Britannica, 2022).

1.3.3.2. LAB Bakteriyofajları

Çok sayıda gıda ürünü, ticari kimyasallar ve biyoteknoloji ürünleri, çeşitli organik substratların büyük ölçekli bakteriyel fermantasyonu yoluyla endüstriyel olarak üretilmektedir. Büyük fermantasyon teknelerinde her gün muazzam miktarlarda bakteri üretildiğinden, bakteriyofaj kontaminasyonunun hızla fermantasyonları durdurma ve ekonomik aksaklıklara neden olma riski, bu endüstriler için ciddi bir tehdittir (Lactic acid bacteria, 2021). Endüstriyel uygulamalarda, istenen tat, aroma ve doku özelliklerine sahip ürünler üretmek için belirli LAB suşları kullanılmaktadır. Örneğin; süt ve süt ürünleri üretiminde starter kültür olarak çeşitli laktik asit bakterileri, genellikle *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc* spp. ve *Lactobacillus* spp. kullanılır. Fakat fermentasyon sürecinin bakteriyofaj kontaminasyonu ile bozulması istenmeyen bir durumdur ve üretim için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Bu yüzden özellikle kolay indüklenebilen profiller taşıyan fajları bulunduran LAB suşları ticari kullanıma giremez (Murphy vd., 2017).

LAB'yi enfekte eden tüm karakterize edilmiş bakteriyofajların genomları çift zincirli doğrusal DNA içerir. *Lactobacillus* cinsinin *Lactobacillus acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis/bulgaricus* gibi üyelerinden Siphoviridae, Podoviridae ve Myoviridae üyelerine ait fajlar izole

edilmiştir. *Lactococcus* cinsi bakterilerde saptanan laktokokal fajlar, Siphoviridae veya Podoviridae faj ailesine aittir**.** Bugüne kadar izole edilen tüm *S. thermophilus* fajları ve çoğunlukla *Leuconostoc (L.) mesenteroides* veya *L. pseudomensenteroides*'i enfekte eden fajlar Siphoviridae ailesinin üyeleridir (Murphy vd., 2017).

1.3.4. Probiyotik Olarak Laktik Asit Bakterileri

Profilaktik veya terapötik özellikleri nedeniyle insanlar ve hayvanlar için probiyotik olarak kullanıldığı bilinen en yaygın LAB cinsleri; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* ve *Streptococcus* gruplarına aittir. Bu bakteriler bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, bağırsak homeostazının korunması, serum kolesterolünün düşürülmesi, kolon kanserinin önlenmesi, gastrointestinal ve üriner enfeksiyonların, depresyonun, ateroskleroz, arteriyoskleroz gibi kardiyovasküler rahatsızlıkların önlenmesi ve tedavisi, mide veya duedonum ülseri, romatoid artrit, atopik dermatit ve diyabet tedavisi gibi bir dizi terapötik kullanımlar için probiyotik olarak önerilmiştir (Parvez vd., 2006; Messaoudi vd., 2011; Razmpoosh vd., 2015; Maldonado Galdeano vd., 2019; Vásquez vd., 2019; Goel ve Kumar, 2021).

Lactobacillus cinsleri bulundukları canlıda ortak bağırsak bakterilerinin (örneğin; *Bifidobacterium*) büyümesini teşvik ederek prebiyotik aktiviteye sahip biyopolimer kaynakları ve diğer kimyasalları (biyoaktif peptitler, kısa zincirli asitler, vitaminler) sağlarlar. Gıda alerjisi olan bebeklerin mikrobiyotası üzerinde yapılan bir araştırmada, *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* ve *Enterococcus* gibi yararlı bakteri türlerinde azalma meydana gelmesiyle birlikte potansiyel zararlı bakteriler *Staphylococcus aureus, Clostridium* türleri ve koliformlar arasında dengesiz bir artış olduğu belirtilmiştir. Bu verilere dayanarak, çocuklarda alerjik bozukluklar üzerine probiyotik kullanımını ele alan birçok klinik çalışma yapılmıştır (Fijan, 2014; Lorca vd. 2015).

İnsanlar üzerindeki yararlı etkilerini hayvanlarda da benzer şekilde gösteren laktik asit bakterilerinin, en yoğun şekilde temasta bulundukları canlılardan biri olan bal arılar üzerindeki probiyotik etkileri oldukça ilgi çeken bir alandır. Arılarda saptanan bazı LAB'lerin (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* ve *L. lactis casei*), muhtemelen bağırsaktaki spesifik savunma mekanizmalarının bir sonucu olarak, kontrol gruplarına kıyasla potansiyel olarak patojenik bakterilerin sayısında

önemli düşüşlere yol açtığı gösterilmiştir. Faydalı bakteri türlerine sahip arı sindirim sistemi mikroflorası, arı sağlığının iyileştirilmesi için çok önemli sonuçlara sahiptir ve mikrofloranın normal dengesinde bir bozukluk ortaya çıktığında arı sağlığı ciddi şekilde etkilenmektedir (Patruica ve Mot, 2012).

1.4. Probiyotik Mikroorganizmalar

1.4.1. Genel Özellikleri

Yunanca "yaşam için" anlamına gelen probiyotik terimi, konağı (insan veya hayvan) faydalı bir şekilde etkileyen ve bağırsak mikrobiyal dengesini geliştiren canlı mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Bu faydalı etkiler, herhangi bir hastalığın önlenmesi veya tedavisinin yanı sıra besinlerin sindirimi ve emiliminin iyileştirilmesini de içerir. 1989'da Fuller, probiyotik mikroorganizmaları, bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek konakçı hayvanı olumlu yönde etkileyen canlı bir mikrobiyal gıda takviyesi olarak tanımlamıştır. Probiyotiklerin yeterli dozda kullanımının insanların ve hayvanların sağlıklı beslenmesinde ve çeşitli mikrobiyal enfeksiyonlardan korunmasında güvenli bir yol olduğuna işaret edilmektedir (Fuller, 1989; Uymaz, 2009; Taşdemir, 2017; Bilginer ve Çetin, 2019; Maldonado Galdeano vd., 2019).

Probiyotikler, bağırsaklarda yiyecekleri sindirmeye yardım ederek, zararlı molekülleri detoksifiye ederek, gerekli besinleri sağlayarak, istilacı patojen ve parazitlere karşı koruyarak, gelişim ve bağışıklığı modüle ederek konakçılarına fayda sağlayabilmektedir. Ayrıca intestinal düzensizlikler ve hastalıklarla mücadele etmek için gerekli olduğu çeşitli klinik deneylerle ispatlanmıştır. Probiyotiklerin hayvanlar üzerinde, bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan çeşitli bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği belirtilmektedir. Örneğin, bazı laktobasillerin arılar üzerinde potansiyel probiyotik etkisinin olduğu, bal arılarının patojeniteye karşı direncini, koloninin polen ve nektardan yararlanımlarını (fermentasyon, sindirim ve emilim) ve balın antimikrobiyal özelliğini arttırdığı bildirilmektedir (Evans ve Lopez, 2004; Forsgren vd., 2010; Fontana vd. 2013; Linjordet, 2016; Maldonado Galdeano vd., 2019).

Memelilere göre böcekler daha az sayıda simbiyont barındırmalarına rağmen, bal arısı bağırsak mikrobiyotası memelilerinkiyle yüksek benzerlik göstermektedir.

Tıpkı arılarda olduğu gibi insanlarda da laktobasiller, doğumdan sonra bebeğin bağırsağını kolonize eden ilk bakterilerden biri olan *Bifidobacterium* ile birlikte bulunur. İnsanlarda gastrointestinal kanalda ve vajinada daimi mikrobiyotayı oluşturan laktobasiller, patojen kolonizasyonuna karşı etkili bir bariyer oluşturur ve çeşitli metabolik substratlar (vitaminler ve kısa zincirli yağ asitleri gibi) üretir. Birçok araştırma laktobasillerin insan sağlığı için, vajinal ve kolorektal kanserin, çeşitli gastrointestinal hastalıkların, enfeksiyöz enteritlerin ve enterokolitlerin önlenmesinde ve tedavisinde önemli etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte probiyotikleri insan sağlığına, beslenmeye ve farklı anormalliklerin düzenlenmesine dahil etmek için hala kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır (Gilliam, 1997; Evans ve Lopez, 2004; Forsgren vd., 2010; Linjordet, 2016; Maldonado Galdeano vd., 2019; Fontana vd. 2013).

Bilinen pek çok probiyotik bakteri bağırsak mikrobiyotasının üyeleridir ve bunlardan bazıları gastrointestinal mikrobiyal dengeyi koruyarak bağırsak sağlığını iyileştirmek için giderek artan şekilde gıdalara dahil edilmektedir. Probiyotik mikroorganizmalar canlıların kullanımına çeşitli şekillerde sunulabilir. Direkt gıda olarak (örneğin, probiyotik yoğurt) veya doğrudan alınması için kullanılabilen kapsül, macun, toz veya granül şeklinde üretilebilirler. Bugüne kadar yaygın şekilde kullanılan veya kullanımı önerilen probiyotik mikroorganizmalar Tablo 3'te gösterilmektedir (Fuller, 1989; Maldonado Galdeano vd., 2019).

Laktobasiller ve streptokoklar, probiyotik üretiminde en sık kullanılan gruplardır. Laktobasillere bu yaygın yönelimin ilk olarak, doğumdan sonra bağırsak florası geliştiğinde laktobasiller arttıkça floradaki diğer zararlı bileşenlerin azaldığını gösteren çalışmalardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Gnotobiyotik (florasında mikroorganizma bulunmayan) civcivlerle yapılan deneyler, laktobasillerin *Escherichia coli* üzerinde kontrol edici bir etki yaptığını doğrulamıştır (Fuller, 1986; Fijan, 2014).

Probiyotik olarak saptanan bir diğer tür olan *Enterococcus faecium* suşlarının bazıları *E. faecium* değil, *Enterococcus hirae* olarak tanımlanan farklı bir türdür. İki benzer mikroorganizma aynı anda aynı niş için rekabet ediyor olabilir ve konakçıya faydalı etkiyi, büyümeyi baskılayan suşu başarılı bir şekilde ortadan kaldıran probiyotik suş verir. *E. faecium*, özellikle antibiyotikle ilişkili ishalin önlenmesinde

probiyotik olarak uzun bir kullanım geçmişine sahip olmasına rağmen bazı suşlar, potansiyel bir antibiyotik direnci ve virülans gen rezervuarı sunan fırsatçı patojenlerdir. Bu nedenle genellikle insanlar için güvenli maddeler (GRAS, Generally Recognized as Safe) olarak kabul edilmez ancak hayvanlar için önemli probiyotikleri temsil ederler (Fuller, 1986; Fijan, 2014).

Tablo 3. Probiyotik olarak belirtilen mikroorganizmalar

Tür	Cins	Fermentatif Sınıflandırma
Lactobacillus cellobiosus, L. delbrueckii, L. brevis, L. acidophilus, L. paracasei, L. casei, L. reuteri, L. curvatus, L. fermentum, L. gasseri, L. plantarum, L. jonhsonii, L. rhamnosus, L. crispatus, L. helveticus, L. salivarius, L. bulgaricus	*Lactobacillus*	Laktik Asit Bakterisi
Pediococcus cerevisiae, P. acidilactici, P. pentosaceu	*Pediococcus*	Laktik Asit Bakterisi
Streptococcus salivarius ssp. *thermophilus, S. intermedius, S. diacetylactis*	*Streptococcus*	Laktik Asit Bakterisi
Lactococcus lactis	*Lactococcus*	Laktik Asit Bakterisi
Enterococcus faecalis, E. faecium, E. hirae, E. durans	*Enterococcus*	Laktik Asit Bakterisi
Leuconostoc mesenteroides ssp.	*Leuconostoc*	Laktik Asit Bakterisi
Bifidobacterium bifidum, B. animalis, B. adolescentis, B. breve, B. infantis, B. longum, B. thermophilum	*Bifidobacterium*	Laktik Asit Bakterisi
Akkermansia muciniphila	*Akkermansia*	Nonlaktik Asit
Peptostreptococcus productus	*Peptostreptococcus*	Nonlaktik Asit
Bacteroides capillus, B. ruminicola, B. suis, B. amylophilus, B. uniformis	*Bacteroides*	Nonlaktik Asit
Propionibacterium shermanii, P. freudenreichii	*Propionibacterium*	Nonlaktik Asit
Bacillus subtilis, B. licheniformis, B. pumilus, B. lentus, B. coagulans	*Bacillus*	Nonlaktik Asit
Escherichia coli Nissle 1917	*Escherichia*	Nonlaktik Asit
Aspergillus niger, A. oryzae	*Aspergillus*	Nonlaktik Asit
Saccharomyces cerevisiae, S. boulardii, S. bayanus	*Saccharomyces*	Nonlaktik Asit
Candida (Torulopsis) glabrata	*Candida*	Nonlaktik Asit

Kaynak: İnal vd., 2004; Parvez vd., 2006; Uymaz, 2010; Fijan, 2014; George Kerry vd., 2018

Bazı probiyotik takviyeler, bileşenlerinden biri olarak *Bacillus subtilis* içerir. Bağırsaklarda *B. subtilis*'in barınabileceğini düşünmek zordur çünkü *B. subtilis* zorunlu aerob olduğu için normal şartlar altında bağırsakta üreyemez. Buna rağmen *B. subtilis* sporları hayvan tüketimi için probiyotik olarak kabul edilmiş ve insanlarda da ishal ve *Helicobacter pylori* infeksiyonunu tedavi etmek için önerilmiştir. Bununla birlikte, *B. subtilis* sporları ile tedaviye bağlı immün sistemi baskılanmış bir hastada tekrarlayan septisemi raporu ve *B. subtilis* sporları içeren oral preparatın neden olduğu dört nozokomiyal bakteremi vakası gözlenmiştir. Bu durum *B. subtilis* suşlarının insan üzerinde kullanım risklerini göz ardı etmemeyi desteklemektedir. Bazı *B. cereus* suşları da insanlar için oldukça toksik olmasına rağmen bazıları özellikle hayvanlar üzerinde kayda değer probiyotik etki gösterir. Örneğin; *B. cereus* NVH 75/95 suşu hayvanlar için etkili bir probiyotiktir (Fuller, 1986; Fijan, 2014; Trapecar vd., 2011).

Bazı araştırmalar probiyotik mikroorganizmalar tarafından ortama salınan metabolik yan ürünlerin veya bazı cansız bakteriyel yapıların, canlı bakteriler ortamda olmadığında dahi, onlarla benzer probiyotik etkilere sahip olabileceğini göstermektedir. Bu ürünler postbiyotikler olarak adlandırılır. Genel olarak postbiyotikler; bakteriyosinler, organik asitler, asetaldehitler, etanol, diasetil ve hidrojen peroksit gibi bakteriyel metabolik yan ürünleri içerir. Aynı zamanda bazı ısıyla öldürülmüş probiyotik mikroorganizmaların, konakçıda biyolojik aktivite uygulayabilen önemli bakteri yapılarını koruyabildiği bulunmuştur. Bu durum onları da postbiyotikler sınıfına dahil etmektedir. Postbiyotikler toksik değildir, patojenik değildir ve memeli enzimleri tarafından hidrolize karşı dirençlidir. Araştırmalar, postbiyotik metabolik ürünlerin patojenik mikroplara karşı geniş bir inhibisyon özelliğine sahip olduğunu ve bu nedenle antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir (George Kerry vd., 2018).

1.4.2. Probiyotiklerin Seçilim Kriterleri

Probiyotiklerin etki mekanizmalarının ve kullanılabilirlik verimlerinin en detaylı şekilde araştırıldığı mikroorganizma grubunu laktik asit bakterileri oluşturmaktadır. Probiyotik LAB kullanımı ve uygulamaları son yirmi yılda muazzam bir artış göstermiştir. Bu nedenle, çeşitli LAB üyeleri göz önüne alındığında, kapsamlı tarama ve karakterizasyon, potansiyel probiyotik suşları

belirlemede oldukça önemlidir. Probiyotikler bir gıda ürününe eklenerek insan, hayvan ve bitki sağlığının yararına kullanılabilmektedir. Probiyotik içeren takviye ürünlerin özellikle depolama süresi (raf ömrü) boyunca içerdikleri mikroorganizmaların etkinliklerini koruyabilmeleri, probiyotiklerin seçiminde önemli faktörlerdendir (Wedajo, 2015; Ahmad vd., 2018; Tarrah vd., 2018).

Bir suşun etkin bir probiyotik olarak nitelendirilebilmesi için belirli özelliklere sahip olması beklenir. Genel olarak, beklenen kriterler şu şekildedir: Konakçı üzerinde kanıtlanmış faydalı bir etkiye sahip olmalıdır. Patojenik, toksik vb önemli yan etkileri olmamalıdır. Gastrointestinal sistemde hayatta kalabilmelidir. Kullanıldığı ürün içerisinde yeterli sayıda canlılığı sürdürebilmeli ve sahip olduğu nitelikleri ürünün işlenme ve saklanma koşulları ile uyumlu olacak şekilde muhafaza edebilmelidir (Fontana vd., 2013; Fijan, 2014).

İnsan kullanımına önerilebilecek probiyotikler için en önemli seçim kriterleri, mide asidi, safra tuzları, pankreas salgıları gibi zorlu sindirim sistemi koşullarında canlılığını sürdürebilme, hedef bölgeye, örneğin bağırsak epitel, tutunabilme (adezyon), konak için patojenite sergileyen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki gösterebilme yeteneğidir. İyi bir probiyotik adayının konakta zararlı mikroorganizmaların kolonizasyonunu engelleyebilecek agregasyon yeteneğine ve zararlı toksin üretmeme ve bakteriyofaj taşımama gibi kriterlere sahip olması da beklenir. Potansiyel probiyotik adaylarının, kolesterol asimilasyonu, laktaz aktivitesi, vitamin üretimi gibi metabolik etki özellikleri de test edilebilir. İnsan kullanımına önerilmesi planlanan probiyotiklerin, türe bağlı sağlık etkileri açısından insan orijinli olması gerektiği belirtilmesinin yanında, günümüzde gıda endüstrisinde uzun yıllardır yaygın olarak kullanılan *Saccharomyces boulardii* gibi bazı probiyotik mikroorganizmalar insan orijinli değildir (Uymaz, 2009; Ahmad vd., 2018; George Kerry vd., 2018).



Şekil 5. Liçi ve mangosteen meyvesi orijinli ticarileştirilmiş probiyotik maya *S. boulardii*

Kaynak: Lukaszewicz, 2012*;* Liçi meyvesi, 2022; Saccharomyces boulardii capsule, 2022; Reflor, 2022

Probiyotik seçiminde uygulanabilecek bir diğer seçim kriteri hemolitik aktivitesidir. Araştırılan örneklerin gama γ-hemoliz (non-hemolitik aktivite) göstermesi beklenir. Çalışılan suşlarda otoagregasyon (toplanma, yığılma) ve koagregasyon yeteneğinin bulunması önemlidir. Çünkü faydalı suşların kolonize olacakları alanlarda toplanıp etkin bir küme oluşturmaları, *Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes, Helicobacter pylori, Staphylococcus aureus* gibi patojenlerle rekabet ederek kolonizasyonlarını ve enfeksiyonlarını engellemesi oldukça önemlidir (Sung-Mee ve Dong-Soon, 2009).

Potansiyel probiyotiklerin seçilim çalışmalarında değinilmesi gereken bir diğer önemli husus, yararlı bir etkinin ancak in vivo çalışmalarla gösterilebilmesidir. *In vitro* çalışmalar veya hayvan modelleri probiyotik bir etkiyi kanıtlayamasa da, olası bir probiyotik etki mekanizmasını karakterize etmek, probiyotik mikroorganizmaların güvenilirliğini belirlemek veya probiyotik suşlara ilişkin diğer bilgileri aktarmak için kullanılabilir. Bu nedenle, *in vitro* çalışmalar, gıda kullanımı için probiyotiklerin değerlendirilmesinde ilk adımı sağlar ama bu aşamayı çift kör, randomize, plasebo kontrollü insan denemeleri gibi deneyler de mutlaka izlemelidir. Bu bağlamda in vivo ile ilişkili olan, uygun, hedefe özgü *in vitro* çalışmalar önerilir. Örneğin, *in vitro* safra tuzları direncinin in vivo mide sağkalımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, probiyotik suşlar hakkında bilginin ilk adımı *in vitro* çalışmalar yoluyla atılabilmektedir (Fijan, 2014).

2014 yılında Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Derneği, probiyotik teriminin kullanımını aydınlatmak için bir yayın yapmıştır. Bu kapsamda *Akkermansia muciniphila, Faecalibacterium prausnitzii, Roseburia* spp. gibi bazı

insan bağırsağı kökenli bakteriler de dahil olmak üzere *Bifidobacterium adolescentis, B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. longum* ve *Lactobacillus acidophilus, L. casei , L. fermentum, L. gasseri, L. johnsonii, L. paracasei, L. plantarum, L. rhamnosus* ve *L. salivarius* gibi belirli probiyotik cins ve türleri evrensel olarak güvenli, temel (çekirdek) probiyotikler olarak belirtilmiştir. Bu bağlamda, son birkaç yıldır düzenli olarak potansiyel çekirdek suşlar üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin fruktofilik laktik asit bakterileri (FLAB) olarak adlandırılan bir mikroorganizma grubu, insan sağlığı için potansiyel olarak faydalı özellikleri ve laktik asit bakterilerine yakınlığı nedeniyle büyük ilgi görmektedir. FLAB, yakın zamanda karakterize edilen ve tanımlanan spesifik bir LAB alt grubudur. FLAB metabolik substrat olarak fruktozu tercih eder ve sadece fruktoz açısından zengin nişlerde bulunur. Bal arıları gibi özel beslenme davranışları olan böceklerle simbiyotik yaşam sürer (Vergalito vd., 2020).

Uzun yıllar boyunca, fermente süt ürünleri probiyotik bakterilerin izolasyonu için ana kaynak olarak kabul edilmiştir. Ancak son birkaç yıldır araştırmalar geleneksel olmayan kaynaklardan yeni probiyotikler saptamaya yoğunlaşmış durumdadır. Bu nedenle, potansiyel olarak faydalı bakteriler et, meyve, sebze, tahıllar, bal ve diğer arı ürünleri dahil olmak üzere çok sayıda süt ürünü olmayan, alternatif kaynaktan izole edilmeye başlanmıştır. Yeni potansiyel probiyotik suşların seçim süreci, izolasyon kaynağının kökeninden ziyade konakçıların sağlığı üzerindeki yararlı etkilerine, güvenilirliklerine ve fonksiyonel özelliklerine daha çok odaklanmalıdır (Vergalito vd., 2020).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma 2019-2021 yılları arasında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) işbirliği ile yürütülmekte olan TAGEM/HSGYAD/G/18/A5/P3/736 nolu proje kapsamında Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden gelen *Apis mellifera* bal arısı ve larva örneklerinden izole edildi.

2.1.2. Araçlar ve Gereçler

Çalışmada kullanılan çeşitli cihazlar; otoklav (Nüve-OT-40L), inkübatör (Memmert-600), pastör fırını (Nüve-FN-500), ışık mikroskobu (Nikon-E100), koloni mikroskobu, görüntü analiz sistemli araştırma mikroskobu (Olympos Bx51, BSPROP 200), soğutmalı santrifüj (Sigma- 2-16PK), mikrosantrifüj, hassas terazi (Denver-PL-214), çalkalayıcı (GFL-3005), buzdolabı, –20°C ve –80°C'lik derin dondurucular, vorteks (Heidolph-Reax top), sınıf II güvenlik kabineti (Nüve-MN-20), pH metre (Hanna-HI3220), distile su cihazı (GFL-2108), magnetik karıştırıcı, ultrasonik su banyosu (Heidolph-Promax 2020, Schwbach, Almanya), ısıtıcı blok (Nosheng-MS100), PZR cihazı, görüntü analiz sistemi, UV Transilluminator, mikro plak okuyucu (Bioscreen), bunzen beki ve elektroforezdir.

Çalışmada laboratuvar araç ve gereçleri olarak; vida kapaklı borosilikat 500-1000 mL'lik besiyeri şişeleri, 5-10-20 mL'lik vida kapaklı tüpler, beher, erlenmayer, lam, lamel, pastör pipeti, cam baget, anaerobik kavanozlar gibi çeşitli cam malzemeler ve 5-10-100-1000 µL'lik otomatik mikropipet seti, beyaz-sarı-mavi mikro ve makro pipet uçları, pipet kutuları, 60-100-150 mm'lik steril petriler, mezür, filtre kağıdı, 0.2-1.5-2.0 mL eppendorf tüpleri, 15-50 mL'lik falkon tüpleri, mikro kuyucuklu eliza plakları, 500 mL piset, 0.22-0.45 µm steril şırınga filtreleri, pens, öze, eküvyon çubukları, tüp sporları gibi malzemeler kullanıldı.

2.1.3. Kimyasallar ve Besiyerleri

2.1.3.1. De Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) Agar ve Sıvı Besiyeri

Ticari olarak temin edilen MRS sıvı besiyeri (Neogen, LAB094), firmanın önerisi doğrultusunda 37 g tartılarak 750 mL suda çözüldü. Aynı karışıma 9 g agar eklenerek ve besiyeri otoklavda 1.1 atm basınçta 121°C'de 20 dk steril edildi. Otoklavlandıktan sonra sıvı besiyeri steril vida kapaklı borosilikat şişelerde saklandı. Agar besiyerleri steril şartlarda 90 mm'lik ve 60 mm'lik steril petrilere aktarıldı. Besiyerleri kullanılacağı süreye kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Hazırlanan MRS besiyerleri laktik asit bakterilerinin kültivasyonu için genel üretimde, antimikrobiyal ve antibiyogram etkinliklerini ölçme çalışmalarında kullanıldı.

2.1.3.2. MYPGP Agar ve Sıvı Besiyeri

Mueller-Hinton Broth	7 g
Yeast Exract	10.5 g
Glukoz	1.4 g
Sodyum Pirüvat	0.7 g
K_2HPO_4	2.1 g
Agar	9.8 g

Yukarıda verilen maddeler, belirtilen oranlarda hassas terazi yardımı ile tartılarak 700 mL distile su içerisinde homojen şekilde (dH_2O) çözüldü. 1.1 atm basınçta 121°C'de 20 dakika otoklav edildi. Otoklavlanan besiyeri, 90 mm'lik steril petrilere döküldü. Aynı miktardaki karışımdan agar ilave edilmeden hazırlanan sıvı besiyeri yine 1.1 atm basınçta 121°C'de 20 dakika otoklavlandıktan sonra steril vida kapaklı borosilikat şişelerde saklandı. Besiyerleri kullanılacağı süreye dek +4°C'de muhafaza edildi (Syal ve Vohra, 2013).

Hazırlanan MYPGP besiyerleri *Paenibacillus* suşları için genel üretim besiyeri olarak kullanıldı.

2.1.3.3. Mueller-Hinton Agar (MHA) ve Sıvı Besiyeri

Ticari olarak temin edilen Mueller-Hinton sıvı besiyeri (Oxoid, CM0337) firmanın önerisi doğrultusunda litrede 48 g tartılarak hazırlandı. Aynı miktarda malzemelere 12 g agar eklenerek MHA katı besiyeri hazırlandı. Otoklavda 1.1 atm basınçta 121°C'de 20 dk steril edildikten sonra sıvı besiyeri steril vida kapaklı borosilikat şişelerde, katı besiyeri steril şartlarda 90 mm'lik steril petrilere aktarılarak +4°C'de muhafaza edildi.

Hazırlanan MHA besiyerleri antimikrobiyal aktivite testi için çeşitli patojen bakterilerin kültürasyonunda kullanıldı.

2.1.3.4. Potato Dextrose (PDA) Agar ve Sıvı Besiyeri

Ticari olarak tedarik edilen (Neogen, NCM0018A) hazır besiyerinden 27.3 g tartılıp 700 mL distile su içinde çözülerek hazırlanan sıvı besiyeri ve aynı karışıma 9 g agar eklenerek katı besiyeri hazırlandı. 1.1 atm basınçta 121°C'de 20 dk otoklavda steril edildi. Otoklavlandıktan sonra sıvı besiyeri steril vida kapaklı borosilikat şişelerde saklandı. Agar besiyerleri steril şartlarda 90 mm'lik steril petrilere aktarıldı. Besiyerleri kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi.

Hazırlanan PDA besiyerleri antimikrobiyal aktivite çalışmasında maya mantarları için genel üretim besiyeri olarak kullanıldı.

2.1.3.5. Brucella Agar ve Sıvı Besiyeri

Hazır Brucella sıvı besiyeri (Himedia, M348-500G) firma önerisi doğrultusunda 14.05 g tartılarak 500 mL distile suda homojen şekilde çözülerek hazırlandı. Aynı karışıma 7.5 g agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlandı. 1.1 atm basınçta 121°C'de 20 dakika otoklavlandıktan sonra 48°C'de su banyosunda bekletildi. Besiyerine supplement olarak steril şartlar altında 10 mg/L vankomisin, 5 mg/L trimetoprim ve 1 mg/L amfoterisin B solüsyonu ve %5 insan kanı ilave edilerek homojen bir karışım sağlandıktan sonra petrilere döküldü.

Hazırlanan besiyeri antimikrobiyal aktivite çalışması için *Helicobacter pylori* kültivasyonunda genel besiyeri olarak kullanıldı.

2.1.3.6. Brain Heart Infusion (BHI) Kanlı Agar

Ticari olarak temin edilen BHI agar besiyeri (Conda Pronadisa, 1048.00) firma önerisi doğrultusunda litrede 26 g tartılarak 500 mL distile suda çözülerek

hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 20 dk steril edildikten sonra steril koşullarda %5 oranda insan kanı eklenerek steril petrilere dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Hazırlanan besiyeri laktik asit bakterileri için hemolitik aktivite çalışmasında kullanıldı.

2.1.3.7. Kromojenik Selektif Besiyerleri

2.1.3.7.1. Proteaz Besiyeri

Süt Tozu	1 g
Yeast Extract	0.1 g
Agar	1.5 g

Yukarıda verilen maddeler proteaz besiyeri hazırlamak için belirtilen oranlarda tartılıp 100 mL distile su içerisinde çözüldü. 1.1 atm basınçta 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi. Otoklavdan sonra petrilere dökülen besiyeri kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4°C'de saklandı (Carlisle ve Falkinham, 1989).

2.1.3.7.2. Lipaz Besiyeri

Lipaz besiyeri hazırlamak için; 2 g agar, 0.8 g Nutrient Broth, 0.4 gr NaCI, 1 g Gum Arabic tartılarak 100 mL distile su içerisinde çözüldü. Hazırlanan besiyeri 1.1 atm basınçta 121°C'da 15 dk otoklavlanarak steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri su banyosunda 55°C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra içerisine %2.5 steril Zeytinyağı ve 1 mg/mL Rhodomin B ayıracından 10 ml eklenerek homojen bir şekilde karıştırılarak petrilere dağıtıldı. Besiyeri kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi.

2.1.3.7.3. Amilaz Besiyeri

Beef Extract	0.3 gr
Soluble Starch	0.1 gr
Agar	1.2 gr

Yukarıda verilen maddeler amilaz besiyeri hazırlamak için belirtilen oranlarda tartılarak 100 ml distile su içerisinde çözüldü. 1.1 atm basınçta 121°C'de 15 dk otoklavlandı ve ardından steril petrilere dağıtılarak kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.3.7.4. Jelatinaz Besiyeri

Nutrient sıvı besiyerine % 10 jelatin ilave edilerek kaynar suda eritildi ve 1.1 atm basınçta 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edildi. 2 ml'lik ependorflara aktarılarak kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi (Koneman vd., 1997).

2.1.3.7.5. Sitrat Besiyeri

K2HPO4	1 g
NaCl	5 g
MgSO4	0.2 g
Sodyum sitrat	2 g
Bromtimol mavi	0.08 g
Agar	13 g

Yukarıda verilen maddeler belirtilen miktarlarda tartıldıktan sonra 1000 ml distile suda çözülerek sitrat besiyeri hazırlandı. Daha sonra 121°C'de 1.1 atm basınç altında otoklav edildi. Steril 2 mL eppendorf tüplerine dağıtıldıktan sonra yatık bir şekilde donması için bekletildi. Donduktan sonra kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4ºC'de muhafaza edildi. Sitrat besiyeri çalışılan laktik asit bakterilerinin tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadıklarını test etmek amacıyla kullanıldı (Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004).

2.1.3.7.6. Selülaz Besiyeri

CMC (Karboksi Metil Selülaz)	1 g
Yeast Extract	1 g
NaCI	1 g

Tripton	1 g
Agar	1.5 g

Besiyerini hazırlamak için yukarıda listesi verilen malzemeler belirtilen miktarlarda tartılarak 100 mL distile su içerisinde homojen şekilde çözüldü ve 1.1 atm basınçta 121°C'da 15 dk otoklavlandı. Besiyeri daha sonra steril mm petrilere dökülerek kullanılacağı süreye dek +4°C'de saklandı (Hols vd., 1994).

2.1.3.7.7. Lesitinaz Besiyeri

Ticari olarak temin edilen ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan BHI-Agar besiyeri 1.1 atm basınçta 121°C'de 20 dakika otoklav edildikten sonra soğutuldu. İki yumurtanın yüzeyi yıkanıp alkolle dezenfekte edildikten sonra, yumurta sarıları falkon tüp içerisinde iyice karıştırıldı. Daha sonra soğuyan BHI-Agar besiyerine steril koşullar altında ilave edildi. Besiyeri homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra steril petrilere döküldü. Kullanılacağı süreye kadar +4ºC'de muhafaza edildi (Rhodehamel ve Harmon, 1995).

2.1.3.7.8. Eskülin Sıvı Besiyeri

Eskulin sıvı besiyeri, %1 Heart Infusion Broth distile su ile 80°C'ye kadar ısıtılarak çözüldükten sonra filtre kağıdından süzülüp, içerisine %1 Bacto Peptone, %0.5 Sodium Chloride, %0.1 Esculin ilave edilerek hazırlandı. Homojen şekilde karıştırıldıktan sonra 1.1 atm basınçta 121°C'da 20 dk otoklavlanarak steril edildi. Besiyeri steril 96'lık mikro eliza plaklara 100 µL olacak şekilde dağıtılarak kullanılacağı süreye kadar +4°C'de muhafaza edildi (Alpay, 1999).

2.1.3.7.9. Fermentasyon Besiyeri

Bacto peptone	% 1 (100 mL'de)
Beef extract	% 0.1 (100 mL'de)
Sodium chloride	% 0.5 (100 mL'de)
Bromocresol purple	% 0.015 (100 mL'de)

Karbonhidrat fermentasyon testi için baz besiyeri hazırlamak için yukarıda belirtilen miktarlarda malzemeler 750 mL distile suda çözülerek ve pH: 6.8'e

ayarlandıktan sonra otoklavda steril edildi. Hazırlanan fermentasyon besiyeri kullanılacağı süreye kadar +4°C'de muhafaza edildi (Alpay, 1999).

2.1.3.7.10. TMB-Plus Besiyeri

1. Aşama

Brucella Agar Base	4.3 g
Nişasta	1 g
Hemin	1 mL (5 mg/mL)
$MgSO_4$	57 mg
$MnSO_4.H_2O$	12 mg

Hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimi testi için hazırlanan TMB-Plus (Tetrametilbenzidin-Plus) besiyeri iki aşamalı olarak hazırlandı. Yukarıda listesi verilen malzemeler ile 1. aşamada hazırlanan 100 ml baz besiyeri homojen şekilde karıştırıldıktan sonra 1.1 atm basınçta 121°C'de 20 dakika otoklavlandı. Ardından besiyeri su banyosuna alınarak 50°C'ye soğutuldu.

2. Aşama

Horseadish Peroxidase	200 µL (5mg/mL)
TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)	10 mL
Bovine Serum	5 mL
Vitamin K (Phytomenadione)	2 mg/0.2 mL

Uygun sıcaklıktaki baz besiyerine 2. aşamada belirtilen tüm malzemeler 0.45 µm şırınga filtresi (Aisimo) ile sterilizasyonu yapıldıktan sonra aseptik şartlar altında eklendi. Hazırlanan TMB-Plus besiyeri steril petrilere alınarak kullanılacağı süreye dek +4°C'de muhafaza edildi (Rabe ve Hillier, 2003).

2.1.4. Kullanılan Solüsyonlar ve Ayraçlar

2.1.4.1. Gram Boyama Solüsyonları

Kristal viyole stok solüsyonu (%90-95 boya içeren) hazırlamak için; 40 g kristal viyole tartıldı ve 400 mL etanol (%95) ile bir cam şişede çözüldükten sonra oda ısısında muhafaza edildi.

Amonyum okzalat solüsyonu (%1'lik) hazırlamak için; 4 g amonyum okzalat, 400 mL distile su içerisinde bir cam şişede çözüldükten sonra oda sıcaklığında saklandı. Her iki solüsyonun raf ömrü 1 yıldır. Kristal viyole stok solüsyonunun 40 mL'si amonyum okzalat solüsyonunun 160 mL'si ile karıştırılarak kullanıldı.

Lügol solüsyonu; 1 g iyot ve 2 g potasyum iyodür havanda birlikte ezilip 300 mL distile su ile homojenize edilerek çözünmesi sağlandı. Karanlık şişeye alındı ve tam çözünmesi için bir gece bekletildi (Bilgehan, 2004).

Alkol (%96'lık etil alkol); kristal viyole ile boyanmış, lügol solüsyonu ile mordalanmış preparatlarda renk giderilmesi için kullanıldı.

Safranin solüsyonu; porselen kroşede 2.5 g safranin 10 mL alkol (%95) ile çözülüp ışık geçirmeyen vida kapaklı şişeye aktarıldı. Üzerine 100 mL distile su ilave edilerek tamamlandı. Bir gün bekletildikten sonra zıt boya olarak gram boyamada kullanıldı (Koneman vd., 1997).

2.1.4.2. Katalaz Testi

Katalaz, hidrojen peroksitin bakterisit etkilerini nötralize eden bir enzimdir. Bu enzim aerobik bakterilerde ve bazı fakültatiflerde bulunur. Katalaz enzimini sentezleyen bakteriler, hidrojen peroksiti su ve oksijene hidrolize eder ve bu reaksiyon gaz kabarcıklarının oluşumuna neden olur. Katalaz testi, çoğu bakterinin ilk karakterizasyonunda önem taşır.

Ticari olarak temin edilen %30'luk H_2O_2 reaktifi 1:10 oranında distile su ile dilüe edilerek kullanıldı. Hazırlanan solüsyon -20°C'de muhafaza edildi (Garcia ve Isenberg, 2010).

2.1.4.3. Oksidaz Testi

Bu test, oksidatif fosforilasyon yapan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen intrasellüler oksidaz enziminin varlığını ortaya koymada kullanılır. %1'lik çözelti için 0.1 g miktarında 1,4-fenilendiamin dihidroklorür (N, N, N, N-

tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür) 10 ml steril distile su içerisinde homojen şekilde çözüldü. Ependorf tüplerine 1 ml şeklinde dağıtıldı. Ardından ependorf tüpler alüminyum folyayla sarılarak kullanılacağı süreye kadar -20°C'de saklandı (Garcia ve Isenberg, 2010).

2.1.4.4. PBS Solüsyonu

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na_2HPO_4	14.4 g
KH_2PO_4	2.4 g
	pH: 7.2

Fosfat tampon çözeltisi (PBS, phosphate buffered saline), birçok biyolojik araştırma uygulamasında kullanılan izotonik bir çözeltidir. PBS çözeltisi, biyosıvıların (insan vücut sıvıları) iyon konsantrasyonu, ozmolaritesi ve pH'ı ile benzeştiği için ve bu nedenle hücre hasarına, toksisiteye veya istenmeyen çökelmeye neden olma olasılığı düşük olduğu için biyolojik, tıbbi veya biyokimyasal araştırmalarda sıklıkla tercih edilmektedir.

10 x PBS solüsyonu hazırlamak için yukarıda listesi verilen malzemeler 800 ml distile su içerisinde çözüldü. Hidroklorik asit (HCI) kullanarak pH 7.4'e ayarlandıktan sonra nihai hacim 1000 mL'ye tamamlandı. Solüsyon 121°C'de 20 dk. otoklavlanarak kullanıma hazır hale getirildi. Buzdolabında +4°C'de muhafaza edilen stok solüsyon 1 x PBS'ye seyreltilerek çalışmalarda kullanıldı (Xiao vd., 2017).

2.1.5. İndikatör Bakteri Suşları

Çalışmada RTEÜ, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan çeşitli insan ve gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar ve arı patojeni mikroorganizmalar indikatör olarak kullanıldı (Tablo 4). İlgili suşlar antimikrobiyal aktivite, otoagregasyon, koagregasyon testlerinde ve bazı diğer kromojenik testlerde patojen veya pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Tablo 4. Çalışma süresince kullanılan mikroorganizmalar

Tür	Suş
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853
Lactobacillus acidophilus	DSM 20242
Staphylococcus aureus	ATCC 29213
Bacillus cereus	ATCC 43288
Escherichia coli	ATCC 25922
Klebsiella pneumonia	ATCC 13883
Yersinia pseudotuberculosis	ATCC 911
Enterococcus faecalis	ATCC 29212
Salmonella enterica serovar Enteritidis	ATCC 13076
Listeria monocytogenes	ATCC 43251
Helicobacter pylori	J99
Mycobacterium smegmatis	RSKK 607
Paenibacillus larvae ERIC I	ATCC 9545
Paenibacillus larvae ERIC II	DSM 25430
Paenibacillus larvae ERIC III	LMG 16252
Paenibacillus alvei	PB33
Paenibacillus dentriformis	PB22b
Melissococcus plutonius	RTEÜ Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvar Suşı
Candida albicans	ATCC 60193

2.2. Metod

2.2.1. Numunelerin Temini ve Kültürasyonu

Bal arısı ve larva örneklerinin toplanması ve numune hazırlanımı Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Arı Hastalıkları Laboratuvarı tarafından gerçekleştirildi. Temin edilen numunelerin, LAB kültürasyonu için MRSA besiyerine 100 µL olarak yayma ekimleri yapıldı. Ekimleri tamamlanan petriler 37°C'de 2-3 gün mumlu kavanoz tekniği kullanılarak %5'lik CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

2.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Saflaştırılması ve Stoklanması

LAB kültürlerinin inkübasyonundan sonra MRS agar üzerinde üreyen bakteri kolonilerinin makroskobik ve mikroskobik morfoloji özellikleri incelendi. Gram pozitif, ince basil ve kok gözlenen kültürlerden 24 suş tek koloni düşürme ekim tekniği ile MRS agar besiyerine pasajlandı. Kültürler 37°C'de 24-48 saat mumlu kavanozda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda izole edilen saf LAB kültürlerinden bir öze dolusu alınarak 3 mL MRS sıvı besiyerine yeniden pasajları yapıldı ve 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 120 rpm'de 1 gece üremeye bırakılarak taze kültürler sonraki deneyler için hazırlandı. Kalan kültürler eküvyon çubuk yardımıyla toplanarak 1 mL MRS sıvı besiyeri ve %20 gliserol içeren steril ependorf tüplerinde

ikişer tekrarlı olarak stoklandı. Saf stok kültürler hedeflenen çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de ve -80°C'de muhafaza edildi.

2.2.3. Bakteriyofaj İçeriklerinin Belirlenmesi

2.2.3.1. Bakteriyofaj İndüksiyonu

Bakterilerin bakteriyofaj içerikleri, bu suşların mitomisin C ile indüklenmesi ile belirlendi. Laktik asit bakterilerinin 24 saatlik kültüründen subkültür yapılarak bir gecelik taze kültür elde edildi. 2.5 mL (10 mM) $CaCl_2$ içeren 250 mL MRS sıvı (MRS-C) besiyeri 3 mL olarak tüplere dağıtıldı. MRS-C besiyeri içine taze LAB kültüründen 60 µL (1/20 oranında) pasajlandı. Yaklaşık 2 saat (OD_{600}nm=0.2) inkübasyondan sonra, son konsantrasyon 0.2 µg/mL olacak şekilde mitomisin C ilave edilerek yaklaşık 5-8 saat inkübasyona tabi tutuldu. Mitomisin C ile indüklenmiş kültürler inkübasyon süresince gözlemlenerek bulanık kültürlerin profaj indüksiyonu ve laktobasillerin liz olması sonucu berraklaşması veya toz gibi çökmesi belirlendi. Liz gözlenen veya gözlenmeyen tüm kültürlerden 1.5 mL ependorf tüplerine alınarak 13000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant, başka bir ependorf tüpe aktarılıp bir damla kloroform ilave edildi. Bu şekilde hazırlanan lizatlar, bakteriyofajların belirlenmesi için damla (drop assay) yönteminde kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi (Trevors vd., 1983; Kılıç vd., 1996).

2.2.3.2. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması

LAB sıvı kültürlerinde logaritmik fazın başında olan konak bakterilerden (OD_{600}= 0.4) 100 µL alındı ve 10 mM $CaCl_2$ içeren 48-50°C'ye soğutulmuş yarı-katı MRS agarın (% 0.6) 3 mL'sine ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra MRS agar plakların yüzeyine yayıldı. Agarın donmasını takiben önceden hazırlanan indüklenmiş LAB suşlarına ait lizatlardan 5'er µL agar yüzeyine belirli bir sırayla damlatıldı ve kuruması beklendi. Kültürler 37°C'de 24-48 saat mumlu kavanoz yöntemiyle hazırlanan %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Lizat damlatılan alanlarda indikatör bakterinin üremediği bir inhibisyon zonunun oluşması bakteriyofaj veya antibakteriyel aktivite varlığı olarak belirlendi. Tek plak oluşturan lizatlar bakteriyofaj pozitif olarak değerlendirildi. Damlatma yapılan bölgede faj plakları oluşturan lizatlar kaydedilerek ileriki çalışmalara dahil edilmedi (Alpay, 1999).

2.2.4. Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

2.2.4.1. Gram Boyama

Gram boyama bakterilerin hücre duvarlarının biyokimyasal yapısına göre tanımlanması ve sınıflandırılması için kullanılan en temel boyama yöntemidir. Gram boyama ile bakteriler Gram pozitif, Gram negatif veya Gram değişken olarak üçe ayrılır. LAB kültürlerinden hazırlanan preparatlar ısı ile tespit edilerek boyamaya hazırlandı. Soğuyan preparatlar ilk olarak kristal violet ile 2 dk boyandı. Süre sonunda preparatlar Lugol solüsyonuyla yıkanarak 2 dk bekletildi. 15 sn boyunca %96'lık etil alkol ile dekolarize edilen preparatlar distile su ile yıkandı. Ardından safranin ile 1 dk boyandı. Son aşama olarak preparatlar distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra mikroskopta 100X büyütmede immersiyon yağı yardımıyla incelendi. Mikroskopta mor renge boyanan bakteriler morfolojilerine göre Gram pozitif laktobasil ve Gram pozitif laktokok olarak tanımlandı. Pembe renge boyanan bakteriler ise Gram negatif olarak değerlendirildi ve çalışmaya dahil edilmedi (Koneman vd., 1997).

2.2.4.2. Katalaz Testi

Çalışmada katalaz testi, LAB'ler tarafından sentezlenen katalaz enziminin varlığını saptamak amacıyla yapıldı. Temiz bir lam üzerine bir damla %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ayracı damlatıldı. MRSA besiyerinde geliştirilen 18-24 saatlik saf LAB kültürlerinden öze yardımıyla bir koloni alınarak lam üzerinde hidrojen peroksit ile karışımı sağlandı. Köpürme şeklinde gaz kabarcıklarının gözlenmesi pozitif, ortalama 20 sn. süresince köpürme gözlenmemesi negatif olarak değerlendirildi (Garcia ve Isenberg, 2010).

2.2.4.3. Oksidaz Testi

Oksidaz testi temel olarak bir mikroorganizmanın aerob olup olmadığını saptamak için yapılır. Sitokrom-c içeren organizmalar, hücre içi oksidaz enzimi üretir. Atmosferik oksijen varlığında, bir bakteri hücre içi oksidaz enzimlerine (sitokrom oksidaz veya indol fenol oksidaz) sahipse, koyu mor bir bileşik olan indol fenolü oluşturmak için ortamda bulunan, yapay bir elektron alıcı görevi gören fenilendiamin reaktifini okside eder. Oksitlenmiş reaktif mavi mor renk oluşturur (Garcia ve Isenberg, 2010).

Hazırlanan çözeltiden lam üzerine bir miktar damlatıldı. Ardından çözelti üzerine taze kültürden öze yardımı ile alınan bakteriler bırakıldı. Lam üzerinde kurutma kâğıdı ile yapılan kontrolde 10-30 sn. içerisinde mavi-mor renk oluşumunun gözlemlenmesi testin pozitif, 60 sn sonunda herhangi bir renk değişimi gözlemlenmemesi ise testin negatif olduğunu gösterdi (Garcia ve Isenberg, 2010).

2.2.4.4. Proteaz Üretimi

İzolatların proteaz enzimi üretimleri hazırlanan proteaz besiyerinde test edilerek belirlendi. Bir gecelik taze LAB kültürlerinin proteaz test besiyerine tek koloni ekimleri gerçekleştirildi ve 37°C'de inkübasyona tabi tutuldu. Düzenli aralıklarla kontrol edilerek petri etrafında açık zon oluşturan koloniler proteaz pozitif olarak belirlendi (Carlisle ve Falkinham, 1989).

2.2.4.5. Lipaz Üretimi

Bir gecelik taze LAB kültürlerinin her birinden lipaz besiyerine steril öze ile nokta ekim yapıldı. 2-3 gün 37°C'de inkübasyon sürecinin ardından petri kapları UV 354 nm ışığı altında kontrol edilerek parlak turuncu renk gözlenen koloniler lipaz pozitif olarak değerlendirildi (Jette ve Ziomek, 1994).

2.2.4.6. Amilaz Üretimi

Amilaz besiyerine ekimleri yapılan bir gecelik taze LAB kültürleri 37°C'de 48 saat inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra üreme gözlenen petrilerin yüzeyi iyot solüsyonu ile kaplandı. Amilaz üreten izolatlar kolonilerin etrafında oluşan beyaz zonla belirlendi.

2.2.4.7. Selülaz Üretimi

İzolatların selülaz enzim üretimleri hazırlanan selülaz besiyerinde test edilerek belirlendi. Bir gecelik taze LAB kültürlerinin selülaz test besiyerine ekimleri gerçekleştirildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra selülaz aktivitesinin belirlenmesi için petri kapları %0,1'lik Kongo Kırmızısı ile kaplandı ve rengin açılması için 1N NaCl ilave edilip 15 dk. beklendi. Zemin kırmızı renge boyanırken selülaz üreten kolonilerin çevresinde boyanmayan sarı/şeffaf zonların varlığı selülaz pozitif olarak değerlendirildi (Hols vd., 1994).

2.2.4.8. Lesitinaz Üretimi

Lesitinaz testi yumurta sarısında bulunan lipoprotein komplekslerinin bakteriler tarafından oluşturulan lesitinaz ve fosfolipaz enzimleri ile hidroliz edilebilme durumunu belirlemek için yapılır. Lesitin, yumurta sarısının normal bir bileşenidir. Lesitinaz enzimine sahip mikroorganizmalar, besiyerindeki lesitini çözünmeyen digliserit ve fosforilkoline parçalayarak koloninin kenarının ötesine yayılan beyaz opak bir çökelme bölgesi oluştururlar. MRS agarda 37°C'de 48 saat inkübe edilen bakterilerden tek koloni alınarak MRS sıvı besiyerinde çözüldü. McFarland 0.5 olarak ayarladı ve lesitinaz besiyerlerine 5 µL damlatıldı. 37°C'de yaklaşık 24-48 saat inkübe edilen test besiyerlerindeki koloniler etrafında lesitin hidrolizasyonu sonucunda oluşan açılmalar ve opaklaşmalar pozitif olarak değerlendirildi (Arturo vd., 1995; García vd., 2019).

2.2.4.9. Jelatinaz Üretimi

Bu test bakterilerin jelatini hidroliz eden jelatinaz enzim sentez yeteneğini ölçmede kullanılır. MRSA besiyerinde 37°C'de yaklaşık 2 gün inkübe edilen bakterilerden tek koloni alınarak MRS sıvı besiyerinde çözüldü. McFarland 0,5 olarak ayarlandıktan sonra jelatin besiyerlerine 3-5 µL damlatıldı. 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda üreme gözlenen örnekler 1 saat buzdolabında bekletildi. Jelatinin hidroliz edildiği durumlarda buzdolabından çıkarılan örneklerin sıvı halde olduğu ve katılaşmadığı görüldü. Bu durum jelatin testi için pozitif kabul edilirken, jelatinin katılaşması test sonucunu negatif olarak gösterdi.

2.2.4.10. Sitrat Testi

Bu test, mikroorganizmaların besiyerlerine katılan sitratı karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamada kullanılır. Sitrat kullanma yeteneğini belirlemek için tek karbon kaynağı olarak sodyum sitrat içeren bir agar ortamı kullanıldı. MRSA besiyerde 37°C'de 24 saat inkübe edilen bakterilerden tek koloni alınarak MRS sıvı besiyerinde McFarland 0.5 olarak ayarladı ve sitrat besiyerlerine 3-5 µL damlatıldı. Örnekler 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yeşil olan sitrat besiyerinin renginin maviye dönüşmesi sonucun pozitif, renk değişimi görülmemesi sonucun negatif olduğunu gösterdi.

2.2.4.11. Eskulin Hidrolizi

Eskulin, UV ışığı altında floresan veren bir glikozittir. Bazı bakterilerin ürettiği yapısal bir enzim olan eskülinaz (β-glikozidaz) aktivitesi ile glukoz ve eskületine yıkılır. Bunun sonucunda ortamda floresan ışımasının azalması ve kaybı ile eskülinaz varlığı tespit edilebilir (Gracia vd., 2019). Hazırlanan eskülinli sıvı besiyeri 100 µL olarak 96 kuyucuklu eliza plaklara dağıtıldı. Bir gecelik LAB kültürleri son konsantrasyon MacFarland 0.5 olacak şekilde MRS sıvı besiyerinde çözüldü. Eskulinli besiyeri içeren mikro kuyucuklara birer damla bakteri süspansiyonu inoküle edildikten sonra 24-48 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda UV ışığı altında floresan vermeyen örnekler eskulin hidroliz testi pozitif olarak değerlendirildi (Alpay, 1999).

2.2.4.12. Hidrojen Peroksit Üretimi

Bakterilerin bir gecelik kültüründen tetra metil benzidin içeren TMB-Plus besiyerine çizgi ekimleri yapıldı. 72 saat 37°C 'de anaerobik (mumlu kavanozda) ortamda inkübasyondan sonra kültürler inkübasyondan çıkarılıp atmosferik havada 15 dk. bekletildi. H_2O_2 üreten kolonilerin etrafında oksijenle temas halinde siyah/koyu gri halka oluşumunun gözlenmesi testi pozitif olarak belirledi (Alpay, 1999).

2.2.4.13. Karbonhidrat Fermantasyonu

LAB suşlarının glukoz, galaktoz, maltoz, mannitol, melibioz, raffinoz, riboz, sükroz, trehaloz vb. şekerleri fermente etme ve nişasta hidroliz etme yetenekleri test edildi. Stok karbonhidrat solüsyonları distile su ile %10'luk konsantrasyonda hazırlandı. 0.45 µm'lik filtrelerden süzülerek steril edildi. Kullanılacak karbonhidrat solüsyonlarının her birinden %1'lik hazırlandı ve fermentasyon besiyeri ile karıştırıldı. Karbonhidrat içeren fermentasyon besiyeri 96 kuyucuklu eliza plaklara 100 µL olarak dağıtıldı. Bir gece öncesinde inkübe edilen taze LAB kültürlerinden bir öze dolusu koloni toplandı. 1 mL distile su ile yıkanarak 14000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Ardından süpernatant atılarak pelet tekrar 1 ml distile su içerisinde çözülerek vortekslendi. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan bir damla (≈5 µL) alınarak eliza plaklardaki %1 karbonhidratlı fermentasyon besiyerlerine inoküle edildi. 37°C'de 3-4 gün inkübasyonun ardından bromocresol purple içeren

besiyerinin renginin mordan sarıya dönüşmesi durumunda test pozitif olarak değerlendirildi (Alpay, 1999).

2.2.4.14. Düşük ve Yüksek Sıcaklıkta Üreme

Geceden MRSA besiyerine inoküle edilen LAB kültürleri MRS sıvı besiyerinde çözülerek son konsantrasyon MacFarland 0.5 olarak ayarlandı. Bakteri yoğunluğu ayarlanan sıvı LAB kültürleri 3 mL MRS sıvı besiyerine aktarıldıktan sonra 15°C'de ve 45°C'de 48-72 saat boyunca inkübasyona bırakılarak üreme özellikleri yönünden incelendi. En fazla bir hafta sonunda üreme olmayan kültürler negatif olarak değerlendirildi (Alpay 1999).

2.2.5. Moleküler Tanımlama

2.2.5.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için fenol-kloroform metodu kullanıldı. 24 saatlik sıvı kültürler ependorf tüplere alınarak 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Santrifüjden sonra süpernatant kısımları döküldü ve kültürün geri kalanından tekrar ependorf tüpe alınarak aynı şekilde çöktürüldü. Süpernatant kısımları döküldü ve pellet kısımlarının üzerine 500 µL TE tamponu eklendi (10mM Tris pH:8; 1mM EDTA pH:8). İyice karıştırılıp çözündürdükten sonra her bir tüpe 50 µl lizozim (10 µg) enzimi eklenerek vortekslendi. Tüpler 37 °C'de 1 saat bekletildi. Her bir tüpe 50µL %10'luk SDS eklenerek tüpler 5-6 defa alt üst edildi ardından 37°C 'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra her tüpe 3 M'lık 1/10 hacim (≈55 µL) sodyum asetat (Na-Ac pH: 5.2) eklendi. Tüpler 65°C 'de her 10 dakikada bir alt üst edilerek 30 dakika beklendi. Her tüpe 500 µL fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek vortekslendi ve 4 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerin üst kısmındaki sıvı dikkatlice alınarak yeni ependorf tüplerine aktarıldı. Yeni tüplere tekrar 500 µl kloroform eklendi ve alt üst edilerek 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı kısım temiz tüplere aktarıldı. Tüplere tekrar 500 µl kloroform ilave edildi ve yeniden alt üst edilerek 13.000 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı kısım tekrar yeni ependorflara aktarıldı. Bu işlem gerekli durumlarda üç kez tekrarlandı. En son elde edilen tüplere 1/10 hacim 3M sodyum asetat (≈55 µL) ve 2 hacim (≈900 µL) %96'lık soğuk EtOH (etil alkol) ilave edilerek -20°C'de 45 dk bekletildi. Daha sonra tüpler 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj

edildi ve üst kısımdaki sıvılar atıldı. Kalan pelletlerin üzerine 500 µL %70'lik soğuk EtOH ilave edilerek tekrar 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Üst kısımlar dökülerek pelletler 37°C'de 10 dk kurumaya bırakıldı. Kurutmadan alınan tüplere 50 µL TE (20 µg/mL RNase içeren) ilave edilerek çözdürüldü. DNA'lar kullanılacağı süreye kadar –20°C'de muhafaza edildi.

2.2.5.2. Genomik DNA'nın Agaroz Jelde Yürütülmesi

Genomik DNA'ların görüntülenebilmesi için %1'lik agaroz jel hazırlama işleminde öncelikle 0.8 g agaroz hassas terazide tartıldı. 80 ml 1X TAE tamponu ile karıştırıldı ve mikrodalga fırında 2-3 dk çözüldü. Agaroz jel homojen şekilde çözüldükten sonra 50°C'ye kadar soğutuldu ardından içerisine 3 µl etidyum bromür ilave edildi. Homojen şekilde karıştırılan etidyum bromürlü agaroz jel, kuyucukların oluşması için jel tarağı takılarak hazırlanan jel kalıbına döküldü ve 15-20 dk donması için bekletildi. Agaroz jel donduktan sonra jel tarağı dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra agaroz jel elektroforez tankının içerisine düzgünce yerleştirildi ve jelin üzerini kaplayacak şekilde 1X TAE tamponu ilave edildi. Her bir izolatın DNA solüsyonundan 5 µL alındı ve 2 µL yürütme boyası (Orange g) ile karıştırılarak dikkatli bir şekilde kuyucuklara yüklendi. 110 V'luk elektrik alanda 20-25 dakika yürütüldü. Yürütme sonucunda izolatlardan elde edilen genomik DNA'lar UV ışığı altında görüntülendi. Daha sonra DNA'lar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

2.2.5.3. 16S rRNA Geninin PZR ile Amplifikasyonu

16S rRNA gen amplifikasyonu için, her bir izolattan elde edilen genomik DNA'lardan 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ileri ve 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') geri evrensel primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle yapıldı. Primerler Macrogen Inc. (Amsterdam, Hollanda) firmasından temin edildi. PZR reaksiyonu 50 µl son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyonlar, son hacimde 1X Taq DNA polimeraz Buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP mix, 0.3 pmol/µL ileri ve geri primerlerden, 1 U Taq DNA Polimeraz (Fermentas) kullanılarak hazırlandı. PZR döngüsü ise ilk denatürasyon basamağı 95°C'de 3 dk daha sonra 35 döngü, denatürasyonda 95°C'de 30 sn, primer bağlanma sıcaklığında (Tm) 45 sn, uzama basamağında 72°C'de 2 dk olacak şekilde

ayarlandı. Son uzama basamağı ise 72°C'de 10 dk olarak ayarlandı ve proses tamamlandıktan sonra PZR ürünleri +4°C'de muhafaza edildi. PZR ürünleri etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde UV ışığı altında görüntülenerek kontrol edildi. gerçekleştirilen 16S rRNA gen bölgesi PZR'si sonucunda elde edilen ürünler pürifikasyon ve sekans işlemi için Macrogen Inc. (Amsterdam, Hollanda) firmasına gönderildi.

2.2.5.4. Verilerin Biyoinformatik Analizi

Macrogen'den elde edilen dizi analizi sonuçları BioEdit (Hall, 1999, version 7.09) programı ile incelendi. Diziler Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) GenBank veri tabanındaki Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (BLAST) kullanılarak yakından ilişkili türlerle karşılaştırılmış ve yüzde benzerlikleri belirlenmiştir. Buradan elde edilen veriler izolatların morfolojik tanımlamalarını doğrulamak için kullanıldı. Tanımlanan suşların evrimsel akrabalıklarını belirlemek amacı ile oluşturulan filogenetik ağaç, MEGA 11.0.8 yazılımı ile Neighbor-Joining yöntemi temelinde oluşturulmuştur (Saitou ve Nei 1987; Tamura ve diğerleri 2004). Oluşturulan dendrogramların güvenilirliği MEGA 5.0 programı kullanarak seç-bağla (bootstrap) analizi ile 1.000 tekrarlı olacak şekilde test edildi.

2.2.6. Antimikrobiyal Aktivite

2.2.6.1. İndikatör Patojenlerin Kültürasyonu

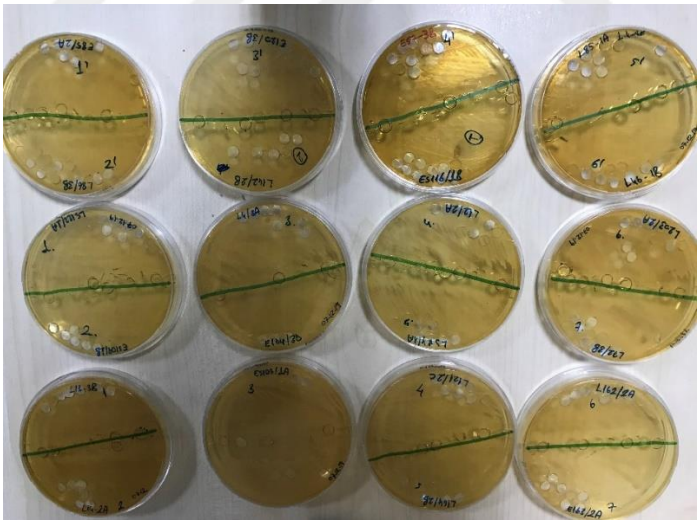
E. coli, K. pneumonia, Y. pseudotuberculosis, S. typhimurium, P. auroginosa, S. aureus, E. faecalis, B. cereus ve *L. monocytogenes* suşlarının kültürü için Mueller Hinton katı besiyeri (agar) ve sıvı besiyeri kullanıldı. *H. pylori* için suplement katkılı ve %5 insan kanlı Brucella agar besiyeri kullanıldı. Antitüberküloz aktivite *M. smegmatis*'e karşı test edildi ve kültürasyonda BHI besiyeri (agar ve sıvı) kullanıldı. Maya mantarlarına karşı antimikrobiyal aktivite testi için *C. albicans* kültürleri ile PDA besiyeri kullanıldı. *Paenibacillus larvae, P. alvei,* ve *Melissococcus plutonius* kültürü için MYPGP besiyeri kullanıldı.

Patojen test bakterileri uygun besiyerlerinde mumlu kavanoz metodu veya gas pak kullanılarak 37°C'de (maya mantarları 30°C'de) 18 saat aktifleştirildikten sonra kültürlerin son konsantrasyonu McFarland 0.5 (1 x 10^8 KOB/mL) olacak şekilde

ayarlandı. Tüm aktif bakteriler test besiyerlerine steril eküvyon çubuğu ile homojen bir şekilde yayılarak agar plug ve agar kuyucuk difüzyon metodu için hazır hale getirildi.

2.2.6.2. Agar Plug Difüzyon Metodu

MRSA besiyerinde 24-48 saat inkübe edilen LAB suşlarının patojen mikrorganizmalara karşı inhibisyon etkinliği test edildi. LAB kültür plaklarından steril cam boru ile 6 mm çapında kesilen diskler indikatör patojen suşların (MacFarland 0.5 bakteri yoğunluğunda) yayıldığı besiyerlerine 2 cm aralıklarla sırayla yerleştirildi. *Paenibacillus* suşları için LAB'ler arasındaki sinerjik etkileşimin ve daha güçlü koruma etkisinin gözlenebilmesi amaçlı kombo plak olarak da aynı test uygulandı. Kombo plaklarda, MYPG katı besiyerine test için seçilen *Paenibacillus* kültür plaklarının üzerine, hazırlanan agar pluglar toplu olarak birbirlerine yakın şekilde (5 mm) yerleştirildi. Tüm plaklar 37°C'de CO_2'li ortamda 24 saat inkübe edildikten sonra disklerin oluşturduğu inhibisyon zon çaplarına göre antimikrobiyal etkinlikler değerlendirildi (Balouiri vd., 2016).



Şekil 6. Agar plug kesimi yapılan petri örnekleri

2.2.6.3. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu

Her bir LAB suşundan elde edilen steril lizatlar (LAB-CFS) seçilen patojen bakteri suşlarına karşı inhibe edici aktiviteleri test edildi. 37°C'de MRS katı besiyerinde aktifleştirilen 24 saatlik LAB kültürleri hücresiz kültür süpernatantı (CFS, cell-free supernatant) hazırlamak için subkültür edilerek sıvı MRS besiyerine

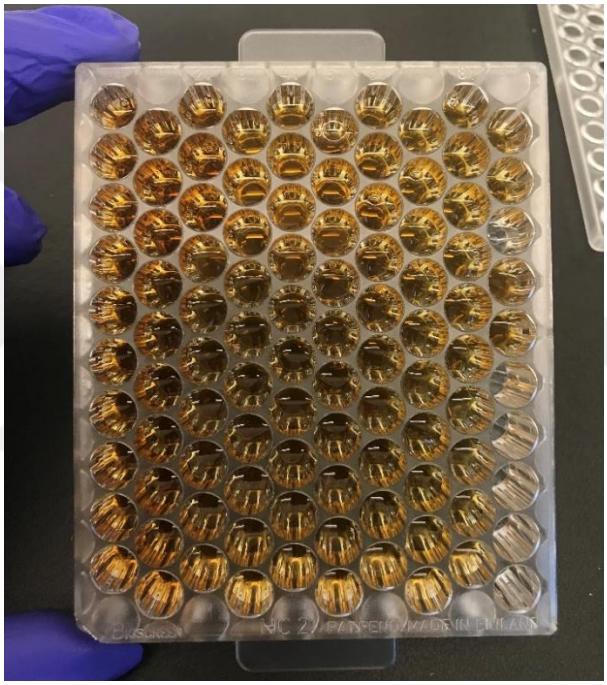
çekildi. Çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 120 rpm'de 72 saat inkübe edilen sıvı kültürler daha sonra 10500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, steril şartlarda 0.45 µm'lik steril tek kullanımlık mikro filtreden geçirildi. Belirlenen agar besiyerlerine ekimleri yapılan (McFarland 0.5) patojen bakterilerinin kültür plakları üzerine aseptik koşullar altında steril agar delici ile 6 mm kuyucuklar açıldı. LAB-CFS'ler 60 µL olacak şekilde açılan kuyucuklara transfer edildi. Plakların 2 saat oda ısısında bekletilmesinin ardından bakteriler 37°C'de ve mayalar 30°C'de 24 saat inkübe edildi. Antimikrobiyal aktivite, inkübasyon sonunda kuyucukların çevresinde oluşan zon çapının mm olarak ölçülmesiyle değerlendirildi (Ahmad vd., 2018; Pelyuntha vd., 2019).

2.2.6.4. *P. larvae*'ya Karşı Sporisidal Etkinlik

İzolatlardan tek tek elde edilen LAB-CFS'ler, *P. larvae* sporlarının çimlenmesini (sporasidal aktivite) ve vejetatif hücrelerin büyümesini (bakteriostasis) önleme etkinlikleri açısından test edildi. İlk olarak, 48 saatlik *P. larvae* kültüründen 0.5 McFarland bulanıklıkta (≈10^6 KOB/mL) bakteriyel solüsyonu hazırlandı ve OD_{620} nm ile doğrulandı. Spor hasadı için MYPGP agar besiyerinde yetiştirilen 48 saatlik *P. larvae* kültürü +4°C'de 15 gün boyunca inkübasyonda bırakıldı. Süre sonunda üreyen kültür tek kullanımlık steril eküvyon çubukları yardımıyla toplandı ve steril distile su ile yıkandı. Vejetatif hücreleri ortadan kaldırmak ve aynı zamanda spor oluşumunu indüklemek için kültür solüsyonu 10 dk boyunca sıcaklığı 72°C'ye ayarlanan su banyosuna yerleştirildi. Bu işlemden sonra kültür solüsyonu içeren tüpler 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Bakteri peleti tüplerin dibinde toplanmış olarak kaldı ve süpernatanda kalan sporlar toplandı. Bu şekilde toplanan sporlar seri dilüsyondan geçirilerek koloni sayma tekniği ile mL başına 2x10^6 spor oluşturan birim (SOB/mL) içerek şekilde nihai spor solüsyonu hazırlandı. Bu spor solüsyonu, larva besleme deneyinde de kullanıldı. 100 oyuklu petek plaklara her bir LAB-CFS'den 150 µL miktarında dağıtıldı ardından bu plaklara hazırlanan *P. larvae* spor solüsyonundan 20 µL miktarında ilave edildi (Şekil 7). Kuyucukların son hacmi MYPGP sıvı besiyeri ile 300 µL'ye tamamlandı. Bioscreen C cihazına yerleştirilen plaklar her 30 dakikada bir çalkalama yapılarak 37°C'de 18 s boyunca her saat fotometrik ölçümler (OD_{600nm}) alınarak veriler kaydedildi. *P.larvae*'nın spor formlarının gelişim aktivitesi, CFS varlığında negatif kontrol grubu ile gözlendi.

İnkübasyon süresi sonunda elde edilen spektrum değerleri kullanılarak test gruplarının kontrol grubuyla karşılaştırmalı bakteriyel üreme eğrisi oluşturuldu.

Hazırlanan spor solüsyonundaki spor canlılığını test etmek için solüsyonun 100 µL'si MYPGP agar besiyeri üzerine yayıldı ve inkübasyona bırakıldı. Ayrıca 100 µL spor solüsyonu yayılan petrilere steril delici ile 6 mm kuyucuklar açıldı. Test edilen LAB-CFS'lerden bu kuyucuklara sırasıyla 60 µL miktarında damlatıldı ve petriler 4 gün 37°C'de mumlu kavanoz tekniğiyle oluşturulan CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı.



Şekil 7. CFS dağıtılan Bioscreen C petek plak görünümü

2.2.7. Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi

2.2.7.1. Safra Toleransı

LAB suşlarının safra tuzuna karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ince bağırsak sistemini simüle etmesi için %0.3 (w/v) oranında safra tuzu (Edukim) içeren sıvı MRS besiyeri (Bile-MRS) hazırlandı. Bir gecelik aktif LAB kültürlerinden 1'er mL alındı ve 10.000 g'de 5 dk santrifüjlendi. Elde edilen hücre pelleti iki kez PBS (pH 7.2) ile yıkandı. Daha sonra bakteri pelleti 1 mL %0.3'lük Bile-MRS sıvı besiyerine, A_{600}nm'de optik yoğunluk OD_{600nm}=0.1-0.2 ($\approx 10^6$ KOB/mL) olacak şekilde ayarlanarak, inoküle edildi. Kültürler 37°C'de 4 saat

inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 0. ve 4. saatinde kültürlerden 100 µL örnek alınıp seri dilüsyonlar yapılarak MRS agar besiyeri ortamına ekildi. 37°C'de 24-48 saat inkübasyon süresince üreme gözlenen petrilerde koloni sayısı sayılarak log koloni oluşturan birim (log KOB/mL) olarak hesaplandı. Bile-MRS sıvı besiyerinde inkübasyona bırakılan LAB suşlarının 20 saat boyunca üreme aktivitesi mikrobiyolojik üreme izleme cihazında (Bioscreen C, Labsystems) fotometrik ölçümle takip edildi. Standart MRS sıvı besiyerinde üremesi izlenen kontrol gruplarının ve Bile-MRS ortamında üremesi izlenen test gruplarının karşılaştırmalı olarak bakteriyel üreme eğrisi oluşturuldu (Chateau vd., 1994, Chung vd., 1999, Maragkoudakis vd., 2006, Lee vd., 2011).

2.2.7.2. pH Toleransı

Potansiyel probiyotik karakterdeki mikroorganizmaların midede geçirilen asidik pH'lı sindirim sürecine direncini ve ince bağırsağa ulaşıp ortamdaki pH'ya uyum sağlayarak üremeye devam edebilme yeteneğini *in vitro* koşullarda belirlemek için pH değeri 3.0 ve 7.8 olan PBS solüsyonları hazırlandı. LAB izolatları bir gece aktifleştirildikten sonra taze kültürlerden 1 mL örnek alındı. 10.000 g'de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen pelletler PBS (pH 7.2) ile iki kez yıkandı. Pelletler daha sonra pH'sı 3.0 ve 7.8 olan 1'er mL PBS içerisinde süspanse edilerek nihai hücre yoğunlukları OD_{600nm}=0.1-0.2 ($\approx 10^6$ log KOB/mL) olarak ayarlandı. Süspansiyonlar besinlerin midede geçirdiği sindirim süresi baz alınarak 3 saat 37°C'de anaerobik olarak inkübe edildi. İnkübasyonun 0. ve 3. saatinde bakteri süspansiyonlarından 100 µL örnek alınarak seri dilüsyonlardan geçirildi ve MRS agar besiyerine yayma ekim yapıldı. 37°C'de 24-48 saat inkübasyonun sonunda üreme gözlenen petrilerdeki koloniler sayılarak canlılık log KOB/mL olarak hesaplandı (Jacobsen vd. 1999, Maragkoudakis vd. 2006, Lee vd. 2011).

2.2.7.3. Otoagregasyon Yeteneği

LAB izolatları MRS sıvı besiyerine inoküle edilerek 37°C'de 18 saat aktifleştirildi. İnkübasyonun ardından kültürler 5000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Hücre pelletleri iki kez PBS (pH 7.2) ile yıkandı. Daha sonra 600 nm'de optik dansite OD_{600nm}=0.1-0.2 ($\approx 10^6$ KOB/mL) olacak şekilde bakteri yoğunluğu ayarlanarak pelletler 4 ml PBS içerisinde çözüldü. Hazırlanan süspansiyonlar 10 sn

vortekslenerek, otoagregasyon özelliğini tespit etmek üzere 4 saat süresince oda sıcaklığında hareket ettirmeden bekletildi. 0. saatten başlamak üzere her saat başında kültürlerin üst kısmından nazikçe 0.1 mL örnek alınarak 3.9 mL PBS ile karıştırıldı ve OD değerleri (A_{600} nm) spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kör olarak PBS kullanıldı. Yüzde otoagregasyon hesaplamaları aşağıdaki formüle göre değerlendirildi (Kos vd., 2003, Kang vd., 2018).

$$\% \text{ Otoagregasyon} = \left[1 - \frac{ODson}{ODilk}\right] \times 100 \qquad (1)$$

OD_{ilk}: Örneğin 0.saatte OD değeri

OD_{son}: Örneğin her saat sonundaki OD değeri

2.2.7.4. Koagregasyon Yeteneği

LAB izolatları MRS sıvı besiyerine inoküle edilerek 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 18 saat aktifleştirildi. Kültürler 5000 g'de 15 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen pelletler iki kez PBS ile yıkandı. Daha sonra 600 nm'de OD 0.1 ($\approx 10^6$ KOB/mL) olacak şekilde bakteri yoğunluğu ayarlanarak PBS içerisinde pelletler çözüldü. Koagregasyon yeteneğini belirlemek için kullanılacak olan patojen bakterilerin süspansiyonları da uygun sıvı besiyerlerinde aktifleştirildikten sonra aynı şekilde hazırlandı. Koagregasyon için, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* ve *Paenibacillus larvea* PB34 suşları kullanıldı. Patojen her suşdan 2 mL alındı ve test edilecek LAB solüsyonu ile aynı oranda karıştırıldı. Ek olarak patojen suşların bireysel agregasyon özellikleri otoagregasyon deneyinde belirtildiği gibi ayrı bir yerde hazırlandı. Karışımlar 10 sn vortekslendi ve koagregasyon özelliğinin tespit edilebilmesi için 4 saat süresince oda sıcaklığında hareket ettirmeden bekletildi. 0. saat ve 4. saat başında hem patojen örneklerin hem de karışımın üst fazından 0.1 mL alınarak 3.9 mL PBS ile karıştırıldı. Bu örneklerin OD değerleri bekletme öncesi ve bekletme sonrası olarak 600 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Koagregasyon yüzdesinin hesaplanmasında aşağıda belirtilen formül kullanıldı (Kos vd., 2003, Rinkinen 2003).

$$\% \text{ Koagregasyon} = \left[1 - \frac{2\ x\ A\ mix}{A\ patojen + A\ probiyotik}\right] \times 100 \qquad (2)$$

$A_{patojen}$: Test edilen patojen mikroorganizmanın OD değeri

$A_{probiyotik}$: Test edilen laktik asit bakterisinin OD değeri

A_{mix}: Test edilen patojen ve LAB'nin karışım halinde OD değeri

2.2.7.5. Hemolitik Aktivite

Çalışmada kullanılan LAB suşları MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 1 gece subkültür edildikten sonra %5 insan kanı içeren BHI kanlı agarda ekimleri yapıldı. Kontrol suşu olarak *Streptococcus pyogenes* kullanıldı. İnkübasyon sonunda etrafında berrak zon oluşturan koloniler β-hemolitik, parlak yeşil zon oluşturan koloniler α-hemolitik ve zon oluşturmayan koloniler ise γ-hemolitik (non-hemolitik) olarak değerlendirildi (Maragkoudakis vd., 2006).

2.2.7.6. Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Probiyotik olarak önerilmek istenen bakterilerde aranan özelliklerden birisi antibiyotiklere karşı doğal dirençli olmalarıdır. Diyare gibi antibiyotik kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilen hastalıklarda bağırsak florasını düzenlemek amacı ile probiyotikler kullanılmaktadır. Dolayısı ile uygulanacak probiyotik bakterilerin bağırsağa nüfuz eden antibiyotiklerden etkilenmemeleri gerekmektedir (Tarrah. 2018). Bu amaçla çalışmamızda probiyotik özellikleri karakterize edilen LAB'ların insanlarda sık kullanılan bir dizi antibiyotiklere olan direnç profillerinin belirlenmesi için antibiyogram yapıldı (CLSI, 2013). Antibiyotik seçimi Gram pozitif ve /veya Gram negatif bakterilerde kullanılan; gentamisin, eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol, streptomisin, ampisilin, seftazidim, sefaklor, sefazolin, trimetoprim-sulfametoksazol ve vankomisin antibiyotikleri olarak belirlendi (Tablo 5). Antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon metodu ile test edildi. LAB izolatları 37°C'de MRS sıvı besiyerinde aktifleştirildi. 24 saat inkübasyondan sonra her bir izolat steril serum fizyolojik içerisinde bakteri yoğunluğu McFarland 0.5 (≈$1.5x10^8$ KOB/mL) olacak şekilde seyreltildi. Üretici firma prosedürüne göre hazırlanıp steril petri plaklarına 4 mm kalınlığında dökülmüş MRSA besiyeri üzerine steril bir eküvyon çubuğu yardımı ile bakteri yoğunluğu ayarlanan LAB kültürlerinin yayma ekimleri yapıldı. Ekim yapıldıktan sonra agar yüzeyi kurumaya bırakıldı. Ardından +4°C'de muhafaza edilmekte olan antibiyotik diskleri alınarak agar yüzeyine temas edecek ve disk aralarında en az 24 mm mesafe kalacak şekilde sırayla yerleştirildi.

Disklerin yerleştirilmesinden sonra petriler 37˚C'de 48 s inkübe edildi. İnkübasyondan sonra antibiyotik diskleri etrafında oluşan zonların çapları ölçüldü. Ölçülen zon çapları referans değerler ile karşılaştırılarak, bakteri test edilen antibiyotiğe karşı "duyarlı" veya "dirençli" olarak değerlendirildi. LAB insan patojeni olmadıkları için spesifik olara antibiyotik duyarlılık yada dirençlilikten söz edilmez ve CLSI'de de antibiyotiklere olan duyarlılık standardı da verilmemiştir. Bu nedenle Gram pozitif bakteriler için en yakın cins olan *Enterococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. cinslerine ait kriterlere göre ve Gram negatif bakteriler için ise *Enterobacter* spp. cinsine göre dirençlilik zonlarının belirlenmesi hedeflendi (Tablo 5).

Tablo 5. Test edilen antibiyotikler, kısaltmaları, doz içerikleri ve direnç aralıkları

Grubu	**Antibiyotik Adı/Kısaltması**	**Doz İçeriği**	***Enterococcus* spp.**		***Enterobacter***	
			R	**I**	**R**	**I**
Aminoglikozit	Gentamisin (CN)	10 µg	6	7-9	≤12	13-14
	Streptomisin (S)	300 µg	6	7-9	≤11	12-14
Makrolid	Eritromisin (E)	15 µg	≤13	14-22	-	-
Tetrasiklin	Tetrasiklin (TE)	30 µg	≤14	15-18	≤11	12-14
	Kloramfenikol (C)	30 µg	≤12	13-17	≤12	13-17
Penisilinler	Ampisilin (AM)	10 µg	≤14	-	≤13	14-16
Glikopeptidler	Vankomisin	30 µg	≤14	15-16	-	-
3.Kuşak Sefolosporin	Seftazidim (CAZ)*	30 µg	≤14	15-25	≤17	18-20
2.Kuşak Sefolosporin	Sefaklor (CEC)*	30 µg	≤14	15-25	≤14	15-17
1.Kuşak Sefolosporin	Sefazolin (CZ)*	30 µg	≤14	15-25	≤19	20-22
Beta Laktam İnhibitör	Trimetoprim-Sulfametoksazol (SXT)*	25 µg	≤15	16-18	≤10	11-15

**S. pneumonia* ve *Streptococcus* spp. için verilen değerlerdir. R; Dirençli, I; Orta Dirençli, -; Belirsiz

Kaynak: CLSI, 2013

2.2.8. Profilaktik Etkinliğin Belirlenmesi

Deneyde kullanılan larvaların genetik kaynağı ve yaşının kontrol edilmesi amacıyla ana arıların kafeslere alındığı tarih ve saat net olarak kaydedilmiştir. Ana arıların yumurtladığı yumurtalar, larva evresine geçtikten hemen sonra (üç günlük yumurta dönemini takip eden 72. saatte) transfer edilmiştir. Peteklerden ELISA plaklara larva transferi, sıcaklık ve nemin kontrollü olduğu bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Boş Elisa plaklar tartılarak dara belirlenmiş ve larva transferinden sonra plaklar yeniden tartılarak larvaların başlangıç ağırlıkları alınmıştır. Bunu takiben larvalar en kısa sürede laboratuvara getirilerek 32°C'de %65 nem koşulundaki inkübatöre (Nüve TK-600) yerleştirilmiştir.

Test edilecek LAB suşlarının MRS sıvı besiyeri içinde McFarland 0.1 yoğunlukta (≈10^6 CFU/mL) süspansiyonları hazırlandı. Süspansiyonlar kullanılmadan önce sıcaklığı 35°C'ye yükseltilmiş arı sütü içerisine ayrı ayrı karıştırılarak uygulamaya hazır hale getirildi. Ardından oluşturulan deney planına göre (Tablo 6), uygulamanın 1. günü 5 saat yaştaki larvalara 5'er µL LAB solüsyonu (50 µL arı sütü + 50 µL test edilen LAB izolatı) tek seferde uygulandı ve plaklar inkübatöre yerleştirildi. Her uygulama 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 30 larva olacak şekilde düzenlendi. İnkübasyon süresinin (8 saat) sonunda larvalarda enfeksiyon oluşturmak için, deney gruplarına *P. larvae* sporları arı sütü içerisinde (1.5 x 10^8 SOB/mL *P. larvae* içeren 1:2 v/v oranında su + arı sütü karışımı) 5 µL miktarda tek seferde uygulandı ve inkübasyona devam edildi (Kaftanoğlu vd., 2011; Crailsheim vd., 2013).

Çalışmada U1-2-3 ve U8 gruplarına herhangi bir etken verilmemiş, sadece LAB solüsyonları uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubuna (PK) sadece etken bakteri sporları uygulandı, negatif kontrol (NK) grubu ise sadece arı sütü ile beslendi. LAB ve spor uygulaması sonrasında inkübasyona kaldırılan larva plakları düzenli olarak kontrol edilerek besin ihtiyacı gözlemlenen her bir larva 7 gün süresince eşit miktarda arı sütü ile beslenmeye devam edildi ve klimatik etüvde (32°C sıcaklık ve %65 nem) inkübe edildi. Deney sonucunda larvalar makroskopik, mikroskobik ve kültürel olarak incelendi. Canlı, AYÇ hastası, ölü ve AYÇ'den dolayı ölü şeklinde larva sayısı belirlenerek uygulanan LAB solüsyonlarının profilaktik etkinliği değerlendirildi.

Tablo 6. Larva üzerinde profilaktik etkilerin değerlendirildiği deneme modeli (Toplam larva sayısı 900)

Deney Grubu	**Larva Sayısı**	**1. Gün**	**2.-7. Gün**	***P. larvae* SOB/mL**
NK	90	AS	AS	-
U1	90	AS + E163/2A	AS	1.5 x 10^8
U2	90	AS + L142/2B	AS	1.5 x 10^8
U3	90	AS + L46/3A + L164-2B	AS	1.5 x 10^8
U4	90	AS + E163/2A + *P. larvae* spor	AS	1.5 x 10^8
U5	90	AS + L142/2B + *P. larvae* spor	AS	1.5 x 10^8
U6	90	AS + L46/3A + L164/2B + *P. larvae* spor	AS	1.5 x 10^8
U7	90	AS + Karışık LAB + *P. larvae* spor	AS	1.5 x 10^8
U8	90	AS + Karışık LAB	AS	1.5 x 10^8
PK	90	AS + *P. larvae* spor	AS	1.5 x 10^8

NK: Negatif kontrol, U: Uygulama, PK: Pozitif kontrol, AS: Arı sütü

2.3. Bulgular

Bu çalışma, Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Arı Hastalıkları Laboratuvarı destekleriyle, RTEÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Arı numuneleri Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Arı Hastalıkları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Çalışmada ilk etapta 34 larva örneği, 13 ergin arı örneği olmak üzere toplamda 47 adet numuneden saflaştırılan LAB şüpheli izolatlar kullanıldı. Faj taraması sonucunda bakteriyofaj içermeyen suşlar seçilerek 16 adet izolat nihai denek olarak çalışma kapsamına alındı. Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden gelen ilk örnekler E (Ergin), L (Larva) şeklinde, daha sonraki örnekler ise ES (Ergin Sekonder), LS (Larva Sekonder) şeklinde kodlanarak numune geliş sırasına göre rakamla, izolat sırasına göre alfabetik harflerle numaralandırıldı (Tablo 7).

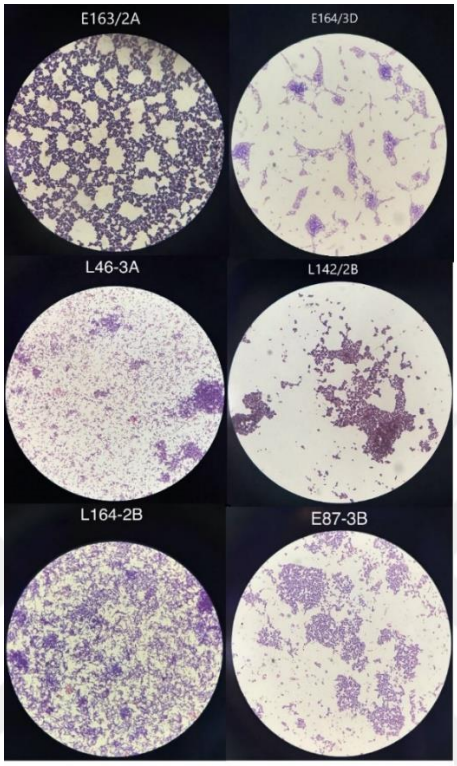
Tablo 7. Çalışılan örneklerin nihai sayısı, kodları, alındıkları yerler ve orijinleri

Sayı	İzolat	Alındığı Bölge	Orijini
1	L4/3A	Diyarbakır/Sur	Larva
2	L14/2A	Antalya/Alanya	Larva
3	L46/3A	Sivas/Merkez	Larva
4	L72/3B	Edirne/Merkez	Larva
5	L86/3B	Muğla/Menteşe	Larva
6	L12/2C	Kastamonu/Merkez	Larva
7	L142/2B	Balıkesir/Kepsut	Larva
8	L164/2B	Denizli/Serinhisar	Larva
9	L203/2A	Hakkari/Merkez	Larva
10	E85/2A	Elazığ/Sivrice	Ergin
11	E87/3B	Muğla/Milas	Ergin
12	E163/2A	Denizli/Serinhisar	Ergin
13	E164/3D	Denizli/Serinhisar	Ergin
14	LS84/1A	Karaman/Ermenek	Larva
15	LS122/1A	Bingöl/Genç	Larva
16	ES107/1A	Elazığ/Merkez	Ergin

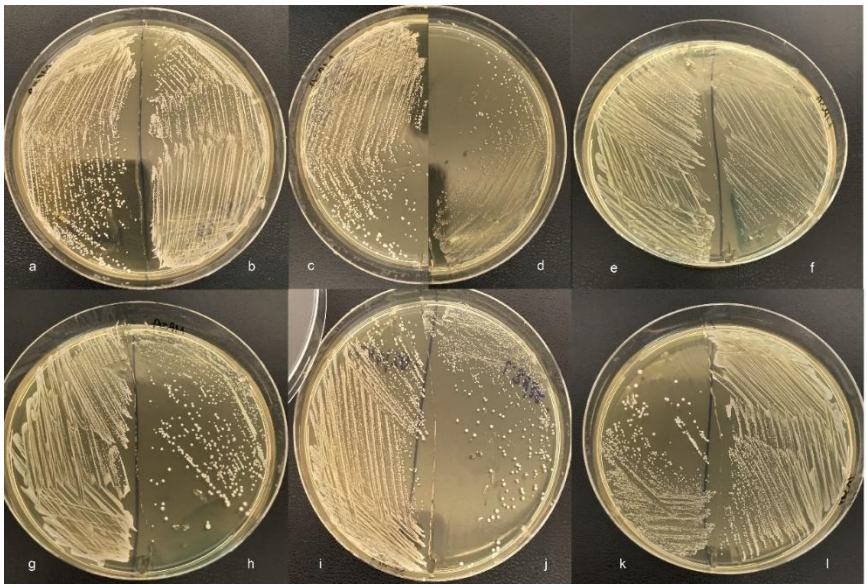
2.3.1. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Uygun kültürasyon sonunda üreyen LAB kolonileri Gram özelliği ve bakteri morfolojisi bakımından mikroskobik olarak incelendi (Şekil 8). İnceleme sonucunda izolatların tümünün Gram pozitif bakteri oldukları, büyük çoğunluğunun krem/beyaz renklere sahip laktobasil kolonileri oldukları belirlendi (Şekil 9). İzolatların 9

tanesinin basil, 5 tanesinin kokobasil ve 2'sinin streptokok morfolojisine sahip oldukları tespit edildi (Tablo 8).

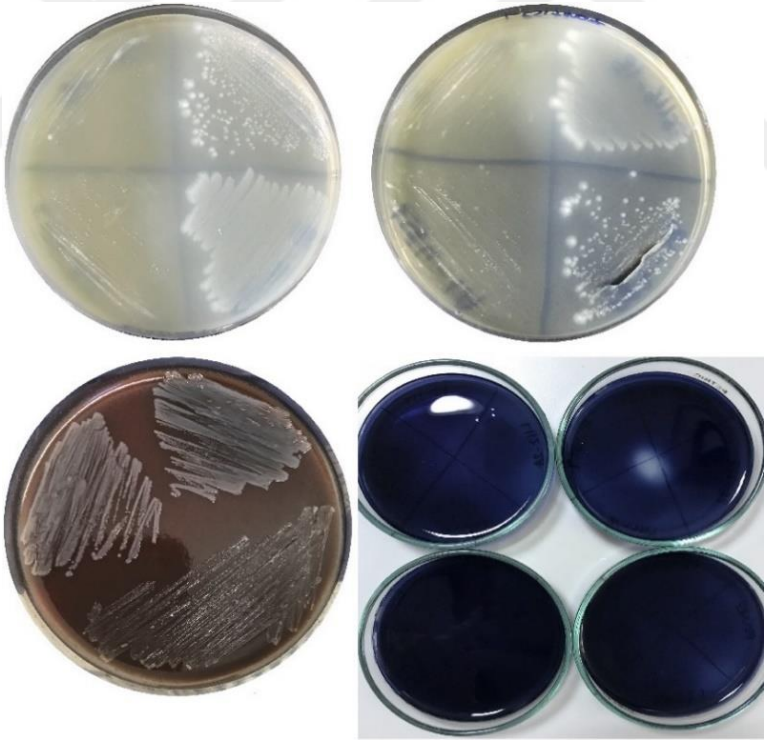


Şekil 8. *Enterococcus*, *Fructobacillus*, *Leuconostoc* ve *Apilactobacillus* suşlarının mikroskop görüntüleri



Şekil 9. Laktik asit bakterilerinin petri görüntüleri (a) E164/3D (b) L164/2B (c) E85/2A (d) L142/2B (e) L14/2A (f) E163/2A (g) L203/2A (h) E87/3B (i) L46/3A (j) LS122/1A (k) L86/3B (l) L121/2C

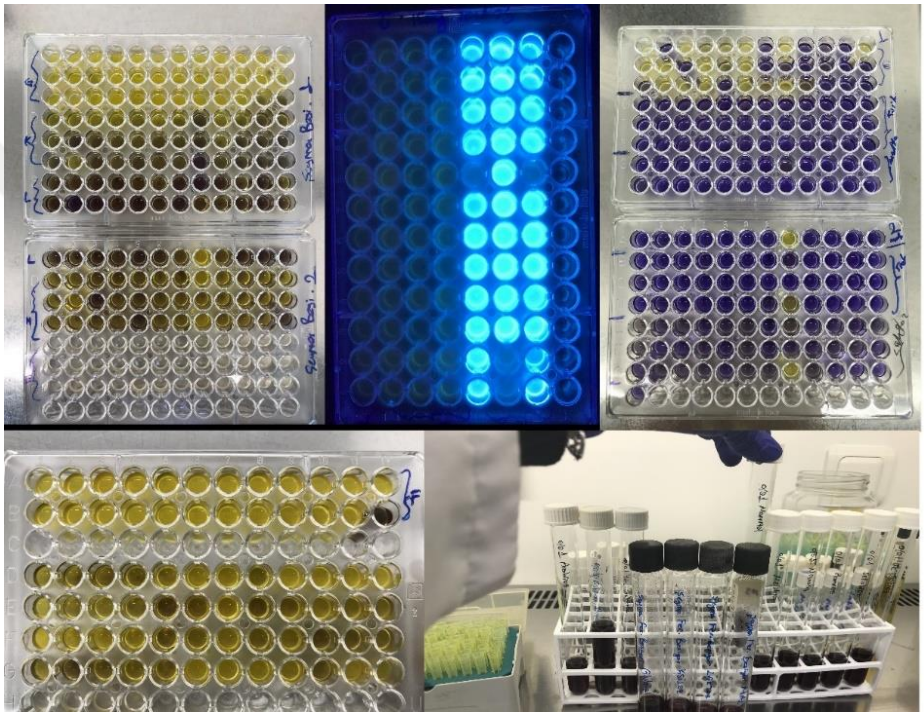
Çalışma kapsamında LAB izolatlarının minimum 18°C'de, maksimum 45°C'de üreme özellikleri incelendi. L4/3A, E87/3B, E164/3D, LS122/1A ve L142/2B suşlarının yüksek ve düşük sıcaklığıa duyarlı oldukları belirlenirken, L14-2A, L46/3A, L72/3B, L164/2B, L203/2A, E163/2A ve LS84/1A suşları sıcaklık değişimine karşı toleranslı bulundu. LAB izolatlarının biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde bir dizi test kullanıldı (Tablo 8). Çalışmada bütün suşların katalaz ve oksidaz testleri bakımından negatif olduğu belirlendi. İzolatların 5'i sitrat kullanımı, 6'sı selülaz üretimi, 3'ü lesitinaz üretimi bakımından pozitif belirlendi. Bunun yanısıra izolatların hiçbirinin proteaz, jelatinaz, amilaz ve lipaz enzimini içermediği belirlendi. Eskülin pozitif tek suş E163/2A suşu olarak belirlendi. Seçilen suşların tümü kanlı besiyerinde negatif hemoliz (gamma hemoliz) gösterdi (Şekil 10). Hidrojen peroksit üretim yeteneğinde kontrol suş olarak *L. acidophilus* DSM 20242 kullanıldı. Suşların 10 tanesinde hidrojen peroksit üretimi pozitif gözlendi (Tablo 8).



Şekil 10. Çeşitli kromojenik testler ve hemolitik aktivite görüntüsü (Soldan sağa, lesitinaz aktiviteleri, gama hemoliz, amilaz testleri)

İzolatların nişasta hidrolizasyonu ve bir dizi karbonhidratları (glukoz, fruktoz, galaktoz, maltoz, sükroz, laktoz, mannitol, ramnoz, arabinoz, trehaloz, mellibioz,

sellibioz, ksiloz) fermente edebilme özellikleri araştırıldı (Şekil 9, Şekil 11). Yapılan fermentasyon deneyleri sonucunda suşların tamamı çalışılan şekerlerin birçoğunu fermente edebilirken, sadece 6 tanesinin laktozu fermente edebildiği gözlemlendi. E85/2A ve E163/2A izolatlarının mannitol, arabioz ve mellibiozu fermente edemedikleri belirlendi. Trehalozu kullanabilen tek izolat zayıf pozitif olarak L4/2A suşu olarak saptandı. İzolatlardan sadece E163/2A'nın nişastayı hidrolize edemediği tespit edildi (Tablo 9).



Şekil 11. Karbonhidrat fermentasyon, nişasta ve eskülin hidroliz testleri

MRS sıvı besiyeri içerisinde büyütülen laktik asit bakterileri fermentasyon sonucu temel ürün olarak ürettikleri laktik asit veya asetik asit gibi organik asitler vasıtasıyla bulundukları ortamın pH'sını düşürmektedir. 5.7 pH'ya sahip olan MRS sıvı besiyeri pH'sı, LAB inokülasyonunun ardından 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda ortamda biriken asidik metabolitler sebebiyle pH 3.0-4.0 arası değişim göstermektedir (Şekil 12).



Şekil 12. 48 s LAB kültivasyonu sonunda MRS besiyerindeki pH değişimi (a) *Apilactobacillus* Kültürü (b) *Enterococcus* Kültürü (c) Standart MRS

Tablo 8. İzolatların morfolojik, biyokimyasal ve üreme özellikleri (N=16)

İzolat	Morfolojik Özellikler		Sıcaklık Toleransı		Biyokimyasal Özellikler										
	Gram Boyama	Hücre Şekli	18°C	45°C	K/O	H_2O_2	Li	A	Se	P	Le	J	Si	E	H
L4/3A	+	Kokobasil	–	–	–/–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	γ
L14/2A	+	Basil	±	+	–/–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	γ
L46/3A	+	Basil	±	±	–/–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	γ
L72/3B	+	Kokobasil	±	+	–/–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	γ
L86/3B	+	Basil	±	–	–/–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	γ
L121/2C	+	Kokobasil	–	+	–/–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	γ
L142/2B	+	Streptokok	–	–	–/–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	γ
L164/2B	+	Basil	±	+	–/–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	γ
L203/2A	+	Kokobasil	±	±	–/–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	γ
E85/2A	+	Basil	–	+	–/–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	γ
E87/3B	+	Basil	–	–	–/–	+	–	–	+	–	+	–	–	–	γ
E163/2A	+	Streptokok	±	±	–/–	–	–	–	+	–	–	–	+	+	γ
E164/3D	+	Basil	–	–	–/–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	γ
LS84/1A	+	Kokobasil	±	+	–/–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	γ
LS122/1A	+	Basil	–	–	–/–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	γ
ES107/1A	+	Basil	–	+	–/–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	γ

K: Katalaz, O: Oksidaz, Li: Lipaz, A: Amilaz, Se: Selülaz, P: Proteaz, Le: Lesitinaz, J: Jelatinaz, Si: Sitrat, E: Eskülin Hidrolizi, H: Hemoliz, γ: Gama Hemoliz (Non-hemolitik),
+: Pozitif, –: Negatif, ±: Zayıf.

Tablo 9. Karbonhidrat fermentasyon özellikleri (N=16)

İzolat	G	F	Ga	Ma	Sü	L	Mn	R	A	T	Me	Se	K	N
L4/3A	+	+	±	+	+	–	+	±	±	±	±	±	–	±
L14/2A	+	+	±	+	+	–	+	±	±	–	±	±	±	±
L46/3A	+	+	±	±	+	–	+	±	±	–	±	±	–	±
L72/3B	+	+	±	+	+	±	+	±	±	–	+	±	±	±
L86/3B	+	+	±	±	+	±	+	±	±	–	±	±	±	±
L121/2C	+	+	±	±	+	±	+	±	±	–	±	±	–	±
L142/2B	+	+	±	+	+	–	+	+	±	–	+	+	–	±
L164/2B	+	+	±	+	+	±	+	±	±	–	±	±	–	±
L203/2A	+	+	±	±	+	–	+	±	±	–	±	±	±	±
E85/2A	+	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	+	±	±
E87/3B	+	+	±	+	+	±	+	±	±	–	±	±	±	±
E163/2A	+	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	±	–	–
E164/3D	+	+	±	±	+	–	±	±	±	–	±	±	±	±
LS84/1A	+	+	±	±	+	±	+	±	±	–	±	±	±	±
LS122/1A	+	+	±	±	+	–	±	±	±	–	±	±	±	±
ES107/1A	+	+	±	+	+	–	+	±	±	–	±	±	±	±

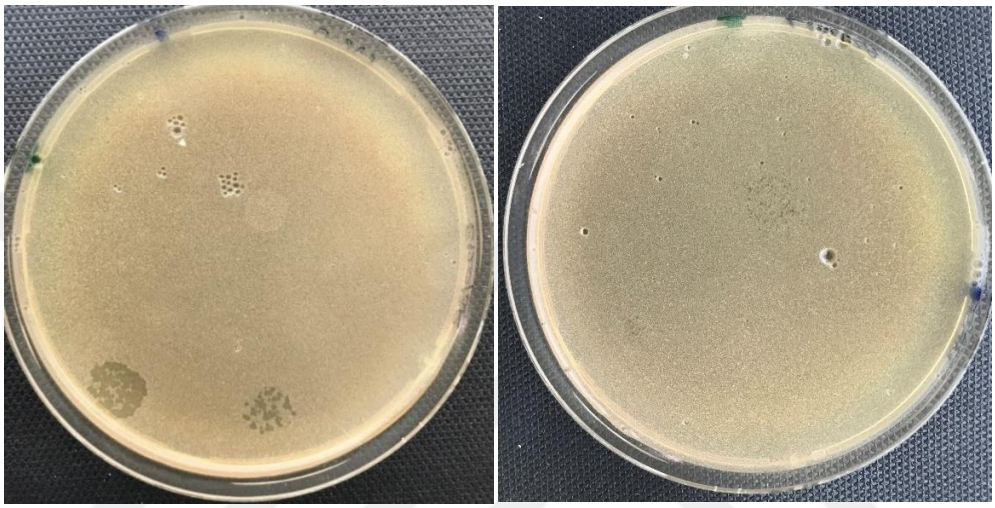
G: Glukoz, L: Laktoz, Ma: Maltoz, F: Fruktoz, Ga: Galaktoz, Sü: Sükroz, T: Trehaloz, Mn: Mannitol, R: Ramnoz, A: Arabinoz, Me: Mellibioz, Se: Sellibioz, K: Ksiloz, N: Nişasta, +: Pozitif, –: Negatif, ±: Zayıf Pozitif

2.3.2. İzolatlarda Bakteriyofaj Taraması

Laktik asit bakterilerinin bakteriyofaj içeriklerinin incelenmesi Mit-C ile indükleme metoduyla yapıldı (Bölüm 2.2.3.1). MRS sıvı besiyerine inoküle edilen suşların üremesi 120 rpm çalkalamalı inkübatörde izlendi. Kültür izolatlarının toplamda 2-5 saat içinde faj indüksiyonları tamamlanarak tamamen liz oldukları gözlendi. İndüklenen suşlardan liz görülmeyenlerin de inkübasyonu en geç 18 saat sonra durduruldu. Bütün suşlardan santrifüjlenerek elde edilen lizatları hem kendilerine hem de konak olarak belirlenen diğer LAB suşlarına karşı çapraz enfeksiyon yapıldı.

Çalışmada toplam 26 adet konak kullanıldı ve LAB lizatlarının 19 farklı konağa karşı faj plağı veya inhibisyon zonu (antibakteriyel aktivite/bakteriyosin) oluşturduğu belirlendi. Oluşan inhibisyon zonları cetvel yardımıyla ölçüldü ve ayırt edilebilen faj plakları sayıldı (Şekil 13). Lizatların bir kısmında sadece faj varlığı belirlenirken bazılarında hem bakteriyofaj hem de antimikrobiyal etkinlik gözlendi. Suşlarda oluşan inhibisyon zonunun kesin hatlı ve tam açılma şeklinde olması, bekleme esnasında genişlememesi ve faj plağı gözlenmemesi bakteriyosin ya da antimikrobiyal aktivite içerdiği şeklinde yorumlandı veya faj içermediği sonucuna varıldı. LAB suşlarına ait toplamda 47 adet indüklenmiş lizattan 16 tanesi hariç

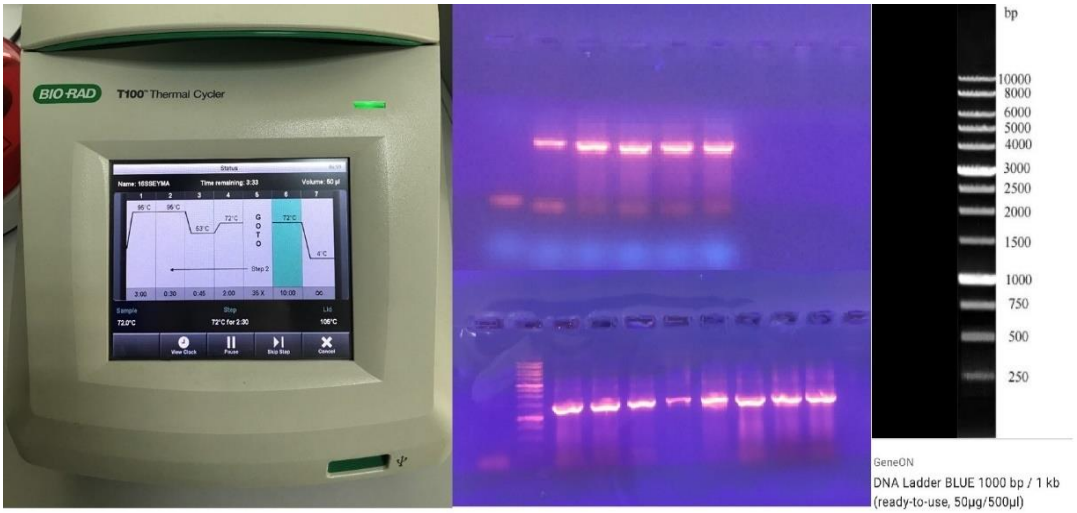
hepsinin bakteriyofaj içerdiği ya da indüklenebilir bakteriyofaj taşıdığı ve bu fajların test edilen konaklardan en az birini enfekte edebileceği belirlendi. Potansiyel bir probiyotik suşun *in vitro* güvenlik özelliğinin önemli hedeflerinden biri faj enfeksiyonunun olmamasıdır. Bu nedenle bakteriyofaj indüksiyon analizi sonucunda gözlenen faj plaklı suşlar çalışmaya dahil edilmemiş ve probiyotik değerlendirme testlerinin uygulanabilmesi için tüm suşlar faj içermeyen suşlardan seçilmiştir.



Şekil 13. Bakteriyofaj plak görüntüsü

2.3.3. İzolatların Moleküler Tanımlanması

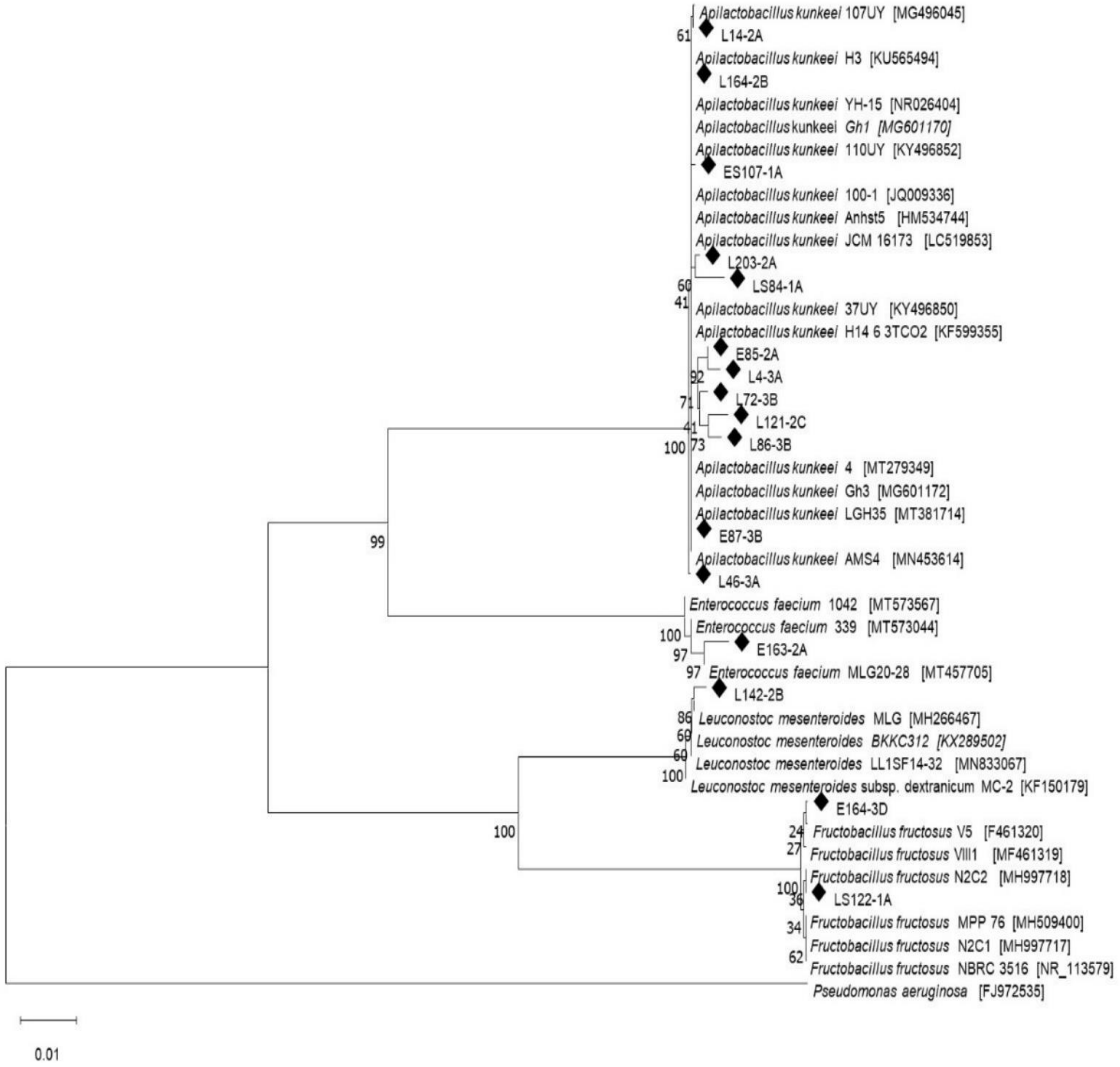
Çalışmada kullanılan 16 izolatın tür düzeyinde tanımlanması 16S rRNA gen bölgesinin sekans sonuçlarının işlenmesi ile gerçekleştirildi. İzole edilen DNA örnekleri ile gerçekleştirilen 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu sonucunda yaklaşık 1500 bp PZR ürünü elde edildi (Şekil 14). Elde edilen PZR ürünleri dizi analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi. Gelen ham veriler Bioedit programı ile düzenlendi ve dizilerin NCBI GenBank sitesinde var olan diziler ile benzerliği karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda çalışılan suşlar *Lactobacillus, Fructobacillus, Leuconostoc* ve *Enterococcus* cinslerine ait bakteriler olarak tanımlandı (Şekil 15).



Şekil 14. LAB DNA'larından PZR ile spesifik bölgelerin çoğaltılması ve jel elektroforezinde moleküler markır ile görünümleri

Çalışmadan izole edilip, geleneksel ve moleküler yöntemlerle tanımlanan suşların kendi aralarındaki filogenetik akrabalıklarını belirlemek amacıyla veritabanından alınan gen dizileri ile MEGA programı yardımıyla Neighbor-joining (NJ) metodu kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 15'te verilmiştir.

Dendogram MEGA 5.0 filogenetik programı kullanılarak neighbor-joining (NJ) metodu ile yapılmıştır. Şekilde nodların yanındaki rakamlar seç-bağla (bootstrap) değerlerini göstermektedir. Şeklin altındaki skala ise benzerlik derecesini göstermektedir. Her dizi çifti için tüm belirsiz konumlar kaldırıldı. Nihai veri setinde toplam 1388 pozisyon vardır. Dış grup olarak *Pseudomonas aeruginosa* türü kullanmıştır (Şekil 15).



Şekil 15. LAB suşlarının filogenetik ağacı

2.3.3.1. *Apilactobacillus* Suşlarının Tanımlanması

Gen dizileri elde edilen izolatların 12 tanesinin NCBI GenBank'ta var olan diziler ile yüzde benzerliği karşılaştırıldığı zaman *Apilactobacillus* cinsine benzer oldukları tespit edildi (Tablo 10).

Sağlıklı bal arısı ve larva örneklerinden izole edilen 12 laktobasil izolatının yakın ilişkili olduğu suşlar ile filogenetik benzerlikleri belirlendi. Elde edilen dendograma göre suşların tamamı *A. kunkeei* olarak tanımlandı (Tablo 10, Şekil 15).

Tablo 10. *Apilactobacillus* suşlarının 16S rRNA gen benzerlikleri

Suş	Benzer Bakteriler	Erişim No	Örtüşme (%)	Benzerlik (%)
L4-3A	*Apilactobacillus kunkeei* JCM 16173	LC519853	100	99.03
	A. kunkeei 4	MT279349	100	99.03
	A. kunkeei 110UY	KY496852	100	99.58
L46-3A	*Apilactobacillus kunkeei* 4	MT279349	100	99.58
	A. kunkeei 110UY	KY496852	100	99.58
	A. kunkeei YH-15	NR_026404	100	99.58
L86-3B	*Apilactobacillus kunkeei* LGH35	MT381714	99	99.44
	A. kunkeei 4	MT279349	99	99.44
	A. kunkeei H14_6_3TCO2	KF599355	99	99.37
LS84-1A	*Apilactobacillus kunkeei* LGH35	MT381714	99	98.96
	A. kunkeei 4	MT279349	100	98.89
	A. kunkeei AMS4	MN453614	100	98.82
L121-2C	*Apilactobacillus kunkeei* 4	MT279349	100	98.96
	A. kunkeei 110UY	KY496852	100	98.96
	A. kunkeei Anhst5	HM534744	99	98.96
L164-2B	*Apilactobacillus kunkeei* LGH35	MT381714	99	99.93
	A. kunkeei 4	MT279349	99	99.93
	A. kunkeei 35UY	KY496849	99	99.93
L203-2A	*Apilactobacillus kunkeei* 4	MT279349	100	99.65
	A. kunkeei JCM 16173	LC519853	100	99.65
	A. kunkeei 37UY	KY496850	100	99.65
E87/3B	*Apilactobacillus kunkeei* 4	MT279349	100	99.79
	A. kunkeei JCM 16173	LC519853	100	99.79
	A. kunkeei 110UY	KY496852	100	99.79
ES107/1A	*Apilactobacillus kunkeei* 4	MT279349	99	99.86
	A. kunkeei JCM 16173	LC519853	99	99.86
	A. kunkeei 110UY	KY496852	99	99.86
L14/2A	*Apilactobacillus kunkeei* LGH35	MT381714	100	99.70
	A. kunkeei JCM 16173	LC519853	100	99.70
	A. kunkeei H3	KU565494	100	99.70
L72/3B	*Apilactobacillus kunkeei* JCM 16173	LC519853	100	99.52
	A. kunkeei 110UY	KY496852	100	99.52
	A. kunkeei AMS4	MN453614	100	99.45
E85/2A	*Apilactobacillus kunkeei* JCM 16173	LC519853	99	99.72
	A. kunkeei Gh3	MG601172	99	99.72
	A. kunkei H14_7_2TCO2	KF599357	100	99.58

2.3.3.2. Fructobacillus, Leuconostoc ve Enterococcus Suşlarının Tanımlanması

Gen dizilerini elde ettiğimiz 16 izolatın 2'sinin NCBI GenBank'ta var olan diziler ile yüzde benzerliği karşılaştırıldığında *Fructobacillus* cinsine, 1 tanesinin *Leuconostoc* cinsine, 1 tanesinin *Enterococcus* cinsine benzer olduğu tespit edildi (Tablo 11, Şekil 15).

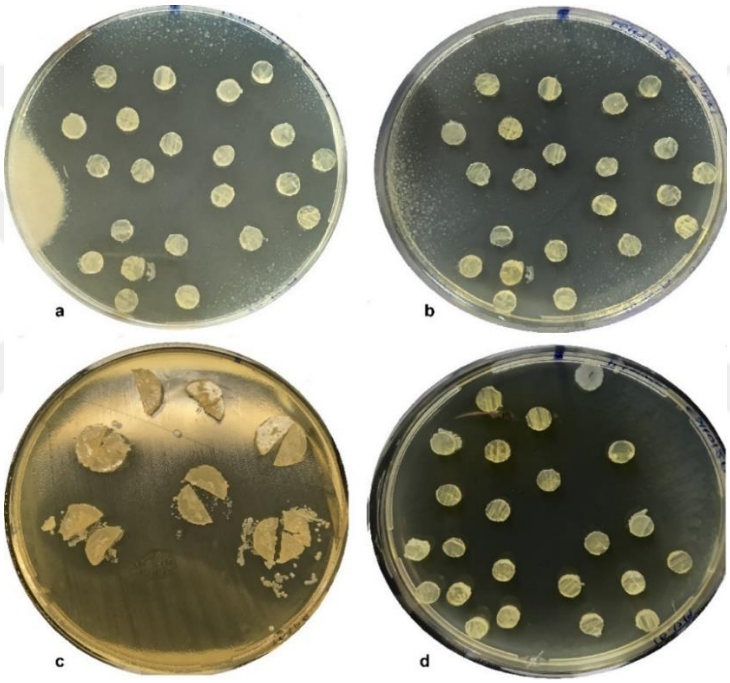
Tablo 11. *Fructobacillus, Leuconostoc* ve *Enterococcus* suşlarının 16S rRNA gen benzerlikleri

Suş	Benzer Bakteriler	Erişim No	Örtüşme %	Benzerlik %
E164-3D	*Fructobacillus fructosus* V5	MF461320	100	99.78
	F. fructosus N2C2	MH997718	100	99.71
	F. fructosus VIII1	MF461319	100	99.71
LS122-1A	*Fructobacillus fructosus* N2C2	MH997718	100	99.72
	F. fructosus MPP_76	MH509400	100	99.64
	F. fructosus NBRC 3516	NR_113579	100	99.64
L142-2B	*Leuconostoc mesenteroides* MLG	MH266467	100	99
	L. mesenteroides subsp. *dextranicum* MC-2	KF150179	100	98.99
	L. mesenteroides LL1SF14-32	MN833067	100	98.99
E163-2A	*Enterococcus faecium* 1042	MT573567	100	100
	E. faecium 339	MT573044	100	100
	E. faecium MLG20-28	MT457705	100	100

2.3.4. İzolatlarda *in vitro* Antimikrobiyal Etkinliğin Belirlenmesi

Çalışmada LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivite özelliklerini belirlemek amacıyla seçilen indikatör patojen mikroorganizmalara karşı agar plug difüzyon metodu ve agar kuyucuk difüzyon metodu uygulandı (Balouiri vd., 2016; Ahmad vd., 2018; Pelyuntha vd., 2019). Çalışmada antimikrobiyal aktivite geniş ölçekli olarak çeşitli insan-gıda patojeni bakteriler, patojen *Candida* sp. türü ve bal arısı patojenleri üzere toplam 17 mikroorganizmaya karşı test edilmiştir. Yapılan agar plug difüzyon analizleri sonucunda izolatların tamamı indikatör test bakterileri üzerine genel inhibisyon etki göstermiştir ancak maya mantarı *C. albicans*'a karşı hiçbir suş etkili çıkmamıştır. Elde edilen inhibisyon zonları özellikle enterik bakteriler olan *E. coli* ATCC 25922, *S. enteritis* ATCC 13076 karşı en yüksek değerlere (sırasıyla 18 mm ve >20 mm) ulaşmıştır (Tablo 8). L4/3A, L164/2B, L14/2A, L72/3B, L86/3B, L142/2B, L203/2A, E85/2A ve LS84/1A suşları en etkili suşlar arasında yer almaktadır. Çalışma kapsamında LAB izolatlarının belirlenen bal arısı patojenlerine

karşı inhibisyon etkinliklerini belirlemek amacıyla yapılan agar plug difüzyon test sonucuna göre *P. larvae* ATCC 9545 ERIC I suşuna karşı en yüksek 18 mm zon çapıyla L164/2B suşu, *P. larvae* DSM 25430 ERIC II'ye karşı en yüksek 15 mm zon çapıyla inhibisyon gösteren suş L46/3A suşu olarak saptanmıştır. *P. larvae* LMG 16252 ERIC III suşuna karşı en etkili zon çapını 14 mm olarak E85/2A ve E163/2A suşları sergilemiştir. Bununla birlikte AYÇ ajanları *P. alvei* PB33 ve *M. plutonius*'a karşı en yüksek zon çapları sırasıyla 15 mm (E85/2A) ve 14 mm (E85/2A ve E87/3B) olarak ölçülmüştür (Tablo 12).



Şekil 16. *P. larvae* ve *P. alvei*'ye karşı LAB suşlarının antagonist etkinlikleri (a-b) *P. alvei* (c-d) *P. larvae*

P. larvae suşlarına karşı sinerjik etkileşimlerin test edildiği petrilerde LAB suşları *P. larvae*'ya karşı belirgin şekilde antagonist etki göstermiş, geniş bir zon oluşturmuştur. Bu zonun dışında kalan, petri sınırlarında kalan bölgelerde yoğun şekilde *P. larvae* üremesi gözlenirken LAB agar plugların yerleştirildiği bölgelerde *P. larvae* kolonizasyonu baskılanmıştır (Şekil 16).

Tablo 12. Agar plug difüzyon metodu ile antimikrobiyal etkinlik

	İnhibisyon Zonu (mm)														
İzolat	**Ec**	**Yp**	**Kp**	**Se**	**Pa**	**Sa**	**Ef**	**Lm**	**Bc**	**Pl I**	**Pl II**	**Pl III**	**Pal**	**Mp**	**Ca**
L4/3A	18	12	12	>20	5	10	10	12	9	12	6	7	12	7	–
L14/2A	16	15	14	>20	12	12	10	12	9	7	6	10	9	8	–
L46/3A	10	8	10	18	8	6	8	10	8	15	15	13	14	12	–
L72/3B	18	12	10	>20	10	10	6	10	9	12	7	10	9	13	–
L86/3B	18	12	12	>20	–	10	8	12	9	8	7	8	12	–	–
L121/2C	14	8	10	18	10	10	10	10	9	11	7	8	8	–	–
L142/2B	18	10	12	>20	10	10	8	10	8	15	8	9	10	12	–
L164/2B	16	14	12	>20	5	10	10	10	9	18	8	9	12	13	–
L203/2A	18	12	10	>20	10	10	6	10	9	15	7	7	8	–	–
E85/2A	17	10	8	>20	5	10	6	8	9	15	7	14	15	14	–
E87/3B	12	12	10	18	5	6	6	6	9	14	6	9	9	14	–
E163/2A	6	6	12	12	–	–	4	6	9	12	11	14	9	13	–
E164/3D	17	6	12	18	–	10	6	10	9	7	–	–	–	–	–
LS84/1A	15	10	8	17	10	8	6	12	9	12	7	8	12	11	–
LS122/1A	10	10	9	–	–	–	–	8	7	13	6	8	7	–	–
ES107/1A	–	10	–	–	–	–	–	–	–	6	9	10	9	–	–

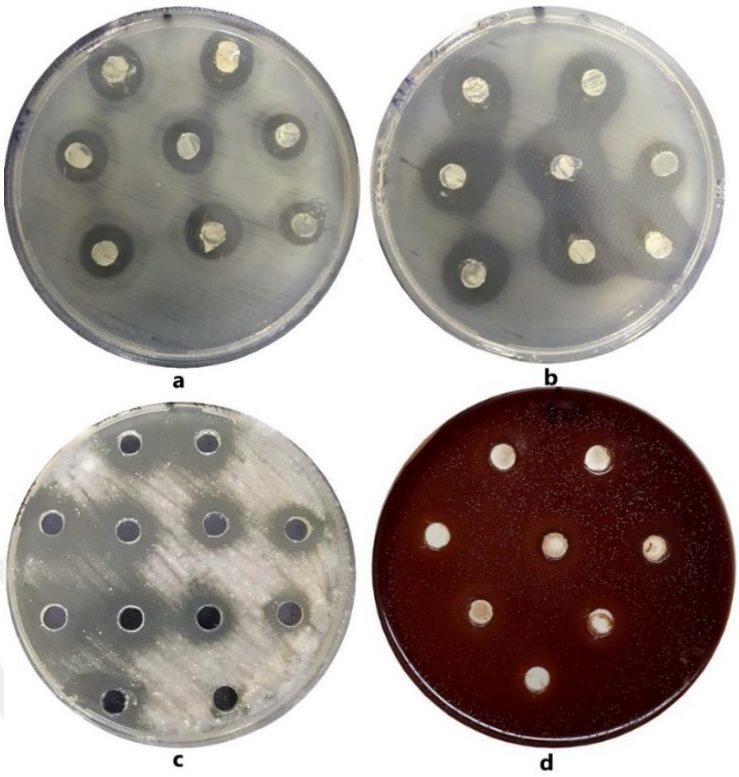
Ec: *E. coli*, Yp*: Y. pseudotuberculosis*, Kp: *K. pneumoniae*, Se*: S. enteritis*, Pa*: P. aeruginosa*, Sa: *S. aureus* , Ef: *E. faecalis*, Lm: *L.monocytogenes*, Bc: *B. cereus*, Pl I: *P. larvae*, Pl II: ERIC II , Pl III: ERIC III, *P. larvae* ERIC I, Pal: *P. alvei* , Mp: *M. plutonius*, Ca: *C. albicans*

CFS agar kuyucuk difüzyon testinde plug difüzyon testinden farklı olarak çalışmaya mide ülseri etkeni *Helicobacter pylori* J99 suşu ve tüberküloz etkeni aside alkole dirençli bakteri grubu temsilen *M. smegmatis* RSKK 607 suşu dahil edilmiştir. *H. pylori*'ye karşı en yüksek inhibisyon etkisi, zon çapı 13 mm olarak, yalnızca 5 suşta gözlenmiştir. *M. smegmatis*'e karşı 72 saatlik LAB-CFS'in inhibisyon etkisi oldukça etkili bulunmuştur (Şekil 17). En güçlü inhibisyon etkisini 17 mm zon çapıyla L164/2B ve L203/2A suşları göstermiştir. Gram negatif enterik bakteriler üzerine CFS'lerin antimikrobiyal etkinliği, agar plug difüzyon uygulamasına göre daha zayıf olsa da en düşük 7 mm en yüksek 12 mm olacak şekilde inhibisyon zonları elde edilmiştir (Tablo 13).

Tablo 13. CFS'lerin agar kuyucuk difüzyon metodu ile antimikrobiyal etkinliği

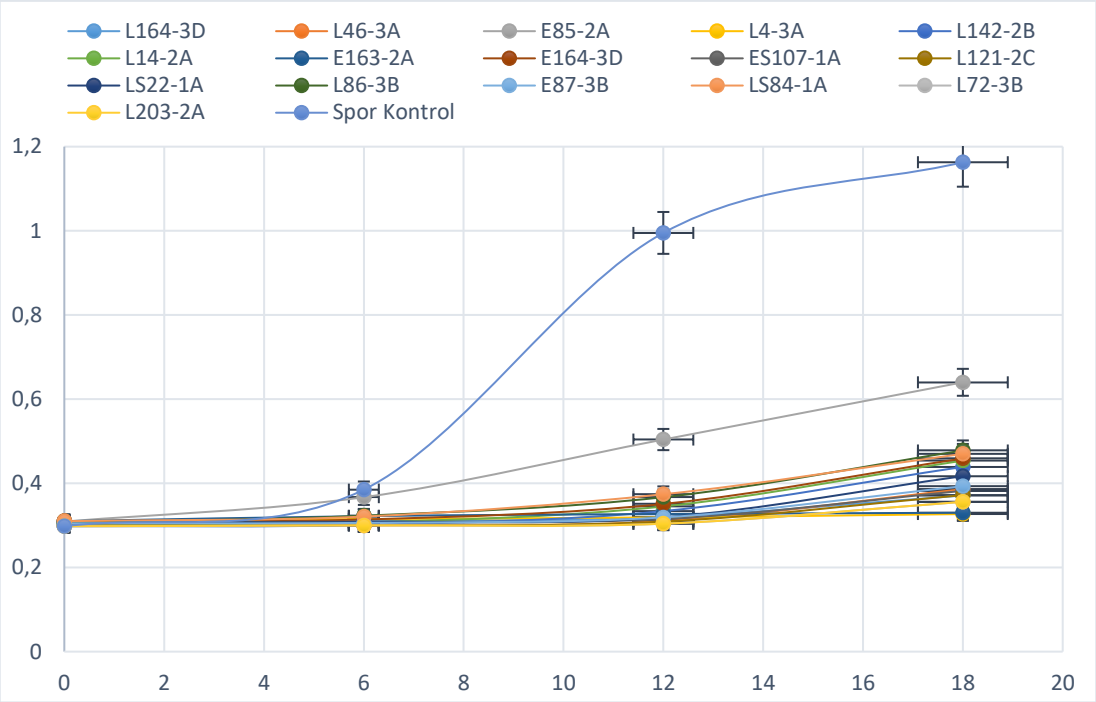
	İnhibisyon Zonu (mm)									
İzolat	**Ec**	**Se**	**Pa**	**Hp**	**Sa**	**Lm**	**Bc**	**Pl**	**Pal**	**Ms**
L4/3A	7	9	–	13	–	9	–	–	7	14
L14/2A	–	8	–	12	–	8	–	–	–	16
L46/3A	8	6	–	–	–	9	–	12	–	6
L72/3B	9	–	–	–	–	10	–	8	6	12
L86/3B	8	–	–	–	–	–	–	11	6	16
L121/2C	7	8	–	–	–	9	–	12	8	13
L142/2B	8	6	–	–	–	–	–	–	–	–
L164/2B	–	–	–	13	–	–	–	11	6	17
L203/2A	7	9	–	–	–	9	–	–	8	17
E85/2A	–	–	–	–	6	8	–	10	–	12
E87/3B	6	6	–	12	–	–	–	10	–	10
E163/2A	–	8	–	13	–	12	–	7	12	16
E164/3D	–	6	–		–	–	–	13	–	12
LS84/1A	7	8	–	–	–	9	–	13	–	14
LS122/1A	–	–	–	–	–	–	–	6	–	6
ES107/1A	6	6	–	–	–	–	–	13	–	6

Ec: *E. coli*, Se*: S. enteritis*, Pa*: P. aeruginosa*, Hp: *H. pylori*, Sa: *S. aureus*, Lm: *L.monocytogenes*, Bc: *B. cereus*, Pl : *P. larvae*, Pal: *P. alvei* , Ms: *M. smegmatis*



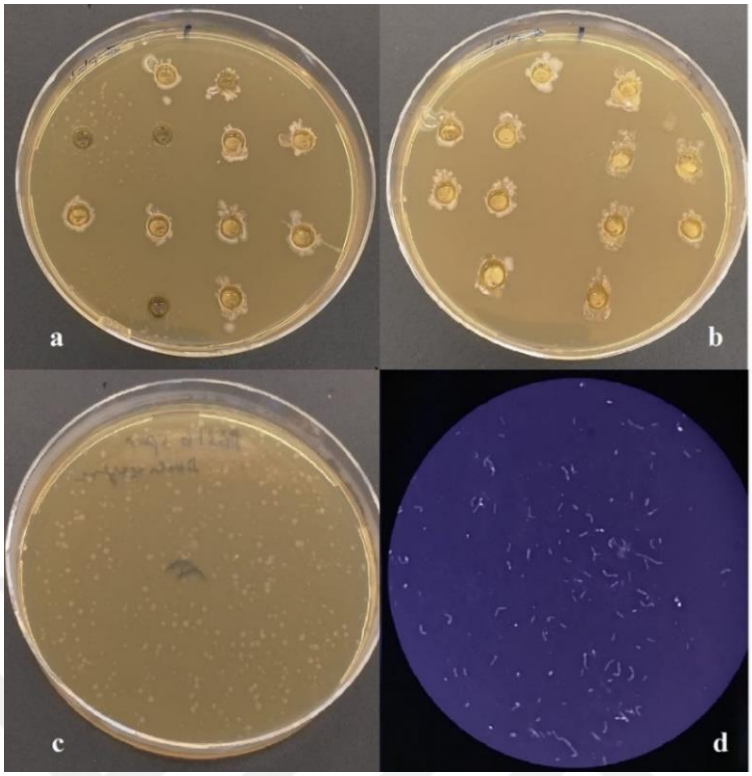
Şekil 17. Suşların bazı antimikrobiyal etkinlik zon çapları (a) *E. coli* (b) *S. enteritis* (c) *M. smegmatis* (d) *H. pylori*

CFS varlığında 18 saat süreyle *P. larvae* spor çimlenmesi ve mikrobiyal büyümesi izlenen örneklerin negatif kontrol gruba kıyasla aktif çimlenme gösteremediği saptanmıştır. Negatif kontrol *P. larvae* spor solüsyonu inkübasyonun 6. saate kadar adaptasyon evresini (lag faz) tamamlamış ve 6. saatten itibaren logaritmik çoğalma evresine geçmiştir. Hücre sayısındaki artış 12 s içerisinde OD_{600nm}=0.4 seviyelerinden 1.2 seviyelerine ulaşmıştır. LAB-CFS uygulanan sporlar ise E85-2A suşuna ait uygulamanın haricinde diğer uygulamalar çimlenme gözlenememiş mikrobiyal gelişme ciddi miktarda duraksamıştır. E85-2A'ya ait CFS muamele edilen spor grubunda ise negatif kontrol ile aynı seviyede olmasa da az miktarda spor aktivasyonu ve mikroorganizma sayısında çoğalma gözlenmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. *P. larvae* sporlarının CFS varlığında 18 s'lik çimlenme aktivitesi

Çalışılan *P. larvae* spor solüsyonu 4 günlük inkübasyon süresinin sonunda aktif canlılık göstermiş ve petrilerde üremiştir. Bununla birlikte agar kuyucuk difüzyon metoduyla spor çimlenme inhibisyon etkisi test edilen petrilerde üreme gözlenmemiş, özellikle boş bırakılan kuyucuklar ve petri sınırlarında spor çimlenmesi ve bakteriyel üreme gözlenirken LAB lizatı içeren kuyucuklar etrafında *P. larvae* üremesi gerçekleşmemiş ve geniş inhibisyon zonları gözlenmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. LAB lizatlarının agar kuyucuk metoduyla sporosidal etkinlikleri ve *P. larvae*'nin makroskobik ve mikroskobik görünümleri (a-b) Spor çimlenmesi üzerine inhibisyon etkisi (c) 100 µL *P. larvae* spor kültürünün normal üremesi (d) *P. larvae* sporlarının Nigrosin boyama ile mikroskobik inceleme

2.3.5. İzolatların Probiyotik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

2.3.5.1. İzolatların Safra ve Asidik pH Direnci

In vitro olarak çeşitli sindirim sistemi koşullarına maruz bırakılan LAB suşlarının canlılık özellikleri Bölüm 2.2.7'de belirtilen şekilde test edildi. Elde edilen sonuçlara göre L46/3A, L72/3B, L142/2B, L203/2A ve LS122/1A suşları pH değişimine, L86/3B, L164/2B, E87/3B ve E163/2A suşları ise %0.3 safra maruziyetine duyarlılık göstermiş ve canlılığını koruyamamıştır (Tablo 14).

İnkübasyon süresinin sonunda tüm petrilerdeki bakteri kolonileri sayılarak 1 mL'deki hücre yoğunlukları hesaplanmıştır. pH değişimine karşı direnç gösteremeyen suşların 0. saatten itibaren hassasiyet geliştirdikleri, safraya karşı direnç gösteremeyen suşların ise safra ortamında inkübasyona bırakıldığında başlangıçta safra muamelesini tolere edebildiği daha uzun süreli maruziyet sonrasında üremenin inhibisyona uğradığı saptanmıştır (Tablo 14).

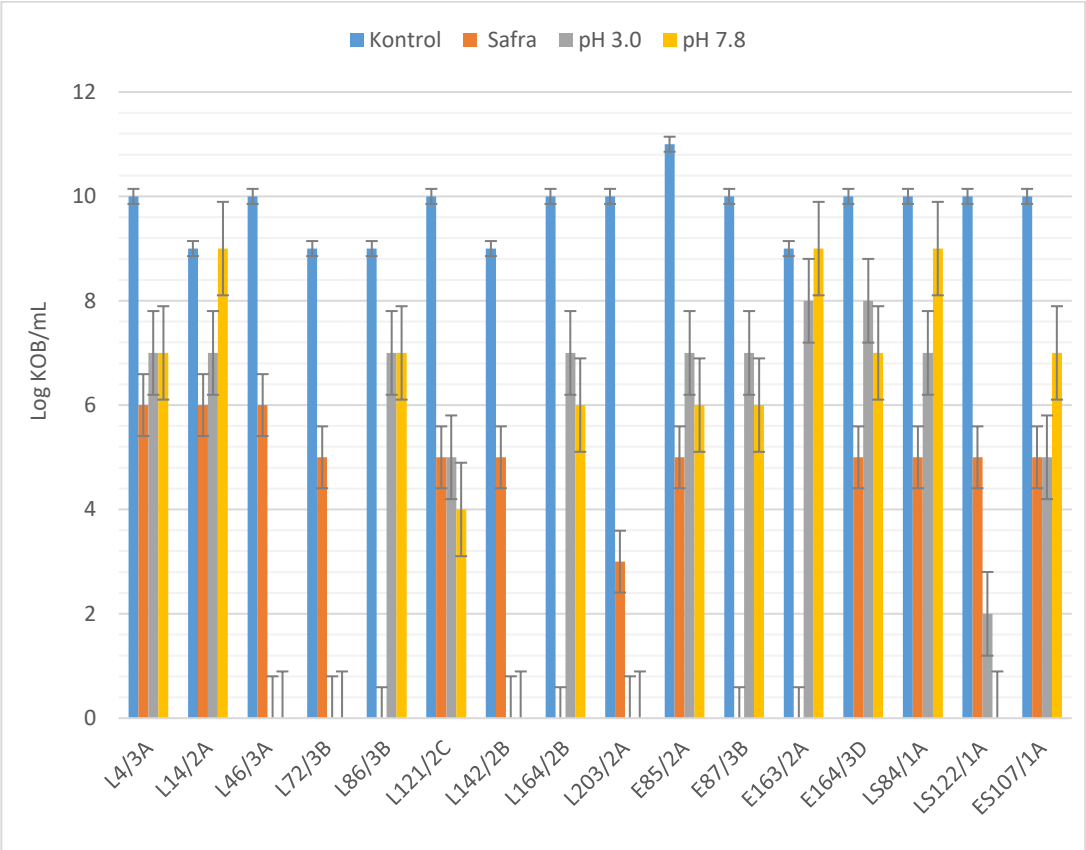
3 saat süresince asidik pH ve alkali pH'ya, 4 saat süresince %0.3'lük safra ortamına maruz bırakılan suşların standart besiyerine inokülasyonu sonucu kontrol gruplarına göre üreme aktiviteleri log KOB/mL cinsinden analiz edilmiştir. pH değişimini ve safra ortamını en iyi tolere edebilen suşlar L4/3A, L14/2A, L121/2C, E85/2A, E164/3D, LS84/1A ve ES107/1A olarak saptanmıştır (Tablo 14, Şekil 20).

Tablo 14. LAB suşlarının 48 saat sonunda üreme miktarı, log KOB/mL

İzolat No	pH 7.8		pH 3.0		%0.3 Safra		Kontrol
	3. s	0. s	3. s	0. s	4. s	0. s	
L4/3A	$3.5x10^7$	$6.9x10^9$	$7.1x10^7$	$1.2x10^{10}$	$6x10^6$	$1.1x10^9$	$1.1x10^{10}$
L14/2A	$2.3x10^9$	$1.4x10^{10}$	$2.8x10^7$	$1.1x10^{10}$	$1.2x10^6$	$5.5x10^7$	$5.4x10^9$
L46/3A	–	–	–	–	$4.6x10^6$	$1.4x10^9$	$2.4x10^{10}$
L72/3B	–	–	–	–	$4x10^5$	$1.4x10^9$	$2.7x10^9$
L86/3B	$3x10^7$	$1.9x10^9$	$5x10^7$	$3.6x10^{10}$	–	$3.2x10^6$	$6.1x10^9$
L121/2C	$6.2x10^4$	$1.4x10^7$	$6.8x10^5$	$1.4x10^7$	$1.4x10^5$	$3.9x10^8$	$2.5x10^{10}$
L142/2B	–	–	–	$9.6x10^8$	$2.5x10^5$	$1.2x10^5$	$6.3x10^9$
L164/2B	10^6	$1.3x10^{10}$	$3.1x10^7$	$3.6x10^9$	–	$1.8x10^6$	$1.1x10^{10}$
L203/2A	–	–	–	$2x10^6$	10^3	$5.6x10^6$	$1.9x10^{10}$
E85/2A	$2x10^6$	$3.3x10^9$	$2.7x10^7$	$3.7x10^9$	$1.4x10^5$	$9x10^6$	$9.2x10^{11}$
E87/3B	$3x10^6$	$1.6x10^9$	$5.3x10^7$	$1.3x10^{10}$	–	$2.6x10^7$	$4.3x10^{10}$
E163/2A	$8.2x10^9$	$1.2x10^{10}$	$9.2x10^8$	$2.4x10^{10}$	–	$4.9x10^5$	$4.5x10^9$
E164/3D	$6.7x10^7$	$2.8x10^{10}$	$2.2x10^8$	$2.5x10^{10}$	10^5	$2.4x10^8$	$4.5x10^{10}$
LS84/1A	$1.6x10^9$	$5.9x10^9$	$3.5x10^7$	$1.6x10^9$	$3.5x10^5$	$4.5x10^7$	$2.6x10^{10}$
LS122/1A	–	–	10^2	–	$5x10^5$	$1.8x10^7$	$5.9x10^{10}$
ES107/1A	$2.6x10^7$	$1.7x10^9$	$3x10^5$	$8.8x10^9$	$5.5x10^5$	$1.1x10^8$	$2.5x10^{10}$

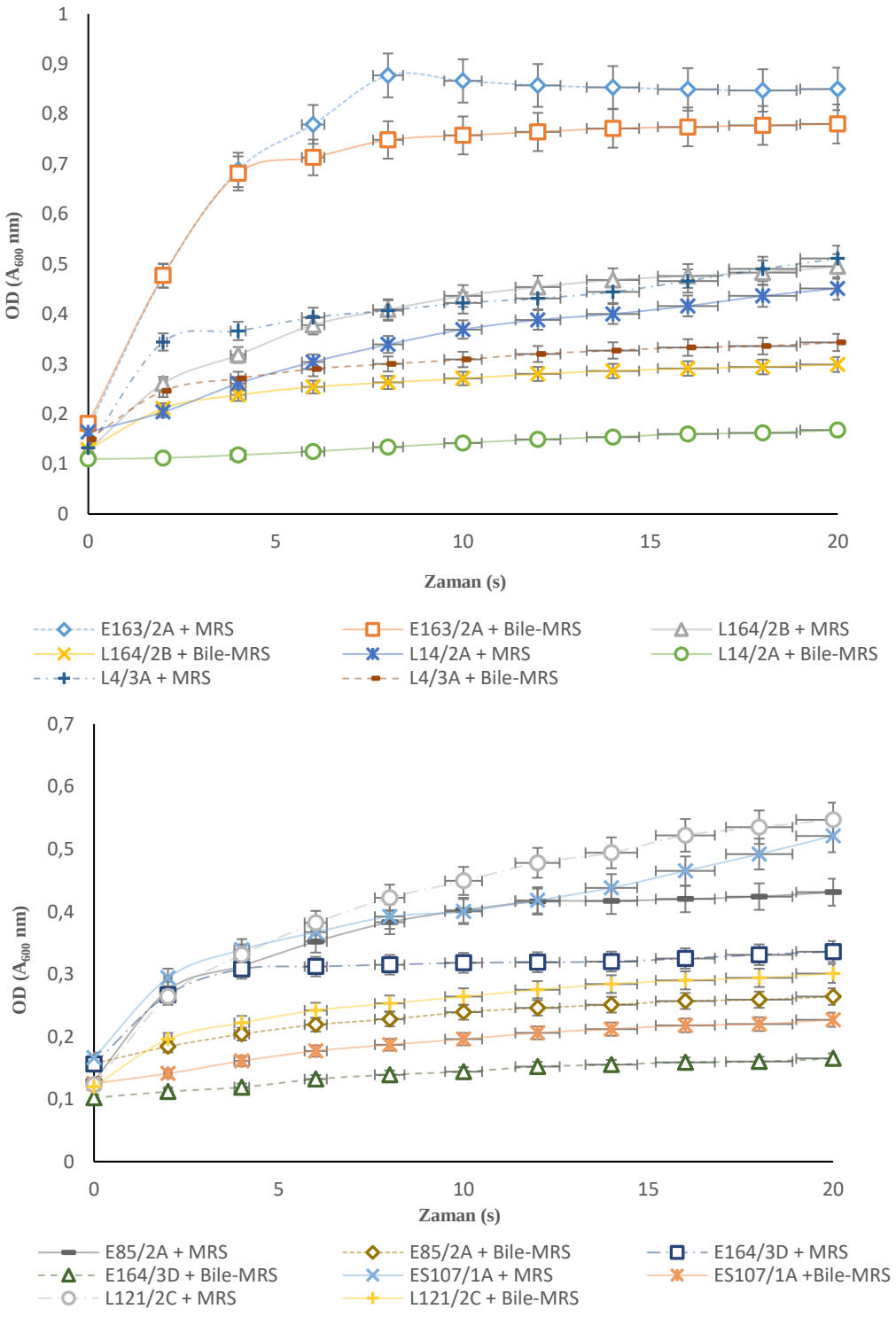
pH 3.0 ve pH 7.8 ortamına toleransı ve üreme aktivitesi en yüksek olan suş E163/2A olarak belirlenmiştir fakat 4 saatlik safra muamelesi sonrası pasajlanan örnekte üreme gözlenememiştir. Aynı şekilde L86/3B, L164/2B ve E87/3B suşları da asidik ve alkali pH muamelesine tolerans gösterirken safra muamelesi sonrası gelişim gösterememiştir (Şekil 20). Buna ek olarak Bile-MRS sıvı besiyeri ortamında gelişimi 20 saat boyunca gözlenen bu suşlar, örneğin E163/2A suşunun, üreme aktivitesi kontrol grubuyla hemen hemen aynı seyretmiş 4 saatin sonunda net gelişme hızında düşüş yaşandığı belirlenmiştir. Bu durum pozitif kontrol üreme ile aynı süre içerisinde gerçekleştiği için safra varlığından kaynaklı değil ortamdaki besin

miktarının bitişi, ortam rekabeti ve gittikçe kısıtlanan koşullardan kaynaklı olduğu, bakterilerin logaritmik üreme fazından duraklama fazına geçtiği şeklinde yorumlanmıştır (Şekil 21, Şekil 22).

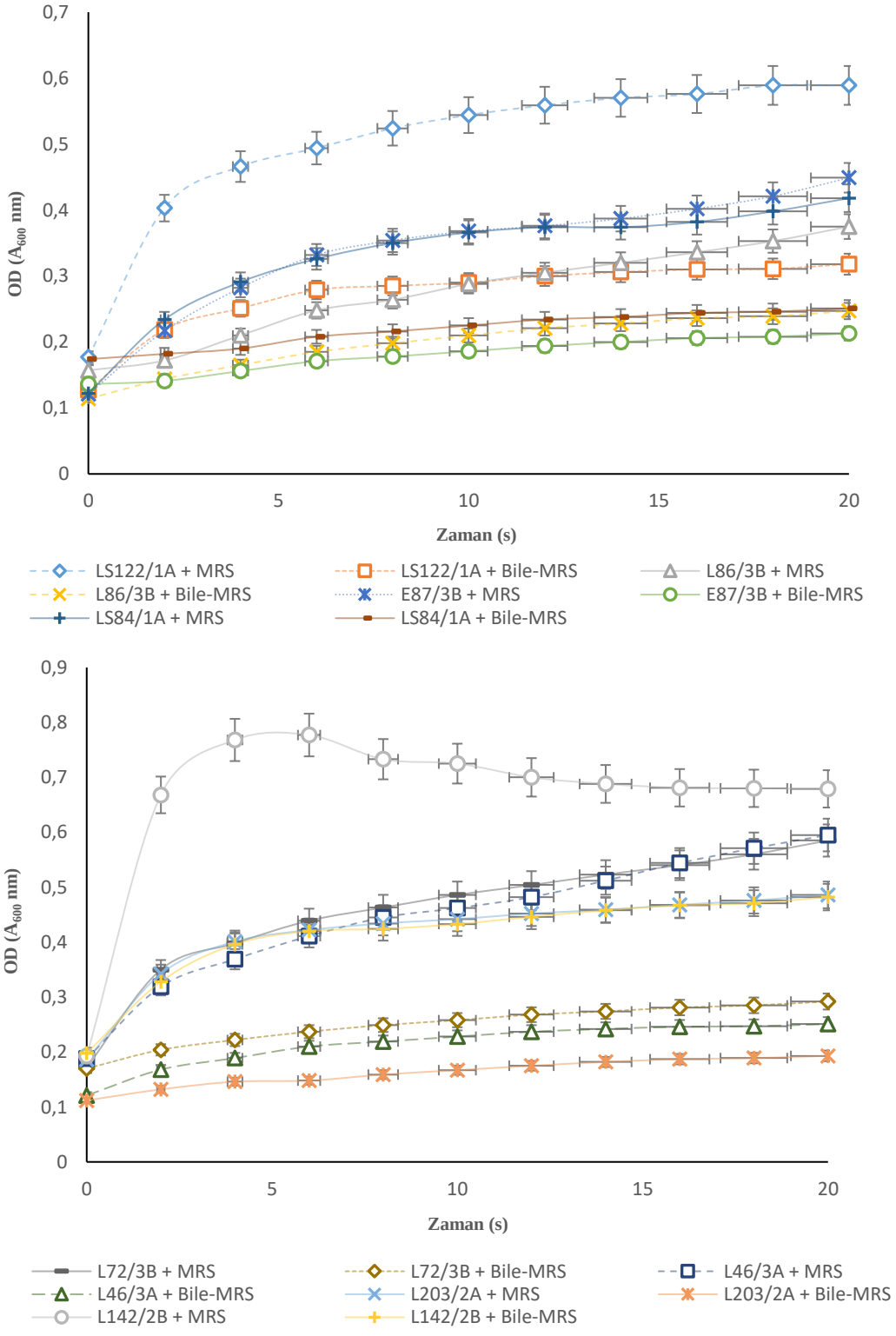


Şekil 20. Suşların 48 s sonunda asidik ve alkali pH ile safra ortamında üreme aktivitelerinin grafiksel görünümleri

Bile-MRS sıvı besiyerinde 20 saat boyunca üremeleri izlenen LAB suşlarının bakteriyel gelişme eğrileri kontrol gruplarına göre oluşturulmuştur. Standart MRS sıvı besiyerinde inkübe edilen kontrol gruplarına ve safra ortamında inkübe edilen diğer test suşlarına kıyasla gelişme aktivitesini ilk 4 saat boyunca en iyi sürdürebilen suşlar L142/2B, LS122/1A, L164/2B, L4/3A, L121/2C, L86/3B ve E163/2A olarak belirlenmiştir. En hassas suşlar ise L14/2A, E164/3D, E87/3B, LS84/1A ve L203/2A olarak belirlenmiştir. Safra tuzunun bakteri büyümesini yavaşlatıcı etkisinin, inkübasyonun 2-4 saat sonrasında önemli ölçüde gözlemlenebildiği saptanmıştır (Şekil 21, Şekil 22).



Şekil 21. Suşların %0.3 safra ortamında kontrol grupları ile üreme aktiviteleri-1



Şekil 22. Suşların %0.3 safra ortamında kontrol grupları ile üreme aktiviteleri-2

2.3.5.2. İzolatların Agregasyon Özellikleri

Çalışılan LAB suşlarının agregasyon yetenekleri Bölüm 2.2.7'de belirtilen şekilde test edildi. Alınan spektrum değerlerine göre yapılan analizde LAB suşlarının otoagregasyon yeteneklerinin 4 saat sonunda %5,55 ila %44 arasında değiştiği belirlendi. Yüzde artış hesaplamasına göre yorumlandığında en yüksek otoagregasyon gelişimi sırasıyla ES107/1A, E164/3D, L14/2A, L4/3A, L142/2B ve E85/2A suşlarında gözlenmiştir. En düşük otoagregasyon aktivitesi ise L203/2A ve E87/3B suşlarında belirlenmiştir (Tablo 15). Sonuçlar, suşların önemli otoagregasyon değerine sahip olduğunu ve dolayısıyla iyi adezyon ve kümelenme aktivitesi gösterebileceklerini kanıtlar niteliktedir.

Tablo 15. LAB suşlarının otoagregasyon değerleri (%) (N=16)

İzolat	1. s	2. s	3. s	4. s
L4/3A	18,5	27,8	28,9	30,68
L14/2A	10,5	12,5	13,7	15
L46/3A	16,47	17,64	20	20
L72/3B	21,3	22,24	22,47	23,59
L86/3B	23,9	26,04	30,2	32,29
L121/2C	14,63	15,85	17,1	18,29
L142/2B	23,9	28,13	28,12	35,41
L164/2B	23,9	23,91	26,08	28,26
L203/2A	19,0	19,04	19,04	19,04
E85/2A	16,85	20,22	21,3	24,71
E87/3B	30,3	30,3	31,31	31,31
E163/2A	29,2	32,5	33,33	37,5
E164/3D	2,77	2,81	4,2	5,55
LS84/1A	21,5	26,59	26,59	27,65
LS122/1A	37,6	41,6	41,6	44
ES107/1A	14,7	22,11	23,07	30,76

LAB suşlarının *Listeria monocytogenes* ATCC 43251, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 ERIC I test suşlarına karşı koagregasyon (birliktelik oluşturma, yapışma) yeteneği araştırılmıştır (Tablo 16). Çalışılan LAB suşların çoğunun iyi koagregasyon yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir. L86/3B suşu *Listeria*'yla ortalamanın üstünde, *E. coli* ile ortalamanın altında koagregasyon sergilerken diğer suşlara göre *P. larvae* ile koagregasyon yeteneği zayıftır. Benzer şekilde L14/2A'nın *P. larvae* ile koagregasyon yeteneği ortalamanın üstünde, *Listeria* ile koagregasyon yeteneği ortalamaya yakın seyrederken *E. coli*'ye karşı ortalamanın altındadır.

Özetle *P.larvae* ile diğer suşlara oranla ortalamanın üstünde etkili koagregasyon yeteneği gösteren suşlar L14/2A, L121/2C, L142/2B, E87/3B, E163/2A, E164/3D ve ES107/1A, *E. coli* ile diğer suşlara oranla etkili koagregasyon yeteneği gösteren suşlar L72/3B, L164/2B, L203/2A, E87/3B, E163/2A, E164/3D ve LS122/1A, *Listeria*'yla diğer suşlara oranla daha etkili, ortalamanın üstünde etkinlik gösteren suşlar L86/3B, L121/2C, L142/2B, L164/2B, E85/2A, LS84/1A, LS122/1A ve ES107/1A olarak tespit edilmiştir.

Ortalamaya yakın sonuçlar gösteren suşlar nispi oranda önemlidir. *E.coli* ile ortalamaya yakın sonuç gösteren suşlar L72/3B, L142/2B, LS84/1A ve ES107/1A'dır. *Listeria* ile ortalamaya yakın sonuç gösteren suşlar L14/2A ve E164/3D, *P. larvae*'yla ortalamaya yakın sonuç gösteren suşlar L46/3A ve E163/2A'dır. Çalışmanın sonuçlarına göre patojenlere karşı en iyi koagregasyon özelliğine sahip suşların L164/2B, LS122/1A, E164/3D, E163/2A, L121/2C, ES107/1A, L86/3B ve L142/2B olduğu belirlenmiştir. En zayıf etkinliği L4/3A, L46/3A ve L72/3B suşları sergilemektedir.

Tablo 16. LAB suşlarının koagregasyon değerleri (%) (N=16)

İzolat	***E. coli***		***L. monocytogenes***		***P. larvae***	
	0. s	**4. s**	**0. s**	**4. s**	**0. s**	**4. s**
L4/3A	7.8	13.1	2,89	10.71	9,09	13,25
L14/2A	5,3	6,1	1,38	6,57	2,66	7,24
L46/3A	1,3	2,0	1,4	2,59	2,94	6,57
L72/3B	2,8	7,6	5,03	8,86	3,84	5,96
L86/3B	6,35	11,9	1,47	15,47	10,76	10,84
L121/2C	3,54	7,89	1,31	8,6	1,33	9,09
L142/2B	6,94	17,85	1,7	10,71	3,7	10,84
L164/2B	1,42	12,19	0,72	8,53	6,17	11,45
L203/2A	1,4	5,19	3,89	12,23	6,57	8,27
E85/2A	7,8	9,43	1,44	5,66	16,6	19,74
E87/3B	3,49	13,45	1,42	19,29	5,97	13,6
E163/2A	2,06	34,22	1,36	5,2	15,78	34,28
E164/3D	1,38	5,55	1,38	6,38	9,62	35,21
LS84/1A	2,81	8,43	1,71	15,66	5,26	9,75
LS122/1A	6,2	23,07	1,2	23,07	12,95	15,55
ES107/1A	8,04	20,54	2,09	16,09	13,95	32,84

2.3.5.3. İzolatların Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Çalışmada izole edilen *Apilactobacillus, Fructobacillus, Enterococcus ve Leuconostoc* cinsi bakterilerin antibiyotik direnç testleri bir dizi antibiyotiklere karşı disk difüzyon metoduyla test edildi. Suşların direnç durumunu hem Gram pozitif

(*Enterococcus* spp. ve *Stretococcus* spp.) hemde Gram negatif (*Enterobacter* spp.) bakterilerin direnç sınırı dikkate alınarak belirlendi. Genel olarak bakıldığında tümünün en az üç en çok 10 antibiyotiğe direnç içerdiği belirlendi. Seçilen suşların tümü seftazidim, trimetoprim-sulfametaksazol, vankomisin ve ikisi hariç (L46/3A ve LS122/1A) sefaklora dirençli oldukları gözlendi. İnhibisyon zonunun çapları 38 ile 0 mm arasında değiştiği belirlendi (Tablo 17).

Tablo 17. Suşların disk difüzyon metoduna göre antibiyotik direnç profilleri (N=16)

İzolat No	**Test edilen antibiyotikler ve zon çapları (mm)**											**Anti.**
	CN	**S**	**E**	**TE**	**C**	**AMP**	**CAZ**	**CEC**	**CZ**	**SXT**	**VA**	**Sayısı**
L4/3A	10 r	18	18 r	17 r	28	20	12r	18r	30	- r	- r	7
L14/2A	- r	- r	- r	8 r	10r	23	8r	22r	12r	- r	- r	10
L46/3A	18	27	30	25	33	28	12r	28	38	18 r	- r	3
L86/3B	10 r	20	- r	16 r	28	- r	17r	25r	30	- r	- r	8
L121/2C	18	27	25	30	32	25	- r	23r	14r	- r	- r	5
L164/2B	10 r	20	25	20	30	28	13r	20r	35	- r	- r	5
L203/2A	20	25	28	25	25	25	- r	- r	12r	- r	- r	5
E87/3B	10 r	20	- r	16r	28	- r	17r	25r	30	- r	15 r	8
L72/3B	18	25	25	30	30	23	- r	23r	13r	- r	- r	5
E85/2A	6 r	- r	- r	- r	10r	20	10r	20r	15r	- r	- r	10
LS84/1A	20	18	22r	18r	30	25	10r	20r	30	- r	- r	6
ES107/1A	10r	20	25	20	30	28	13r	20r	35	- r	- r	5
E164/3D*	12	24	22r	15r	30	25	12r	20r	30	- r	- r	6
LS122/1A	10 r	18	27	17r	30	30	20r	30	30	- r	- r	5
L142/2B	18	25	25	25	35	23	- r	23r	14r	- r	- r	5
E163/2A	6 r	- r	- r	6r	10r	25	8r	10r	17r	- r	- r	10
Suş sayısı	9	3	8	9	3	2	16	14	7	16	16	

CN: Gentamisin, S: Streptomisin, E: Eritromisin, TE: Tetrasiklin, C: Kloramfenikol, AMP: Ampisilin, CAZ: Sefazidim, CEC: Sefaklor, CZ: Sefazolin, SXT: Trimetoprim-Sulfametaksazol, VA: Vankomisin,. r: Dirençli

Bu kriterler dikkate alındığında *Apilactobacillus* cinsine ait toplam 12 suşun antibiyotik direnç profiline incelendiğinde; en fazla sayıda antibiyotiklere direncin L14/2A ve E85/2A suşlarında test edilen 11 antibiyotiğin 10'una, bunu takiben L86/3B ve E87/3B ise 8'ine ve L4/3A'nın 7'sine karşı dirençli oldukları belirlendi. En duyarlı suş olan L46/3A'nın yanlızca 3 antibiyotiğe karşı dirençli olduğu

belirlendi. İzolatlardan L121/2C ve L72/3B ile L164/2B ve ES107/1A suşları birbirine çok benzer bir direnç/duyarlılık profiline sahip olması dikkate değer olduğu düşünülmektedir.

Fructobacillus cinsine ait toplam 2 (E164/3D ve LS122/1A) suşun antibiyotik direnç profili incelendiğinde direnç profillerinin benzer olduğu, tetrasiklin, seftazidim, trimetoprim-sulfametaksazol ve vankomisine dirençli oldukları gözlendi.

Leuconostoc cinsine ait L142/2B suşun antibiyotik direnç profili incelendiğinde sefalosporinlere, trimetoprim-sulfametaksazol, vankomisin ve sefazoline yüksek, sefaklora ise orta düzeyde dirençli olduğu belirlendi.

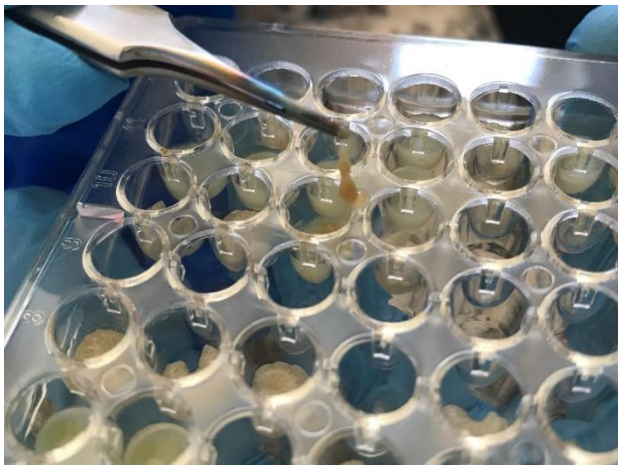
Son olarak *Enterococcus* cinsine ait E163/2A suşu ise test edilen 11 antibiyotiğin 10'una karşı son derece yüksek düzeyde dirençli olduğu, sadece ampisiline karşı 25 mm zon çapıyla duyarlılık gösterdiği belirlendi.

2.3.6. İzolatların *in vivo* Profilaktik Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Çalışmada *Apilactobacillus kunkeei* (L46/3A ve L164/2B), *Enteroccoccus faecium* (E163/2A) ve *Leuconostoc mesenteroides* (L142/2B) cinslerine ait 4 adet suş, bal arısı larvalarında *P. larvae*'ya karşı önleyici tedavi (profilaksi) etkisi test edildi (Tablo 6). *Fructobacillus* olarak tanımlanan suşlar antimikrobiyal etkinlik değerlendirmesine göre *P. larvae*'ya karşı istenilen derecede inhibisyon sergilemediği ve deney aşamasında üremediği için çalışmaya dahil edilmedi. Onun yerine fruktofilik laktik asit bakterilerini temsilen iki adet *A. kunkeei* suşu (L46/3A ve L164/2B) birlikte bir grup olarak kullanılmıştır. NK grubunda canlılık yüzdesi 61,67 olduğu, en yüksek canlılık U8 grubunda (%64,4) olduğu ve bunu sırayla U3 grubu (%63,3) ve U2 grubu (%53,2) izlemiştir. En düşük canlılık sırasıyla U5 (%8,86), U7 (%15,53) ve PK (16,33) gruplarında gözlenmiştir. *P. larvae* spor uygulama gruplarında denemenin başarılı olamadığını, AYÇ enfeksiyonu oluştuğu belirlenmiştir (Tablo 18, Şekil 23).

Tablo 18. LAB suşlarının larval sağlığa ve *P. larvae* enfeksiyonuna etkileri (N=10, 3x30 larva)

Deney Grubu	Canlı sayısı	Ölü sayısı	Hastalıklı canlı/ AYÇ nedeniyle ölü	Sağlıklı sayısı	Ort. Ağırlık (g)	Grup Ort.	Sağlıklı (%)	Grup Ort.
	19	11	-	19	1,00		63	
NK	20	10	-	20	0,99	1,01	66	%61,67
	17	13	-	17	1,03		56	
	10	20	-	10	0,99		33,3	
U1	12	18	-	12	0,97	0,98	40	%36,63
	12	18	-	11	0,98		36,6	
	14	16	-	14	0,99		46,4	
U2	17	13	-	17	0,99	0,99	56,6	%53,2
	17	13	-	17	0,98		56,6	
	18	12	-	18	0,99		60	
U3	20	10	-	20	0,99	1,01	66,6	%63,3
	20	10	-	19	1,03		63,3	
	20	10	6 canlı / 1 ölü	13	0,98		43,3	
U4	20	10	10 canlı / 1 ölü	10	0,97	0,98	33,3	%28,87
	15	15	12 canlı / 2 ölü	3	0,98		10	
	9	21	9 canlı	0	0,98		0	
U5	10	20	8 canlı / 2 ölü	3	0,97	0,97	10	%8,86
	16	14	11 canlı	5	0,95		16,6	
	13	17	5 canlı	6	0,98		20	
U6	17	13	6 canlı / 1 ölü	10	0,98	0,99	33,3	%27,77
	13	17	4 canlı / 1 ölü	9	0,98		30	
	23	7	15 canlı / 5 ölü	6	0,98		20	
U7	17	13	15 canlı / 5 ölü	2	0,97	0,95	6,6	%15,53
	15	15	12 canlı / 4 ölü	6	0,96		20	
	20	10	-	20	0,99		66,6	
U8	19	11	-	19	1,00	0,99	63,3	%64,4
	20	10	-	19	0,99		63,3	
	9	21	3 canlı / 13 ölü	6	0,97		20	
PK	6	24	2 canlı / 11 ölü	4	0,99	0,98	13	%16,33
	7	23	2 canlı / 9 ölü	5	0,98		16	



Şekil 23. Deneme modeli üzerinde AYÇ hastalık tanısı konulan larva örneği

3. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında sağlıklı bal arılarından izole edilen kalıcı veya geçici mikroflora üyesi laktik asit bakterilerinin detaylı şekilde karakterizasyonu, özellikle bakteriyel arı hastalıkları ile mücadelede yararlanımları saptanarak hem arı probiyotiği olarak hem de çeşitli öncül seçim kriterleri ve antimikrobiyal etkinlikleri test edilerek insan probiyotiği olarak kullanılabilme potansiyelleri araştırılmıştır.

Probiyotiklerin etki mekanizmalarının ve kullanılabilirlik verimlerinin en detaylı şekilde araştırıldığı mikroorganizma grubunu laktik asit bakterileri (LAB) oluşturmaktadır (Wedajo, 2015). Laktik asit bakterileri terimi, filogenetik bir organizma sınıfıyla değil, nitelenen türlerin metabolik yetenekleriyle ilgilidir. Laktik asit bakterileri çeşitli besin maddelerini öncelikle laktik aside fermente edebilen ve birçok mikroflorada bulunabilen bir mikroorganizma ailesi olarak tanımlanır (LAB, 2014). Beslenme ve sağlık yararına büyük öneme sahip olan laktik asit bakterilerinin pek çoğu, insan ve hayvan mikrobiyotasının önemli bileşenleridir (Muñoz vd., 2011; Zhang ve Chai, 2014).

Hayvanların bağırsaklarındaki mikroorganizmalar, yiyecekleri sindirmeye yardımcı olarak, zararlı molekülleri detoksifiye ederek, temel besinleri sağlayarak, istilacı patojenlere ve parazitlere karşı koruma sağlayarak, gelişme ve bağışıklığı modüle ederek konakçılarına fayda sağlayabilir. Bağırsaktaki mikrobiyal toplulukların bileşimi türler içinde ve türler arasında büyük farklılıklar gösterir, örneğin omurgasızlar omurgalılara göre nispeten daha basit bağırsak mikrobiyotasına sahiptir. Bununla birlikte, bu mikrobiyal topluluklar genellikle düzensizdir, kolonize olan ve bulunduğu ortamda özelleşmiş çekirdek mikrobiyal ortakyaşarların yanında (kalıcı mikroflora), fırsatçı çevresel mikroorganizmalar (geçici mikroflora) şeklinde de bulunurlar (Kwong, 2016).

Bal arılarında beslenme rutininin çeşitli mikroorganizmalarla etkileşime yol açtığı ve bu sayede bal arısı bağırsağının zengin bir mikrobiyal floraya sahip olduğu uzun zamandır bilinmektedir (Jeyaprakash vd., 2003). Bal arısı *Apis mellifera* mikrobiyotası, memelilerinkine yakın benzerlikler sergiler, ancak bileşimlerinde daha basittirler (Kwong, 2016). Arı sindirim sistemi, farklı türde mikrobiyal topluluklar içeren karmaşık bir ekosistemdir. Erişkin bal arılarının mide-bağırsak

yolu dört ana bölüme ayrılır: Bal midesi, orta mide, ileum ve rektum. Her bölmenin, gastrointestinal sistem boyunca eşit olmayan bir mikrobiyota dağılımı, spesifik mikroorganizmalarla zengin farklı bir ortamı bulunmaktadır (Royan, 2019). Günümüzde bal arısından izole edilen laktik asit bakterilerinin, bal arısı sağlığı üzerine etkisi ve çeşitli enfeksiyonlardan korunma ve tedavideki rollerinin belirlenmesi amacı ile yapılan araştırmalarda faydalı etkinlikleri kanıtlanmıştır (Al-Ghamdi vd., 2017; Arredondo vd., 2017; Daisley vd., 2020; Iorizzo vd., 2020; Huang vd., 2021; Pachla vd. 2021).

Bugüne kadar bal arılarının midelerinden, bağırsaklarından, arı ürünlerinden ve kovandan izole edilen 45'ten fazla LAB türü bulunmaktadır. Bu türler arasında yer alan *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus* Firm-4 ve Firm-5, *L. apis, L. mellifera, L. johnsonii, A. kunkeei, F. fructosus* gibi birçok *Lactobacillus* türünün ve *Bifidobacterium asteroides, B. coryneform, Leuconostoc* spp., *Enterococcus* spp., *Micrococcus* gibi türlerin sağlıklı bal arısı kolonileriyle ilişkili oldukları bildirilmiştir (Endo ve Salminen, 2013; Jones vd., 2017; Silva vd., 2017; Zheng vd., 2017; Lamei, 2019; Filannino vd., 2019; Vergalito vd., 2020; Huang vd., 2021). Ayrıca arılarda LAB kolonizasyonunun ve kompozisyonunun mevsimsel olarak ve yiyecek arama aktivitesine göre değiştiği belirtilmektedir (Vásquez vd., 2009).

Anderson vd. (2013) hem erişkin bal arısı hem larva bağırsaklarından izole ettiği suşları 16S rRNA gen analizine göre *A. kunkeei, F. fructosus, Weissella confusa, Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp. ve çekirdek bağırsak bakterileri olan *Lactobacillus* Firm5 olarak tanımlamıştır. Bu türlerin aynı zamanda nektar ve polende de bulunduğu ve larvalardaki mikrobiyota varlığının gıda yoluyla bulaşan mikroorganizmalardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Anderson vd., 2013). Vojvodic vd. (2013) Nisan ayından Mayıs ayına dek topladıkları 346 adet bal arısı larvasında mikrofloranın 1. instar dönemden 5. instar döneme dek devamlı değiştiğini, dönemsel farklılıklarla *Acetobacteraceae, Neisseriaceae, Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium, Bacillus* sp., *F. fructosus* ve *A. kunkeei* türlerini içerdiğini ve mikrobiyal floranın esas olarak çevresel mikroorganizmalardan kaynaklandığını belirtmektedir.

Çalışmamızda sağlıklı bal arısı ve larva örneklerinden çok sayıda simbiyotik nitelikli Gram pozitif bakteri izole edilmiştir. Bunlardan seçilen 5 izolat erişkin işçi

arı, 11 izolat larva orijinlidir (Tablo 7). Çalışmamızda yer alan izolatlara kültür temelli yaklaşımlar ve 16S rRNA dizilimi kullanılarak yapılan filogenetik analizle *A. kunkeei*, *F. fructosus*, *E. faecium* ve *L. mesenteroides* ile ilişkili suşların Türkiye'nin farklı bölgelerindeki sağlıklı bal arılarında ve larvalarda tanımlanması ve literatüre kazandırılması sağlanmıştır (Şekil 15).

Çalışmada izolatların 12 tanesi *A. kunkeei*, 2 tanesi *F. fructosus*, 1 tanesi *E. faecium* ve 1 tanesi *L. mesenteroides* olarak tanımlanmış, koloni ve bakteri morfolojileri tür düzeyinde farklılık gösterdiği belirlenmiş ve bazı biyokimyasal test sonuçlarının birebir benzer olmadığı gözlenmiştir (Tablo 8, Şekil 8, Şekil 9). İzole edilen LAB izolatlarının oksidaz ve katalaz aktivitelerinin negatif olduğu ve bu sonuçların literatürle uyumlu olduğu görülmüştür (Yörük ve Güner, 2011).

Fruktofilik laktik asit bakterileri (FLAB), birkaç *Fructobacillus* ve *Lactobacillus* türünden oluşan, substrat olarak glukoz yerine fruktozu tercih eden, yeni keşfedilen bir gruptur. Glukoz ve oksijen varlığında zayıf üreme gösterme gibi benzersiz özellikleri nedeniyle, geleneksel olmayan laktik asit bakterileri olarak kabul edilmektedirler (Endo vd., 2018). Fruktoz açısından zengin nişlerde, örneğin çiçekler, meyveler, bal bulunurlar. *Fructobacillus* spp. ve *Lactobacillus (Apilactobacillus) kunkeei* bu mikroorganizmaların temsilcileridir (Endo ve Salminen, 2013).

Endo ve Salminen (2013), işçi arılar, larvalar, bal ve arı polenlerinden toplam 66 adet FLAB suşu izole etmiştir. FLAB izolatlarından 63 tanesi *A. kunkeei*, 3 tanesi *F. fructosus* olarak bildirilmişlerdir. Çalışmamızda da bal arısı ve larva örneklerinden izole edilen suşların %75'i *A. kunkeei*, %12.5'u *F. fructosus* olarak bulunmuştur (Şekil 15, Tablo 10,11). Bu sonuç, *A. kunkeei*'nin bal arılarından izole edilebilen ve kültürlenebilen en baskın LAB'lerden biri olduğunun tespit edildiği önceki bulgularla uyumludur (Mohr ve Tebbe, 2007; Vásquez vd., 2009; Neveling vd., 2012; Endo ve Salminen, 2013).

Çalışmada sağlıklı arı larvasından *E. faecium* E13/2A suşu izole edilmiştir. Geleneksel tanı (Gram pozitif, zincir şeklinde kok olmaları, oksidaz katalaz negatifliği ve koloni morfolojisi) yöntemleriyle belirlenen özellikler ve moleküler tanı sonuçlarının birbirine uyumlu olduğu gözlenmiştir (Tablo 8, Şekil 15, Tablo 11). Bilindiği gibi *E. faecium*, hayvanların mide-bağırsak kanallarında, fermente

gıdalarda, süt ürünlerinde, toprak ve su gibi çeşitli ortamlarda yaygın olarak bulunan genel olarak kommensal bir organizmadır. Enterokoklar bal arısı kolonilerinde yaygındır ve ilk olarak Martin ve Mundt (1972) tarafından *A. mellifera* erginlerinden izole edilmiştir (Du vd., 2021). *E. faecium*, dev bal arısı *A. dorsata*'nın ve *A. mellifera*'nın mide-bağırsak sisteminde sıklıkla izole edilmiş olup, *Enterococcus* suşlarının diğer *Apis* cinslerinin mikrobiyotasında bulunabildiğini göstermektedir (Carina Audisio vd., 2011; Tajabadi vd., 2011).

Çalışmamızda sağlıklı arı larvasında tanımlanan bir diğer suş *L. mesenteroides* L142/2B'dir (Tablo 11, Şekil 15). Önceki çalışmalarda *Leuconostoc* spp.'nin sağlıklı bal arısı kolonisi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Budge vd., 2016; Rozitis, 2016). Mikroflorada *Lactobacillus, Bifidobacterium* ve *Leuconostoc* cinsi laktik asit bakterilerinin varlığının bal arısı larvalarının bağışıklık tepkisini artırabileceği belirtilmektedir (Forsgren vd, 2010). Huang vd. (2021) *L. mesenteroides*'i Bombus arılarından izole etmiş ve laboratuvar ortamında bal arıları üzerinde probiyotik etkilerini kanıtlamıştır.

A. kunkeei olarak tanımlanan L4/3A, L14/2A, L46/3A, L72/3B, L86/3B, L121/2C, L164/2B, L203/2A, E85/2A, E87/3B, LS84/1A ve ES107/1A'nın 16S rRNA gen analizine göre %99-100 örtüşme ve %99 benzerlik taşımasına rağmen biyokimyasal özelikleri karşılaştırıldığında bazı enzimatik aktiviteler bakımından (selülaz, lesitinaz ve sitrat aktiviteleri, hidrojen peroksit üretimi ve eskülin hidrolizi) suşlar arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir (Tablo 8, Tablo 10, Şekil 15).

Enzimler, canlı hücreler tarafından üretilen ve spesifik biyokimyasal reaksiyonlarda görev yapan biyokatalizörlerdir (Diler, 2007). Çalışmamızda bal arısı örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinden *E. faecium* olarak tanımlanan E163/2A'nın, *F. fructosus* olarak tanımlanan LS122/1A'nın ve *A. kunkeei* L121/2C, E85/2A, E87/3A ve ES107/1A'nın selülaz enzimi içerdiği belirlenmiştir (Tablo 8). Bitki bazlı beslenme rutininden enerji alımı için gerekli olan enzimatik aktiviteleri (yani selülaz, hemiselülaz ve lignaz aktivitesi) kodlayan genlere sahip olduklarından mikrobiyal bağırsak simbiyontları sosyal böcekler için oldukça önemlidir. Ayrıca mikroflora yağ asitleri, amino asitler ve diğer gerekli besinleri ve metabolitleri üretir (Akman Gunduz ve Douglas, 2009). Bal arıları vitamin B kompleksi de dahil olmak üzere bazı vitaminlere ihtiyaç duyar ve tıpkı insanlarda olduğu gibi bağırsak

bakterileri bu ihtiyaç doğrultusunda büyük öneme sahiptirler (Brodschneider ve Crailsheim, 2010).

Bakteriyel lesitinazlar, patojenitedeki olası rolleri nedeniyle özel ilgi görmektedir. Lesitinazlar diğer adıyla fosfolipazlar, bakteri tarafından salınan, hayvan dokularını yok etme yeteneğine sahip ve patojenitede rol oynayan enzimlerdir. Fosfolipaz C olarak da adlandırılan lesitinaz, fosfolipid yapıda lesitini parçalayan bir enzimdir. Fosfolipid kompleksleri genellikle dokularda, serumda ve yumurta sarısında bulunan emülsifiye edici ajanlardır. Gıda toksisitesinde rol oynayan en önemli kirleticilerden bazıları lesitinaz, kazeinaz ve hemolizin aktivitesidir. Bu nedenle lesitinaz (fosfolipolitik) aktivitesi gıda toksisitesinin bir göstergesi olarak kullanılır (Arturo vd., 1995). Çalışılan suşlar arasında *A. kunkeei* E87/3B, *F. fructosus* E164/3D ve *F. fructosus* LS122/1A suşları lesitinaz enzim aktivitesi pozitif olarak belirlenen suşlardır. Lesitinaz üreme sistemi dokularına zarar verebilir, hemolize ve hücre lizisine yol açan membran bozulmalarına neden olabilir (Sharaf vd., 2014). Bu durumun lesitinaz aktivitesi pozitif suşların probiyotik olarak kullanım güvenirliğini olumsuz etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda bazı suşların, *E. faecium* E163/2A, *L. mesenteroides* L142/2B ve *A. kunkeei* L203/2A, L121/2C ve L4/3A, sitratı karbon kaynağı olarak kullanabildikleri gözlenmiştir (Tablo 8). Laktik asit bakterilerinin fermantasyon sırasındaki ana faaliyeti, gıdada bulunan şekerlerin katabolizması ile homo veya hetero fermentatif yollarla laktik asit üretilmesidir. Ek olarak, bu mikroorganizmalar ayrıca sitrat gibi diğer substratları metabolize etme yeteneğine de sahiptirler. Sitrat, meyve suları, süt ve sebzelerde bulunur ve ayrıca gıdalara koruyucu olarak eklenir. LAB ile sitrat fermantasyonu, aromatik özelliklere sahip, başlıca diasetil, asetoin ve bütandiol olmak üzere 4-karbonlu bileşiklerin üretilmesine yol açar. Bu bileşiklerden biri olan diasetil, tereyağı, ekşi krema, yoğurt ve süzme peynir gibi süt ürünlerinin tereyağı aromasından sorumludur (García Quintans vd., 2008).

Çalışmamızda bazı suşların antibakteriyel aktivite etkeni olarak hidrojen peroksit ürettikleri gözlenmiştir (Tablo 8). Bazı LAB, gıda kaynaklı patojenik bakteri ve mantarların büyümesini ve metabolizmasını etkilediği kanıtlanmış güçlü bir oksitleyici olan hidrojen peroksiti (H_2O_2) üretir. LAB, katalaz üretmediği için ekstraselüler salınan H_2O_2 parçalanamaz ve bu nedenle hücrede birikerek ortamdaki

mikroorganizmaların gelişmesini engeller. H_2O_2, ortamdaki mikroorganizmaların elektronlarını ve moleküllerini toplayarak protein moleküler yapısını bozar (Liu vd., 2022). Güçlü bir antimikrobiyal ajan olan H_2O_2 üretimi çalışılan suşların 10 tanesinde kromojenik metodlarla saptanmıştır. *Fructobacillus* ve *Enterococcus* cinsine ait bakteriler H_2O_2 üretimi göstermezken *Leuconostoc* suşu ve 9 adet *Apilactobacillus* suşu pozitif etkinlik sergilemiştir. Bu bağlamda antimikrobiyal etkinlikleri geniş çaplı olarak çeşitli patojen bakteriler üzerinde test edilen bu suşların birincil antimikrobiyal etkili metabolitinin H_2O_2 olduğu düşünülebilir.

Selüloz, doğada en yaygın olarak bulunan karbonhidrat polimeridir ve günümüzde biyoyakıtlar ve bazı kimyasallar gibi faydalı endüstriyel malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır. Biyobozunur bir malzemedir ve bitki hücre duvarının yapısında bulunarak hücre biyokütlesinin yaklaşık %40'ını oluşturur (Yan vd., 2011). Selülozu hidrolize edebilen selülaz enzimleridir, bu enzimler endoglukanaz (endo-1,4-β-glukanaz), ekzoglukunaz (exo-1,4- β-glukanaz) ve β glukosidaz (1,4-β-glukosidaz) olarak üç tipe ayrılabilir (Sukumaran vd., 2005). Selülazlar, tekstil ve deterjan, gıda ve yem, fırıncılık, kağıt hamuru ve atık işleme gibi çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılan önemli endüstriyel enzimlerdir (Maurya vd., 2012). Çalışmamızda izole edilen *A. kunkeei* ES107/1A, E87/3B, E8/2A L212/2C suşları ile *E. faecium* E163/2A ve *F. fructosus* ES107/1A suşlarının selülaz aktivitelerinin pozitif bulunması endüstriyel kullanım açısından özel ve güçlü bir mekanizmaya sahip olduklarını düşündürmektedir. Ayrıca arılar karbonhidratları nektardan, lipitleri ve amino asitleri polenden alırlar ve bu besinler selüloz, hemiselüloz ve pektin gibi polisakkaritler açısından oldukça zengindir. Bu potansiyel enerji kaynakları, mikrobiyal enzimler vasıtasıyla bozunabilir ve fermente edilebilir (Brodschneider ve Crailsheim, 2010). Bal arıları da dahil olmak üzere bazı böcekler endojen GH9 selülaza sahiptir, bu enzim polenin iç selülozik duvarının bozulmasında rol oynar (Kunieda vd., 2006; Watanabe ve Tokuda, 2010). İzole edilen LAB'lerin selülaz aktivitesi sergileyebilmesi bu bakterilerin özellikle polen sindiriminde bal arısı metabolizmasında simbiyotik görev aldıklarını düşündürmektedir.

Eskülin hidrolizi, eskülinin (bir glikozit) β-glukosidaz veya eskülinaz enzimine sahip bir mikroorganizma tarafından glukoz ve eskületine hidrolizidir. Eskülin hidrolizi testi mikroorganizmanın eskülinaz enzimi üreterek eskülini

hidrolize etme yeteneğini saptamak ve bu sayede *Enterobacteriaceae* familyasının üyelerini ayırt etmek ve tanımlamak için kullanılır (Edberg vd., 1976). Çalışmada test edilen LAB suşlarından yalnızca *E. faecium* E163/2A suşu eskülin pozitifliği göstermiş ve tanımlama sonucunu doğrulamıştır.

Sıcaklık değişimi, LAB için hem fermentasyon süreci için hem de mikroorganizmanın metabolik fonksiyonları açısından önemli bir parametredir. LAB geniş bir sıcaklık aralığında (2-53°C) gelişebilmekte olup genellikle 30-40°C'de optimum ürer (Madigan ve Martinko, 2010; Linjordet, 2016). Çalışılan suşlardan yalnızca *A. kunkeei*'ye ait 4 suş (L14/2A, L72/3B, L164/2B ve LS84/1A) geniş sıcaklık aralığında rahat üreyebilen suşlar olarak saptanmıştır (Tablo 8). Ayrıca *A. kunkeei* L121/2C, ES107/1A ve E85/2A suşları düşük sıcaklıkta üreme gösteremediği halde diğer suşlardan farklı olarak yüksek sıcaklıkta pozitif üreme sergilemişlerdir. Bu durum geniş sıcaklık aralığında üreme davranışının suşlar arası farklılık gösterdiğine ve dolayısıyla çalışılan suşların farklı biyotipik özellikler içerdiklerini göstermektedir. L142/2B (*L. mesenteroides*) suşu sıcaklık değişimlerine hassasiyet sergilemiş, E163/2A suşu ise (*E. faecium*) zayıf üreme sergilemiştir (Tablo 8). Yapılan bütün morfolojik ve biyokimyasal analizler suşların çeşitli özelliklerinin belirlenmesinde önem arz etmekte olup tür tanılarına ve biyokimyasal özelliklerinin bilinmesine destek olmaktadır.

Şeker fermentasyon testlerinin LAB tanısında önemli olduğu çeşitli çalışmalarla belirtilmektedir. (Zhang ve Chai 2014; Wedajo 2015; Linjordet 2016). Çalışmamızda bu amaçla yapılan karbonhidrat fermentasyon testlerinin sonucunda, bulguların literatürle uyumlu olduğu, dolayısıyla LAB türlerinin ön tanısında kullanılabilir olduğu saptanmıştır. Arılar yalnızca karbonhidrat sağlayan nektarla, aminoasit, lipit ve vitamin sağlayan ve yeni ortaya çıkan (doğan) bal arılarında gelişim için elzem olan polenle beslenirler (Brodschneider ve Crailsheim, 2010). Karbonhidratların, arıların hayatta kalması üzerindeki etkisi iyi çalışılmış bir alandır ve arıların sakkaroz, glukoz veya fruktoz içeren şuruplarda daha verimli ve uzun süre yaşadığı kanıtlanmıştır (Haydak, 1970).

Arı besinlerinden nektar, su, polen ve değişen oranlarda monosakkaritler; glukoz, fruktoz ile disakkarit; sükrozdan oluşur (Taylor vd., 2019). Polen sitoplazmasında polisakkaritlerden oluşan intin tabakası selüloz, hemiselüloz ve

pektin içerir. Polen hücre duvarları esas olarak pektinin ana bileşenleri olan tip I rhamnogalakturonan (RG-I) ve homogalakturonan içerir. Ayrıca polenler arabinogalaktan, mannoz, ksiloz, galaktoz, mannitol ve arabinoz dahil birçok monosakkaritleri yapısında bulundurabilir (Kochansky vd., 2001; Li vd., 2017). Bal arıları için bazı belirli karbonhidratlar toksik olarak belirtilmektedir, çünkü bu böcekler uygun sindirim enzimlerinden yoksundurlar (Barker ve Lehner, 1974; Johnson, 2015). Ana besinler olan glukoz ve fruktoz gibi basit şekerler, arının orta bağırsağında emilir ve bu potansiyel enerji kaynakları, mikrobiyal enzimatik aktivite yoluyla fermente edilebilir (Crailsheim, 1988; Roulston ve Cane, 2000). Karmaşık polisakkaritlerin parçalanmasına eşzamanlı olarak katılma ve toksik şekerleri metabolize etme yetenekleri göz önüne alındığında, laktik asit bakterilerinin bal arılarında beslenme toleransını geliştirmede ve aynı zamanda konakçılarının sağlığını korumadaki rolü dikkate değer görünmektedir (Lee vd., 2015; Zheng vd., 2016; Ricigliano vd., 2017). Sonuç olarak, bağırsak bakterileri için bal arısı beslenme rutininde mevcut olan ana enerji ve karbon kaynaklarının kullanımı arı ile simbiyotik ilişki içerisinde yaşabilmesi için oldukça önemlidir. Bu bağlamda test edilen izolatların en iyi glukoz, fruktoz, sükroz ve mannitol olmak üzere birçok karbonhidratı etkin şekilde kullanabilmesi bu bakterilerin bal arısı mikroflorasına uygun olduğunun göstergesidir (Tablo 9).

Probiyotik bakterilerde, özellikle insanda kullanıma önerilmek için, istenen özelliklerden biri vücutta laktoz kullanımını arttırmasıdır. Bakterilerin ortamda bulunan laktoz sindirimini artırması ve laktoz fermantasyonu sonucu oluşan metabolitlerin gastrointestinal sistemde antimikrobiyal etki göstermesi sağlık üzerine pozitif etki yaratmaktadır (Çelikel vd., 2018). Çalışmamızda *A. kunkeei* harici türler laktozu karbon kaynağı olarak kullanamamıştır. *A. kunkeei* L72/3B, L86/3B, L121/2C, L164/2B, E87/3B ve LS84/1A ortamda bulunan laktozu zayıf şekilde fermente edebilmiştir.

Pek çok çalışmada laktik asit bakterilerinin insan sağlığı üzerinde olumlu etkiler oluşturduğu, bağırsak mikroflorasını dengelediği, çeşitli hastalıklara karşı tedavi edici, biyoterapötik, probiyotik veya koruyucu ajan olarak kullanılabilecekleri, yeni potansiyel suşlar olarak farklı kaynaklardan araştırılabilecekleri ifade edilmiştir (Savadogo vd., 2007; Klayraung ve Okonogi, 2009; Syal ve Vohra, 2013; Pisano vd.,

2014; Quinto vd., 2014; Yangılar, 2015; Azat vd., 2016; Uğraş, 2017; Ahmad vd., 2018; George vd., 2018; Tarrah vd., 2018, Wang vd., 2018; Maldonado Galdeano vd., 2019; Aziz vd., 2021; Soni vd., 2021). Bu noktada çalışmamızda tanımlanan laktik asit bakterilerinin insan tüketimi sonucunda sergileyebileceği probiyotik nitelikler araştırılmıştır. Bir bal arısının sahip olduğu mikrobiyal kolonizasyon, floral orijinlidir ve bal, propolis, arı ekmeği, kovan materyallari gibi arının temas ettiği birçok bileşende bu mikroorganizmalara rastlanmaktadır (Endo ve Salminen, 2013; Powell vd., 2014; Kwong ve Moran, 2016). Dolayısıyla insanların dolaylı (çevresel etmenlerle) veya doğrudan (bal ve diğer arı ürünlerini tüketmesi sonucu) bu bakterilere maruz kalma olasılığı vardır.

Probiyotik bir suşun başarılı olması ve güvenli statüde (GRAS) nitelendirilebilmesi için belirli özelliklere sahip olması gerekir (Fijan, 2014). Yararlı bir probiyotiğin geleneksel olarak şu kriterleri karşılaması beklenir: Konak üzerinde kanıtlanmış faydalı bir etkiye sahip olmak, patojenik etki, toksik etki ve diğer önemli olumsuz yan etkiler taşımamak, gastrointestinal sistem koşullarında hayatta kalabilmek (*in vitro* ve *in vivo*), sağlığa fayda sağlamak için kullanılacağı üründe yeterli sayıda hücre canlılığı sergileyebilmek (Fontana vd., 2013). Bu bağlamda öncelikli olarak çalışılan LAB suşların bakteriyofaj enfeksiyonu taşıma, hemoliz aktivitesi sergileme ve antibiyotiklere direnç gösterme gibi bazı güvenlik özellikleri araştırılmıştır.

Probiyotik tedavi sırasında veya süt fermantasyon süreçlerinde faj enfeksiyonunun olumsuz etkilerini azaltmak için bakteriyofaj enfeksiyonlarına karşı doğal bağışıklığa sahip probiyotik kültürlerin seçimi oldukça önemlidir (Ventura vd., 2010). Çalışmamızda ilk etapta laktik asit bakterisi olarak morfolojik özellikler ve Gram boyama sonuçlarına göre analiz edilen 47 izolat üzerinde bakteriyofaj taraması yapılmıştır. Bölüm 2.2.3'de yapılan deneyin sonucunda faj içermediği belirlenen 16 LAB izolatı ile çalışmalara devam edilmiştir. Bakteriyofajların litik özelliklerini belirlemek için damlatma ve petri yüzeyine kaplama testi kullanılmaktadır (Montso vd., 2019). Çalışmamızda da seçilen suşlar Mitomisin-C ile indüklenip çapraz enfeksiyon şeklinde damlatma yöntemiyle test edildi. Bu metod her bir fajın konak aralığının belirlenmesine ve fajlar arasındaki litik yetenek modellerinin karşılaştırılmasına izin vermektedir. Bu sayede elde edilen faj plakları ve genişleyen

açılmalar kullanılan bakteriyel lizatlarda bakteriyofaj enfeksiyonu olduğunu göstermektedir (Şekil 13). Bakteriyofaj taramasında çapraz enfeksiyon sonucunda suşlarımızın hem faj içermedikleri hem de konak olmadıkları (bağışık oldukları) tespit edilmiştir.

Çalışmamızda tanımlanan tüm suşlar %5 insan kanlı BHI agar besiyerinde gama hemoliz göstermiştir (Tablo 8, Şekil 10). Hemoliz aktivitesinin ölçülmesi, kan dolaşımına giren bir biyomateryalin güvenliğini belirlemede temel testlerden biri olarak kabul edilir. Önemli ölçüde hemoliz meydana gelirse, tehlikeli patolojik durumlara yol açabilir (Upadhyay vd., 2015). Yararlı yeni probiyotik mikroorganizmalar geliştirmek veya seçmek için öncelikle hemolitik aktivitesinin olmadığı değerlendirilmelidir. Özellikle enterokoklar için virülansın en önemli göstergesi hemolitik aktivitedir (Elzeini vd., 2021). Hemolitik aktivite sonucu gama hemoliz gösteren suşların patojenite göstermediği ve tüketim için güvenli olduğu belirtilmektedir (Yadav vd., 2016).

Günümüzde insanlardaki çeşitli bakteriyel hastalıklara karşı kullanılan antibiyotikler hayvancılık, insan, tarım ve su ürünleri yetiştiriciliğinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak özellikle antibiyotik direnci ve aktarılabilir direnç gelişimi probleminden dolayı bu durum iki ucu keskin bir kılıç olarak kabul edilebilir (Tenover ve Hughes, 1996). Örneğin, enterokoklara karşı sefalosporinler, aminoglikozitler, klindamisin ve trimethoprim *in vitro'*da etkili görülür ancak *in vivo'*da etkili değildir, çünkü enterekoklar intrinsik (doğal) direnç (bir mikroorganizmanın kalıtsal özellikte olmayan ve yapısı nedeniyle olan dirençli gen tipi) içermektedirler. Ayrıca penisiline hassas olan enterokokların ampisilin, amoksisilin vb. antibiyotiklere duyarlı oldukları da belirtilmektedir (CLSI, 2013). Probiyotik olarak önerilmek istenen bakterilerde aranan özelliklerden birisi antibiyotiklere karşı doğal dirençli (intrinsik) olmalarıdır. Diyare gibi antibiyotik kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilen hastalıklarda bağırsak florasını düzenlemek amacı ile probiyotikler kullanılmaktadır. Dolayısı ile uygulanacak probiyotik bakterilerin bağırsağa nüfuz eden antibiyotiklerden etkilenmemeleri beklenmektedir (Tarrah, 2018).

Bir sağlık tehdidi olarak, antibiyotik direnç genleri, probiyotikler tarafından bağırsaktaki bakterilere aktarılabilir. Bu nedenle probiyotiklerde antibiyotik direncin

tespiti, *in vitro* güvenlik testlerinin önemli bir parçası olarak kabul edilmektedir (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi EFSA, 2008; Wang, 2018). Toomey vd. (2009) bazı *Lactobacillus* suşlarında bulunan *tet* geninin diğer bakterilere aktarılabileceğini bildirmiştir. Direnç genlerinin saptanmasında *van* geni oldukça önemlidir çünkü vankomisin, antibiyotiklere dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan son antibiyotiktir (Woodford vd., 1995). Çalışmamızda test edilen bütün suşlarda vankomisin direnci gözlenmiştir. Bu suşlarda aktarılabilir gen olup olmadığı araştırılmalıdır (Tablo 17). Laktobasillerin basitrasin, kanamisin, gentamisin, streptomisin, teikoplanin, trimetoprim/sülfametoksazol ve vankomisine karşı yüksek doğal dirençli olduğu, penisilin ve ampisilin gibi pek çok β-laktama karşı ise duyarlı oldukları belirtilmiştir (Demir vd., 2018).

Antibiyotik direnci ile ilgili olarak, bazı *Lactobacillus* türlerinin penisilin gibi β-laktam antibiyotiklere karşı daha az dirence sahip olduğu bildirilmiştir. Begum vd. (2014) potansiyel sideroforojenik özellikli bir probiyotik bakteri olarak baldan izole ettikleri *Gluconobacter oxydans*'ın penisilin ve rifampisine dirençli iken gentamisin, tetrasiklin, kanamisin ve eritromisine duyarlı olduklarını ortaya koymuştur.. Ampisilin ve penisilin, bakteri hücre duvarının temel yapısı ve bakteri canlılığı için gerekli kritik bir bileşen olan peptidoglikan sentezini inhibe eden enterokoklara karşı en aktif β-laktamlardır (Begum vd., 2014). Çalışmamızda sadece iki adet *A. kunkeei* izolatlarında ampisilin direnci gözlenmiştir. Bu suşlarda da aktarılabilir gen olup olmadığının araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Gram pozitif bakterilerin tedavisinde sık kullanılan antibiyotik olan tetrasikline karşı aktarılabilir direncin varlığı potansiyel probiyotik bir suş için önemli bir eleme kriteridir. Enterokoklarda iki ana grup Tcr (*tet*) geni tanımlanmıştır (Chopra ve Roberts, 2001). Birinci grup ribozomal koruma ile direnç sağlar ve *Enterococcus* spp.'de saptanan *tet*(M), *tet*(O) ve *tet*(S) genlerini içerir. İkinci bir grup, hücrelerden enerjiye bağlı tetrasiklin çıkışına aracılık eder ve enterokoklarda *tet*(K) ve *tet*(L) genleri ile temsil edilir. Altıncı bir gen olan *tet*(U), bilinmeyen bir mekanizma yoluyla *E. faecium*'da düşük seviyeli direnci kodlar (Ridenhour vd., 1996). Çalışmamızda probiyotik olma potansiyeli yüksek olan enterokok suşumuzun, E163/2A, tetrasiklin direnci içermemiş olması önemli bulunmuştur. Buna karşın

tetrasiklin direnci gözlenen diğer 9 izolatın muhtemel probiyotik kullanımlarından önce aktarılabilir tetrasiklin direnç genleri varlığı araştırılmalıdır (Tablo 17).

Çalışılan LAB suşlarının, insan midesinin asidik koşullarına direnç göstererek bağırsağa ulaşabilmeleri ve ince bağırsakta maruz kalacakları pH değişikliği, safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarında canlılıklarını sürdürebilmeleri baz alınan bir diğer probiyotik seçilim kriterleridir (Chung vd., 1999, Çomak Göçer vd., 2016). Boş mide pH'sı 1.5-2.0 iken tüketilen besin türüne ve miktarına bağlı olarak yaklaşık 2 saatlik sindirim süresince mide pH'sı 3.0'e yükselir. Besinlerin sindirimi ince bağırsakta (pH 6.6 ±0.5) 5-6 saat ve kalın bağırsakta (pH 7.0 ±0.7) 12-24 saat kadar devam etmektedir. Başka bir deyişle, gastrointestinal sistemdeki sindirim işlemi sırasında ortam pH'sı 1.5 ile 8.0 arasında değişir (Elçioğlu ve Kunduhoğlu, 2014). Çalışmada gastrointestinal sistemi simüle etmek için pH 3.0 ve pH 7.8 besiyeri ortamları baz alınmıştır. pH 3.0 ve pH 7.8 ortamına maruz bırakılan suşların geneli kayda değer bir üreme aktivitesi sergilemiştir (Tablo 14, Şekil 20). Suşların %75'i pH:3.0'de %69'u pH:7.8'de canlılığını sürdürmüştür. Canlı kalabilen bu suşların %83'ü iyi üreme, %17'si ise zayıf üreme sergilemiştir. LAB asidik duruma maruz kaldığında, H+/-ATPase'nin etkisiyle hücre dışına H+ pompalayarak hücre içi pH homeostazını sağlamaktadır (Matsumoto vd., 2004). Bu mekanizma izole edilen LAB'nin asit toleransının nedenini açıklamaktadır.

Safra tuzlarına toleransın belirlenmesi amacıyla yapılan analizde hem 4 s süresince %0.3'lük safra muamelesi sonrası canlılığı hem de 20 s süresince %0.3'lük safra varlığında üreme aktivitesi test edilen suşların %94'ü hücre canlılığını kontrol grubuna göre %50 verimle koruyabilmiş, safra varlığında gelişim gösterebilmiştir. Safra muamelesi haricinde safra ortamına inoküle edilen ve gelişimi bu ortamda 20 saat boyunca izlenen suşların maksimum 4 saat süresince canlılığını koruyabildiği saptanmıştır (Şekil 21-22). Bu sonuçlar neticesinde, laboratuvar ortamında simüle edilen basit sindirim sistemi koşullarına maruz bırakılan suşlar arasında üç koşulda da en iyi L14/2A, LS84/1A, L4/3A, L121/2C, E85/2A, ES107/1A, L86/3B ve L164/2B, *F. fructosus* E164/3D ve *E. faecium* E163/2A sergilemiştir. L86/3B, L164/2B ve E163/2A suşları, pH değişimine çok iyi tolerans göstermesine rağmen safra muamelesi sonrası petride üreme gösteremeyen izolatlardı. İzolatın Bioscreen C cihazında safra ortamında gelişimi izlenildiğinde ise ilk 4 saat aktif üreme sergilediği

saptanmıştı. Bu durumun safra muamelesi sonra petriye inokülasyon aşamasında yapılan pipetasyon hatasından kaynaklanabilceği ve bu yüzden üremediği oldukları, aslında safraya dirençli olduklarını ya da sıvı ortamda dirençli olduklarını düşündürmüştür. Bu amaçla ilave testler organize edilebilir. *L. mesenteroides* L142/2B suşu safra tuzlarına direnç gösterirken, asidik ve alkali pH'ya karşı hassasiyet göstermiştir.

Suşların safra tuzuna dirençli olması, potansiyel bir probiyotiğin önemli bir özelliğidir. Çünkü ince bağırsak ve kolon, hücreler için toksik olan yüksek konsantrasyonlarda safra tuzuna sahiptir (Suwannaphan, 2021). Bir probiyotik tüketildiğinde, gastrointestinal yol boyunca ilerleyecek ve yüksek mide asiditesi gibi engellerle karşılaşacaktır (Mohammad vd., 2021). Mide asiditesi açlık sırasında pH 1'e kadar düşebilmesine ve gıda alımından sonra pH 4.5'e kadar yükselebilmesine rağmen (Guo vd., 2009), iyi bir probiyotik en azından ortalama pH 3.0'e dayanmalıdır (Liong ve Shah, 2005). Bulgularımız 10 izolatın insan gastrointestinal sisteminde hayatta kalma potansiyeline sahip olduğunu ve mide ile ince ve kalın bağırsaklardan geçişte hayatta kalabileceğini göstermiştir (Şekil 20-21-22).

Sayısız çalışma probiyotik olarak kullanılmak istenen veya halihazırda probiyotik olarak kullanılan bakterilerin sindirim sistemi koşullarına yüksek tolerans gösterdiğini benzer bulgularla bildirmiştir. Örneğin, Ebrahimi vd. (2021) probiyotik referans olarak kullandığı *L. rhamnosus* suşuna karşı baldan izole ettikleri *A. kunkeei* suşunun pH 2.0 ve %0.3 safra ortamında 1.5 saat sonunda %74 canlılık sergilediğini belirtmiştir. Fermente yiyeceklerden izole edilen *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının sindirim sistemi toleranslarının oldukça yüksek olduğu bilinmektedir (Wang vd., 2018; Lazzeri vd., 2020).

Mohammad vd. (2020) arı ekmeğinden izole ettiği *Lactobacillus* spp., *F. fructosus, L. mesenteroides, Enterococcus faecalis* ve *Bacillus* sp. bakterilerinin *Bacillus* sp. hariç hemolitik aktivite göstermediklerini, 3 s süresince pH 3.0 ve 4 s süresince %0.3 safra, pepsin ve pankreatin ortamına muamele sonucunda *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* sp. ve *L. mesenteroides* suşlarının en yüksek canlılık oranını gösterdiğini (%91-99), bizim sonuçlarımıza benzer şekilde çoğu izolatın hayatta kalma oranının ekstrem sindirim şartlarından önemli ölçüde

etkilenmediğini belirtmiştir. Bununla birlikte, çalışmada *F. fructosus* U47 suşunun hayatta kalma oranının %0.3 safrada önemli ölçüde etkilendiği bulunmuştur.

Günümüzde her ne kadar probiyotik olarak kullanılan başlıca LAB suşları *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* olsa da *Enterococcus* cinsini probiyotik olarak kullanmak için birçok çalışma yapılmıştır. *E. faecium* henüz genel olarak güvenli tür statüsünü kazanmamış olsa da, antibiyotiklerin neden olduğu ishal gibi insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde ve önlenmesinde ve irritabl bağırsak sendromu semptomlarının giderilmesinde kullanılabilmektedir (Araújo ve Ferreira, 2013). Sim vd. (2018) çalıştıkları *E. faecium* suşunun %0.3 pepsin içeren gastrik ortama ve %0.5 safra içeren örnek ince bağırsak ortamına tolerans gösterdiğini, *Salmonella typhimurium*'a karşı koruma mekanizması oluşturduğunu ve iyi bir probiyotik ajan olarak ek gıdada kullanılabileceğini belirtmiştir.

Elzeini vd. (2021) *Apis mellifera* bağırsak mikrobiyotasından izole ederek tanımladığı *Enterococcus faecalis, Lactobacillus brevis, L. casei* suşlarının hemolitik aktivite sergilemediklerini ve gastrointestinal sistem koşulları (düşük pH ve safra tuzu) altında yüksek hayatta kalma oranı (>%95) gösterdiklerini dolayısıyla bu suşların probiyotik olarak uygulama için iyi bir potansiyele sahip olduklarını belirtmiştir. Çalışmanın, çalışmamızdaki sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Laktik asit bakterilerinin safranın zararlı etkilerini, safra tuzlarını hidrolize ederek veya safra direncine aracılık etmek için hücre zarının ve hücre duvarının bileşimini değiştirerek önlemektedir. Safra tuzu hidrolazlarının (BSH) aktivitesi, safra tuzu dekonjugasyonu yoluyla koruma sağlamaktadır (Ruiz vd., 2013). BSH'ler, kologlisin hidrolaz enzim ailesine aittir ve safra içeren ortamlara bir adaptasyon olarak evrimleştikleri öne sürülmektedir (Begley vd., 2005; Jones vd., 2008). Özellikle laktobasiller ve bifidobakteriler, genomlarında BSH genlerinin çeşitli fonksiyonel kopyalarını barındırabilir ve bunların tümü safra tuzu dekonjugasyonuna katılır (Ren vd., 2011). Safra tuzu hidrolazının *Lactobacillus* türlerinde indüklenebilir bir aktivite olduğu, örneğin; *L. plantarum*'da *bsh* gen ekspresyonunun %2'lik safra muamelesinden sonra altı kat arttığı belirtilmektedir (Duary vd., 2012). Bu bağlamda çalışmamızda kullanılan safraya dirençli bakterilerde safra tuzu hidrolaz enziminin varlığı ve *bsh* gen ekspresyonu ileri araştırmalara dahil edilebilir.

Otoagregasyon, aynı suşların bir araya gelerek küme oluşturması özelliğidir. Laktik asit bakterilerinin otoagregasyon yeteneğine sahip olması, intestinal sistem epitel hücrelerine yapışması (adhezyon) ve bir bariyer oluşturması açısından önemlidir (Del Re vd., 2000; Kos vd., 2003; Collado vd., 2008). Probiyotik mikroorganizmaların otoagregasyon özelliği bağırsaklarda konak savunma mekanizmalarının iyileştirilmesine yardımcı olur. Potansiyel bir probiyotik suşun %40'ın üzerinde artış gösteren otoagregasyon özelliği sergilmesi beklenir (Suwannaphan, 2021). Sonuçlarımız, en yüksek otoagregasyon değerlerinin *A. kunkeei* L4/3A, L14/2A, E85/2A ve ES107/1A, *F. fructosus* E164/3D ve *L. mesenteroides* L142/2B suşlarına ait olduğunu gösterdi (Tablo 15). Juarez Tomas vd. (2005) yaptıkları çalışmada sıcaklık artışının, büyüme ortamı ve ortam pH'sı değişiminin agregasyon özelliğini etkileyebileceğini göstermiştir. Sonuçlar, suşların otoagregasyon özelliğine sahip olduğunu ve kümelenme aktivitesi gösterebileceklerini kanıtlar niteliktedir.

Patojen bakterilerin bağırsaklara erişimi ve kolonizasyonu, kan dolaşımına girişine ve bakteriyemi, peritonit, endokardit gibi enfeksiyonlara neden olmaktadır (Vergalito vd., 2020). Bu nedenle kolonizasyonlarının önlenmesi çok önemlidir. Probiyotik suşların patojenlerle bir araya gelme, rekabet ederek patojenleri elimine etme ve bulundukları ortamda baskın şekilde kolonize olma yetenekleri koagregasyon olarak bilinmektedir. Disbiyosize uğrayan bağırsak mikrobiyotasının tedavisi için koagregasyon oldukça önemlidir (Rinkinen, 2003; Collado vd., 2008; Bilginer ve Çetin, 2019). Özellikle patojenlerle koagrege olabilme özelliğine sahip mikroorganizmalar, bağırsak ortamından daha kolay uzaklaştırılan non-koagregatif mikroorganizmalara göre önemli bir avantaja sahiptir (Nikolic vd., 2010; Zhang vd., 2013). Çalışmamızda suşların çoğu belirli kombinasyonlara bağlı olarak patojenlere karşı umut verici agregasyon yetenekleri gösterdi. 4 saat süresince *E. coli* ile en yüksek koagregasyon yüzdesini *E. faecium* ve *A. kunkeei* göstermiştir. *L. monocytogenes* ile en yüksek koagregasyon yüzdesini *A. kunkeei* ile ilişkili üç suş sergilemiştir. *P. larvae*'yla en yüksek koagregasyon aktivitesini ise *A. kunkeei* suşları ve *F. fructosus* ile ilişkili bir suş göstermiştir (Tablo 16). Agregasyon yüzdelerinin inkübasyon süresinin uzamasıyla (20-24 s) artacağı bilinmektedir (Juarez Tomas vd., 2005; Collado vd., 2008; Zhang vd., 2013; Kang vd., 2018; Pachla vd., 2021).

Pachla vd. (2021) bakteriyel endosimbiyont olarak nitelendirdiği bal arısı bağırsağından izole ettikleri laktik asit bakterilerinin (*A. kunkeei* ve *F. fructosus*) agregasyon yeteneğinin zamanla arttığını, özellikle PBS'de oda sıcaklığında (18-20°C) 24 saatlik bakteri inkübasyonunda en yüksek değerlerin *L. kunkeii* suşları için %24.3 ile %37.8 arasında değiştiğini, *F. fructosus* için %42.2 ve %46.5 olarak alındığını belirtmişlerdir. Fruktofilik laktik asit bakterilerinin 24 saatlik inkübasyonundan sonra en iyi koagregasyon verimini *E. coli* ve *P. larvae* suşlarıyla sergilediği tespit edilmiştir. Çalışma bulgularının bizim çalışmamız ile paralellik gösterdiği görülmektedir.

Probiyotikler sadece bağırsak mikroflorasının dengesini iyileştirmekle kalmayıp aynı zamanda birçok patojeni de engelleyen canlı mikroorganizmalardır (Gıda Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü FAO, 2011). Laktik asit bakterilerinin otoagregasyon-koagregasyon yetenekleri ile birlikte antimikrobiyal aktiviteleri de kolonize oldukları ortamda patojenlerin uzaklaştırılmasında arzu edilen bir probiyotik özelliktir (Pachla vd., 2021). Bir uygulamada tercih edilen probiyotik bakteriler yüksek antibakteriyel aktivite göstererek geniş bir bakteri spektrumunu inhibe edebilmelidir (Fijan, 2014). Bu bağlamda çalışmada test edilen LAB izolatlarının insan-gıda patojeni birçok bakteriye karşı ve bal arısı sağlığı için büyük tehdit oluşturan virülans bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği Bölüm 2.2.6'da belirtildiği şekilde çeşitli metodlarla test edilmiştir. LAB'nin antibakteriyel aktivitesi sentezlediği bakteriyosin, diasetil ve hidrojen peroksit gibi çeşitli metabolitlere ve laktik asit gibi organik asitlere dayandırılmaktadır (O'Bryan vd., 2014). Çok sayıda çalışma LAB'nin özellikle gıda kaynaklı ve enterik patojenlere karşı antimikrobiyal etkinlik sergilediğini bildirmiştir (Haghshenas vd., 2017; Ebrahimi vd., 2020; Lashani vd., 2020; Mohammad vd., 2020; Vergalito vd., 2020; Suwannaphan vd. 2021). Çalışmamızda da agar plug metoduna göre test edilmiş tüm izolatların aktif kültürleri, ES107/1A hariç, özellikle *E. coli, S. enteritis, L. monocytogenes, K. pneumoniae* ve *Y. pseudotuberculosis* üzerine etkili bulunmuştur (Tablo 12). Agar plug difüzyon yöntemi mikroorganizmalar arasındaki antagonizmi belirlemek için sıklıkla kullanılır ve prosedür disk difüzyon yöntemine benzerdir (Jiménez-Esquilín ve Roane, 2005; Elleuch vd., 2010). Bulunduğu petriden kesilip çıkarılan agar plug üzerindeki bakterilerin üremesi devam ederken salgıladıkları maddeler

yerleştirildikleri yeni petride agar yüzeyine yayılır ve bu moleküllerin antimikrobiyal aktivitesi, agar plug etrafındaki inhibisyon bölgesinin görünümü ile tespit edilir (Balouiri vd., 2016). Bu sayede araştırılan bakterilerin, *A. kunkeei*, *F. fructosus*, *E. faecium* ve *L. mesenteroides*, kolonize oldukları ortamda inhibitör aktivite sergiledikleri, test edilen göstergelere karşı etkili oldukları bulunmuştur (Şekil 17).

Bazı çalışmalar konakçı hücrelerle etkileşime giren probiyotik hücre bileşenlerinin (parabiyotik) veya metabolitlerinin ve yan ürünlerinin (postbiyotik) probiyotik etkileri arttırabildiğini öne sürmektedir (Cicenia vd., 2014; Liu vd., 2017; Aguilar-Toalá vd., 2018; De Marco vd., 2018). Postbiyotikler, konakçıya fizyolojik yararları olan probiyotikler tarafından salgılanan çözünür ürünler veya metabolitler olarak tanımlanır (Aguilar-Toalá vd., 2018). Bu nedenle canlı probiyotik bakteri uygulamasının yanında türetilen postbiyotiklerin uygulamaları da oldukça fazla ilgi görmektedir. Çalışmamızda postbiyotik etkinliği gözlemlemek için hazırlanan filtre sterilizasyonundan geçirilmiş 72 saatlik hücresiz süpernatantların (CFS) hem insan patojeni hem de arı patojeni bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi değerlendirilmiştir (Tablo 13). Suşlarımızın *E. coli*, *S. enteritis*, *L. monocytogenes*, *M. smegmatis* gibi patojenler üzerinde iyi etkinlik göstermesi önemli bulunmuştur, çünkü özellikle diyare, gastroenterit, intestinal tüberküloz, Crohn's sendromu, ülseratif kolit, irritabl bağırsak sendromu gibi hastalıkların tedavisinde probiyotik uygulamalar son yıllarda önem kazanmıştır (Shanahan, 2004).

Bulgularımız, Ebrahimi vd. (2020) tarafından çalışılan *L. kunkeei* ve *E. faecium*'a ait CFS'lerin *E. coli*, *S. enterica*, *B. cereus* ve *S. aureus*'a karşı, Lashani vd. (2020) tarafından çalışılan *L. kunkeei ve F. fructosus* CFS'lerinin *L. monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, enteropatojenik *E. coli*, *E. coli* O157 H7 ve *B. cereus*'a karşı, ve Daisley vd. (2020)'nin çalıştıkları *L. plantarum*, *L. rhamnosus* ve *L. kunkeei* CFS'lerinin *P. larvae*'ya karşı sergilediği pozitif sonuçları desteklemektedir. CFS'ler, esas olarak temel immünomodülatör etkileri olan ve patojenlere karşı antagonize edici özelliklere sahip bakteriyel bileşenleri içerdikleri için faydalı etkiler sağlamaktadır (Vergalito vd., 2020).

Çalışmamızda *L. mesenteroides* L142/2B'nin canlı hücre uygulamasında (agar plug) gözlenen yüksek inhibisyon etkinliğine rağmen CFS deneyinde oldukça düşük spektrumlu inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır (Tablo 12, Tablo 13). Bu

bulgu, Mohammad vd. (2020) tarafından yakın zamanda yayınlanan bir araştırmada bildirilenlerden farklıdır. Söz konusu çalışmada değerlendirilen *L. mesenteroides* suşunun 24 saatlik CFS'si test edilen etkenlerin tümüne karşı (*S. typhi, E. coli, K. pneumonia, B. cereus, P. aeruginosa, S. aureus*) önemli derecede inhibisyon etki göstermiştir (Mohammad vd., 2020). Bakteriyosin, organik asitler gibi ürettiği sekonder metabolitlerin yanında, *L. mesenteroides*'te bulunan peptidoglikan hidrolaz enzimi yüksek antibakteriyel etkiye sahiptir (Giles-Gomez vd., 2016). Kullandığımız 72 saatlik CFS'te metabolitlerin etkisinin çeşitli nedenlerle yitirilebileceği ve bu nedenle 24 saatlik CFS'in *L. mesenteroides* metabolitleri için daha uygun olabileceği, veya *L. mesenteroides*'in sergilediği antimikrobiyal etkinliğin bakteriyel metabolitleri veya yan ürünleri sayesinde değil hücre bileşenlerinden kaynaklanabileceği gözlenmiştir. Ayrıca bu nedenlere ilaveten hücre bileşensiz uygulama yerine direkt canlı hücreler veya parabiyotik uygulamayla daha verimli inhibisyon etkisi gösterebileceği düşünülmektedir. Antibakteriyel etkinliklerdeki farklılıklar, aynı türler arasında farklı antimikrobiyal metabolitlerin salgılanmasıyla açıklanabilir (Ołdak vd., 2017).

Myllyluoma vd. (2007) yaptıkları çalışmada, mide ülserlerinde laktik asit bakterilerinin faydalı etkilerini bildirmişlerdir. LAB'ler anti-ülseratif tedavi kombinasyonunda kullanılırsa, sonuçlarda şaşırtıcı derecede hızlı iyileşme ve tedavi etkinliğinde artış gözlenmektedir (Myllyluoma vd., 2007). Çalışmamızda *A. kunkeei* L4/3A, L14/2A, L164/2B, E87/3B, ve *E. faecium* E163/2A'ya ait CFS'ler *Helicobacter pylori*'ye karşı etkili bulunmuştur.

Bazı çalışmalar bal arısına özgü *Lactobacillus* ve diğer LAB türlerinin, bal arısının doğuştan gelen bağışıklığını artırma ve gerek *in vitro* gerek kovan koşullarında *P. larvae*'ya karşı doğrudan bir inhibisyon etkisi sergileme potansiyelini vurgulamıştır (Lamei vd., 2020; Daisley vd., 2020). Ayrıca Lazzeri vd. (2020) gıda kaynaklı birçok laktik asit bakterisinden, *Lactobacillus plantarum, L. brevis* ve *L. paracasei,* türettikleri CFS'lerin *P. larvae*'ya karşı antibakteriyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda seçilen LAB-CFS'lerin kullanıldığı deneyde *P. larvae* ve *P. alvei*'ye karşı kayda değer seviyelerde inhibisyon saptanmış ve bal arısından izole edilen LAB'ler ile yürütülen benzer gözlemleri doğrulamıştır (Lamei vd., 2020). Rangberg vd. (2015), *A. mellifera*'da uygulanan *A. kunkeei*'nin, arılar için

patojen çeşitli bakterilere karşı antagonistik etki gösterebileceğini göstermiştir. Bulgularımız hem aktif LAB kültürünün hem CFS'lerinin *P. larvae* vejetatif formu ve spor formu üzerinde güçlü antibakteriyel, bakteriyostatik ve sporisidal etkinliğini kanıtlamıştır (Şekil 16, Tablo 12-13).

Larva gelişimi boyunca edinilen mikrobiyal floranın, hastalık önlemede ve/veya bağışıklığın gelişmesinde rolü olduğu bilinmektedir (Miller vd., 2020). Probiyotiklerin profilaktik ve terapötik potansiyelleri çok sayıda *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışma ile değerlendirilmiştir (Aponte vd., 2020). Çalışmamızda *P. larvae* enfeksiyonu üzerine bulgular, laboratuvarda yetiştirilen *Apis mellifera* larvaları üzerinde profilaktik etki sayesinde hayatta kalma deneyleri gerçekleştirilerek araştırılmıştır (Tablo 6). Uygulamamızda kontrollü koşullar altında LAB takviyesi larvalarda patojen yükünü ve hastalık belirteçlerini önemli ölçüde azaltamamıştır. *P. larvae* sporları ile enfekte edilen larvalarda sağlık yüzdesinin %61'den %16'a düştüğü bulunmuştur. Bu bulguya göre yorumlanan sonuçlarımızda LAB karışımı, sadece *A. kunkeei* ve sadece *L. mesenteroides* uygulanan gruplarda larvalarda sağkalım olumsuz etkilenmezken *E. faecium* uygulanan grupta önemli bir düşüş görülmüştür (Tablo 18). Bunun yanında ilginç şekilde enfeksiyon başlatılan *Enterococcus* ile beslenmiş gruplarda pozitif kontrol enfeksiyon gruplarına göre hastalık bulgusu çok daha az seyretmiştir. LAB solüsyonları, *P. larvae* enfeksiyonunun önlenmesinde istenen düzeyde bir etki gösterememiştir. Bunun nedeninin LAB solüsyonlarıyla beslemenin sadece bir kez yapılmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Kontrol grubu sonuçlarına göre larval canlılığı olumsuz etkilemeyen suşlar devamlı olarak besin maddesine katılarak larvada yaratacağı etkinlik tekrar izlenmelidir.

Bulgularımız, laktik asit bakterilerinin *P. larvae* enfeksiyonu esnasında koloni üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını belirten yakın tarihli bir araştırmayla örtüşmektedir (Stephan vd., 2019). Bu durumun Stephan vd. (2019)'nin uygulama esnasında laktik asit bakterilerini %15'lik sakkaroz solüsyonu içerisine inoküle etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu ortamın laktik asit bakterilerinde şiddetli ozmotik stresi indükleyebileceği bilindiği için larvalara kolonize olan bakterilerin hücre canlılığının büyük oranda azaldığı düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda da özellikle uygulama sonunda larvalarda mikrobiyolojik (kültür ve

boyama yöntemleri) olarak yapılan incelemede benzer şekilde saptanan bakteriyel canlılıktaki düşüşün yüksek antibakteriyel etkiye sahip olan kraliçe arı sütü kullanımından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sonuçları mikrobiyal içeriğin kontrol edilmesi esnasında uygun besiyerine ekilen hem larva hem de arı sütü örneklerinden herhangi bir üremenin gerçekleşmemesi desteklemektedir.

Çalışmada negatif kontrol grubu hariç tüm test gruplarına arı sütü ve taze bakteri kültürü içeren besin karışımı yaklaşık 100 KOB/larva olacak şekilde uygulanarak, toplam 168 saat (7 gün) kültürasyon süresi sonunda değerlendirme yapıldı. Negatif kontrol grubu tüm süre boyunca sadece arı sütü ile beslendi. Negatif kontrol grubunda 3 tekerrür denemenin yüzde sağlık verilerinin ortalaması alındı ve sağlıklı larva yüzdesi %61,67 olduğu belirlendi (Tablo 18). Her tekrar grubundan rastgele seçilen 5 larvanın ortalama ağırlığının hesaplanmasıyla elde edilen verilere göre kontrol grubunun ortalama ağırlık değeri 1.01 g olarak belirlendi. Pozitif kontrol grubunda ise üç denemenin yüzde sağlık ortalaması %16,33, ağırlık ortalaması ise 0.98 olarak bulundu. Deneme planındaki tüm test gruplarından elde edilen veriler aynı yöntemle hesaplanmış ve negatif kontrol ve pozitif kontrol sonuçlarına göre yorumlanmıştır.

Karışım halinde LAB uygulamasında, sadece LAB verilen grubun (U8) yüzde sağlık ortalaması en iyi olduğu, hatta NK grubundan da iyi (%64) olduğu belirlendi. Ayrıca canlı larvalarında sağlıklı oldukları gözlenmiştir. Ancak LAB uygulamasının *P. larvae* sporu ile birlikte enfekte edildiğinde (U7) grubun yüzde sağlık ortalaması çok düştüğü (%15) ve canlı larvaların sağlıklı olanlarının da az olduğu, dolayısıyla *P. larvae* sporlarıyla eş zamanlı enfeksiyonun koruyucu olmadığı şeklinde yorumlandı. Larva ağırlığında da hesaplanan verilere göre 0.99 g'dan 0.95 g'a önemli bir düşüş gözlenmiştir.

Uygulama gruplarından ikinci en iyi olan grup *A. kunkeei* suşları uygulanan grup (U3) olup yüzde sağlık değeri %63 olarak belirlenmiştir. *P. larvae* ile birlikte enfeksiyonda (U6) ise ortalama %27 sağlıklı larva saptanmıştır. Larva ağırlığı ortalama olarak 1.01 g'dan 0.98 g'a düşmüştür. Bu sonuç larva enfeksiyon grubu olan PK grubundan daha iyi olduğu ve kısmen de olsa profilaktif özelliği gösterdiği düşünülmektedir. Deneme gruplarında farklı saat uygulamalarının yapılmış olması muhtemel sonuçları değiştireceği düşünülmekte ve sonraki çalışmalarda mutlak

süretle farklı saat ve farklı sayıda bakteri uygulama çalışmaları yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Kontrol grubu hariç enfeksiyon başlatılmaksızın larval sağlığın iyi olduğu gruplardan biri U2 (sadece *L. mesenteroides* L142/2B ile besleme), larvalarda canlı kalanların ortalama sağlık yüzdesinin %53 olduğu, canlı larva ve sağlıklı larva sayısının eşit olduğu, ancak spor uygulanan gruplarında (U5) ise bu oranın %8 olarak çok düştüğü saptanmıştır. Larval ağırlık ortalaması 0.99 g'dan 0.96 g'a düşmüştür. Bu sonuç ise bakterinin tek başına sağlığı etkilemediği ancak *P. larvae* sporları ile eş zamanlı verildiğinde koruyuculuğunun olmadığı veya uygulanan LAB dozunun yetersiz geldiği şeklinde yorumlanabilir.

E. faecium E163/2A'nın kontrol uygulamasında (U1) larva canlılığında büyük miktarda düşürdüğü gözlenmiştir. Grubun enfeksiyon başlatılmamasına rağmen ortalama sağlıklı larva yüzdesi %36,63 olarak bulunmuştur. Negatif kontrol grubumuzda sağlıklı larva yüzdesi %64'tü, bu durum *E. faecium*'un larvada enfeksiyona ya da dirençlerinin düşüşüne sebep olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın larva canlılığının *E. faecium* + *P. larvae* spor uygulaması (U4) grubunda ise spor kontrole göre canlılık yüzdesi artmış (%28,87) ve kısmen profilaksi sağlamış gözlenmektedir.

Deneme sonunda tüm larvalardan örnek alınarak yapılan mikrobiyolojik incelemenin sonunda laktik asit bakterileri için üreme gözlenemezken *P. larvae* için bakteriyel canlılık az miktarda da olsa (100µL ekim sonucu ortalama 300 KOB) gözlemlenmiştir. Deney sonunda uygulanan *P. larvae* sporlarının geri kazanımı sağlanmış ancak LAB uygulamalarından olumlu sonuç alınamamıştır. Bunun muhtemel nedenleri birden fazla olabilir. En muhtemel nedeni arı sütünün antibakteriyel etkinliği olduğu söylenebilir. Bunun yanısıra uygulamada kullanılan bakteri sayısının azlığı, larvaların 7 gün boyunca arı sütü içinde durmasından dolayı uzun süre antimikrobiyal etkinliğe maruz kalmış olması, larvaların sütten arındırılıp parçalanıp ekim yapılmamış olması vb. nedenler sayılabilir. Bir sonraki denemelerde bu sorunlar dikkate alınması gerekmektedir.

Tüm bu sonuçlar ışığında bal arısı mikroflorasının, probiyotik ve fonksiyonel mikroorganizmalardan oluştuğu kanıtlanmıştır. LAB'nin probiyotik kolonizasyon ve metabolik aktiviteler açısından önemli kriterler olan düşük pH ve safra tuzuna karşı

direncinin suşa bağlı potansiyeller olduğu belirlenmiştir. Hücre otoagregasyon değerinin değişimi ve koagregasyon yeteneğinin, farklı LAB suşları arasında farklılık gösterebilmektedir. Çalışılan suşların uygun probiyotik/koruyucu kültür olarak potansiyelleri umut vadedicidir. Bu sonuçlar, karakterize ettiğimiz suşların biyoterapötik kültürler olarak gelecekteki uygulamalar için umut verici adaylar olarak kabul edilebileceğini ve sağlık yararlarını teşvik eden fonksiyonel gıda ürünlerinin üretimi için yeni potansiyel probiyotikler olabileceğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKÇA

Ackermann, H.W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 154, 245–251. DOI: 10.1016/S0923-2508(03)00067-6

Aguilar-Toalá, J.E., Garcia-Varela, R., Garcia, H.S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B. ve Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: an evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci Technol.*, 75, 105–14. doi: 10.1016/j.tifs.2018.03.009

Ahmad, A., Yap, W.B., Kofli, N.T. ve Ghazali, A.R. (2018). Probiotic potentials of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented durian (Tempoyak), a Malaysian traditional condiment. *Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1002/fsn3.672

Ahn, J.H., Hong, I.P., Bok, J.I., Kim, B.Y., Song, J., ve Weon, H.Y. (2012). Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *Journal of Microbiology*, 50, s., 735–745.

Akman Gunduz, E., ve Douglas, A. (2009). Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1658), 987–991. doi:10.1098/rspb.2008.1476

Al-Ghamdi, A., Ali Khan, K., Javed Ansari, M., Almasaudi, S.B. ve Al-Kahtani, S. (2018). Effect of gut bacterial isolates from *Apis mellifera jemenitica* on *Paenibacillus larvae* infected bee larvae. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 383–387. doi:10.1016/j.sjbs.2017.07.005

Alpay, Ş., 1999. Investigation of Bacteriophages and Bacteriocins in Vaginal *Lactobacilli*. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Bölümü.

Anderson, E.K. ve Sheehan, T., (2011). An Emerging Paradigm of Colony Health: Microbial Balance of the Honey Bee and Hive (*Apis mellifera*). *Insect Soc*, 58, 431.

Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., Walton, A., Jones, M.B., ve Corby-Harris, V. (2013). Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 8(12), e83125. doi:10.1371/journal.pone.0083125

Anjum, I.S., Shah, H.A., Aurongzeb, M., Kori, J., Azim K.M., Ansari, J.M., ve Bin, L. (2017). Characterization of gut bacterial flora of Apis mellifera from north-west Pakistan. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 388–392. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.05.008.

Aponte, M., Murru, N., ve Shoukat, M. (2020). Therapeutic, Prophylactic, and Functional Use of Probiotics: A Current Perspective. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 562048. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562048

Araújo, T.F. ve Ferreira, C.L.D.L.F. (2013). The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56, 457–466.

Arredondo, D., Castelli, L., Porrini, M.P., Garrido, P.M., Eguaras, M.J., Zunino P, ve Antunez, K. (2017). *Lactobacillus kunkeei* strains decreased the infection by honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae*. *Beneficial Microbes*, 9, 279–90.

Arturo, A.M., Oldelson, D.A., Hichey, R.F., ve Tiedje, J.M. (1995). Bacterial community fingerprinting of amplified 16-23S ribosomal DNA gene and restriction endonuclease analysis, in: A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. Bruijn (Eds.), Molecular Microbial Ecology Manual, Kluwer, Alphen aan den Rijn, pp. 1–8.

Audisio, M., ve Benítez-Ahrendts, M. (2011). *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Beneficial Microbes*, 2(1), 29–34. doi:10.3920/bm2010.0024

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi, European Food Safety Authority [EFSA] (2008). Panel on Additives, and Products or Substances used in Animal Feed [FEEDAP]. Technical guidance – Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. EFSA J. 732, 1–15. doi: 10.2903/j.efsa.2008.732

Axelsson, L. ve Ahrné, S. (2000). Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbial Systematics*, s. 367–388. DOI: 10.1007/978-94-011-4020-1_13.

Azat, R., Liu, Y., Li, W., Kayir, A., Lin, D., Zhou, W. ve Zheng, X. (2016). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 17(8), 597–609. doi:10.1631/jzus.b1500250.

Aziz, G., Tariq, M. ve Zaidi, A.H. (2021). Mining indigenous honeybee gut microbiota for *Lactobacillus* with probiotic potential. *Microbiology*, 167(3), 1465–2080. doi: 10.1099/mic.0.001032.

Bacteriophage. (2022, 1 Şubat) https://en.wikipedia.org/wiki/Bacteriophage

Baffoni, L., Gaggìa, F., Alberoni, D., Cabbri, R., Nanetti, A., Biavati, B. ve Di Gioia, D. (2016). Effect of dietary supplementation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in *Apis mellifera* L. against *Nosema ceranae*. *Beneficial Microbes*, 7(1), 45–51. doi:10.3920/bm2015.0085

Balouiri, M., Sadiki, M., ve Ibnsouda, S.K. (2016). Methods for *in vitro* Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *J. Pharm. Anal*., 6, 2, 71–79. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005

Barker, R.J. ve Lehner, Y. (1974). Influence of diet on sugars found by thin-layer chromatography in thoraces of honey bees, *Apis mellifera* L. *J. Exp. Zool*., 188, 157–164.

Begley, M., Gahan, C. G. ve Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev*., 29, 625–651. doi: 10.1016/j.femsre.2004.09.003

Begum, S.B., Roobia R.R., Karthikeyan, M., ve Murugappan, R.M. (2015). Validation of nutraceutical properties of honey and probiotic potential of its innate microflora. *LWT Food Science Technology*, 60:743–750. doi: 10.1016/j.lwt.2014.10.024

Beims, H., Bunk, B., Erler, S., Mohr, I.K., Spröer, C., Pradella, S., Günther, G., Rohde, M., Ohe, von der W., ve Steinert, M. (2020). Discovery of *Paenibacillus larvae* ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(2), 1438-4221. doi: 10.1016/j.ijmm.2020.151394.

Bendel, J.L. (2002). Characterization of the normal flora of honeybee hives in Central Wisconsin. University of Winconsin-La Crosse, Journal of Undergraduate Research, Volume V, *Biology and Microbiology*, 437–441. (URL: https://www.uwlax.edu/urc/juronline/2002/)

Bhargavi, B., Jamil, K., Floor, T., Bhawan, B. ve Road, M.G. (2014). Identification and Characterization of Probiotics from New Sources. *International Journal of Science and Research (IJSR).* 3(6), 837-841. ISSN (Online): 2319-7064

Bilginer, H. ve Çetin, B. (2019). Probiyotikler ve Belirlenmelerinde Kullanılan *in vitro* Testler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(3), 312-325. doi: 10.17097/ataunizfd.549552.

Bir Bal Arısının Yaşam Döngüsünü İzleme (2021, 28 Mart) https://tr.aaa-apm.org/tracking-the-life-cycle-of-a-honey-bee-7025 adresinden 28 Mart 2021 tarihinde alınmıştır.

Blatt, J. ve Roces, F. (2002). The control of the proventriculus in the honeybee (*Apis mellifera carnica* L.) I. A dynamic process influenced by food quality and quantity?. *Journal of Insect Physiology*, 48(6), 643–654. doi: 10.1016/s0022-1910(02)00090-2

Bonilla-Rosso, G. ve Engel, P. (2018). Functional roles and metabolic niches in the honeybee gut microbiota. *Current Opinion in Microbiology*, 43, 69–76. doi: 10.1016/j.mib.2017.12.009.

Britannica (2022) Bacteriophage. https://www.britannica.com/science/bacteriophage adresinden 1 Şubat 2022 tarihinde alınmıştır.

Brodschneider, R. ve Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41, 278–294

Budge, G.E., Adams, I., Thwaites, R., Pietravalle, S., Drew, G.C., Hurst, G.D.D., Tomkies, V., Boonham, N., ve Brown, M. (2016). Identifying bacterial predictors of honey bee health. *Journal of Invertebrate Pathology*, 141, 41–44. doi:10.1016/j.jip.2016.11.003

Carina Audisio, M., Torres, M.J., Sabaté, D.C., Ibarguren, C. ve Apella, M.C. (2011). Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research*, 166, 1–13.

Carlisle, G.E. ve Falkinham, J.O. (1989). Enzyme Activities and Antibiotic Susceptibility of Colonial Variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 3026-3028. DOI:0099-2240/89/113026-03

Chateau, N., Deschamps, A.M., ve Sassi, A.H. (1994). Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Letters in Applied Microbiology*, 18(1), 42–44. doi:10.1111/j.1472-765x.1994.tb00796.x

Chung, H., Kim, Y., Chun, S. ve Ji, G. (1999). Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 47(1-2), 25–32. doi:10.1016/s0168-1605(98)00180-9

Cicenia, A., Scirocco, A., Carabotti, M., Pallotta, L., Marignani, M. ve Severi, C. (2014). Postbiotic activities of Lactobacilli-derived factors. *J Clin Gastroenterol.* 48, S18–22. DOI: 10.1097/MCG.0000000000000231

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. Document M100-S23. Wayne, PA: *Clin Labora Stand Institu*.

Collado, M.C., Meriluoto, J., ve Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226**,** 1065–1073. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x.

Corby-Harris, V., Maes, P., ve Anderson, K.E. (2014). The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLOS ONE*, 9(4);e95056.

Crailsheim, K. (1988). Regulation of food passage in the intestine of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 34(2), 85–90. doi: 10.1016/0022-1910(88)90158-8.

Crailsheim, K., Brodschneider, R., Aupinel, P., Behrens, D., Genersch, E., Vollmann, J., ve Riessberger-Gallé, U. (2013). Standard methods for artificial rearing of *Apis mellifera* larvae. *Journal of Apicultural Research*, 52(1). DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.05.

Çomak Göçer, M.E., Ergin, F. ve Küçükçetin, A. (2016). Sindirim Sistemi Modellerinde Probiyotik Mikroorganizmaların Canlılığı. *Akademik Gıda*, 14(2), 158–165.

Çon, A.H. ve Gökalp, H.Y. (2000). Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyet Dergisi*, 30,3-4/180-190.

Daisley, B.A., Pitek, A.P., Chmiel, J.A., Al, K.F., Chernyshova, A.M., Faragalla, K.M., Burton, J.P., Thompson, G.J., ve Reid, G. (2019). Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *The ISME Journal*, 14(2), 476–491. doi:10.1038/s41396-019-0541-6

Davis, F.C. (2004). Inside and outside influences. In F.C. David (ed.), The Honey Bee Inside Out, Bee Craft Limited, Warwickshire, s., 145-157.

De Marco, S., Sichetti, M., Muradyan, D., Piccioni, M., Traina, G., Pagiotti, R. ve Pietrella, D. (2018). Probiotic cell-free supernatants exhibited anti-inflammatory and antioxidant activity on human gut epithelial cells and macrophages stimulated with LPS. *Evid Based Complement Altern Med.*, 1756308. doi:10.1155/2018/1756308

Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. ve Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(6), 438–442. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x

Demir, E., Kılıç Başyiğit, G., ve Uşan, E. (2018). Farklı Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri'nin Antibiyotik Direnç Profilleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 9(2): 197-204. doi: 10.29048/makufebed.387035

Diler, A. (2007). Probiyotik-Enzim Kombinasyonunun Esmer Irkı Buzağılarda Yemden Yararlanma ve Büyüme Performansı Üzerine Etkileri. Yüksek Linans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Programı. Erzurum

Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre A-S, ve Lavigne R (2012) Learning from bacteriophages—advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Current Protein & Peptide Science*, 13:699–722. doi:10.2174/138920312804871193

Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., ve Maciejewska, B. (2015). Bacteriophages and Phage-Derived Proteins. *Application Approaches.*

Current Medicinal Chemistry, 22(14), 1757–1773. doi:10.2174/09298673226661502091528 51

Du, Y., Luo, S. ve Zhou, X. (2021). *Enterococcus faecium* Regulates Honey Bee Developmental Genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12105. https://doi.org/10.3390/ijms222212105

Duary, R.K., Batish, V.K. ve Grover, S. (2012). Relative gene expression of bile salt hydrolase and surface proteins in two putative indigenous *Lactobacillus plantarum* strains under *in vitro* gut conditions. *Molecular Biology Reports*, 39, 2541–2552. doi: 10.1007/s11033-011-1006-9

Ebrahimi, M., Sadeghi, A., Rahimi, D., Purabdolah, H. ve Shahryari, S. (2020). Postbiotic and Anti-aflatoxigenic Capabilities of *Lactobacillus kunkeei* as the Potential Probiotic LAB Isolated from the Natural Honey. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. doi:10.1007/s12602-020-09697-w

Edberg, S.C., Gam, K., Bottenbley, C.J. ve Singer, J.M. (1976). Rapid spot test for the determination of esculin hydrolysis. *Journal of clinical microbiology*, 4(2), 180–184.

Elçioğlu, O. ve Kunduhoğlu, B. (2014). Probiotic Characteristics of Natural *Lactobacilli* Isolated from Traditional Kargi Tulum Cheese. *Italian Journal of Food Science*, 26(1), 31-40.

Elleuch, L., Shaaban, M., Smaoui, S., Mellouli L., Karray-Rebai, I., Fourati-Ben Fguira, L., Shaaban, K.A. ve Laatsch, H. (2010). Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 579–593. doi: 10.1007/s12010-009-8808-4

Elzeini, H.M., Ali, A.R.A.A., Nasr, N.F., Hassan, M., Hassan, A.A.M., ve Elenany, Y.E. (2021). Probiotic Capability of Novel Lactic Acid Bacteria Isolated from Worker Honey Bees Gut Microbiota. *FEMS Microbiology Letters*, 368, 6.

Endo, A. ve Salminen, S. (2013) Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6), 444–448.

Endo, A., Maeno, S., Tanizawa, Y., Kneifel, W., Arita, M., Dicks, L. ve Salminen, S. (2018). Fructophilic Lactic Acid Bacteria, a Unique Group of Fructose-fermenting Microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.01290–18. DOI: 10.1128/aem.01290-18

Evans, J., ve Lopez, D. (2004). Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 97, 752-756.

Evans, J.D. ve Chen, Y. (2021). Colony Collapse Disorder and Honey Bee Health. In Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner, Chapter 19, (eds T.R. Kane and C.M. Faux). doi: 10.1002/9781119583417.ch19

Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4745–4767. doi:10.3390/ijerph110504745

Filannino, P., Di Cagno, R., Tlais, A. Z. A., Cantatore, V., ve Gobbetti, M. (2019). Fructose-rich niches traced the evolution of lactic acid bacteria toward fructophilic species. *Critical Reviews in Microbiology*, 1–17. doi:10.1080/1040841x.2018.1543649

Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S. ve Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109(S2), S35–S50. doi:10.1017/s0007114512004011

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2018). Main bee diseases: Good beekeeping practices. Thematic Catalogue For Smallholder Farmers To Promote Innovation (TECA), s 80, 4-5. ISBN 978-92-5-130544-7

Forsgren, E., Locke, B., Sircoulomb, F., ve Schäfer, M.O. (2018). Bacterial Diseases in Honeybees. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5(1), 18–25. doi:10.1007/s40588-018-0083-0

Forsgren, E., Olofsson, T.C., Váasquez, A. ve Fries, I. (2010). Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*, 41, 99–108. doi:10.1051/apido/2009065

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365–378.

Gaggìa, F., Baffoni, L. ve Alberoni, D. (2017). Probiotics for Honeybees' Health. Probiotics and Prebiotics in Animal. *Health and Food Safety*, 219–245. doi:10.1007/978-3-319-71950-4_9

García Quintans, N., Blancato, V., Repizo, G., Magni, C. ve López, P. (2008). Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications, ISBN: 978-81-308-0250-3 Editors: Baltasar Mayo, Paloma López and Gaspar Pérez-Martínez.

Garcia, L.S. ve Isenberg, H.D (Editör) (2010). Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria, p 503-642. In Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd Edition. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555817435.ch3.17

García, R., Latz, S., Romero, J., Higuera, G., García, K. ve Bastías, R. (2019). Bacteriophage Production Models: An Overview. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1187. doi: 10.3389/fmicb.2019.01187

George Kerry, R., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.S. ve Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 927–939. doi:10.1016/j.jfda.2018.01.002

George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F.J., Revol-Junelles, A.M., Borges, F. ve Foligné, B. (2018). Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.02899

Giles-Gomez, M., Sandoval Garcia, J.G., Matus, V., Campos Quintana, I., Bolivar, F. ve Escalante, A. (2016). *In vitro* and *in vivo* probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *SpringerPlus*, 5(1), 1–10. DOI: 10.1186/s40064-016-2370-7

Gilliam, M. ve Morton, L.H. (1978). Bacteria belonging to the genus Bacillus isolated from honeybees, *Apis mellifera*. Fed 2,4-D and antibiotics (1). *Apidologie*, Springer Verlag, 9(3), pp.213–222

Gilliam, M. ve Prest, D.B. (1972). Fungi isolated from the intestinal contents of foraging worker honeybees, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 20(1), 101–103. DOI: 10.1016/0022-2011(72)90087-0.

Gilliam, M., Prest, D.B., ve Morton, H.L. (1974). Fungi isolated from honeybees, *Apis mellifera*. Fed 2,4-D and Antibiotics. *Journal of Invertebrate Pathology*, 24(2), 213–217. DOI: 10.1016/0022-2011(74)90013-5.

Gilliam, M. (1971). Microbial Sterility of the Intestinal Content of the Immature Honey Bee, *Apis mellifera*. *Annals of the Entomological Society of America*, 64(1), 315–316. DOI:10.1093/aesa/64.1.315.

Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155, 1-10. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12678.x.

Gilliam, M., ve Valentine, D.K. (1976). Bacteria isolated from the intestinal contents of foraging worker honeybees, *Apis mellifera*: The genus *Bacillus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 28(2), 275–276. DOI:10.1016/0022-2011(76)90137-3.

Goel, G. ve Kumar, A. (Ed.). (2021). Advances in Probiotics for Sustainable Food and Medicine. *Microorganisms for Sustainability*. doi:10.1007/978-981-15-6795-7.

Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W., Liu, X.M. ve Zhang, H.P. (2009). *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1640–1646. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.025

Haghshenas, B., Nami, Y., Almasi, A., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., Barzegari, A. ve Khosroushahi, A.Y. (2017). Isolation and characterization of probiotics from dairies. *Iranian Journal of Microbiology*. 9(4), 234–243.

Hanlon, G.W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), 118–128. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.04.006

Haydak, M.H. (1970). Honey Bee Nutrition. *Annual Review of Entomology*, 15, 143–1.

Hols, P., Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N. ve Delcour, J. (1994). Use of expression secretion signals and vector free stable chromosomal integration in engineering of *Lactobacillus* plantarum for α-amilase and Levanase expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1401-1403.

Honey Bee Diseases and Pests (2021, 29 Mart) https://www.dadant.com/learn/honey-bee-diseases-foulbrood/ adresinden 29 Mart 2021 tarihinde alınmıştır.

Hroncova, Z., Havlik, J., Killer, J., Doskocil, I., Tyl, J., Kamler, M., Titera, D., Hakl, J., Bunesova, V., ve Rada, V. (2015). Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. *PLoS ONE*, 10, e0118707. DOI: 10.1371/journal.pone.0118707.

Huang, Y.H., Chen, Y.H., Chen, J.H., Hsu, P.S., Wu, T.H., Lin, C.F., Peng, C.C., ve Wu, M.C. (2021). A potential probiotic *Leuconostoc mesenteroides* TBE-8 for honey bee. *Scientific Reports*, 11, 18466. https://doi.org/10.1038/s41598-021-97950-9

Iorizzo, M., Testa, B., Lombardi, S.J., Ganassi, S., Ianiro, M., Letizia, F., Succi, M., Tremonte, P., Vergalito, F., Cozzolino, A., Sorrentino, E., Coppola, R., Petrarca, S., Mancini, M., ve De Cristofaro, A. (2020). Antimicrobial Activity against *Paenibacillus larvae* and Functional Properties of *Lactiplantibacillus plantarum* Strains: Potential Benefits for Honeybee Health. *Antibiotics*, *9*(8), 442. https://doi.org/10.3390/antibiotics9080442

Jacobsen, C.N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A.E., Møller, P.L., Michaelsen, K.F., Pærregaard, A., Sandström, B., Tvede, M. ve Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in Humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4949–4956. doi:10.1128/aem.65.11.4949-4956.1999

Jeyaprakash, A, Hoy, M.A., ve Allsopp, M.H. (2003). Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of invertebrate pathology*, *84*(2), 96–103. https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.08.007

Jiménez-Esquilín, A.E. ve Roane, T.M. (2005). Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude Sagebrush Rhizosphere. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32, 378–381. Doi: 10.1007/s10295-005-0007-x

Johnson, R.M. (2015). Honey bee toxicology. *Annual review of entomology*, 60, 415–434. doi: 10.1146/annurev-ento-011613-162005

Jones, B.V., Begley, M., Hill, C., Gahan, C.G. ve Marchesi, J.R. (2008). Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105, 13580–13585. doi: 10.1073/pnas.0804437105

Jones, J.C., Fruciano, C., Hildebrand, F., Al Toufalilia, H., Balfour, N.J., Bork, P., Engel, P., Ratnieks, L.W.F. ve Hughes, W.O. (2017). Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. Ecology and Evolution, 8(1), 441–451. doi:10.1002/ece3.3597

Jones, J.C., Myerscough, M.R., ve Graham, S. 2004. Honeybee nest thermoregulation: diversity promotes stability. *Science*, 16, 402–404.

Juarez Tomas, M.S., Wiese, B., ve Nader-Macias, M.E. (2005). Effects of Culture Conditions on the Growth and Auto-aggregation Ability of Vaginal *Lactobacillus* johnsonii CRL 1294. *J Appl Microbiol*, 99, 6, 1383–1391.

Kang, C.H., Han, S.H., Kim, Y., Paek, N.S., ve So, J.S. (2018). *In Vitro* Probiotic Properties of Lactobacillus salivarius MG242 Isolated from Human Vagina. *Probiotics and antimicrobial proteins*, *10*(2), 343–349. https://doi.org/10.1007/s12602-017-9323-5

Karaman, M.R. (2018). Arı Polinasyonu. Küçükersan MK, editör. Arıcılık, Arı Ürünleri ve Apiterapi. 1. Baskı. Ankara: *Türkiye Klinikleri,* 26–32.

Karpiński, T.M. ve Szkaradkiewicz, A.K. (2016). Bacteriocins. *Encyclopedia of Food and Health*, 312–319. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00053-2

Kılıç, O.A., Pavlova, I.S., Ma, W-G, ve Tao, L. (1996). Analysis of *Lactobacillus* Phages and Bacteriocins in American Dairy Products and Characterization of a Phage Isolated from Yogurt. *Applied and Environmental Microbiology*, 2111–2116.

Killer, J., Dubna, S., Sedlacek, I., ve Svec P. (2014). Lactobacillus apis sp. nov., from the Stomach of Honeybees (*Apis mellifera*), Having an *in vitro* Inhibitory Effect on the Causative Agents of American and European Foulbrood. *Int J Syst Evol*, 64, 152–157.

Killer, J., Kopec, J., Mrazek, J., Rada, V., Dubna, S., ve Marounek, M. (2010). Bifidobacteria in the Digestive Tract of Bumblebees. *Anaerobe*, 16, 165–170.

Klayraung, S. ve Okonogi, S. (2009). Antibacterial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of *Lactobacillus fermentum* isolated from Miang. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 757–766. https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000400005

Kochansky, J., Knox, D.A., Feldlaufer, M. ve Pettis, J.S. (2001). Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and –resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie*., 32, 215–22. https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101142

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. ve Winn, W.C. (1997). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th Edition. Lippincott-Raven Publisher, New York, 1296-1395.

Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., ve Matošić, S. (2003). Adhesion and Aggregation Ability of Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 6, 981–987.

Kunieda, T., Fujiyuki, T., Kucharski, R., Foret, S., Ament, S.A., Toth, A.L., Ohashi, K., Takeuchi, H., Kamikouchi, A., Kage, E., Morioka, M., Beye, M., Kubo, T., Robinson, G.E., ve Maleszka, R. (2006). Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect Molecular Biology, 15*(5), 563–576. https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00677.x

Kwong, W.K. ve Moran, N.A. (2016). Gut Microbial Communities of Social Bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 374–84.

Lactic acid bacteria. (2021, 2 Nisan) https://en.wikipedia.org/wiki/Lactic_acid_ bacteria

Lamei, S., Stephan, J.G., Nilson, B., Sieuwerts, S., Riesbeck, K., de Miranda, J.R., ve Forsgren, E. (2020). Feeding Honeybee Colonies with Honeybee-Specific Lactic Acid Bacteria (Hbs-LAB) Does Not Affect Colony-Level Hbs-LAB Composition or *Paenibacillus larvae* Spore Levels, Although American Foulbrood Affected Colonies Harbor a More Diverse Hbs-LAB Community. *Microbial Ecology*, 79(3), 743–755. doi:10.1007/s00248-019-01434-3

Lamei, S., Stephan, J.G., Riesbeck, K., Vasquez, A., Olofsson, T., Nilson, B., Miranda, J.R. de, ve Forsgren, E. (2019). The secretome of honeybee-specific lactic acid bacteria inhibits *Paenibacillus larvae* growth. *Journal of Apicultural Research*, 1–8. doi:10.1080/00218839.2019.1572096

Lashani, E., Davoodabadi, A. ve Dallal, M.M.S. (2020). Some probiotic properties of *Lactobacillus* species isolated from honey and their antimicrobial activity

against foodborne pathogens. *Veterinary Research Forum*, 11(2), 121–126. doi: 10.30466/vrf.2018.90418.2188

Lazzeri, A.M., Mangia, N.P., Mura, M.E., Floris, I., Satta, A., ve Ruiu, L. (2020). Potential of novel food-borne *Lactobacillus* isolates against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Biocontrol Science and Technology*, 1–12. doi:10.1080/09583157.2020.1769556

Lee, F.J., Rusch, D.B., Stewart, F.J., Mattila, H.R., ve Newton, I.L. (2015). Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environmental Microbiology*, 17(3), 796–815.

Lee, J., Yun, H.S., Cho, K.W., Oh, S., Kim, S.H., Chun, T., Kim, B. ve Whang, K.Y. (2011). Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: Immune modulation and longevity. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2), 80–86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.003

Li, X., Gong, H., Yang, S., Yang, L., Fan, Y. ve Zhou, Y. (2017). Pectic bee pollen polysaccharide from *Rosa rugosa* alleviates diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance via induction of AMPK/mTOR-mediated autophagy. *Molecules*, 22(5), 699. doi: 10.3390/molecules22050699

Liçi meyvesi (2022). https://tropikbahcen.com/urun/lici-meyvesi-1kg/ adresinden 13 Mayıs 2022 tarihinde alınmıştır.

Linjordet, S.M. (2016). A Comparative Analysis of Lactic Acid Bacteria Isolated from Honeybee Gut and Flowers, with Focus on Phylogeny and Plasmid Profile. Master Tezi. Norwegian University of Life Sciences, Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norveç, 37 s, 1-3, 18-20.

Liong, M.T. ve Shah, N.P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*, 88(1), 55–66. doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72662-X

Liu, A., Xu, R., Zhang, S., Wang, Y., Hu, B., Ao, X., Li, Q., Li, J., Hu, K., Yang, Y. ve Liu, S. (2022). Antifungal mechanisms and application of Lactic Acid Bacteria in Bakery Products: A Review. *Frontiers in Microbiol*ogy, 13, 924398. doi: 10.3389/fmicb.2022.92439

Liu, Z., Zhang, Z., Qiu, L., Zhang, F., Xu, X., Wei, H., ve Tao, X. (2017). Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *Journal of Dairy Science*, 100, 6895–905. doi: 10.3168/jds.2016-11944

Lorca, G.L., Twiddy, T.A. ve Saier, M.H. (2015). Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, 55–79. doi:10.1002/9781118868386.ch4

Łoś, M. ve Węgrzyn, G. (2012). Pseudolysogeny. *Advances in Virus Research*, 82, 339–349. doi:10.1016/b978-0-12-394621-8.00019-4

Ludvigsen, J., Rangberg, A., Avershina, E., Sekelja, M., Kreibich, C., Amdam, G., ve Rudi, K. (2015). Shifts in the midgut/pyloric microbiota composition within a honey bee apiary throughout a season. *Microbes and Environments*, 30, 235–244.

Ludvigsen, J. (2013). Seasonal Trends In The Midgut Microbiota of Honeybees. Yüksek Lisans Tezi. Norwegian University of Life Sciences, Department of Chemistry, *Biotechnology and Food Science*, 89 s, 9-15.

Lukaszewicz, M. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* Probiotic Yeast. Probiotics, Chapter 16, 385-398. doi: 10.5772/50105

Madigan, T.M. ve Martinko, M.J. (editör) Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. 11. Baskı. Palme Yayınları, 374-378.

Maldonado Galdeano, C., Cazorla, S. I., Lemme Dumit, J. M., Vélez, E. ve Perdigón, G. (2019). Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 115–124. doi:10.1159/000496426

Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. ve Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189–199. doi:10.1016/j.idairyj.2005.02.009

Martin, J.D. ve Mundt, J.O. (1972). Enterococci in Insects. *Appied Microbiology*, 24, 575–580.

Martinson, V.G., Danforth, B.N., Minckley, R.L., Rueppell, O., Tingek, S., ve Moran, N.A. (2011). A Simple and Distinctive Microbiota Associated with Honey Bees And Bumble Bees. *Molecular Ecology*, 20,3, s., 619–628. DOI:10.1111/J.1365-294x.2010.04959.X.

Martinson, V.G., Moy, J., ve Moran, N. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 2830–2840. [PubMed: 22307297]

Mathialagan, M., Johnson, Edward, Y.S.J.T., David, P.M.M., Senthilkumar, M., Srinivasan, M.R., ve Mohankumar, S. (2018). Isolation, Characterization and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) from Honey Bees. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 7, 894-906. DOI: 10.20546/ijcmas.2018.704.096.

Matsumoto, M., Ohishi, H. ve Benno, Y. (2004). Hþ-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, 93(1), 109–113. Doi;org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.009

Mattila, H.R., Rios, D., Walker-Sperling, V.E., Roeselers, G., ve Newton, I.L.G. (2012). Characterization of the active microbiotas associated with honey bees

reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. *PloS One*, 7: e32962. DOI: 10.1371/journal.pone.0032962.

Maurya, D.P., Singh, D., Pratap, D., ve Maurya, J.P. (2012) Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Journal of Environmental Biology*, 2012. 33(1): p. 5-8.

Messaoudi, M., Violle, N., Bisson, J.F., Desor, D., Javelot, H. ve Rougeot, C. (2011). Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes*, 2(4), 256–261. doi:10.4161/gmic.2.4.16108

Miller, D.L., Smith, E.A. ve Newton, I.L.G. (2020). A bacterial symbiont protects honey bees from fungal disease. *bioRxiv*, 4–22. doi:10.1101/2020.01.21.914325.

Mohammad, S.M., Mahmud-Ab-Rashid, N.K. ve Zawawi, N. (2020). Probiotic properties of bacteria isolated from bee bread of stingless bee *Heterotrigona itama*. *Journal of Apicultural Research*, 1–16. doi.org/10.1080/00218839.2020.1801152

Mohr, K.I. ve Tebbe, C.C. (2007). Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 573–582.

Mohr, K.I., ve Tebbe, C.C. (2006). Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology*, 8, s., 258–272. PMID: 16423014

Montso, P.K., Mlambo, V. ve Ateba, C.N. (2019). Characterization of lytic Bacteriophages infecting Multidrug-Resistant Shiga Toxigenic atypical *Escherichia coli* O177 strains isolated from cattle feces. *Frontiers in Public Health*, 7. doi:10.3389/fpubh.2019.00355

Moran, N.A. (2015). Genomics of the Honey Bee Microbiome. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 22–28. DOI: 10.1016/j.cois.2015.04.003

Moran, N.A., Hansen, A.K., Powell, J.E., ve Sabree, Z.L. (2012). Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS ONE*, 7, e36393.

Mudroňová, D., Toporčák, J., Nemcová, R., Gancarčíková, S., Hajdučková, V., ve Rumanovská, K. (2011). *Lactobacillus* sp. as a potential probiotic for the prevention of *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 50(4), 323–324. doi:10.3896/ibra.1.50.4.11

Muñoz, R., Moreno-Arribas, M. V., ve Rivas, B. de las. (2011). Lactic Acid Bacteria. *Molecular Wine Microbiology*, 191–226. doi:10.1016/b978-0-12-375021-1.10008-6

Murphy, J., Mahony, J., Fitzgerald, G.F., ve van Sinderen, D. (2017). Bacteriophages Infecting Lactic Acid Bacteria. *Cheese*, 249–272. doi: 10.1016/b978-0-12-417012-4.00010-7

Mutinelli, F. (2003) Practical Application of Antibacterial Drugs for the Control of Honey Bee Diseases. *Apiacta*, 2, 149-155.

Myllyluoma, E., Kajander, K., Mikkola, H., Kyrönpalo, S., Rasmussen, M., Kankuri, E., Sipponen, P., Vapaatalo, H., ve Korpela, R. (2007). Probiotic intervention decreases serum gastrin-17 in *Helicobacter pylori* infection. *Digestive and Liver Disease*, 39(6), 516–523

Neveling, D.P., Endo, A. ve Dicks, L.M.T. (2012). Fructophilic *Lactobacillus kunkeei* and *Lactobacillus brevis* Isolated from Fresh Flowers, Bees and Bee-hives. *Current Microbiology*, 65(5), 507–515. doi:10.1007/s00284-012-0186-4

Nikolic, M., Jovcic, B., Kojic, M., ve Topisirovic, L. (2010). Surface Properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* Isolates from Homemade Cheeses Showing Auto-aggregation Ability. *European Food Research and Technology*, 231, 6, 925–931.

O'Bryan, C. A., Crandall, P.G., Ricke, S.C., ve Ndahetuye, J.B. (2014). Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Types and mechanisms of action. In Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality. (pp. 117–136). Woodhead Publishing. doi:10.1016/B978-1-78242-034-7.00006-2

OIE Terrestrial Manual, 2018. American Foulbrood of Honey Bees (Infection of Honey Bees with *Paenibacillus larvae*). Chapter 3.2.2. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf adresinden 1 Nisan 2021 tarihinde alınmıştır.

Ołdak, A., Zielińska, D., Rzepkowska, A., ve Kołożyn-Krajewska, D. (2017). Comparison of Antibacterial Activity of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Two Different Kinds of Regional Cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski Cheese. *BioMed Research International*, 2017, 1–10. doi:10.1155/2017/6820369

Olofsson, T.C. ve Vásquez, A. (2008). Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology*, 57, 356–363. [PubMed: 18663527]

Olofsson, T.C., Butler, È., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., ve Vásquez, A. (2014). Lactic acid bacterial symbionts in honeybees- an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *International Wound Journal*, 13(5), 668–679. doi:10.1111/iwj.12345

Öncül, N. ve Yıldırım, Z. (2020). Growth ability of bacteriocinogenic strains in milk and their bacteriocin activity against cheese starter cultures. *The Journal of Food*, 45(6), 1175–1187. doi: 10.15237/gida.GD20113

Pachla, A., Ptaszyńska, A.A., Wicha, M., Kunat, M., Wydrych, J., Oleńska, E., ve Małek, W. (2021). Insight into probiotic properties of lactic acid bacterial endosymbionts of Apis mellifera L. derived from the Polish apiary. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1890–1899. doi:10.1016/j.sjbs.2020.12.040

Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., ve Kim, H.Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171–1185. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x

Pătruică, S. ve Mot, D. (2012). The effect of using prebiotic and probiotic products on intestinal microflora of the honeybee (*Apis mellifera carpatica*). *Bulletin of Entomological Research*, 102(06), 619–623. doi:10.1017/s0007485312000144

Pelyuntha, W., Chaiyasut, C., Kantachote, D., ve Sirilun, S. (2019). Cell-Free Supernatants from Cultures of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Grape as Biocontrol Against *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* Virulence via Autoinducer-2 and Biofilm Interference. *PeerJ*. https://doi.org/10.7717/peerj.7555

Pisano, M.B., Viale, S., Conti, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Melis, M.P. ve Cosentino, S. (2014). Preliminary evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from sardinian dairy products. *BioMed Research International*, 1–9. doi:10.1155/2014/286390

Powell, J.E., Martinson, V.G., Urban-Mead, K., ve Moran, N.A. (2014). Routes of Acquisition of the Gut Microbiota of the Honey Bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 7378–7387.

Quinto, E., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J. ve Girbés, T. (2014). Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 1765–1775. doi: 10.4236/fns.2014.518190.

Rabe, K.L. ve Hillier, S.L. (2003). Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3260–3264. doi: 10.1128/JCM.41.7.3260–3264.2003

Raghavan, K.T., Jacob, A.A., ve Chandran, H. (2013). Honey bee Gut flora as a Source of LAB (Lactic Acid Bacteria) with Probiotic Capabilities. *The Journal of Food Technology*, Photon, 105, 126-134.

Rangberg, A., Diep, D.B., Rudi, K., ve Amdam, G.V. (2012). Paratransgenesis: An Approach to Improve Colony Health and Molecular Insight in Honey Bees

(*Apis mellifera*). *Integrative and Comparative Biology*, 52(1), 89–99. doi:10.1093/icb/ics089.

Rangberg, A., G. Mathiesen, G.V. Amdam, ve D.B. Diep (2015). The paratransgenic potential of *Lactobacillus kunkeei* in the honey bee *Apis mellifera*. *Beneficial Microbes*, 6 (4): 513-523.

Raymann, K. ve Moran, A.N. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion In Insect Science*, 26, 97–104. DOI: 10.1016/j.cois.2018.02.012

Razmpoosh, E., Javadi, M., Ejtahed, H.S. ve Mirmiran, P. (2015). Probiotics as beneficial agents in the management of diabetes mellitus: a systematic review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32(2), 143–168. doi:10.1002/dmrr.2665

Reflor (2022) https://www.biocodex.com.tr/tr/urunlerimiz/gastrointestinal-sistem/reflor/ aderesinden 03 Şubat 2022 tarihinde alınmıştır.

Rhodehamel, E.J. ve Harmon, S.M., (1995). *Bacillus cereus*. In: Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, eighth ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, pp. 14.01–14.08

Ricigliano, V.A., Fitz, W., Copeland, D.C., Mott, B.M., Maes, P., Floyd, A.S., Dockstader, A. ve Anderson, K.E. (2017). The impact of pollen consumption on honey bee (*Apis mellifera*) digestive XVI physiology and carbohydrate metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 96(2), e21406.

Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., Ouwehand, A.C. (2003). Interaction Between Probiotic Lactic Acid Bacteria and Canine Enteric Pathogens: A Risk Factor for Intestinal *Enterococcus faecium* Colonization? *Veterinary Microbiology*, 92, 1-2, 111–119.

Rokop, Z.P., Horton, M.A., Newton, I.L.G. (2015). Interactions between cooccurring lactic acid bacteria in honey bee hives. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 7261–7270. DOI:10.1128/AEM.01259-15.

Roulston, T.H. ve Cane, J.H. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution*, 222, 187–209.

Ruiz, L., Margolles, A. ve Sanchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in Lactobacillus and Bifidobacterium. *Frontiers in Microbiology*, 4(396), 396–398. https://doi.org/10.3389/fmicb. 2013.00396

Saccharomyces boulardii capsule (2022) https://www.yamamotonutrition.com/eng/saccharomyces_boulardii_pr31335?country=United_Kingdom adresinden 12 Şubat 2022 tarihinde alınmıştır.

Sammataro, D. ve Cicero, J.M. (2010). Functional morphology of the honey stomach wall of the European Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 103(6), 979–987. doi:10.1603/an09111

Sanford, M.T. (2012). Honey Bee Colony Health Sammataro, D., ve Yoder, J.A. (editör) 2012. Honey Bee Colony Health. Challenges and Sustainable Solutions. CRC Press Taylor and Francis Group, 302 s. Hardback, 978-1-4398-7940, Florida Entomologist, 95(1), 242–243. doi:10.1653/024.095.0145

Savadogo, A., Ouattara, T.A.C. ve Traore, S.A. (2007). Potential of Lactic Acid Bacteria in Human Nutrition. *Food*, 1(1), 79–84.

Serrão, J.E., do Carmo Queiroz Fialho, M., Azevedo, D.O., ve Zanuncio, J.C. (2014). Aquaporins in the honeybee crop—a new function for an old organ. *Protoplasma*, 251(6), 1441–1447. doi:10.1007/s00709-014-0645-9

Shanahan, F. (2004). Probiotics in inflammatory bowel disease therapeutic rationale and role. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(6), 809–818. doi:10.1016/j.addr.2003.11.003

Sharaf, E.F., El-Sayed, W.S., ve Abosaif, R.M. (2014). Lecithinase-producing bacteria in commercial and home-made foods: Evaluation of toxic properties and identification of potent producers. *Journal of Taibah University for Science*, 8(3), 207–215. doi:10.1016/j.jtusci.2014.03.006

Silva, M.S., Rabadzhiev, Y., Eller, M.R., Iliev, I., Ivanova, I., ve Santana, W.C. (2017). Microorganisms in Honey. *Honey Analysis*, InTech (11), 233-258. doi:10.5772/67262

Snowdon, J.A. ve Cliver, D.O. (1996). Microorganisms in Honey. *International Journal of Food Microbiology*, 31(1-3), 1–26. DOI:10.1016/0168-1605(96)00970-1

Soni, M., Shah, R.H. ve Patel, M.S. (2021). Isolation, Identification and Analysis of Probiotic Characteristics of Lactobacillus spp. from Regional Yoghurts from Surendranagar District, Gujarat. A*sian Journal of Dairy and Food Research.* (40), 267–272. DOI: 10.18805/ajdfr.DR-1631.

Sporolactobacillus (2021, 10 Aralık) https://en.wikipedia.org/wiki/Sporolactobacillus

Stephan, J.G, Lamei, S., Pettis, J.S., Riesbeck, K., de Miranda, J.R., ve Forsgren, E. (2019). Honeybee-specific lactic acid bacterium supplements have no effect on American Foulbrood-infected honeybee colonies. *Applied and Environmental Microbiology*, 85, e00606–19.

Sukumaran, R.K., Singhania, R.R., Pandey, A. (2005). Microbial cellulases-production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*, Vol. 64, pp. 832-844

Sung-Mee, L. ve Dong-Soon, I. (2009). Screening and Characterization of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Korean Fermented Foods. *Jounal of Microbiology Biotechnology*, 19, 2, 178–186.

Suwannaphan, S. (2021). Isolation, identification and potential probiotic characterization of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented food. *AIMS Microbiology*, 7(4), 431–446. doi: 10.3934/microbiol.2021026.

Suyabatmaz, Ş., Bozdeveci, A., ve Karaoğlu, Ş.A. (2020). Bal arılarında gastrointestinal bakteriyel flora (Gastrointestinal bacterial flora in honey bees). *Uludağ Arıcılık Dergisi,* 20(19), 97–113, doi: 10.31467/uluaricilik.701170

Syal, P. ve Vohra, A. (2013). Probiotic potential of yeasts ısolated from traditional ındian fermented foods. *International Journal of Microbiology Research*, 5(2), 390–398. doi: 10.9735/0975-5276.5.2.390-398

Tajabadi, N., Mardan, M., Shuhaimi, M., ve Abdul Manap, M.Y. (2011). Isolation and identification of *Enterococcus* sp. from honey stomach of honeybee based on biochemical and 16S rrna sequencing analysis. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 6, 95–100.

Tarrah, A., Castilhos, de J., Rossi, R.C., Duarte, V. da S., Ziegler, D.R., Corich, V., ve Giacomini, A. (2018). *In vitro* probiotic potential and anti-cancer activity of newly isolated folate-producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Frontiers in Microbiology*, 9, 22–14. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02214.

Taşdemir, A. (2017). Probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotikler. *Sağlık Akademisi Kastamonu*, 2(1), 71-88. doi: 10.25279/sak.300045

Taylor, M.A., Robertson, A.W., Biggs, P.J., Richards, K.K., Jones, D.F., ve Parkar, S.G. (2019). The effect of carbohydrate sources: Sucrose, invert sugar and components of mānuka honey, on core bacteria in the digestive tract of adult honey bees (*Apis mellifera*). *PLOS ONE*, 14(12), e0225845. doi:10.1371/journal.pone.0225845

Trapecar, M., Leouffre, T., Faure, M., Jensen, H.E., Granum, P.E., Cencic, A., ve Hardy, S.P. (2011). The use of a porcine intestinal cell model system for evaluating the food safety risk of *Bacillus cereus* probiotics and the implications for assessing enterotoxigenicity. *APMIS*, 119(12), 877–884. doi:10.1111/j.1600-0463.2011.02797.x

Trevors, K.E., Holley, R.A., ve Kempton, A.G. (1983). Isolation and Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage Isolated from a Meat Starter Culture. *Journal of Applied Microbiology*, 54, 281–288. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02618.x

Ugras, S. (2017). Isolation, identification and characterization of probiotic properties of bacterium from the honey stomachs of Yigilca honeybees in Turkey. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 41(3), 253–261. doi.org/10.16970/ted.74860

Upadhyay, J., Kumar, A., Gogoi, B., ve Buragohain, A.K. (2015). Antibacterial and hemolysis activity of polypyrrole nanotubes decorated with silver nanoparticles by an in-situ reduction process. *Materials Science and Engineering: C*, 54, 8–13 doi: 10.1016/j.msec.2015.04.027

Uygur, Ş.Ö. ve Girişgin, A.O. (2008). Bal Arısı Hastalık ve Zararlıları. *Uludağ Arıcılık Dergisi*; 08(4), 130–142.

Uymaz, B. (2010). Probiyotikler ve Kullanım Alanları. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, Cilt 16, Sayı 1, 2010, Sayfa 95-104

vanEngelsdorp, D., Traynor, K.S., Andree, M., Lichtenberg, E.M., Chen, Y., Saegerman, C., ve Cox-Foster, L.D. (2017). Colony Collapse Disorder (CCD) and beeage impacthoneybee pathophysiology. *PloS ONE*, 12(7), e0179535. doi: 10.1371/journal.pone.0179535

Vásquez, A., Olofsson, T.C., Sammataro, D., Hartfelder, K. (2009). A scientific note on the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA: a comparison with bees from Sweden. *Apidologie*, 40, 26–28.

Vásquez, E.C., Pereira, T.M.C., Peotta, V.A., Baldo, M.P., ve Campos-Toimil, M. (2019). Probiotics as Beneficial Dietary Supplements to Prevent and Treat Cardiovascular Diseases: Uncovering Their Impact on Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity,* 2019, 1–11. doi:10.1155/2019/3086270

Ventura, M., Sozzi, T., Turroni, F., Matteuzzi, D., van Sinderen, D. (2010). The impact of bacteriophages on probiotic bacteria and gut microbiota diversity. *Genes & Nutrition, 6(3), 205–207*. doi:10.1007/s12263-010-0188-4

Vergalito, F., Testa, B., Cozzolino, A., Letizia, F., Succi, M., Lombardi, S. J., Tremonte, P., Pannella, G., Di Marco, R., Sorrentino, E., Coppola, R., ve Iorizzo, M. (2020). Potential Application of *Apilactobacillus kunkeei* for Human Use: Evaluation of Probiotic and Functional Properties. *Foods*, 9(11), 1535. doi: 10.3390/foods9111535.

Vojvodic, S., Rehan, S.M., Anderson, K.E. (2013). Microbial gut diversity of Africanized and European honey bee larval instars. PLoS ONE, 8:e72106.

Wang, Y., Li, A., Jiang, X., Zhang, H., Mehmood, K., Zhang, L., Jiang, J., Wagas, M. Iqbal, M., Li, J. (2018). Probiotic Potential of *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Lactobacillus* Strains Isolated From Yaks. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02987.

Watanabe, H. ve Tokuda, G. (2010) Cellulolytic Systems in Insects. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 609–632. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085319

Wedajo, B. (2015). Lactic Acid Bacteria: Benefits, Selection Criteria and Probiotic Potential in Fermented Food. *Journal of Probiotics & Health*, 03(02). doi: 10.4172/2329-8901.1000129.

World Organisation for Animal Health (2021, 26 Mart) Disease of bees. https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/diseases-of-bees/ adresinden 26 Mart 2021 tarihinde alınmıştır.

Xiao, S. Y., Schöck, F., González-Morales, N. (2017). Rapid IFM Dissection for Visualizing Fluorescently Tagged Sarcomeric Proteins. *Bio-Protocol*, 7(22), 1–13. doi: 10.21769/BioProtoc.2606

Yadav, R., Puniya, A.K., Shukla, P. (2016). Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an Indigenous Fermented Beverage Raabadi. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1683–92.

Yan, H., Dai, Y., Zhang, Y., Yan, L., Liu, D. (2011). Purification and characterization of an endo-1,4-β-glucanase from *Bacillus cereus. African Journal of Biotechnology,* Vol. 10(72), pp. 16277-16285. DOI: 10.5897/AJB11.155

Yangılar, F. (2015). Probiyotik Mikroorganizmaların Biyokoruyucu Özelliği. *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering*, 20(1): 119-130. doi: 10.17482/uujfe.16850.

Yoshiyama M. ve Kimura K. (2009). Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102 (2), 91–96. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.005

Yoshiyama, M., Wu, M., Sugimura, Y., Takaya, N., KimotoNira, H. ve Suzuki, C. (2013). Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, 62–67.

Yörük, N.G. ve Güner, A. (2011). Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması ve Weissella Türlerinin Gıda Mikrobiyolojisinde Önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2), 163-176.

Yun, H.J., Jung, M.J., Kim, S.P., ve Bae, J.W. (2018). Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee. *Scientific Reports*, 8 (1). doi: 10.1038/s41598-018-19860-7.

Zhang, H. ve Cai, Y. (2014). Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice. ISBN 978-94-017-8841-0 (eBook). doi:10.1007/978-94-017-8841-0.

Zhang, W., Liu, M., ve Dai, X. (2013). Biological Characteristics and Probiotic Effect of Leuconostoc lactis Strain Isolated from the Intestine of Black Porgy Fish. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 685–691. https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000053

Zheng, H., Nishida, A., Kwong, W.K., Koch, H., Engel, P., Steele, M.I. ve Moran, N.A. (2016). Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. *MBio*, 7(6), e01326–16.

Zheng, H., Powell, J.E., Steele, M.I., Dietrich, C., ve Moran, N.A. (2017). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Americ*a, 114(18), 4775–4780.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G. ve Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. doi:10.1099/ijsem.0.004107