ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAL ARISI BAĞIRSAK MİKROBİYOTA ANALİZİ

G. Gül ÇEÇEN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2020

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAL ARISI BAĞIRSAK MİKROBİYOTA ANALİZİ

G.Gül ÇEÇEN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem OSMANAGAOĞLU

Bal arısı *(Apis mellifera L.)* mide-bağırsak sisteminden izole edilen bakterilerin filogenetik analizi yapılmıştır. Bu çalışmada bal arısı mikrobiyotasındaki bakteriler belirlenerek her birinin tayini yapılmıştır. Belirlenen bakterilerin karakterizasyonu için bazı biyokimyasal testler, moleküler karakterizasyonu için RAPD PCR ve 16S rDNA dizi analizi yöntemleri kullanılmıştır. Sekanslama ve filogenetik analizler sonucunda 6 suşun *Enterococcus faecalis,2 suşun Bacillus subtilis* ve 1 adet izolaın ise *Lactobacillus pentosus* olduğu tanımlanmıştır. Yapılan tez çalışmasıyla tanımlanan suşların potansiyel probiyotik özelliklerinin araştırılması arı kayıplarına neden olan hastalıklarla mücadelede etkili olacağı düşünülmektedir.

Aralık 2020, 61 sayfa
Anahtar Kelimeler: Bakteri, balarısı, izolasyon

ABSTRACT

Master Thesis

ANALYSİS OF HONEY BEE GUT MİCROBİOTA

G.Gül ÇEÇEN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem OSMANAGAOĞLU

Phylogenetic analysis of bacteria isolated from the honeybee (*Apis mellifera L.*) gastrointestinal system was performed. In this study, the bacteria in honeybee microbiota were identified and each was identified. Some biochemical tests were used for the characterization of the identified bacteria, and RAPD PCR and 16S rDNA sequence analysis methods were used for the molecular characterization. As a result of sequencing and phylogenetic analysis, 6 souche were identified as *Enterococcus faecalis*, 2 souche as *Bacillus subtilis*, and 1 isolate as *Lactobacillus pentosus*. It is thought that researching the potential probiotic properties of the souche identified with the thesis study will be effective in combating diseases that cause bee losses.

Dicember 2020, 61 pages

Key Words: Bacterium, honeybee, isolation

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinden itibaren, çalışma metodları, makale çeşitleri, araştırma, yol gösterme, planlama, uygulama olarak her adımda bilgi deneyim tecrübesi ile rehberlik yapan, pratik çözümleri ile gelişmeme katkı sağlayan; sayısız projede önderlik etmiş engin fikirlere sahip olan danışman hocam Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Eş danışmanım olan Muş Alparslan Üniversitesi Gıda İşleme Anabilim Dalı öğretim üyesi Öğr. Gör. Harun ÖNLÜ'ye desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. İlker BÜYÜK'e deneyimin her aşamasında; yaşadığım her sorunda ve ihtiyacım olan her türlü destekte asla geri çevirmeden her an gönülden yardımları benim için çok değerlidir. Okulların dahi kapalı olduğu pandemi süreçlerinde bile bana zaman ayırıp deney sürecimi ilerletmemi, dönem dönem telkinleriyle de beni desteklemiş ve sonuca ulaşmamı sağlamıştır, kendisine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim hayatım boyunca elimden tutan bu günlere gelmemin yeğane sebebi Semra ÇEÇEN'e minnet ve teşekkürlerimle…

G.Gül ÇEÇEN
Ankara, Aralık 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Bal Arısı **2**
1.1.1 Anatomi **5**
1.1.2 Sınıflandırılması **7**
1.2 Dünya ve Türkiye'de Önemi ve Üretimi **8**
1.3 Bal Arısının Dünya ve Türkiye'deki Kaybı **12**
1.4 Arıcılıkla İlgili Günümüz Verileri (Covid-19 Salgını) **13**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **16**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **17**
3.1 Bal Arısı Örneklerinin Toplanması **19**
3.2 Saf kültürlerin hazırlanışı **20**
3.3 Saf Kültürlerin Stoklanması **21**
3.4 Bakterilerin Morfolojik Olarak Ayrılması **22**
3.5 Bakterilen Stok Kültürlerinin Aktifleştirilmesi **22**
3.6 Genomik DNA İzolasyonu **22**
3.7 Saflık ve Miktar Tayini **23**
3.8 Agaroz Jel Elektroforezi **23**
3.9 RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) **25**
3.10 16S rDNA PZR ve Dizi Analizi **26**
3.11 Filoğenetik Ağaç Çizimin de Kullanılan Programlar **28**
4. ARAŞTIRMA BULGULARI **31**
4.1 Çeşitli Katı Besiyerlerinde Gelişim Gösteren Arı Gut Mikrobiyota Bakteri Görselleri **31**
4.2 Metilen Mavisi Basit Boyama Örnek Görüntüleri **33**

4.3 Gram Boyama Örnek Görselleri 37
4.4 Genomik DNA'ların Agaroz Jel Görüntüsü 38
4.5 RAPID-PZR Agaroz Jel Görüntüleri 41
4.6 16S PZR Ajaroz Jel Görüntüsü 45
4.7 Sekans Sonuçları 44
4.8 Bal Arısı Genomunda Belirlenen DNA Genleri ve Filogenetik Analizleri 45
5.TARTIŞMA VE SONUÇ 49
KAYNAKLAR 55
ÖZGEÇMİŞ 57

SİMGELER DİZİNİ

bp	Baz çifti
BLAST	Basic Local Alignment Tool- Basit Bölgesel Hizalama Aracı
°C	Santigrat Derece
DNA	Deoksiribonükleikasit
EDTA	Etilendiamin Tetra-Asetik Asit
EtBr	Etidyum Bromür
G	Guanin
Gr	gram
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations- Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
MEGA	Molecular Evalutionary Genetic Analysis- Moleküler Evrimsel Genetik Analiz
mg	Miligram
MgCl2	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe Broth
NaCl	Sodyumklorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPID-PCR	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PZR
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
ITOL	Interactive Tree of Life
TBE	Tris-Borik asit- EDTA
TGE	Tripton Glukoz Yeast Ekstrakt
UV	Ultra Viyole
V	Volt
µl	Mikro litre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Balarısı 3
Şekil 1.2 Apis mellifera'da bağırsak segmentlerinin yerleşimi. 6
Şekil 1.3 Dünya kovan ve bal verileri 9
Şekil 1.4 Türkiye kovan miktarı ve bal üretimi miktarı 11
Şekil 1.5 Amerika da anket sonucu; Balın tüketim durumu 12
Şekil 1.6 Hubei'deki arıcıların araştırma histogramı 14
Şekil 3.1 Mega 0.7 Programı 28
Şekil 3.2 İTOL veri tabanı 29
Şekil 4.1 Anadolu balarısı bakterilerinin katı besiyerinde gelişim görselleri 30
Şekil 4.2 Anadolu ve Kafkas balarısı bakteri katı besiyerinde gelişim görselleri 31
Şekil 4.3 Anadolu ve Kafkas balarısı bakteri katı besiyerinde gelişim görselleri 32
Şekil 4.4 Anadolu ve Kafkas balarısı bakteri katı besiyerinde gelişim görselleri 33
Şekil 4.5 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri 33
Şekil 4.6 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri 34
Şekil 4.7 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri 35
Şekil 4.8 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri 36
Şekil 4.9 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri 35
Şekil 4.10 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri 36
Şekil 4.11 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri 36
Şekil 4.12 Bakterin gram boyama örnek görüntüleri 37
Şekil 4.13 Genomik DNA izolasyonu sonucu agaroz jel görüntüsü 38
Şekil 4.14 OPA-09 Ajaroz jel görüntüsü 41
Şekil 4.15 OPA-09 Ajaroz jel görüntüsü 42
Şekil 4.16 OPA-08 Ajaroz jel görüntüsü 42
Şekil 4.17 OPA-08 Ajaroz jel görüntüsü 43
Şekil 4.18 OPA-06 Ajaroz jel görüntüsü 43
Şekil 4.19 16S PZR Ajaroz jel görüntüsü 44
Şekil 4.20 Mega programı kullanılarak elde edilen balarısı bakterilerinin filogenetik analizi 1 47
Şekil 4.21 Mega programı kullanılarak elde edilen balarısı bakterilerinin karşılaştırmalı filogenetik analizi 2 50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Arılarda ve diğer organizmalarda mikrobiyota araştırmalarının zaman çizelgesi 4
Çizelge 1.2 Balarısının sınıflandırılması 7
Çizelge 1.3 Dünya arıcılık verileri 8
Çizelge 1.4 Türkiye arıcılık verileri 10
Çizelge 1.5 Türkiye arı kaybı oranları 13
Çizelge 3.1 RAPID-PZR Primerleri 25
Çizelge 4.1 Genomik DNA'ların saflık ve miktarları sonuçları 39
Çizelge 4.2 RAPID-PZR reaksiyon koşulları 40
Çizelge 4.3 RAPID-PZR reaksiyon koşulları 40
Çizelge 4.4 16S PZR reaksiyon koşulları 44
Çizelge 4.5 16S PZR reaksiyon koşulları 45
Çizelge 4.6 Sekanslanan DNA örnekleri 48
Çizelge 5.1 Sekanslanan DNA örnekleri 52

1. GİRİŞ

Bal arıları (*Apis mellifera L.*), dünyadaki neredeyse bütün canlıların devamı için hayati önem taşıyan türler olarak belirilenmektedir. Ama, dünyada çapında bal arısı stoklarının geniş oranda kitlesel ölümlere sebep olan koloni çöküşü ciddi endişeye neden olmaktadır. Bu kayıpları engellemek için yeni çözümlerin ortaya konması gerekmektedir. Arıların vücutlarında bulunan probiyotik özellik taşıyan bakterilerin, arıların patojenlere karşı direnç sağlamasında aktif rol oynayacakları öngörülmektedir (Uğraş, 2017).

Bal arılarının beslenme yollarıyla ilişkili mikrobiyal topluluklar, gıda sindirimine yardımcı olmaları, temel besin maddeleri sağlamaları, konakçıyı patojenlerden korumak, zararlı molekülleri detoksifiye etmek ve konakçı bağışıklık sistemini artırmak için çok önemlidir. Arılar doğada tozlaşmayı büyük oranda sağlayarak; doğadaki bitki nesillerinin devamını sağlamakla beraber bitki örtüsünü de korur. Çevre, evren, doğa ve insan için çok önemli olan arıların yok olmaları da büyük kayıp olarak düşünülmektedir (Anonim 2015).

Bal arısı dünya çapında oldukça değerli böceklerdir, sadece bal üretimi için değil aynı zamanda insanlar ve ekosistemler için de önemlidir. Dünya çapında arıcılık endüstrisi, büyük ekonomik kayıplar yaşamaktadır. Bu kayıpların ana nedenleri; kirlilik, düşük kış sıcaklıkları, yüksek yaz sıcaklıkları ve çevresel streslerdir. Bu nedenlerden ötürü, konakçı ve gastrointestinal sistem (GIS) bakteri arasında etkileşimler çalışılarak sağlıklı arılar artırılmaktadır. Sağlıklı arıların bal midesinden probiyotik özellikli laktik asit bakterileirinin izole edilmesi, bu bakterilerin arılarda hastalık etmeni patojenlere karşı etkisinin incelenmesi ve bu bakterilerin arıların bağışıklık sistemini güçlendirmek amacıyla kullanılması hedeflenmiştir.

GİS mikrobiyata araştırmaları, bağırsak ortamlarının ekolojik ve işlevsel hareketlerini anlamamızı geliştiren yeni bir alandır. Bal arısı bağırsak mikrobiyotasının araştırılması oldukça faydalı bir alandır, çünkü bal arıları bal ve birçok arı ürünü(arı sütü, propolis,

arı ekmeği, balmumu) gibi değerli ürünler üretmenin yanısıra, insan tüketimine yönelik birçok mahsulün kritik tozlaştırıcılarıdır.

GİS bakterileri; arılara sağladıkları birçok faydanın yanı sıra, doğal GİS mikrobiyal topluluğu ayrıca kolonizasyon direnci olarak adlandırılan bir işlemle yabancı mikropların büyümesini kısıtlama yeteneğine sahiptir. 16S rRNA sekans sonuçlarına göre erişkin bal arısının GİS bakterilerinin %95'inden fazlasını phyla Firmicutes/Actiobacteria ve Proteobacteria'ya ait türler oluşturmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı; Anadolu ve Kafkas bal arılarındaki besin yollarını kolonize eden GİS mikrobiyata bakterilerini araştırmak ve karakterize etmek, kültüre bağlı yöntemler kullanarak bal arılarının bağırsak mikrobiyatasındaki bakteri türünü ve tayinini yapmaktır.

1.1 Bal Arısı (Apis mellifera L.)

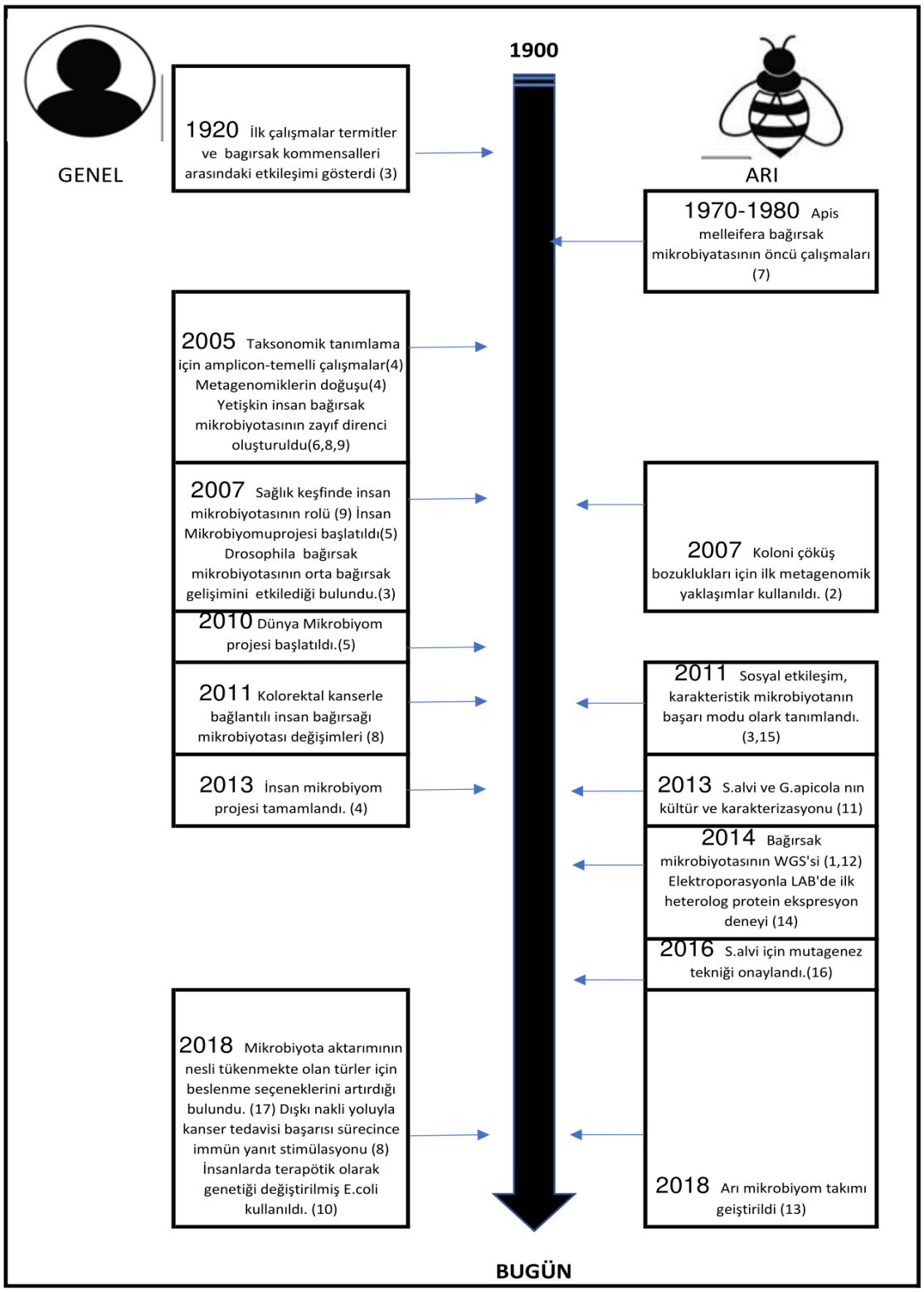
Bal arısı dünya çapında oldukça değerli bir böcek türüdür, sadece bal üretimi için değil, aynı zamanda insanlar ve ekosistemler içinde önemlidir. Ayrıca ekonomik olarak birçok ekin ve yabanıl florada tozlaşmada da görevlidir (vanEngelsdorp and Meixner 2010).



Şekil 1.1 Bal arısı (*Apis mellifera* L.)

Tarihi olarak; ilk arı fosili bundan 100 milyon yıl ve ilk insan fosili ise 300 bin yıl öncesine ait olduğu için biz yokken de arılar dünya üzeride mevcudiyetini sürdürüyolardı.

Çizelge 1.1 Arılarda ve diğer organizmalarda mikrobiyota araştırmalarının zaman çizelgesi



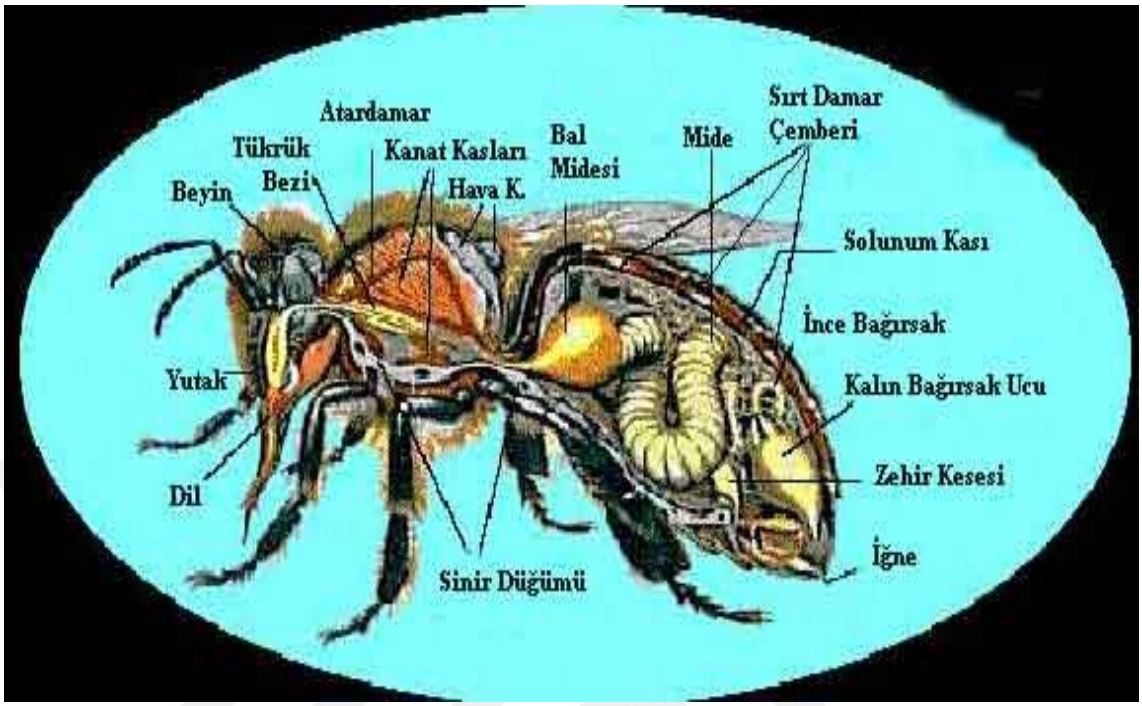
Arı kilometre taşları zaman çizelgesinin sağında gösterilirken, genel mikrobiyota kilometre taşları soldadır. Atıflar: (1) Corby - Harris et al. (2014b); (2) Cox - Foster ve diğ. (2007); (3) Engel ve Moran (2013); (4) Ferranti ve diğ. (2014); (5) Gilbert ve diğ. (2010); (6) Gilbert ve diğ. (2018); (7) Gilliam (1997); (8) Gopalakrishnan ve diğ. (2018); (9) Hall ve diğ. (2017); (10) Isabella ve diğ. (2018); (11) Kwong ve Moran (2013); (12) Kwong ve diğ. (2014); (13) Leonard ve diğ. (2018); (14) Maddaloni ve diğ. (2014); (15) Powell ve diğ. (2014); (16) Powell ve diğ. (2016b); (17) Reardon (2018). LAB, laktik asit bakterileri; WGS, tüm genom dizileme.

Bal arıları oldukça çalışkanlardır, bir grup arı 500 gram bal için yaklaşık 2 milyon çiçeği dolaşması gerekmektedir. Ayrıca çok hızlardır, saniyede 230 defa kanat çırpabilmektedirler. Balarılarında sadece dişi arılar iğneye sahip oldukları için sokabilirler ve sonrasında ölmektedirler. 170 koku alıcısına sahip balarıları çiçekleri bu şekilde gezerek bal üretmektedirler. (Greenpeace 2018).

1.1.1 Anatomi

Anatomik olarak; bal arısının 6 bacağı ve başının yanların 2 bitişik gözleri, başının üzerin tekil bir gözleri olmak üzere toplamda 5 gözlüdürler. 2 çift kanat, 1 nektar kesesi ve 1 de mideleri bulunmaktadır (Greenpeace, 2018).

Bir bal arısının vücudu baş, göğüs (toraks), karın (abdomen) olmak üzere üç bölüme ayrılmıştır. Sindirim (gastrointestinal) sistemi karın bölgesinde yer almakta olup katabolizmada farklı işlevleri ve gıda emilimini gerçekleştirebilecek ve çeşitli bakteriyel simbiyontları içerebilecek şekilde; bal midesi (kursak), orta bağırsak ve arka bağırsak olarak üç ana organa ayrılmıştır (Lamei 2018). Arının gastrointestinal sistemi ağızdan anüse uzanan özelleşmiş bir tüp şeklindedir. Her bölme, spesifik mikroorganizmaları destekleyen ayrı bir ortama sahiptir. Bu bölmeler bir dizi kommensal (ne yarar ne de zarar veren) veya faydalı bakteri topluluğunu barındırır (Martinson v.d. 2012).



Şekil 1.2 *Apis mellifera L.*'de bağırsak segmentlerinin yerleşimi. (Martinson 2012; Powell 2014)

Mikrobiyotanın taksonomik tanımlanmasında ise genel kullanım olarak; hem 'mikrobiyom' hem de 'mikrobiyota' daha büyük bir organizma veya yoğun ortamda yaşayan kolektif mikrobiyal topluluğa atıfta bulunsada 'mikrobiyom' terimi; genellikle kolektif genom veya genel genetik materyal olarak bilinmektedir.

'mikrobiyota' bu incelemede kullanacağımız tanımdır. Mikrobiyomun karakterizasyonu için (tanımlanabilmesi) için genellikle mikrobiyotanın karakterizasyonu ilk adımdır. Canlılarda vücut içinde (sindirim kanalı) ya da dışında (deri florası) birlik içinde (simbiyont) yaşayan mikroorganizmaların meydana getirdiği topluluğa (popülasyona) mikroflora ya da mikrobiyota adı verilir. Mikroflora, vücudumuzda kolonileşen ortak mikroorganizma havuzudur ve bakteri, arkea, virüsler ve tek hücreli ökaryotları içermektedir (Sammataro ve Yoder 2012).

Apis mellifera L.' de mikroorganizma taksonomisini belirlemek için güncel yaklaşımlar, öncelikle genomiktir. Yani, belirli bir genomik dizinin farklı çözünürlük seviyelerinde belirli bir mikrobiyal taksona (bakteri veya ökaryot) filumdan türe hatta suşa atanmasına dayanmaktadır (S.Romero et al. 2019). Mikrobiyotanın yararı ise, bağırsak mikroorganizmaları, metabolizma ve genel sağlık için önemli işlevler sunmuştur. Sindirilemeyen karbonhidratları immünomodülasyona ayırma işlevi bulunan mikrobiyota, birçok konak organizma için gereklidir (Hall v.d. 2017).

Tipik yöntemler, bir mikrobiyal çevresel örnekten genomik DNA'nın izole edilmesini ve ardından tüm genomun, spesisfik genlerin yada genomik bölgelerin dizilimini içerir; bu amplikon bazlı yaklaşımı tanımlamıştır (S.Romero et al. 2019).

1.1.2 Sınıflandırılması

Çizelge 1.2 Bal arısı (*Apis mellifera L.)*'nın sınıflandırılması

Alem: Animallia
Bölüm: Arthropoda
Sınıf: Insecta
Takım: Hymenoptera/Apocrita
Aile: Apoidea/Apidae
Cins: Apis
Tür: *Apis mellifera L*

Bal arıları bitkilerin canlı kısımları veya bitkilerin çiçeklerinde yer alan nektarları ile salğıladıkları tatlı maddeleri toplayarak, organizmalarında bileşimleri değiştirilip petek gözlerine depo edilip orda olgunlaşarak oluşan madde hastalık ve enfeksiyonlara neden olan birçok mikroorganizmayı inhibe etme özelliğine sahip olan bal'dır. (Hışıl ve Börekçioğlu 1986). Laboratuvar araştırmaları sonucu bal *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, ve Salmonella enterica, Ser. Typhimurium* gibi bakteriler üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. (Mundo ve ark. 2004). Bal içerindeki çeşitli bileşimlerden ötürü besin açısından zengin, sindirimi kolay, hastalıklara karşı tedavi

edici fonksiyonel bir gıdadır. Bu yüzden de balın antimikrobiyal ve antioksidant özelliklerine ulaşılmıştır. Baldaki ilk antibakteriyel özellik 1982 yılında keşfedilmiştir (Bogdanow, 1997).

1.2 Dünya ve Türkiye'de Önemi ve Üretimi

Ülkemiz de ve dünya da arıcılık ve en büyük getirisi olan balın yeri ve önemi çok büyük ve yaygındır. Günümüzde doğaya dönüşün artması nedeniyle arıcılığın ürünü olan bal; gıda/sağlık tıbbi kullanımı yanında alternatif tedavilerde de sıkça kulanılmaktadır (Garedew ve ark. 2004).

Çizelge 1.3 Dünya arıcılık verileri

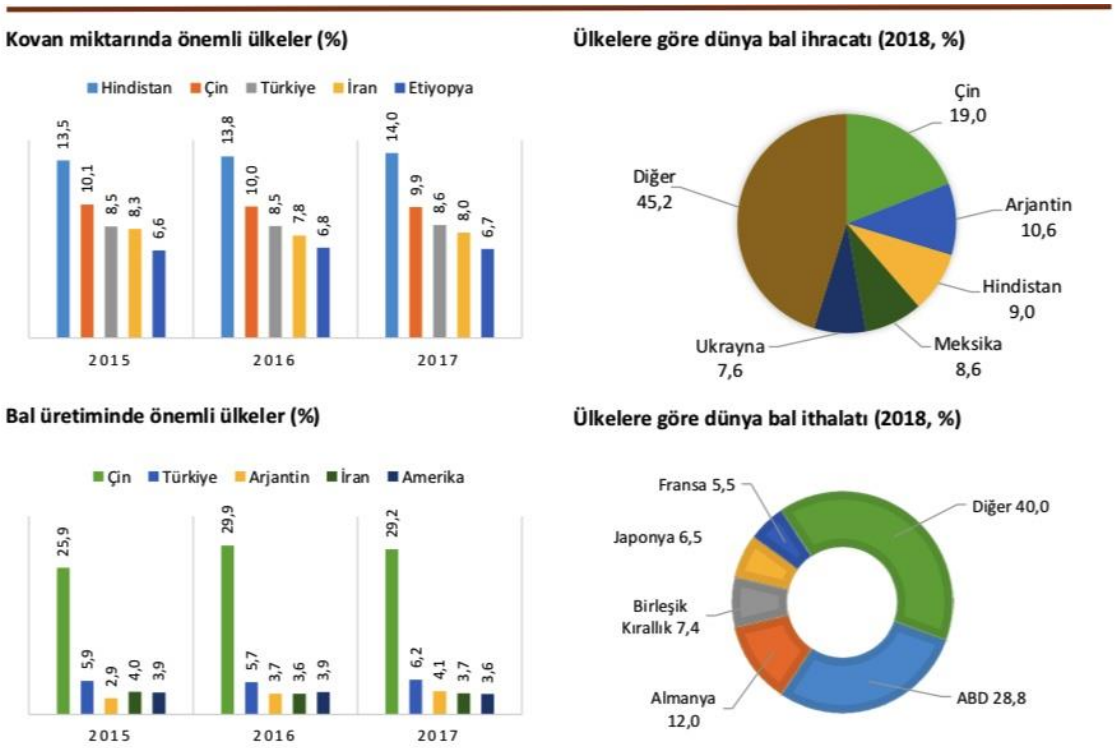
Ocak 2020, No: HÜ-01

Dünya Arıcılık Verileri (bin ton)

	2014	2015	2016	2017	2018	Değişim[3] (%)
Kovan Sayısı (bin adet)	87.414	88.985	90.413	91.000	-	0,6
Verim (kg)[1]	20,4	20,5	20,5	20,4	-	-0,5
Bal Üretim	1.784	1.825	1.859	1.861	-	0,1
Balmumu Üretimi	66	66	67	-	-	0,8
İthalat[2]	618	646	632	691	688	-0,4
İhracat[2]	614	641	627	670	648	-3,2

Kaynak: FAO, [1]/TEPGE hesaplamaları (kg/kovan), [2]/UN-Comtrade, (14.01.2020) [3]/Verisi bulunan son iki yılın değişimini göstermektedir

Arıcılıkta bal üretiminde verim kovan başına düşen bal miktarı ile değerlendirilmektedir. Bu kritere göre de; Dünya da bal üretiminde 2017 yılında 543 bin ton ile Çin 1. sırada, 115 bin tonluk üretimi ile Türkiye 2, Arjantin 76 bin ton ile 3. sırada bulunmaktadır. Bal üretiminde Çin lider konumda iken, toplam dünya bal üretiminin %29,2'lik bölümünü karşılamaktadır. AB ülkeleri % 12,3' lük oranla 2017 yılı bal üretimi verilerine sahiptir. Hindistan ise kovan sayılarında ise %14'lük payı ile lider konumda ve %9,9'luk pay ile Çin ikinci, Türkiye ise %8,6'lık pay ile üçüncü sırada bulunmaktadır (FAO).



Şekil 1.3 Dünya kovan ve bal verileri Uludağ Arıcılık Dergisi. (2008).

Bal dış ticareti Türkiye'de, süzme ve petek bal olarak iki şekilde gerçekleşmektedir. 2018 yılı bal ihracatının %81'lik önemli bölümünü süzme bal oluşturmaktadır. Üretilen bal geniş oranda yurt içinde tüketildiğinden dolayı; 2018 yılında toplam bal üretiminin az bir miktarı (%5,9) ihraç edilmiştir. Dünya çapında bal üretiminde ikinci sırada yer alan Türkiye, ihracatta ise 21. sırada bulunmaktadır. Bu durumun esas nedeni; yüksek bal maliyetinin Türkiye'nin uluslararası piyasada rekabet şansını azaltması ile açıklanabilmektedir. 2018 yılında ise bal ihracatı bir önceki yıla oranla %0,5 azalış gerçekleşmiştir ve 6.413 ton olarak gerçekleşirken 2019 yılı TÜİK geçici verileri incelendiğinde ise, bal ihracat bir önceki yıla oranla %23,1 düşerek 4.932 tona gerilemiştir. Bal ithalatı ise yıldan yıla büyük oranda değişiklik göstererek, kayda değer bir hacme sahip olamamıştır. Son yedi yılda ise en yüksek ithalat miktarı 2019 yılında bir önceki yıla oranla %41,1 artarak 32 ton olarak gerçekleşmiştir (TÜİK, 2020).

Çizelge 1.4 Türkiye arıcılık verileri Uludağ Arıcılık Dergisi. (2008).

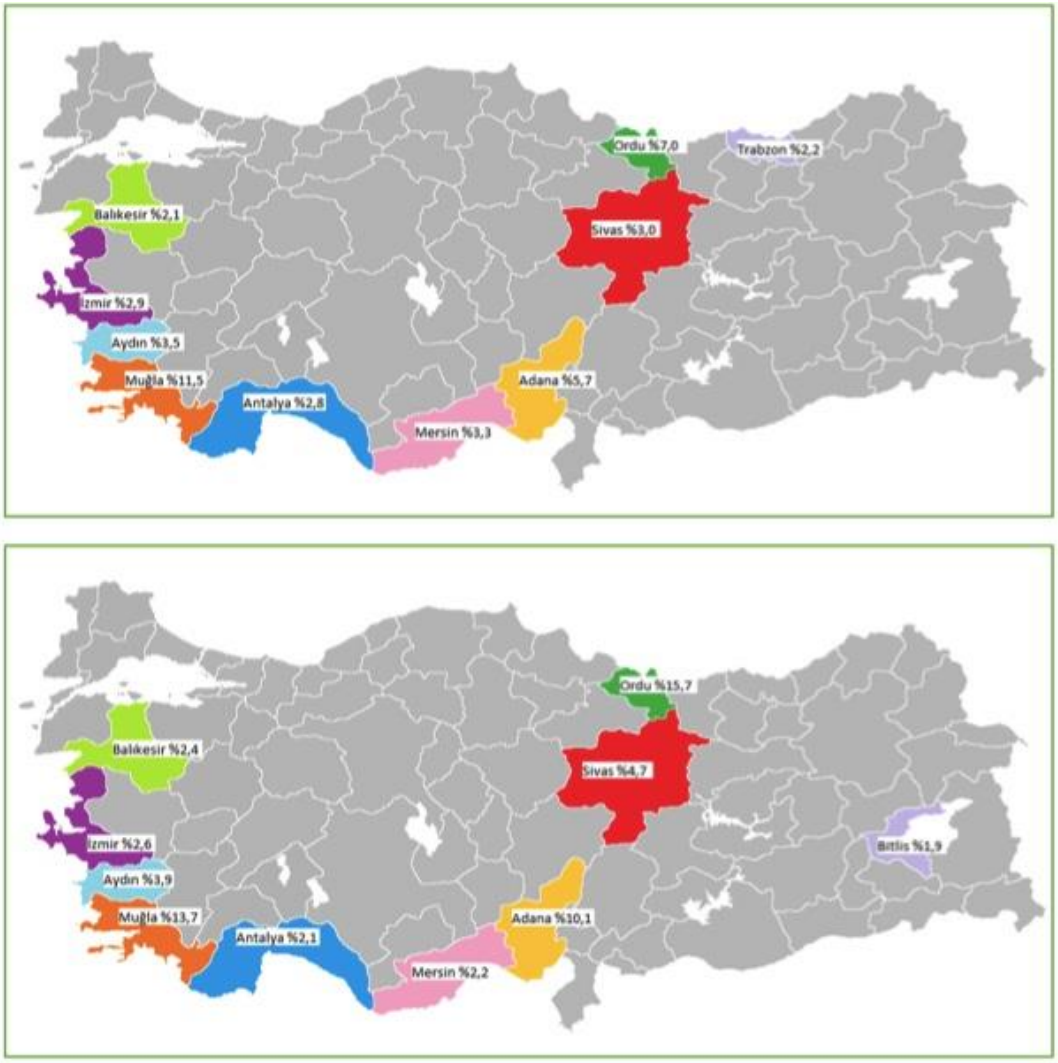
Türkiye Arıcılık Verileri (ton)

	2014	2015	2016	2017	2018	Değişim[1] (%)
Kovan Sayısı (1000 adet)	7.083	7.748	7.900	7.991	8.108	1,5
Verim (kg/kovan)[2]	14,62	13,96	13,38	14,32	13,31	-7,1
Bal Üretim	103.525	108.128	105.727	114.471	107.920	-5,7
İşletme Sayısı (adet)	81.108	83.475	84.047	83.210	81.830	-1,7
İthalat	11,95	0,09	1,02	0,27	22,33	8.264,8
İhracat	4.969	7.192	3.623	6.448	6.413	-0,5

Kaynak: TUİK (14.01.2020), [1]/Verisi bulunan son iki yılın değişimini göstermektedir, [2]/TEPGE hesaplamaları (kg/kovan)

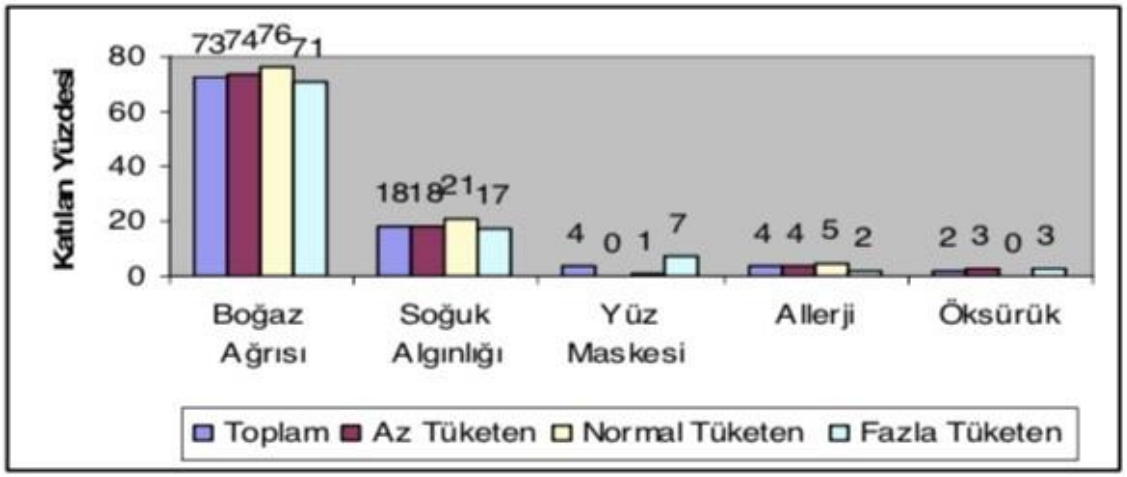
Kovan Miktarı; Türkiye kovan miktarı incelendiğinde ise, Türkiye 2018 yılında kovan sayılarında %11,5'luk paya sahip olan Muğla 935 bin kovan ile birinci, 559 bin kovan ile Ordu ikinci, 462 bin kovan ile üçüncü sırada ise Adana bulunmaktadır. Türkiye kovan miktarı 2017 yılına oranla 2018 yılında %1,5 olarak artış gözlenmiştir. Bölgesel bazda baktığımızda, kovan sayılarında %21,7'lik payı ile Ege Bölgesi lider konumda bulunmakta ve %16,6'lık pay ile de ikinci sırada Akdeniz Bölgesi yer almaktadır. Uludağ Arıcılık Dergisi. (2008).

Bal üretimi; Ordu 2018 yılında 17 bin ton bal üretimi ile birinci sırada bulunurken, 14,7 bin ton ile ikinci sırada Muğla, 10,9 bin ton ile üçüncü olarak Adana bulunmaktadır. 2018 yılında Muğla'nın 935 bin kovan ile kovan varlığında lider olmasına rağmen bal üretiminde ilk sırada yer alan Ordu, bal veriminin Muğla'dan çok olması sebeptir. Ege Bölgesi bal üretiminde %23'lük oran ile birinci sırada iken, %21'lik pay ile Doğu Karadeniz Bölgesi ise ikinci sırada yer almaktadır. Uludağ Arıcılık Dergisi. (2008).



Şekil 1.4 Türkiye kovan miktarı ve bal üretimi miktarı Uludağ Arıcılık Dergisi. (2008).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2000 yılında yapılan bir ankete göre tüketicilerin %65'inin düzenli olarak bal yedikleri, bu kişilerin 1/3'ünün balı şifa bulmak amacıyla tercih ettikleri belirlenmiştir. Bu 1/3'lük dilimdeki tüketicilerin de %73'ünün boğaz ağrısı, %18'inin soğuk algınlığı, %4'ünün allerji ve %2'sinin de öksürüğe karşı balı kullandıkları görülmüştür (Şekil 1.2.3). Şekil 1.2.3'de görüldüğü gibi yapılan ankete göre 274 tüketiciden %39'u haftada bir kez, %31'i 2-3 ayda bir kez bal yemiştir. Balın ayrıca, yüze maske yapılarak nemlendirici özelliğinden de yararlanıldığı ankete katılanlar tarafından belirtilmiştir (Anonim, 2000).



Şekil 1.5 Amerika da anket sonucu; Balın tüketim durumu (Anonim, 2000).

1.3 Bal Arısının Dünya ve Türkiye'deki Kaybı

"Journal of Apicultural Research" adlı uluslararası dergide yayımlanan verilere göre; balarası kayıplarının bugüne kadar ki olan bilgileri derlemek için Avrupa, Kuzey Amerika, Çin, İsaril ve Türkiye'de sistematik çalışmalar yapılmıştır.

Araştırma, Uluslararası COLOSS (Bal arısı koloni kayıplarının önlenmesi) ağını oluşturan 35 bilim adamı ve Kuzey Amerika'da Bilgilendirilmiş Arı Ortaklığı (BIP) kuruluşundan 15 bilim adamından oluşan bir ekip tarafından gerçekleştirilmiştir.

COLOSS sonuçlarına göre; Avrupa'daki ortalama bal arısı kayıpları, 2008-2009 kışında %7-22, 2009-2010 kışında ise %7-30 arasında değişim göstermiştir. Çalışmaya katılan tüm ülkeler için 2009-2010 döneminde yaşanan kış kayıplarının, 2008-2009 dönemindeki kış kayıplarından çok daha fazla olması önemli bir bulgu olarak kaydedilmiştir. 2009-2010 yılında Güneydoğu Avrupa ve Çin'in 5 bölgesindeki kış kayıpları düşük çıkmıştır. Kanada'nın 6 bölgesinde gözlenen kayıplar %16-25 arasında seyrederken, Nova Scotia'da %40'lık yüksek bir kayıp gözlenmiştir. Birbirini izleyen 5 sene boyunca ABD'deki kış kayıplarının %30 civarında olduğu kaydedilmiştir. Anket katılımcılarının, 2010-2011 kışında ortalama olarak kolonilerinin %38.4'ünü kaybettikleri bildirilmiştir. ABD'de ise koloni kayıplarının toplamı ise %29 çıkmıştır.

Çalışmanın Türkiye ayağı ise TÜBİTAK ve Türkiye Arı Yetiştiriciler Birliğinin katkılarıyla gerçekleşti. Türkiye'de 2009 yılında ortalama kayıp %15, 2010 yılında %22, 2011 yılında ise %25 civarında olmuştur.

Çizelge 1.5 Türkiye arı kaybı oranları

Türkiye	
2009	15%
2010	22%
2011	25%

Bal arılarının ekonomik önemi sadece ürettikleri bal ile ilgili değildir ("Journal of Apicultural Research"). Bal arılarının yararları arasında ürettikleri bal en çok bilineni olmakla birlikte arıların tozlaşma yolu ile floranın korunması ve tarımsal üretime katkıları bal üretiminin kat kat üstünde bulunmaktadır (Southwick an Southwick, 1992, Morse and Calderone, 2000).

Her canlı türünün değişen çevre koşullarına uyum sağlayarak varlığını sürdürebilmesi için genetik çeşitlilik vazgeçilmez bir ön koşuldur. Yeterli genetik çeşitliliğe sahip olmayan canlı türleri değişen çevre koşullarına ayak uyduramayarak yok olmaya mahkumdur (Kence, 1987).

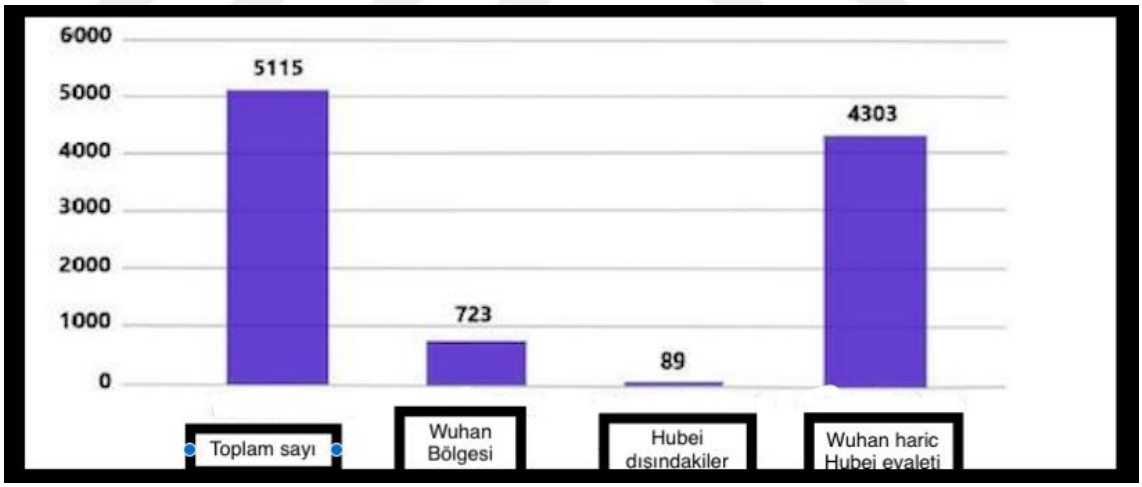
1.4 Arıcılıkla İlgili Günümüz Verileri (Covid-19 Salgını)

15 Nisan'da Johns Hopkins Coronavirus Kaynak Merkezi'nden alınan verilere göre, dünya çapında onaylanmış COVID-19 vakası sayısı 2.0 milyonu aşmıştır.

Hubei eyaletinde, yerel arıcılar birliği tarafından Çin'deki COVID-19 merkez üssünde arıcılar üzerine, toplam 5115 arıcı 723'ü Hubei'nin salgın merkez üssü Wuhan'da olmak üzere 23 Şubat - 8 Mart 2020 tarihleri arasında bir anket çalışması yapılmıştır. Bu anket sonuçlarına göre arıcıların hiçbirinde COVID-19 ile ilişkili semptomların gelişmediği

ve sağlıklarının tamamen normal olduğu belirlenmiştir. Bundan sonra Wuhan'daki beş apiterapistle görüşülmüş ve apiterapi kliniğinde 121 hasta takip edilmiştir. Bu hastalar Ekim 2019'dan Aralık 2019'a kadar apiterapi almış ve tüm beş apiterapisti apiterapi alışkanlığına sahip olduğu bildirilmiş (apiterapi, bazı hastalıkları tedavi etmek veya önlemek için bal arısı sokması ya da arı zehrinin kullanılması anlamına gelir). Hiçbiri koruyucu önlem olmadan, beş apiterapistten ikisi şüpheli COVID-19 vakası ve diğerleri doğrulanmış COVID-19'a maruz kaldı, ancak hiçbiri sonunda enfekte olmamıştır. 121 hastadan üçünün SARS-CoV-2 teyit edilen yakın aile üyeleri ile yakın teması olmasına rağmen hiçbiri SARS-CoV-2 tarafından enfekte olmamıştır.

Arıcıların daha az yoğun nüfuslu kırsal yerlerde yaşadıkları için SARS-CoV-2 ye daha az temasta olduğu varsayılabilir. Ancak beş apiterapist ve onların hastaları Wuhan'daki yoğun nüfuslu alanlar da bulunmaktadır. Bu insanların ortak bir yönü var: arı sokmasına karşı tolerans geliştirirmiş olduklarıdır. Arı zehri ve SARS-CoV-2 (Toxicon 181 (2020) 69–70)



Şekil 1.6 Hubei'deki arıcıların araştırma histogramı

Arı sokması alerjik reaksiyonlara neden olabilir ve hatta bağışıklığın aşırı strese tepkisi nedeniyle ölüme yol açar (Vazque-Revuelta ve Mdrigal-Burgaleta, 2018). Arı zehri vücudun bağışıklık sistemini etkileyebilir ki bu da insanda SARS-CoV enfeksiyon kontrolünde önemli bir rol oynayan düzenleyici T hücrelerinin artmasına neden

olamaktadır. (Caramalho vd, 2015). Bağışıklık sisteminin uyarılması arı zehrinin neden olduğu SARS-CoV-2'ye duyarlılığı azaltır mı? Bunu test etmek için, hayvan deneylerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma için Maymunlar uygun olabilir. Çalışmada aynı cins ve yaşta olan Maymunlar iki deney grubuna ayrılabilir. Bir grup günlük arı sokmalarından sonra arıya toleranslı hale getirilebilmektedir. Diğer grupta herhangi bir müdahale olmamıştır. Daha sonra bu iki grup SARS-CoV-2 ile kontamine olmuş aynı ortamda yetiştirilebilirler. SARS-CoV-2 ile enfekte olup olmadığını anlamak için birden fazla test yapılmıştır (Toxicon, Elsevier 2020).

Amacımız uygun araştırma ve testlerle; SARS-CoV-2 Aşı yokluğunda, eğer bu yöntem işe yararsa, o zaman COVID-19'a karşı zafer için bir umut sunulabilir (Toxicon, Elsevier 2020).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bal arılarını bal midesinde ki probiyotik özellikteki bakterilerin taramasını yaparak, arıların bağışıklık sitemini geliştirmek antiboyotik ve kimyasal tedavi olmaksızın dirençli arılar üretmeye yardımcı olmaktır (Uğraş, S. 2017).

Rıyadh ve AL-Baha olmak üzere iki ayrı bölgedeki balarılarında gözlemlenen; bağırsak mikrobiyal topluluklarındaki farklılık, bağırsak fizyolojik koşullarındaki farklılıklardan, tozlaşma ortamındaki geçici bakterileirin varlığından, bal arılarının yaşından ya da coğrafi bölgelerden etkilenen ortamların mevsimsel özellikleirnden kaynaklanıyor olabilir (Khan, et al. 2017).

Bal arısı bağırsak mikrobiyotasın da tutarlı ve karakteristik bir topluluk keşfedildi ve bu mikrobiyal türlerin işlevesel özellikteki rolü araştırılmış (Raymann and Moran,2018).

Mikrobiyom araştırma alanının önümüzdeki yıllarda büyümeye devam etmesi, moleküler konakçı-mikrobiyota etkileşimini ortaya koyaması ve biyolojik çevrenin etkilerini geliştirmesi beklenmektedir. Balarası bağırsak ortamında, moleküler ekolojisi ve fonksiyonel dinamikleri ile ilgili somut verilere ulaşmak mümkün olmuştur. Son 10 yılda, temel mikrobiyal bileşenlerin tanımlanması, işlevsel katkılarının kısmen ortaya çıkarılması ve geneteik mühendisliğine ilk girişimler gibi önemli adımlar atılmıştır (Romero, et al. 2019).

Bal arısı araştırma yöntemlerininin bir parçası olan balarılarıyla ilişkili mikrobiyal toplulukları tanımlamada yeni nesil dizilemeye dayanan kültürlere dayalı olmayan yöntemleri açıklmaktadır. Arı bağırsağı simbiyotları ve balarıları sağlığı hakkında bilgilerimizi geliştirmemize yardımcı olmaktadır (Engel, et al.2013).

Arı sağlığı ve hastalığına büyük ilgi gösterilmesinden dolayı arılardaki normal mikrobiyal flora hakkında fazlaca bilgi çeşitliliği sağlar. Böceklerle yakın, simbiyotik

bir ilişki içinde yaşayan bakteriler, besin sentezi, sindirim ve hastalık direncinin sağlanması üzerine yararlı verileri açıklmaktadır (Kwong et al.2013).

Hedef DNA/RNA dizilerinin amplifikasyonu ve tanımlanmasını, modifiye PZR bazlı, daha duyarlı ve özgül yöntemlerin geliştirilmesine yönelik denemeler yapılmıştır. Bu tez çalışmasında, DNA'nın belirli hedef bölgelerini çoklu primerler yardımıyla çoğaltılmıştır (Böttger 1989, Giovannoni vd. 1990, Ward vd. 1990, Muyzer vd. 1993, Ludwig ve Schleifer 1994, Amann vd. 1995, Head vd. 1998, Harmsen ve Karch 2004).

Bal üzerine yapılan laboratuvar çalışmaları sonucu bal da mikroorganizma türleri nedeniyle balın antimikrobiyal ve antioksidant özelliğinden yararlanarak hastalıkların tedavisinde ve enfeksiyonlarda kullanılabilceği durumunu kanıtlar niteliktedir (Özmen ve Alkın 2006).

16S rDNA'ya dayalı dizi analizinde nükleik asitlerin kimyasını, yapısal özelliklerini tanıma ve ayırmaya dayalıdır. DNA'lar protein ve farklı enzimlerin sentezlemesini gerçekleştirir. Bu durum, hücre metabolizmasında gerekli olan enzimleri sentezleyerek gerekli kodun açıklanmasını ve anlaşılmasını sağlar (Jill, 2004).

RNA 16S de saklı bölgelerden biri yada diğerleri hibritleme yeteneğinde olan sentetik bir yada birden çok oligonükleotidlerle molekül tanımla yöntemleri uygulanmaktadır (Thorne vd.1998).

1980'li yıllarda bakteri tanımlamak için yeni yöntemler gelişmiştir. Woese (1985), laboratuvar deneylerinde bakterilerin yaşam formlarını belirleyebilen genetik kodlarındaki stabil parçaların karşılaştırlmasıyla, bakterilerin filogenetik ilişkilerin belirleneceğini saptamıştır. Prokaryotların filogenetik incelemesiyle ilgili yeni oluşumlar, rRNA'nın ayırım tekniğinin ilerlemsine de neden olmuştur. İlk molekül küçük parçaların ayırımını kolaylaştıran RNA 5S (120nt) dır. Ulaşılan sonuçlar; hem cins hem de tür bazında ayırımlara izin vermeden sadece büyük evrim sırasını

belirlemeye yardımcı olmuştur. rRNA 16S bölgesinden (1500nt uzunluğunda) elde edilen sonuç yarar sağlamıştır (Böttger 1989, Kolbert ve Persing 1999).

1983 yılında Kary B. Mullis'in Thermus aquaticus'dan izole edilen Taq DNA polimerazı, PZR tekniğinde başarıyla kullanılmış, spesifik DNA dizilerinin in vitro koşullarda çoğaltılmasına olanak sağlamıştır. RNA 16S'teki oligonükleotidlerin dizilişlerindeki karşılaştırma, bir bakteri filogenetiği ve sistematik incelemeler için kullanılmaktadır. Hedef DNA/RNA dizilerinin amplifikasyonu ve tanımlanmasını, modifiye PZR bazlı, daha duyarlı ve özgül yöntemlerin geliştirilmesine yönelik denemeler yapılmıştır (Böttger 1989, Giovannoni vd. 1990, Ward vd. 1990, Muyzer vd. 1993, Ludwig ve Schleifer 1994, Amann vd. 1995, Head vd. 1998, Harmsen ve Karch 2004).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez süresince uygulanan işlemler;

(1) Arı örnekleri toplanmıştır.
(2) Arıların diseksiyonu ile sindirim sistemleri çıkartılmıştır.
(3) Arıların sindirim sitemleri katı besi yerlerinde geliştirilmiştir..
(4) Basit boyama- Gram boyama yapılmıştır.
(5) Gelişen bakterilerin genomik-DNA izolasyonu, rapd-PCR ve 16S PCR ile karakterize edilen bakteriler sekansa dizi analizine gönderilmiştir.
(6) Sanger Dizi yöntemi ile sekanslanan örnekler FİNCHTV, BioEDİT, ITOL ve MEGA programları ile tür tanımlama ve filogenetik ağaçları hazırlanmıştır.

3.1 Bal Arısı Örneklerinin Toplanması

Deneylerde kullanılacak bal arısı örnekleri Ankara Üniversitesi'den Prof. Dr. İrfan Kandemir hocamızın yardımları ile Anadolu, Kafkas ve Ankara bal arıları toplanarak temin edilmiştir.

Temin edilen bal arıları Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarına getirilmiş, mikroskop altında herhangi bir olası kontamianasyonu engellemek amacıyla streil pens yardımı ile 1ml serum fizyolojik içeren steril mikrosantrifüj tüpler içerisine alınmıştır. Arılardan çıkarılan mide-bağırsak sistemleri homojenizasyon sağlanana kadar vortexlendikten sonra (10 dakika) örneklerin seri dilüsyonları yapılmış ve beş farklı besi ortamına (TGE Agar; Tripton Glukoz Yeast Ekstrakt Agar, FYP Agar; früktoz pepton yeast ekstrakt agar, MRS Agar; DE Man, Rogosa Sharpe agar, TOS Agar; TOS-propionat agar; LB Agar; Luria-Bertani) 100µL yayma plaka ekimler yapılarak 48 saat 37 °C'de gelişimi için inkübasyona bırakılmıştır.

3.2 Saf kültürlerin hazırlanışı

İnkübasyon sonucu gelişen kolonilerden farklı tipte morfolojiye göre sahip olanlar seçilmiştir. Seçilen koloniler uygun sıvı besi yerlerine aktarılmış ve ardından 37 °C de 48 saat etüv de inkübasyona bırakıldıktan sonra çizgi ekimi tekniği kullanılarak öze yardımı ile ilk izole edildikleri besi ortamları dikkate alınarak uygun katı besi ortamlarına ekimleri yapılmış ve saflıkları kontrol edilmiştir. İzole edilen bakteri örnekleri lokasyonuna ve geliştiği besi yerine göre isimlendirilmiştir.

Çalışma da kullanılan besi yerleri ve kimysal bileşenleri; besiyerleri uygun miktardaki distile su ile karıştırılarak çözünmesi sağlandıktan sonra katı besiyeri için ise %1.5 lik agar eklenmiştir. Sterilizasyon işlemi içinse 121°C de 15 dakika süreyle yapılmıştır.

Luria Bertani (LB) Besiyeri

10 g/L Tryptone

5 g/L Yeast Extract

5 g/L NaCl

Tripton Glukoz Ekstrat (TGE) Besiyeri

10g/L Glukoz

10 g/L Yeast Extract

10g/L Trypton

1g/L Tween80

0,05g/L MnSO4

0.05g/L MngSO4

Bu içerikler 100 ml distile su içerisinde çözülür, pH 6.8'e ayarlanır. Katı besiyeri hazırlamak için üzerine % 1.5 agar eklenmiştir 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

MRS Besiyeri (52.2gr/l)

Ticari olarak satın alınan ürün protokolüne uygun olarak hazırlanır.

Fruktoz Yeast Peptone (FYP) Besiyeri

%1 fruktoz

%0,5 polipepton

%0,2 sodyum asetat

%1 yeast ekstrat

%0,05 tween80

%0,02 magnezyum sülfat

%0,001 demir sülfat

%0,001 manganaz sülfat

%0,001 sodyum klorit

%0,005 sodyum azid

(TOS) Propionate Agar Besiyeri; Ticari olrak satın alınan bir besi yeri sadece distile su eklenek hazırlanmıştır

3.3 Saf Kültürlerin Stoklanması

Seçilen bakteri izolatlarının çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılabilmesi için bakteriler % 50'lik gliserol içerisinde stoklanarak -80°C de saklanmıştır. Sıvı besi yerinde 24 saat 37°C de geliştirilen bakterilerden alınan 1ml steril serum fizyolojik yardımı ile iki kez yıkanmıştır. Yıkamalar sonucu elde edilen pellet %50'lik gliserol içerisinde çözülmüş -80°C de saklanmıştır.

3.4 Bakterilerin Morfolojik Olarak Ayrılması

Basit Boyama: Bakterilerin hücre şekllerini belirlemek amacıyla basit boyama yapılmıştır. 4 farklı besiyerinde (LB, TOS, TGE, FYP) geliştirelen bakteriler streril kürdan yardımıyla lam üzerine yayılıp ateş yardıyla kurutulup üzerine metilen mavisi boyası eklenip 5 dakika kadar bekledikten sonra ddH2O ile yıkandıktan sonra mikroskop altında incelmesi yapılmıştır. (Benson,1985)

Gram Boyama: Gram boyama da NutrientBroth da gelişmiş olan her bir izolatdan 50µL şer alınarak lam üzerine pipet yardıyla yayıp alev ile kurutarak hazırlanan lam kristal viyole ile muamale edilip kurumaya yakın ddH2O ile yıkanıp 3-5 dakika lügolle teması sağlanıp alkolle yıkanmıştır. 1 dakika kadar safranin ile temas edip tekrar ddH2O ile yıkanmıştır. Daha sonra kurumaya bırakılıp mikroskop altında incelmesi yapılmıştır.
Gram negatif: pembe-kırmızı renkli hücreler

Gram pozitif: mor-mavi renkli hücreler olmak üzere ayrım yapılmıştır.

3.5 Bakterilen Stok Kültürlerinin Aktifleştirilmesi

-80 de gliserol içerisinde bekletilen bakteri stok kültürleri gelişim gösterdiği TGE sıvı besi yerinde 48 saat 37°C de inkübasyon yapılarak aktifleştirilmiştir.

3.6 Genomik DNA İzolasyonu (Manuel Yöntem)

TGE besiyerinde 48 saat 37 °C de geliştirilen ve aktifleştirmesi yapılan bakteri stok kültürler 1,5 µL lik ependorf tüplerine 5 kez 13,200 rpm de 1 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır.

Tüplerde kalan pellet kısma 200 µL spheroplastbuffer eklenir ve 37°C de 15 dakika inkübe edilmiştir.

50 µL liziz buffer-1 ve 50 µL liziz buffer-2 eklenir ve 65 °C de 15 dakika inkübe edilir.

Ardından 100 µL N3 eklenir minik bir vortex işleminden sonra 15 dakika buzda bekletilmiştir. Sonrasında 13.000 rpm de 20 dakika 4 °C de santrifüj işlemi yapılmıştır.

400 µL süpernatan pipet yardımıyla alınıp yeni bir tüpe aktarılır ve 400 µL isopropanol eklenip 10 dakika oda sıcaklığın da bekletilmiştir. Sonrasında yine 20 dakika en yüksek devirde 14.000 rpm de 4 °C de santrifüj yapılır ve süpernatan atılmıştır.

Dipte kalan pellet %70 lik 100 µL alkol ile yıkanır ve 14.000 rpm de 5 dakika santrifüy yapılmıştır. Süpernatant atılır ve pellet kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan pelletler 50 µL buffer/su ile çözülüp, homojenlik sağlanması açısından 65 °C de 1saat inkübe edilip hazır olan DNA izolatlarının ölçümleri yapılmıştır.

Bakterilerden izole edilen genomik DNA örnekleri sonra ki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C de muhafaza edilmiştir.

3.7 Saflık ve Miktar Tayini

Genomik DNA izolasyonundan elde edilien DNA örnekleri saflık ve miktar tayinlerini NANODROP (Wilmington,USA) spektrofotometrede DNA çözmede kullanılan TE buffer ile 1,5µL DNA örneğinden alınarak ölçümleri yapılmıştır. DNA örnekleri 260nm/280nm değerleri ölçülmüş ve DNA örneklerinin konsatrsyonları ng/ml olarak kayıt edilmiştir. (Sambrook Russell 2001).

3.8 Agaroz Jel Elektroforezi

Genomik DNA izolasyonundan elde edilen ve nanodropda ölçümleri yapılan DNA örnekleri %1 lik agaroz jel ile elektroforezi hazırlanarak görüntülenir. (Sambrook Russell 2001).

Jel elektroforezi için 100 ml 1XTBE (Tris-Borik asit-EDTA) elektroforez tamponuyla 1gr agaroz mikrodalga fırın yardımıyla çözünmüştür. Hazırlanan jelin sıcaklığı düşmeye başladığında içerisine %2 Etidyum bromit (10mg/ml) eklenip homojen hale getirdikten sonra tarakları hazırlanmış elektroforez plaklarına kabarcık yapmadan dökümü yapılmıştır ve 1 saat kadar donması beklenmiştir. İşlemler sonucunda donan jelden taraklar hassas bir şekilde çıkarılıp, elektroforez tankına yerleştirilen jel plakanın üzerini geçene kadar 1XTBE tampon çözelti eklenmiştir. -20 de saklanan DNA örnekleri kısa bir süre çözünmesi beklendikten sonra 7 µL DNA örneği ve 2 µL yükleme boyası parafin üzerinde karıştırlarak mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez 100 V'da 40 dakika DNA lar – den + ya doğru koşturulmuştur. Kullanılan Markör; Fermentas GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder dır.

Jel elektroforezi 365 nm dalga boyu UV ışını yardımyla görüntüleri alınıp kaydedilmiştir.

TBE TAMPONU (Tris-Borik asit-EDTA)1X

İçerik (pH:8.3)

Tris	10.8 g
Borik asit	5.5 g
EDTA (1M)	0.94 g
Distile su	1 lt

pH: 8.3

YÜKLEME BOYASI

İçerik

Bromofenol blue	0.25 g
Sakkaroz	40 g
Distile su	100 ml

Bu bileşenler 100 ml distile suda çözülerek 0.22µm çapındaki Sartorius membran filtreden geçirilir ve +4°C'de saklanmıştır.

ETİDYUM BROMİT ÇÖZELTİSİ

İçerik

Etidyum bromit 1.0 g

Distile su 100 ml

Bu bileşenler 100 ml distile suda çözülerek 0.22µm çapındaki Sartorius membran filtreden geçirildi ve +4°C' de stok olarak koyu renk, ışık almayan bir şişede saklanmıştır.

3.9 RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

Rastgele dizilimde DNA üzerindeki çeşitli bölgeleri tek bir primer kullanarak çoğaltılan bakteriler tanımlanıp polimorfizmi üzerinden karakterizasyonu belirleyen yaygın bir yöntemdir (Sineo 1993, Brown 1995). RAPID-PZR yöntemi; tür, alttür ve suşlar arasındaki genetik farklılıkları belirlemede yardımcıdır. Bu çalışmada da türler arasındaki genetik farklılıkları ortaya koymak amacıyla 4 farkı primer ile RAPID-PZR uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan RAPID primerleri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 RAPID-PZR Primerleri

	PRIMER ADI	BAZ DİZİSİ 5'-3'	BAZ SAYISI	Tm('C)
1	OPA-06	5'-GTT CCC TGA C-3'	10	24
2	OPA-07	5'-GAA ACG GGT G-3'	10	40
3	OPA-08	5'-GTG ACG TAG G-3'	10	32
4	OPA-09	5'-GGG TAA CGC C-3'	10	38

3.10 16S rDNA PZR ve Dizi Analizi

16S rDNA PZR'ı için genomik olarak izole edilen DNA'lar öncelikle RAPID-PZR işlemine tabi tutulup sonrasında 16S rDNA dizi analizi yapmak için ileri (5'-3') ve geri (3'-5') olmak üzere iki primer kullanılarak 16S rDNA bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'yla çoğaltılarak baz dizileri belirlenmesi yapılmaktadır. Yapılan PZR sonuçları agaroz jel elektroforezde görüntüleri alınarak polimorfizmi farklı olanlar seçilerek baz dizileri belirlenmesi yapılmıştır. Baz dizileri BM Biosis firması tarafından belirlendikten sonra elde edilen sonuçlar veri tabanındaki mikroorganizlara ait baz sıraları ile karşılaştırılarak tanımlamaları yapılmıştır.

16S rDNA-23S rDNA ISR (Internal spacer region) bölgesi için kullanılan primer çifti;
TAACACATGCAAGTCGAACG 20 baz sayılı Tm;55
TACCTTGTTACGACTT 16 baz sayılı Tm;44 olan baz çifti kullanılmıştır.
16S-23S rDNA ISR bölgeleri organizmalar arasında bulunan "tRNA gen insersiyonlarından" dolayı hem uzunluk hem de dizi bakımından farklılık gösterdiğinden 16S rDNA yapısal geni ile karşılaştırıldığında daha fazla çeşitlilik göstermkte ve bu varyasyon birbiri ile yakın ilişkili suşların ayrımında kullanılabilmekte ve bazı bakteri cinslerinde, ISR bölgelerinin direk amplifikasyonu tür seviyesinde ayırt edici bir tiplendirme sağlamaktadır.

16S rDNA'ya dayalı dizi analizinde nükleik asitlerin kimyasını, yapısal özelliklerini tanıma ve ayırmaya dayalıdır. DNA'lar protein ve farklı enzimlerin sentezlemesini gerçekleştirir. Bu durum, hücre metabolizmasında gerekli olan enzimleri sentezleyerek gerekli kodun açıklanmasını ve anlaşılmasını sağlar (Jill 2004).

1980'li yıllarda bakteri tanımlamak için yeni yöntemler gelişmiştir. Woese (1985), laboratuvar deneylerinde bakterilerin yaşam formlarını belirleyebilen genetik kodlarındaki stabil parçaların karşılaştırlmasıyla, bakterilerin filogenetik ilişkilerin belirleneceğini saptamıştır. Prokaryotların filogenetik incelemesiyle ilgili yeni oluşumlar, rRNA'nın ayırım tekniğinin ilerlemsine de neden olmuştur. İlk molekül

küçük parçaların ayırımını kolaylaştıran RNA 5S (120nt) dır. Ulaşılan sonuçlar; hem cins hem de tür bazında ayırımlara izin vermeden sadece büyük evrim sırasını belirlemeye yardımcı olmuştur. rRNA 16S bölgesinden (1500nt uzunluğunda) elde edilen sonuç yarar sağlamıştır. (Böttger 1989, Kolbert ve Persing 1999).

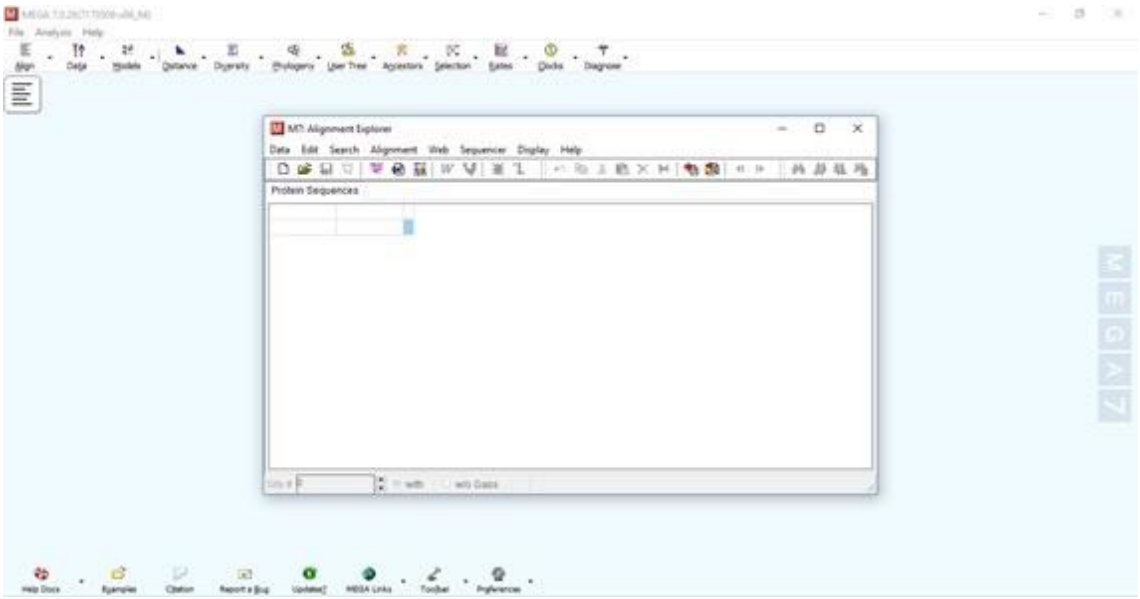
16S rDNA dizi analizi; evrimsel olarak molekülün farklı kısımları üzerinde fonksiyonel baskının çeşitli seviyelerde ifade eden yüksek derece korunmuş bölgeler ile değişebilen bölgelerde de yer aldığını açığa çıkarmıştır. Sonuç olarak; değişken bölgeler yakın akraba organizmaları karşılaştırıken, korunmuş bölgeler ise uzak akrabları gruplandırmaya olanak sağlar. 16S rRNA molekülleri, ortak bakteri merkezine doğru gidebilmek ve evrim yönünü, önemini, hızını belirlemek için kısa zamanda karşılaştırmalardan faydalanmak için kullanılmaktadır (Böttger 1989). Ayrıca, ayırım tekniklerinde de 16S rRNA'nın yapısal özelliklerinden faydalanılmaktadır. RNA 16S de saklı bölgelerden biri yada diğerleri hibritleme yeteneğinde olan sentetik bir yada birden çok oligonükleotidlerle molekül tanımla yöntemleri uygulanmaktadır. (Thorne vd. 1998). Moleküler tanımlama yöntemlerinde 16S rRNA üzerinde fazlaca bilgi edinmede kullanılmış ve hızlı ayırım teknikleri geliştirlmiştir. Hedef DNA'yı çoğaltmada enzim kullanılır ve teorik olarak bir kopya DNA tanımlanmaktadır.

1983 yılında Kary B. Mullis'in Thermus aquaticus'dan izole edilen Taq DNA polimerazı, PZR tekniğinde başarıyla kullanılmış, spesifik DNA dizilerinin in vitro koşullarda çoğaltılmasına olanak sağlamıştır. RNA 16S'teki oligonükleotidlerin dizilişlerindeki karşılaştırma, bir bakteri filogenetiği ve sistematik incelemeler için kullanılmaktadır. Hedef DNA/RNA dizilerinin amplifikasyonu ve tanımlanmasını, modifiye PZR bazlı, daha duyarlı ve özgül yöntemlerin geliştirilmesine yönelik denemeler yapılmıştır (Böttger 1989, Giovannoni vd. 1990, Ward vd. 1990, Muyzer vd. 1993, Ludwig ve Schleifer 1994, Amann vd. 1995, Head vd. 1998, Harmsen ve Karch 2004).

3.11 Filoğenetik Ağaç Çizimin de Kullanılan Programlar

Sanger Dizi yöntemi ile yapılan diziler, Finchtv programı ile diziler açılıp, okunmuş ve not defterine dizilerin önce adı sonra dizilenmiş tepe kısımları yapıştırılmıştır. NCBI blast programında yorumlanmış ve MEGA programında değerlendirilmiştir.Komşu birleştirme yöntemi ile diziler birleştirilmiştir. En iyi temelli algoritmalar tüm muhtemel ağaçları oluşturup daha sonra bu ağaçlar içinden gerçek evrimsel mesafeler ile en iyi örtüşen ağacı seçtiği için komşu-birlrştirme yöntemine başvurulmuştur.

Mega7 programında; dizi hizalaması Mega programı aracılığıyla ClustalW kullanarak yapıldı. Yapılan dizi hizalama filogenitik çizimi için kullanıldı. Filogenetik ağaç MEGA7 programında maksimum komşu-birleştirme yöntemi kullanılarak oluşturuldu ve İTOL veri tabanı kullanılarak görselleştirildi. İTOL veri tabanı yeni bir filogenetik ağaç oluşturulmasında ve filogenetik ağacın görselleştirilerek evrimsel süreçler arasındaki ilişkiyi daha belirgin hale getirebilmesinde kullanılmıştır.



Şekil 3.1 Mega 0.7 Programı



Şekil 3.2 İTOL veri tabanı

NCBI gibi veri tabanından ilgili diziler indirilir. Sonrasında dizilerin hizalanması ve ağaç oluşturmak için olası filognetik programlardan biri seçilmiştir. BLAST; GenBank veri tabanına ait, nükleik asit ve protein sekanslarının analizini yapmada bir hizalama arama motorudur. Homoloji araştırması olarak, kendi dizilerimizin veri tabanındaki karşılaştırmasını yapmada kullanılır. Son aşamada ise, ağacın bir program yardımı ile çizilmesine ihtiyaç vardır. Her program kendine özgü arayüze ve formata sahip olduğundan her bir aşamaya geçişte gerekli dönüşümler yapılır. MEGA7 tek bir kullanıcı arayüzle dört aşamayı tek bir ortamda gerçekleştirir bu yüzden dosya formatlarını birbirine dönüştürme gereksinimine ihtiyaç bırakmayan entegre bir programdır. İstenildiğinde de belirli adımlarda başka programların kullanılmasına imkan tanır. (Baloğlu, 2015).

Filogenetik ağaç ve filogeni; dallarla bağlanmış düğümler bulunan ağaç benzeri bir diyağramdır. İnsanlarda akrabalık ilişkilerini gösteren soy ağaçlarıdır. Filogeni bu soy ağacı anlayışıyla, daha büyük taksonlar arasındaki akrabalık ilişkileirni göstermek üzere geliştirilmiştir. Moleküler filogeni de bu akrabalık ilişkileirni moleküler düzeyde benzer ve farklılıkları incelemek için kullanılır. Filogeni operasyonel taksonomik birim (OTU) setleri arasında evrimsel ilişkileri belirlemek için kullanılan diyagramdır. Genellikle OTU bir türü temsil etmekle beraber popülasyondaki bireysel organizmaları, herhangi bir taksonomik seviyedeki (familya, ordo, sınıf, şube vb) bir taksonu, gen yada protein

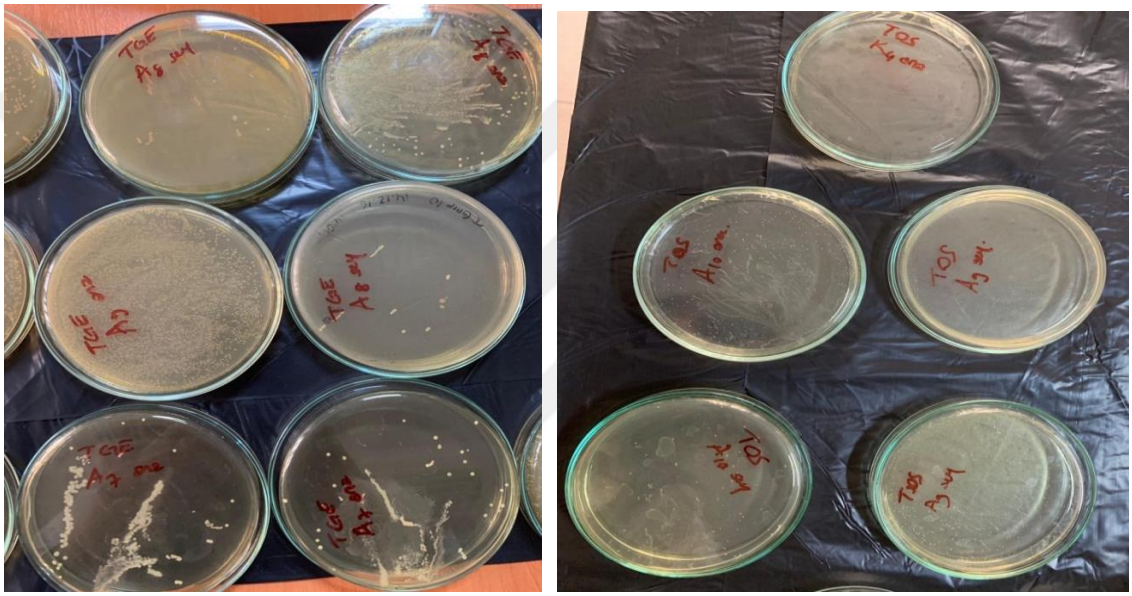
dizisini temsil etmektedir. Ağaç diyağramları düğümler ve dallardan oluşmaktadır. Her bir dal zaman içinde bir genetik bağlantının(soyun) devamlılığını temsil ederken her bir düğüm yeni bir soyun başlangıcını ifade eder. Mesela; bir popülasyondan örneklenen diziye ait gen ağacında, düğümler örneğin atası olan bireylerin doğum olayını temsil ederken, parolog gen ailelerinin ağacında, düğümler gen duplukasyon olayını ifade eder.

Ağacın uçlarındaki noktalar ‘dış-terminal düğüm’adı verilir ve OTU’ ları temsil ederken kullanılır. ‘İç düğüm’ ise bu noktadan tüm düğümler için son ortak atayı ifade eder. Daha yeni ve daha eskidüğümler arasında bağlantı sağlayan çizgiler olan ‘dallar’ taksonlar arsındaki evrimsel ilişkileri gösterirler. İki üç düğümü birleştiren dal ‘iç dal’ bir iç düğüm ile bir dış düğümü birleştiren dal; ‘dış dal’adını alır. Ağacın en derin dalı bu ağaçtaki tüm taksonların ‘kök’ veya ‘en eski ortak atasını’ ifade eder. (Baloğlu, 2015).

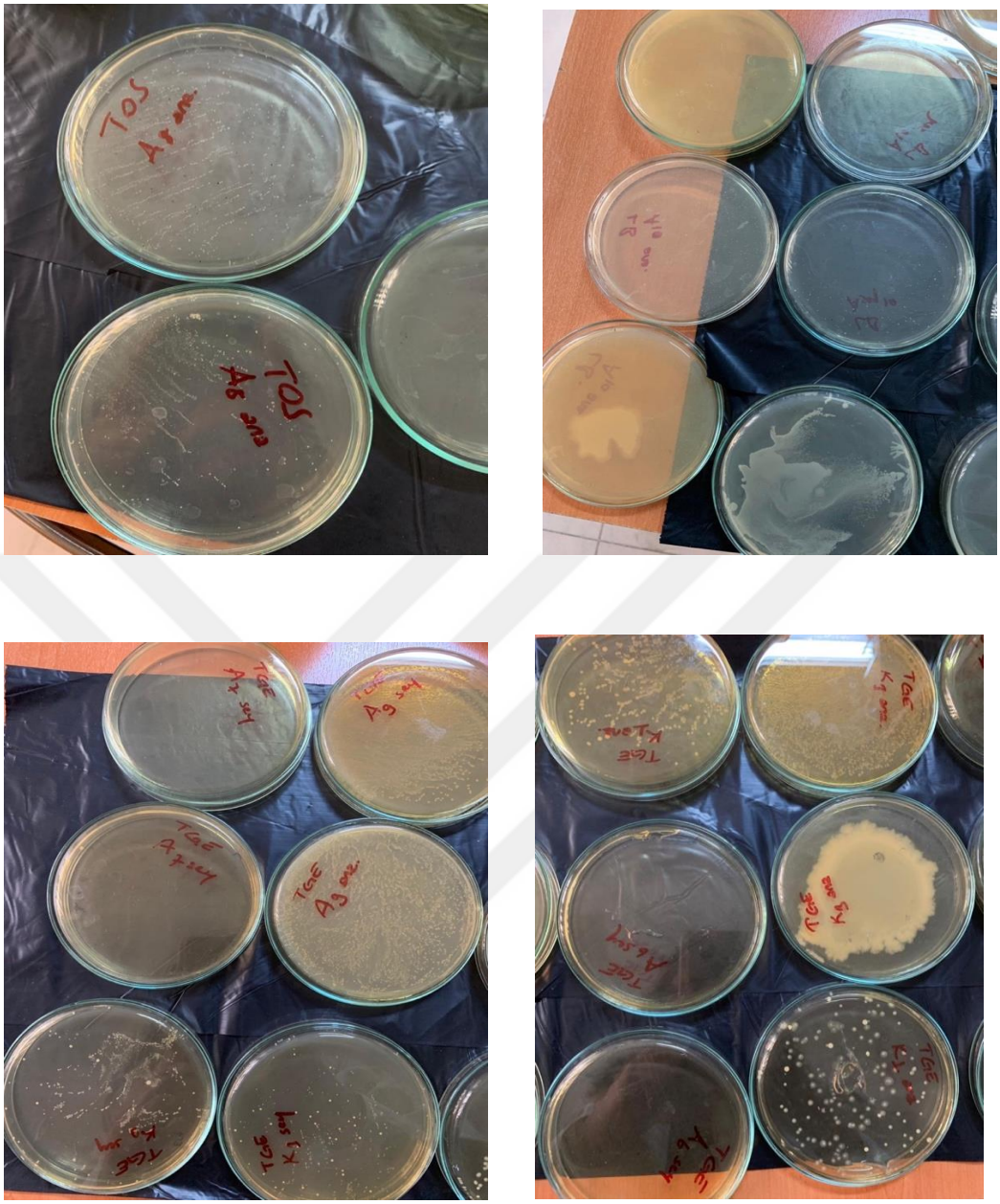
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Çeşitli Katı Besiyerlerinde (LB, TOS, TGE, FYP) Gelişim Gösteren Arı Gut Mikrobiyota Bakteri Görselleri

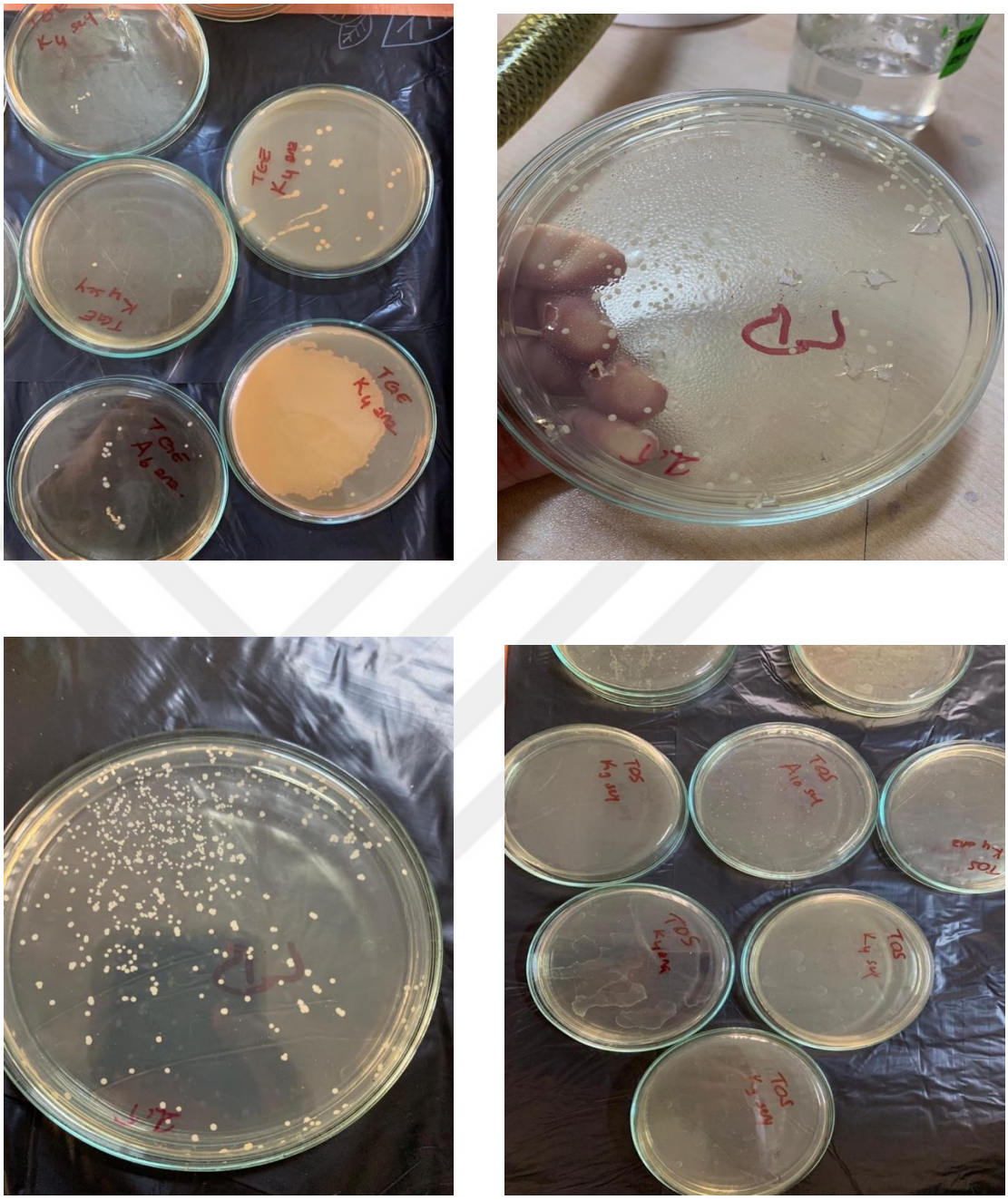
Uygun besi yerlerinde 37 °C de 48 saat geliştirilen örneklelrden elde dilen kolonilere ait görseller Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir. Farklı morfolojiye sahip 22 koloni seçilmiş ve çalışmaya bu koloniler ile devam edilmiştir.



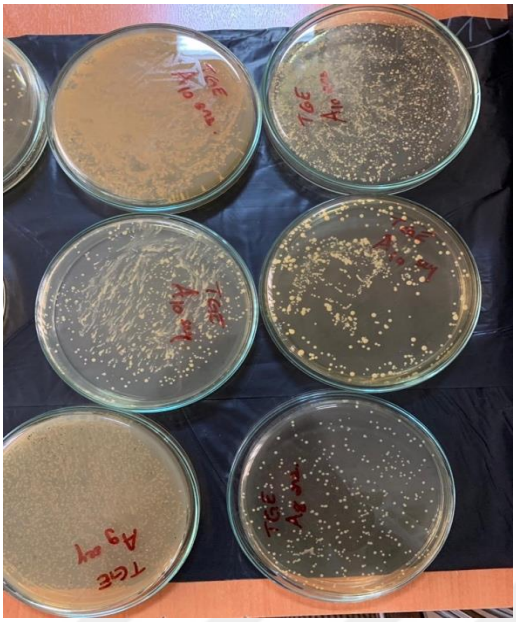
Şekil 4.1 Anadolu ve Kafkas bal arısı bakterilerinin katı besiyerinde gelişim görselleri



Şekil 4.2 Anadolu ve Kafkas bal arısı bakteri katı besiyerinde gelişim görselleri



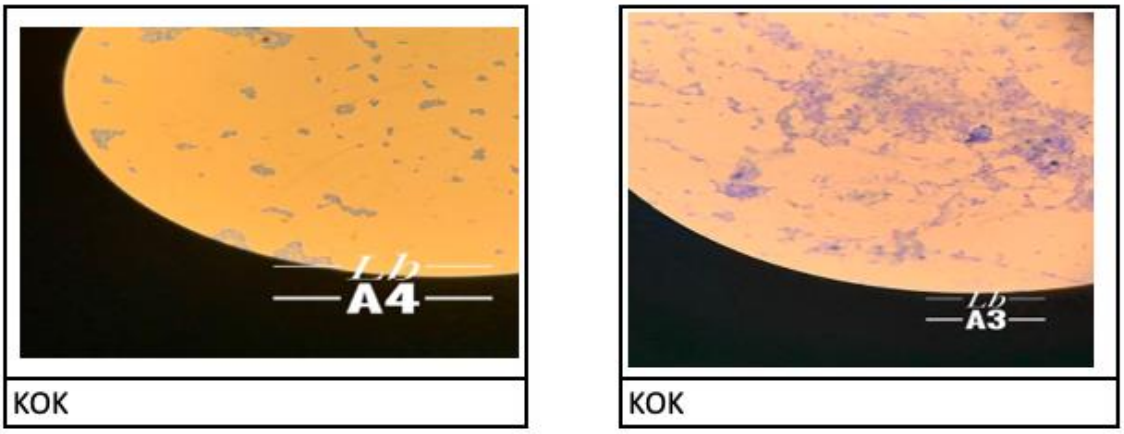
Şekil 4.3 Anadolu ve Kafkas bal arısı bakteri katı besiyerinde gelişim görselleri



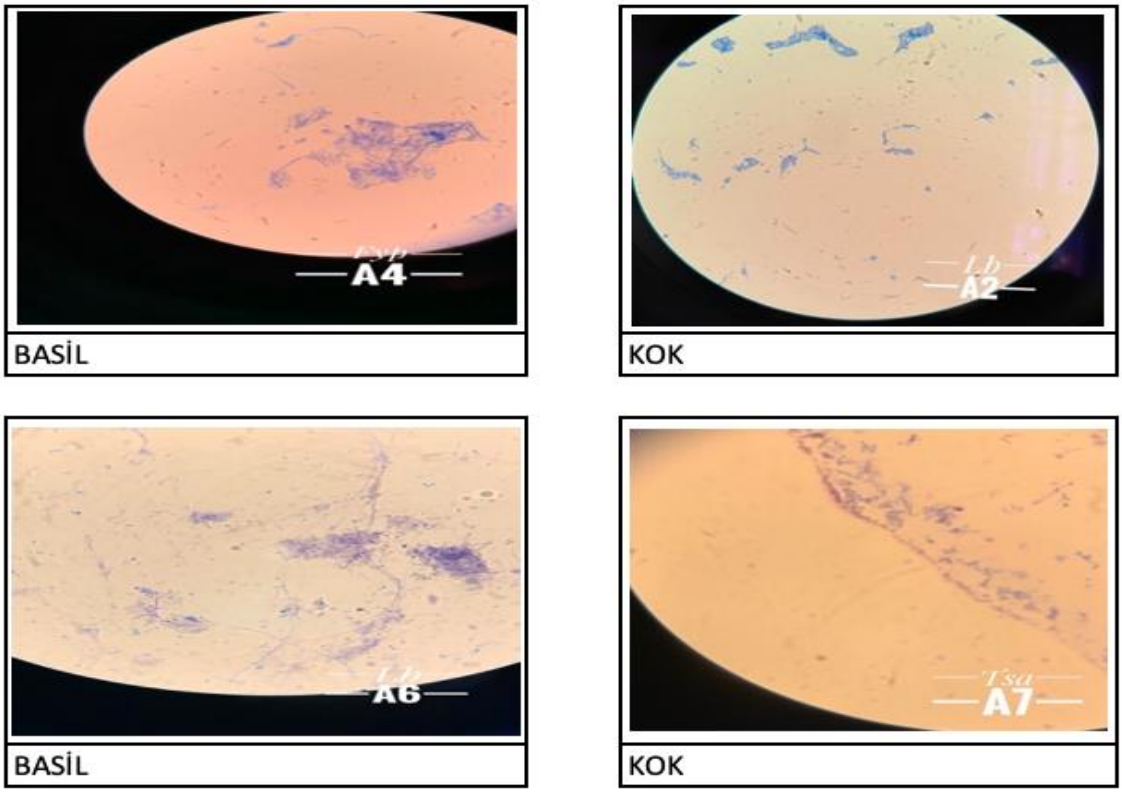
Şekil 4.4 Anadolu ve Kafkas bal arısı bakteri katı besiyerinde gelişim görselleri

4.2 Metilen Mavisi Basit Boyama Örnek Görüntüleri

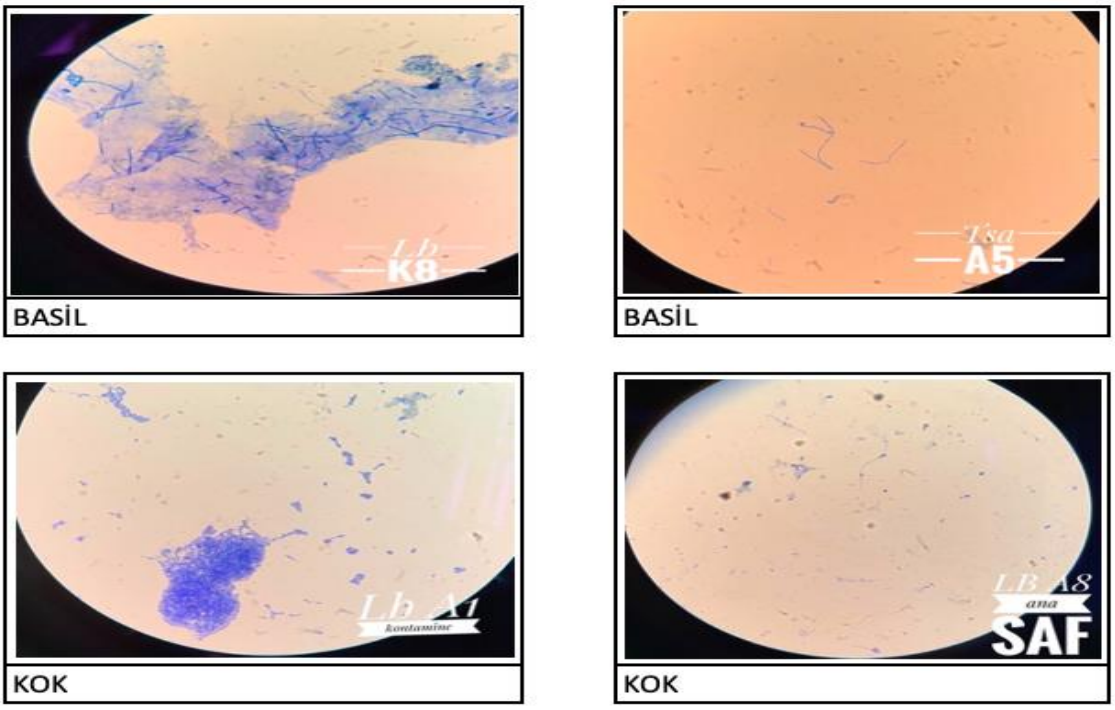
Seçilen farklı koloni tipine sahip izolatlar metilen mavisi ile boyanarak morfolojik görüntüleri ışık mikroskobu altında incelenmiş ve sonuçlar: Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.



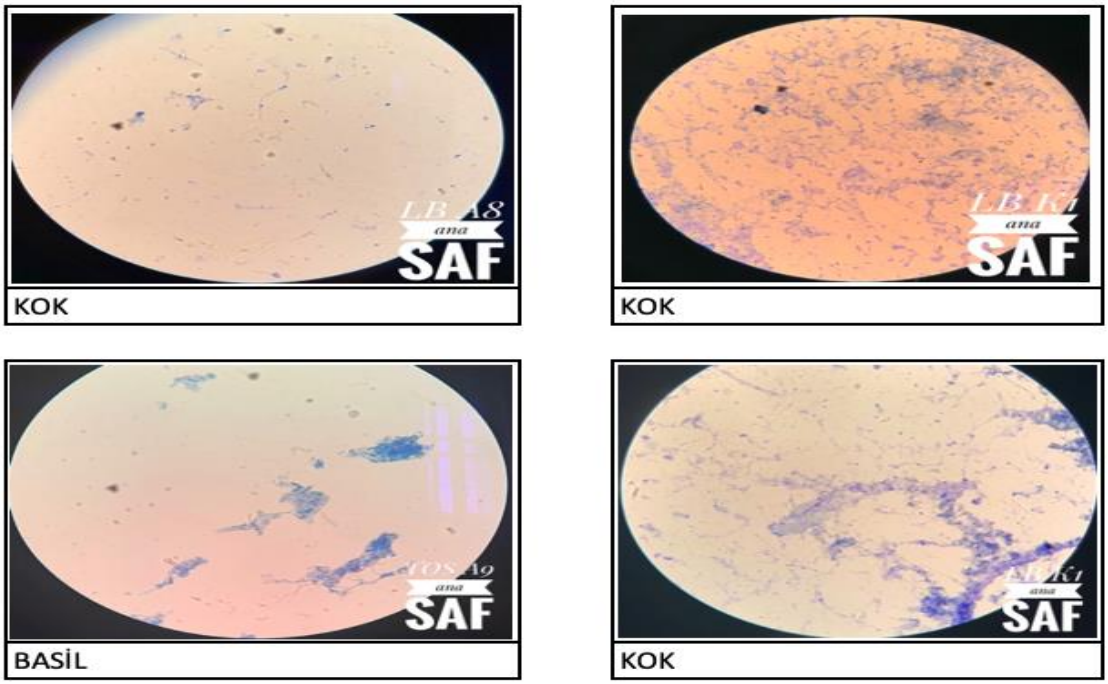
Şekil 4.5 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri



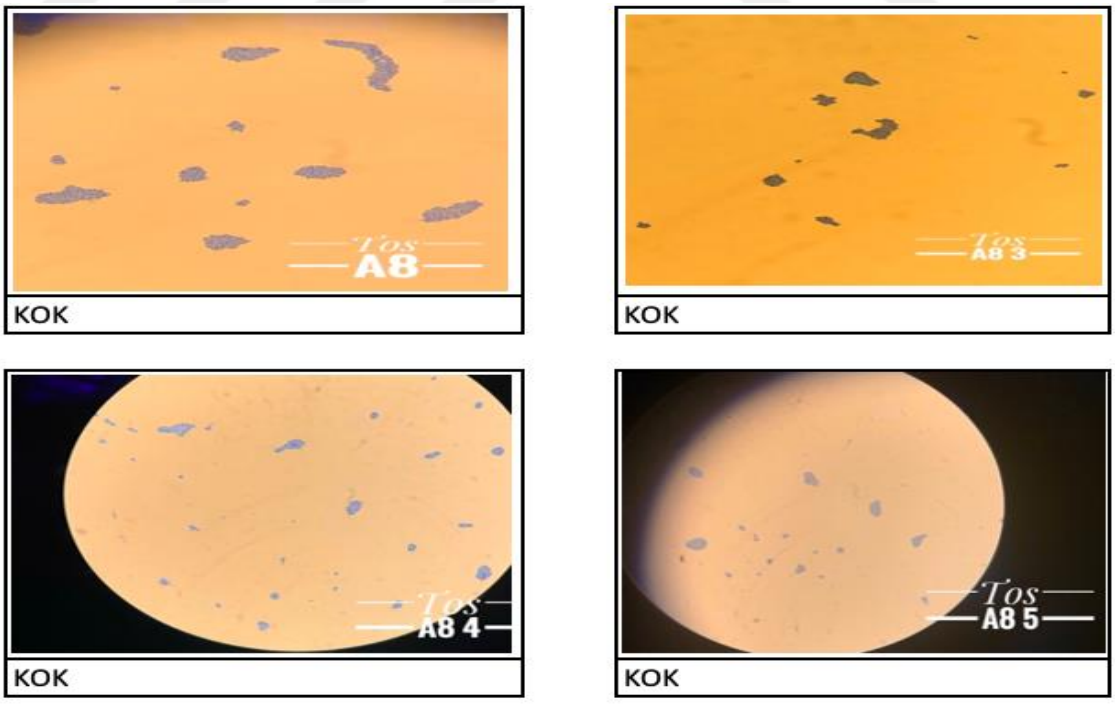
Şekil 4.6 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri



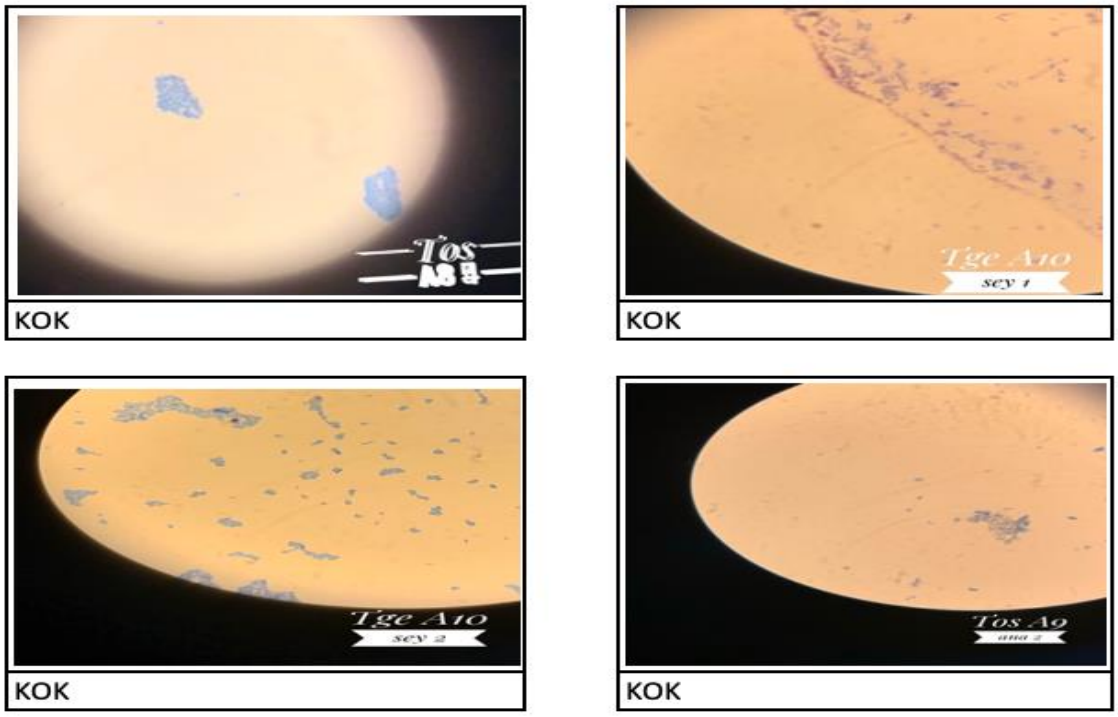
Şekil 4.7 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri



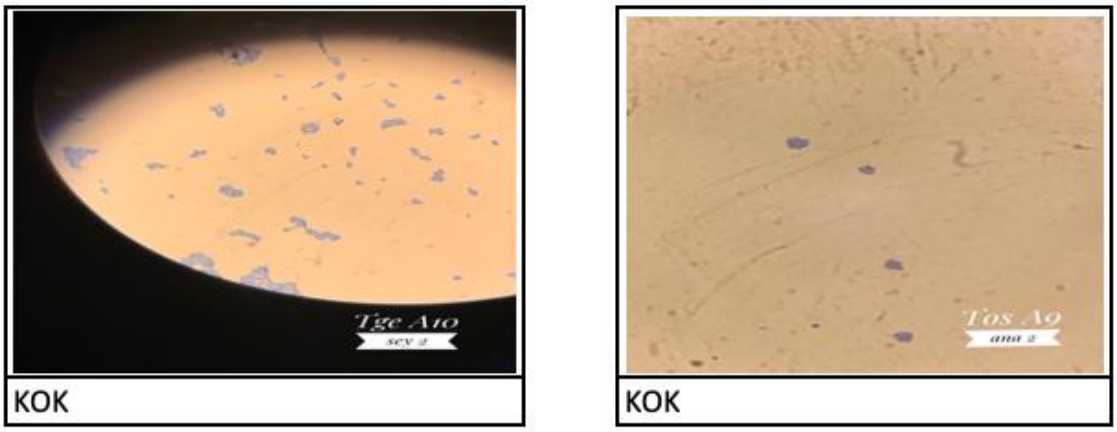
Şekil 4.8 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri



Şekil 4.9 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri



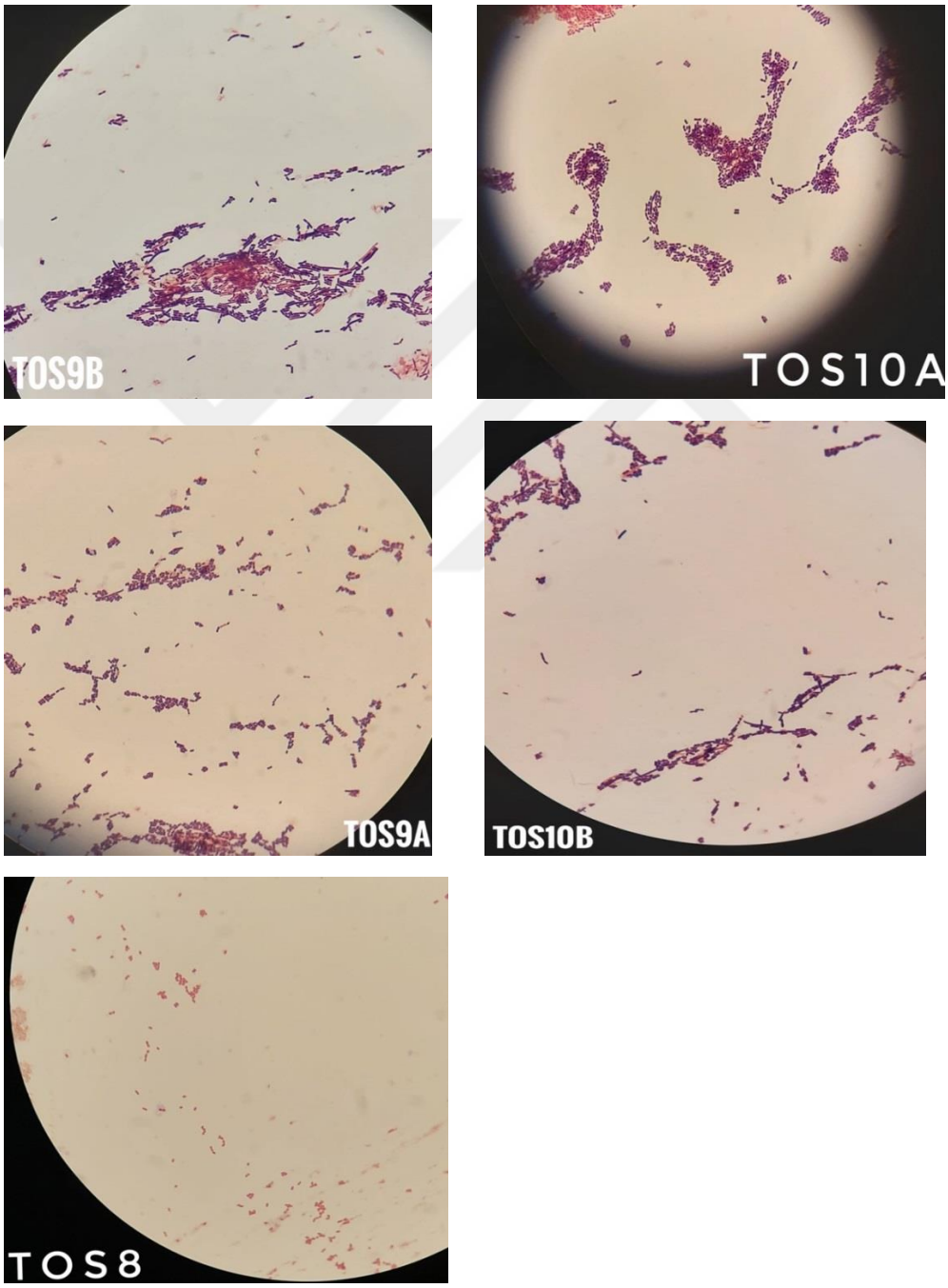
Şekil 4.10 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri



Şekil 4.11 Bakterilerin metilen mavisi boyama örnekleri

4.3 Gram Boyama Örnek Görselleri

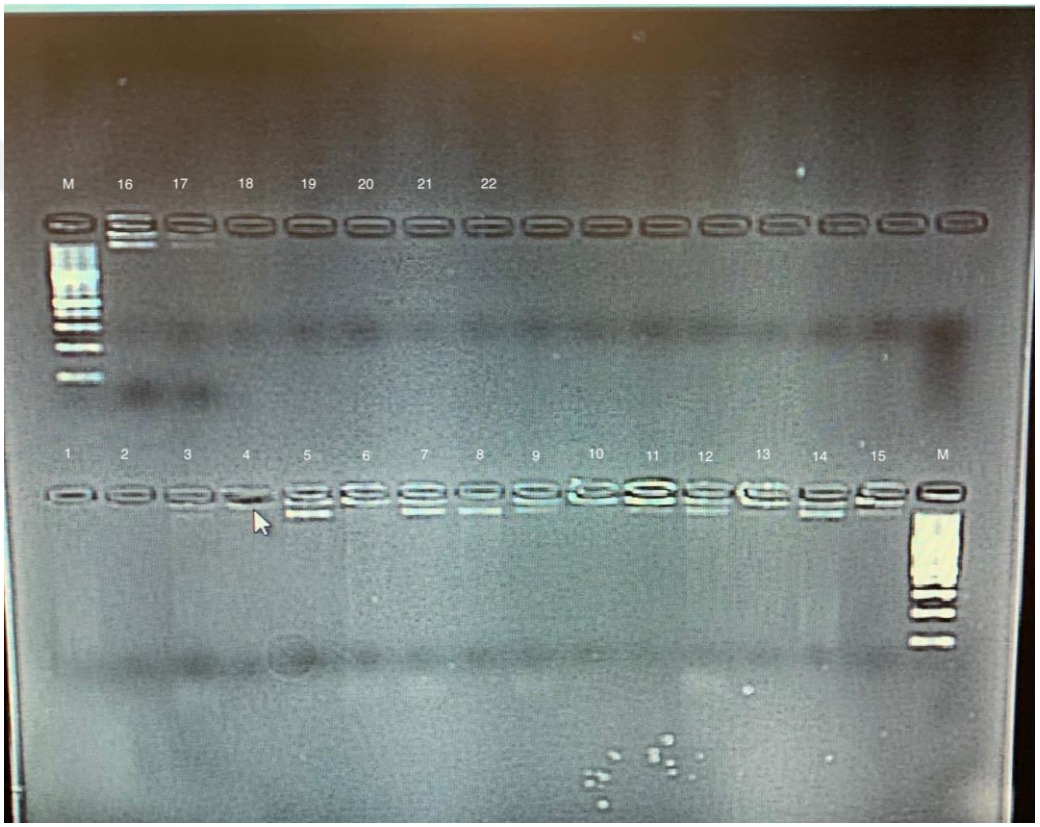
Farklı morfolojik görüntüye sahip koloniler gram boyama tekniği ile boyanarak gram(+) ve gram(-) örnekler belirlenmiştir. Gram boyma sonuçlarına ait görseller Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12 Bakterilerin gram-pozitif boyama örnek görüntüleri

4.4 Genomik DNA'ların Agaroz Jel Görüntüsü

Genomik DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA örnekleri agaroz jelde yürütülmüş (Şekil 4.13) ve varlık yokluk tespiti yapılmıştır. İzole edildiği tespit edilen DNA örneklerinin saflık ve miktar tayinleri nanodrop cihazında 260/280 dalga boyunda belirlenerek çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.13 Genomik DNA izolasyonu sonucu agaroz jel görüntüsü

M:Marker, 1:LB A1, 2:LB A2, 3:LB A3, 4:LB A4, 5:LB A6, 6:LB K1, 7:LB K8, 8:LB A8, 9:LB AG4, 10:FYP A1, 11:FYP A3, 12:FYP A4, 13:FYP A5, 14:TSA A5, 15:TSA A6, 16:TSA A7, 17:MRS L, 18:MRS G, 19:MRS T, 20:TOS 8, 21:TOS 9, 22:TOS 1O

Çizelge 4.1 Genomik DNA'ların saflık ve miktarları sonuçları

SIRA	İSİMLENDİRME	SAFLIK 260/280	MİKTAR ng/ml
1	LB A1	2,02	51,40
2	LB A2	1,94	52,30
3	LB A3	1,99	75,30
4	LB A4	2,01	253,30
5	LB A6	1,90	62,50
6	LB K1	1,87	460,20
7	LB K8	1,99	201,50
8	LB A8	1,91	23,10
9	LB AG4	1,98	56,90
10	FYP A1	1,97	174,40
11	FYP A3	2,11	228,60
12	FYP A4	1,99	105,10
13	FYP A5	2,02	88,90
14	TSA A5	2,01	150,10
15	TSA A6	2,10	59,50
16	TSA A7	1,43	81,20
17	MRS L STOK	2,04	68,80
18	MRS G STOK	1,96	366,60
19	MRS T STOK	2,08	321,10
20	TOS 8	1,95	301,00
21	TOS 9	2,01	183,00
22	TOS 10	1,96	72,40

Çizelge 4.2 RAPID-PZR reaksiyon koşulları

10X Buffer	2,5 µL
10mM dNTPmix	0,5µL
primer	2µL
Taq polimeraz	0,125µL
dH2O	18,875µL
DNA	min 1µL
Toplam	25µL

Çizelge 4.3 RAPID-PZR reaksiyon koşulları

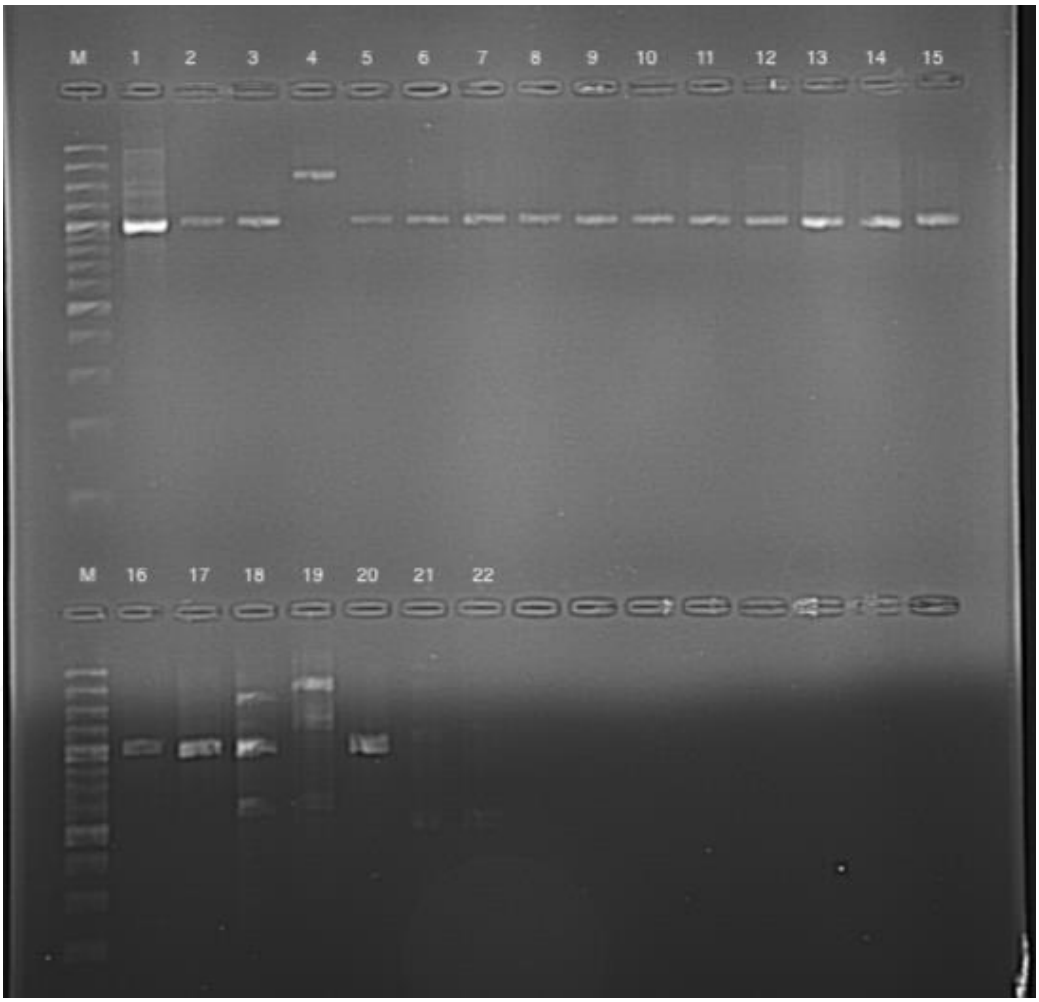
	sıcaklık	Süre
Başlanğıç Denatürasyon	95°C	30 dakika
Denatürasyon	95°C	20 dakika
Bağlanma	33°C	60 dakika
Uzama	68°C	1:15 dakika
Son Uzama	68°C	5 dakika

4.5 RAPID-PZR Agaroz Jel Görüntüleri

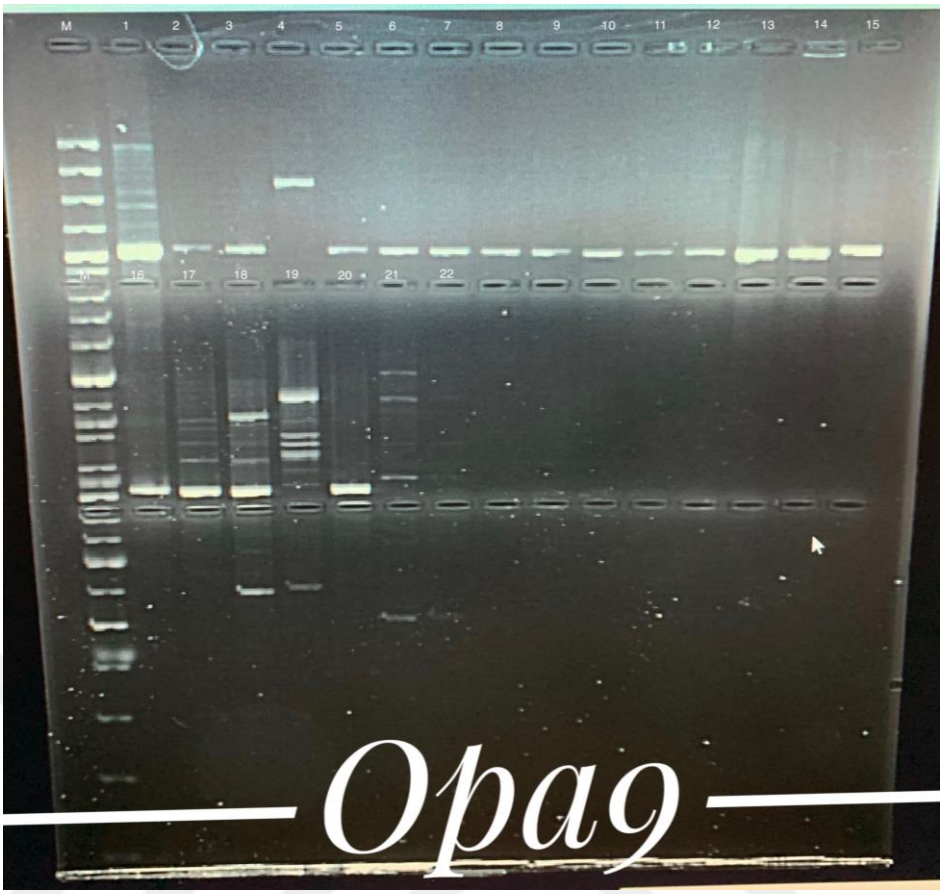
Saflık ve miktar tayini yapıldıktan sonra DNA örnekleri RAPID-PZR işlemi için kullanılmıştır. RAPID-PZR reaksiyon karışımı çizelge 4.2'de, PZR koşulları ise çizelge 4.3'de verilmiştir. RAPID-PZR işleminin ardından örnekler %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. RAPID-PZR için kullanılan OPA6, OPA7, OPA8, OPA9 primerleri ile elde edilen sonuçlara ait jel görüntüleri Şekil 4.14, Şekil 4.15,Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de verilmiştir.

1-22 arası örnekler sıra ile yükleme yapılmıştır**.**

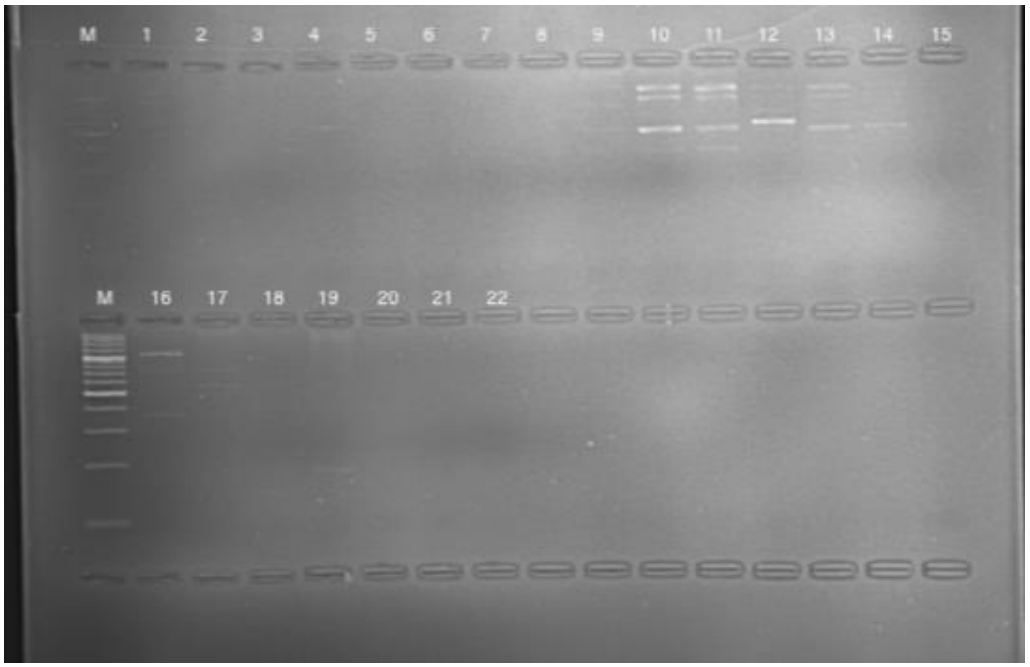
M:Marker, 1:LB A1, 2:LB A2, 3:LB A3, 4:LB A4, 5:LB A6, 6:LB K1, 7:LB K8, 8:LB A8, 9:LB AG4, 10:FYP A1, 11:FYP A3, 12:FYP A4, 13:FYP A5, 14:TSA A5, 15:TSA A6, 16:TSA A7, 17:MRS L, 18:MRS G, 19:MRS T, 20:TOS 8, 21:TOS 9, 22:TOS 1O.



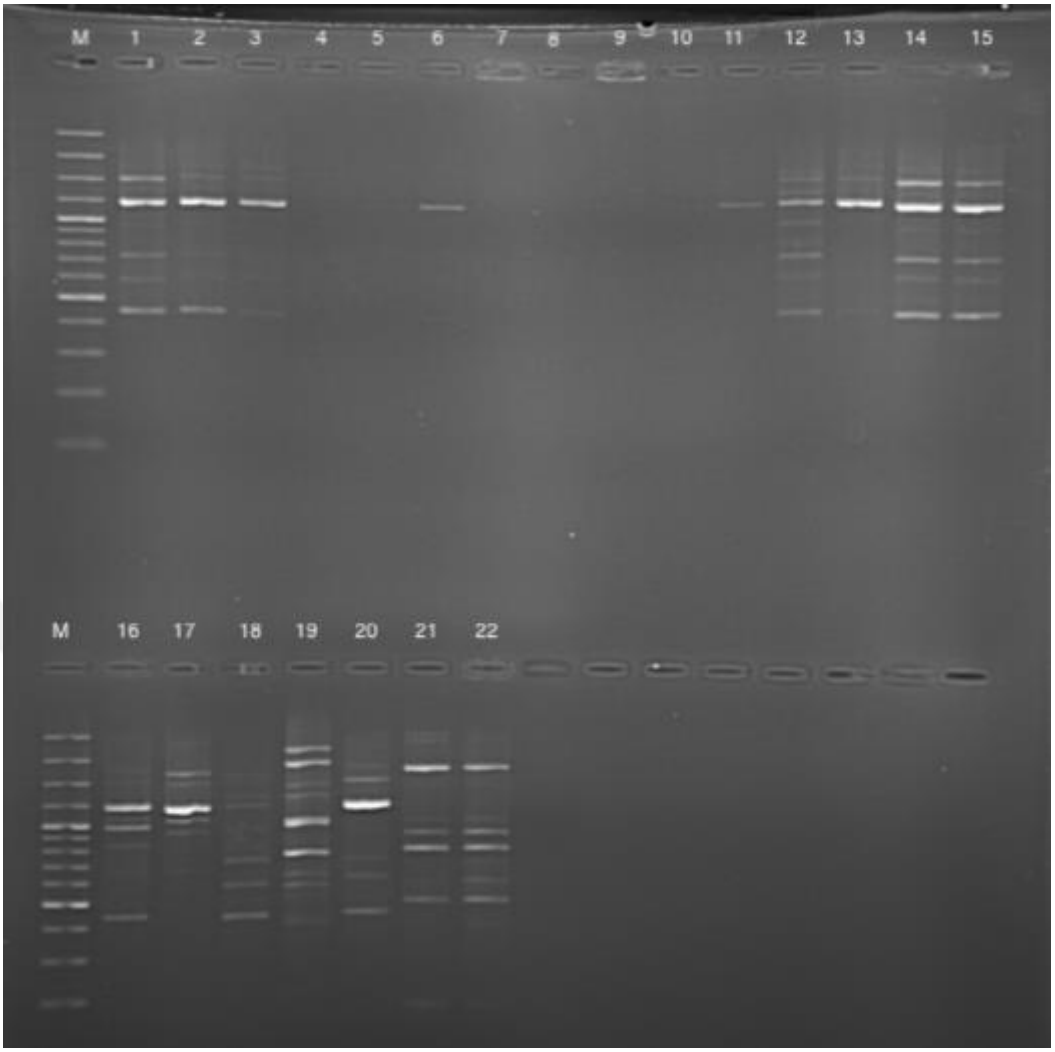
Şekil 4.14 OPA-09 Ajaroz jel görüntüsü



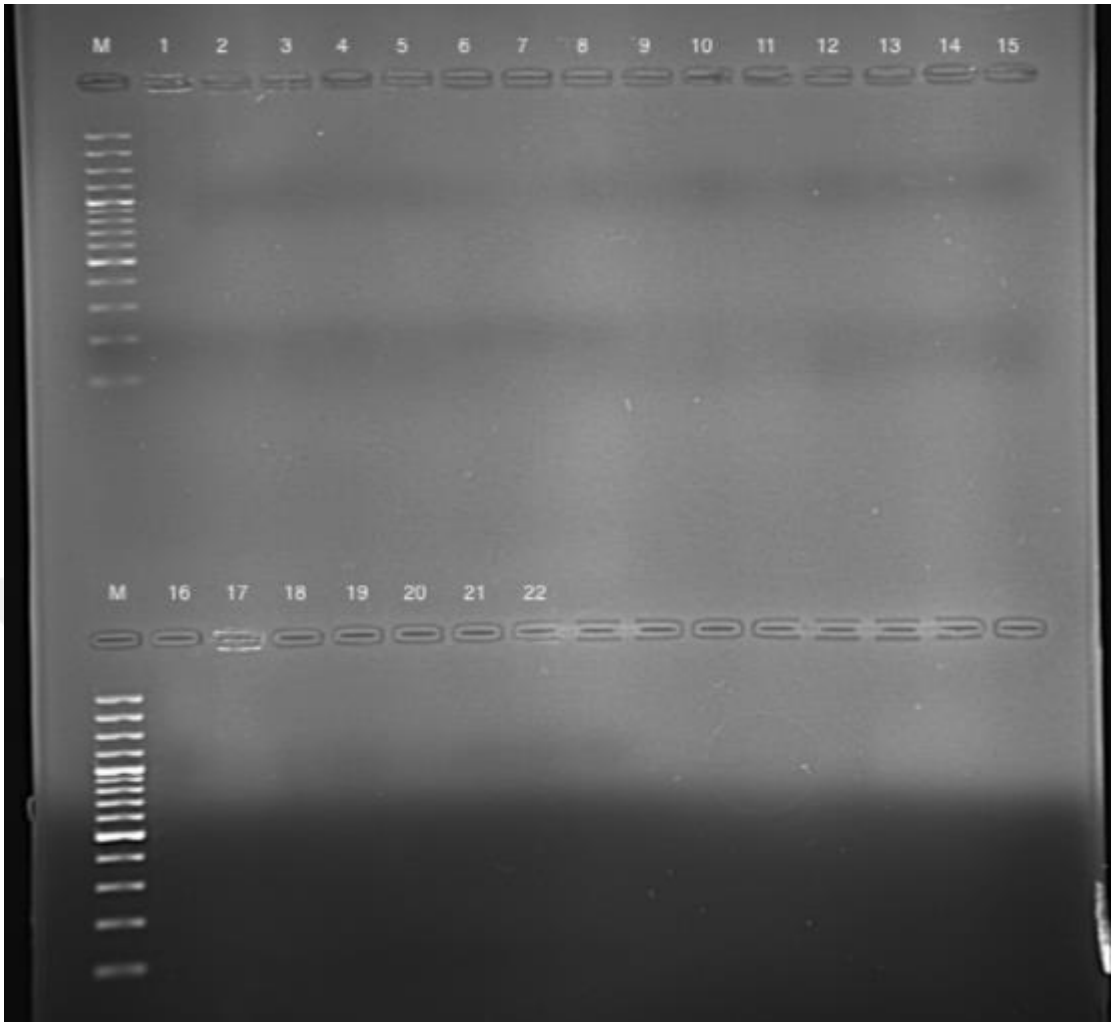
Şekil 4.15 OPA-09 Ajaroz jel görüntüsü



Şekil 4.16 OPA-08 Ajaroz jel görüntüsü



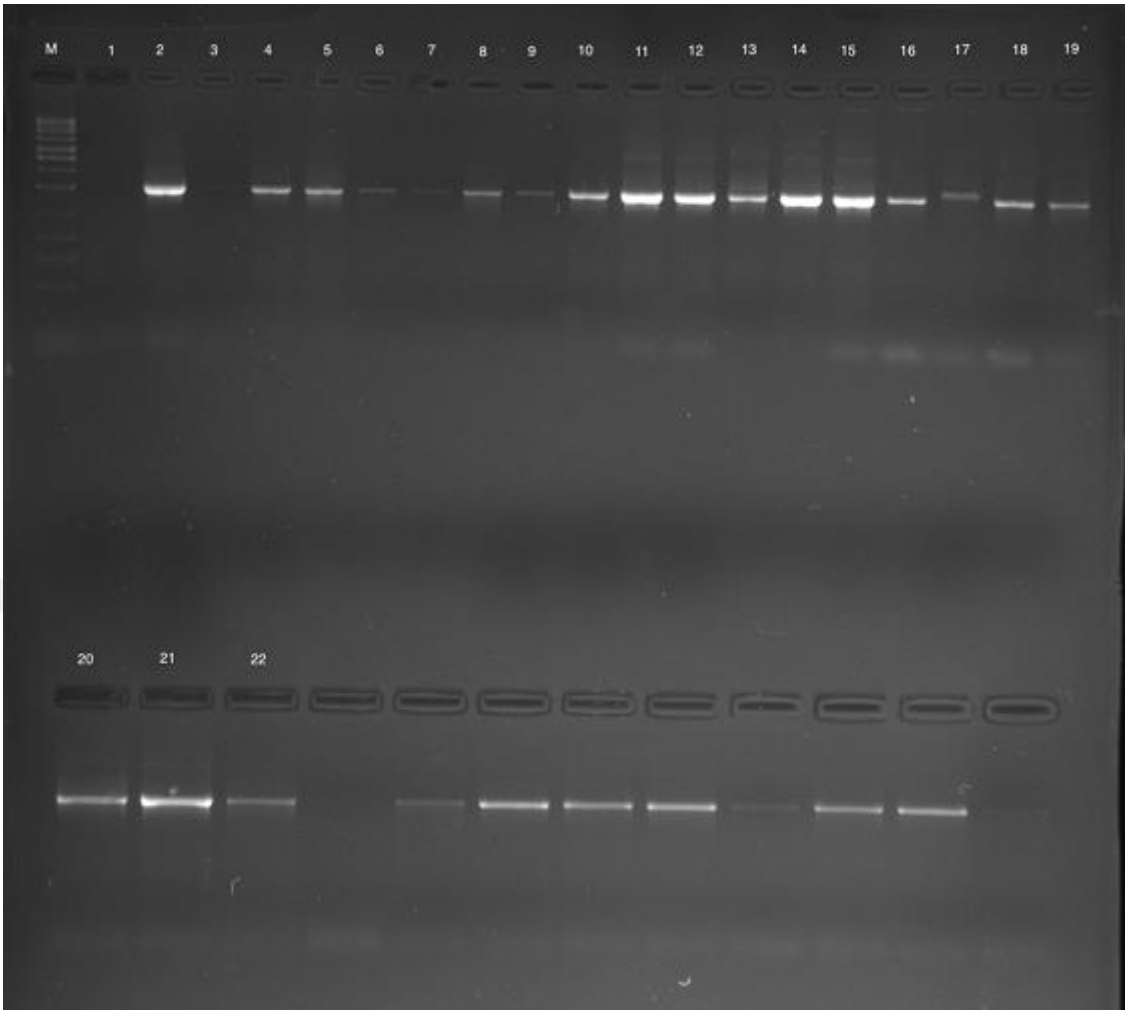
Şekil 4.17 OPA-07 Ajaroz jel görüntüsü



Şekil 4.18 OPA-06 Ajaroz jel görüntüsü

4.6 16S PZR Ajaroz Jel Görüntüsü

Agaroz jel görüntülerine göre farklı bant profili olan 10 adet izolat belirlenmiş ve çalışmanın ilerleyen aşaması için sekans işleminde kullanılmıştır.



Şekil 4.19 16S PZR Ajaroz jel görüntüsü

Çizelge 4.4 16S PZR reaksiyon koşulları

10X Buffer	2,5µL
10mM dNTP	0,5µL
Ters/geri primer	0,5µL
İleri primer	0,5µL
Taq polimeraz	0,125µL
dH2O	19,875µL
DNA(100ng)	1µL
toplam	25µL

Çizelge 4.5 16S PZR reaksiyon koşulları

	sıcaklık	süre
Başlangıç Denatürasyon	95°C	30 dakika
Denatürasyon	95°C	20 dakika
Bağlanma	33°C	60 dakika
Uzama	68°C	1:15 dakika
Son Uzama	68°C	5 dakika

4.7 Sekans Sonuçları

16S PZR sonucu elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve bant tespiti edilen PZR tüpleri sekanslama için BM Biosis Firmasına gönderilmiştir. Sanger Dizileme yöntemi ile elde edilen sekans sonuçları NCBI veri tabanında Blast programında taranarak en yüksek benzerlik gösterdiği türler baz alınarak tür tayini yapılmıştır. Sekanslama işlemi ile elde edilen sonuçlar çizelge 4.7'de verilmiştir.

Sanger Dizileme metodu enzimatik DNA sentezinde en yaygın kullanılan dizi analiz tekniğidir. Yöntemde dizisi yapılacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp görevi görmektedir. DNA sentezi sağlamak için Kleneov, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz yada sequenaz enzimlerinden birisi kullanılmaktadır. Yöntemin temeli, DNA polimerazın dNTP (deoksiribonükleozid trifosfat) ve ddNTP (dideoksiribonükleozid trifosfat) leri de substrat olarak kullanabilmesi esasına dayanmaktadır.

Çizelge 4.6 Sekanslanan DNA örnekleri

SUŞ NO	KOD	*DİZİ SONUÇLARI*
2	LB A2	*Enterococcus faecalis*
5	LB A6	*Enterococcus faecalis*
11	FYP A3	*Enterococcus faecalis*
12	FYP A4	*Bacillus subtilis*
14	TSA A5	*Enterococcus faecalis*
16	TSA A7	*Staphylococcus sp.*
18	MRS G STOK	*Bacillus subtilis*
20	TOS 8	*Enterococcus faecalis*
21	TOS 9	*Lactobacillus pentosus*
22	TOS 10	*Enterococcus faecalis*

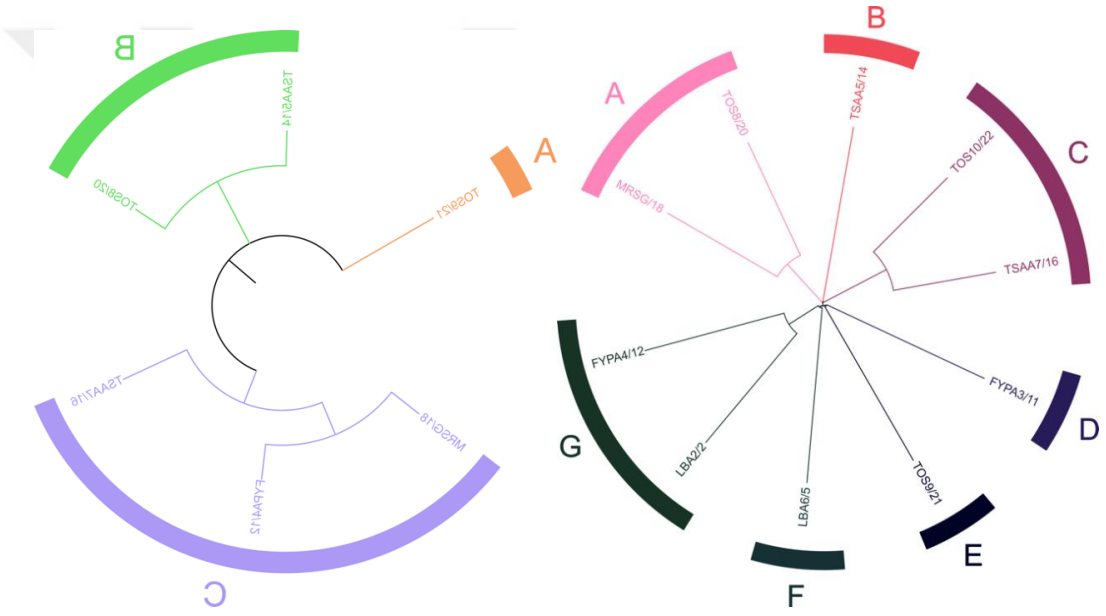
4.8 Balarısı Genomunda Belirlenen DNA Genleri ve Filogenetik Analizleri

NCBI veri tabanından elde edilen 15 bakteri türüne ait *Enterococcus faecalis(LBA2-2, LBA6-5,FYPA3-11,TSAA5-14,TOS8-20,TOS10-22) Enterococcus sp., Staphylococcus sp.(TSAA7-16), Bacillus subtilis(FYPA4-12,MRSG-18), Bacillus sp., Lactobacillus pentosus(TOS9-21)* sekansları indirilmiştir.

Nükleotit dizilerimiz NCBI veri tabanı ile karşılaştırılarak en yakın sonuçlar yani %96 ve üzeri benzerlik gösterenler değerlendirmeye alınmaktadır. Bunun için kullanılan parametreler ise E değeri ve benzerlik yüzdesi baz alınmaktadır. Analiz yapılırken gelişmiş parametre olarak E-değeri 1.0e-10 olarak belirlenmiştir. Veri tabanında BLASTP analizi yapılarak incelenmiştir. (E değeri 0'a ne kadar yakınsa benzerlik oranı maksimumdur).

BLAST; GenBank veri tabanına ait, nükleik asit ve protein sekanslarının analizini yapmada bir hizalama arama motorudur. Homoloji araştırması olarak, kendi dizilerimizin veri tabanındaki karşılaştırmasını yapmada kullanılmaktadır.

MEGA v.7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura vd. 2016) programı ile komşu birleştirme ağacı metodu (Neighbor-Joining Tree) kullanılarak filogenetik analiz gerçekleştirilmiştir (Saitou ve Nei 1987). Ağaçların oluşturulmasında mesafe temelli, tekrarlayıcı algoritma, çoklu dizi analizi parametreleri kullanılmıştır.



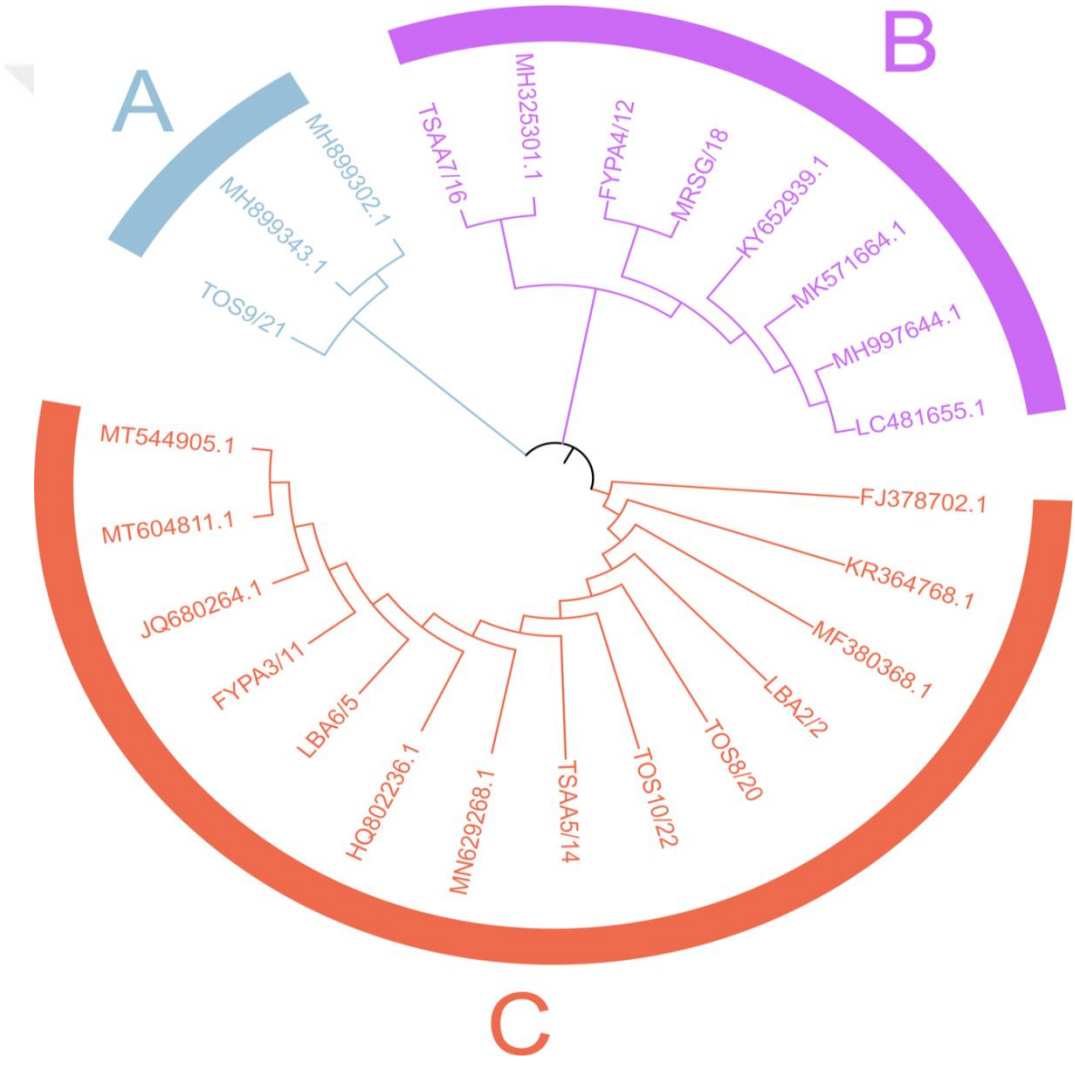
Şekil 4.20 Mega programı kullanılarak elde edilen bal arısı bakterilerinin filogenetik analizi 1

1.filogenetik ağacımız; ortak atamızdan 3 ana gruba (A,B,C) yani 3 farklı türleşme görülmektedir. Üye sayımız 6 adettir. C grubunda bulunan MRSG/18 ve FYP4/12 türü TSAA7/16 türüne göre daha yakın akrabadır. A,B,C aynı zamnada kardeş gruplardır.

C grubunda bulunan TSAA7/16 geni diğer MRSG/18 ve FYPA4/12 den daha uzak akrabadır.

Kendi aralarında filogenetik olarak yapılan analizde; TOS9/21 örnegimiz tek başına A grubunda yer alır iken, 2. Filogenetik ağacımda blast sonucu çıkan türler MH899343.1 MH899302.1 (Lactobacillus dir.

C grubunun üyelerinin tamamı 2.filogenetik ağaçta B grubunda bulunmaktadır ve bu da yaptığımız ağacın güvenilirliğini göstermektedir.



Şekil 4.21 Mega programı kullanılarak elde edilen bal arısı bakterilerinin karşılaştırmalı filogenetik analizi 2

2.filogenetik ağacımız; 3 ana gruba ayrılmaktadır. C grubu en kalabalık grubu oluştururken A grubu en küçük grubumuzdur. A;3 B;8 C;14 türe sahiptir.

Kendi aralarında filogenetik olarak yapılan analizde; TOS9/21 örnegimiz tek başına A grubunda yer alır iken, 2. Filogenetik ağacımda blast sonucu çıkan türler MH899343.1 MH899302.1 dir. Ayrıca A grubundaki TOS9/21 ile beraber yine A grubunda bulunan MH899343.1 MH899302.1 lerin ne olduğunu açıklamaktadır. Bu da blast sonuçlarını doğrulamaktadır.

1.filogenetik ağaçtaki C grubunun üyelerinin tamamı 2.filogenetik ağaçta B grubunda bulunmaktadır ve bu da yaptığımız ağacın güvenilirliğini göstermektedir.

1.filogenetik ağaçta C grubu üyelerinden olan MRSG/18 ve FYPA4/12'nin aynı şekilde 2.filogenetik ağaçta da B grubunda aynı düğüm altında toplandığı görülmektedir. 1.filogenetik ağacımızdaki MRSG/18 ve FYPA4/12 bu iki genimizden daha uzak akraba olan TSAA7/16 geni 2.filogenetik ağacımızda yine B grubu çatısı altında toplandığı görülmektedir. Tüm bu veriler çalışmanın doğruluğunu kanıtlar niteliktedir.

Nükleotit dizilerimiz NCBI veri tabanı ile karşılaştırılarak en yakın sonuçlar yani %96 ve üzeri benzerlik gösterenler değerlendirmeye alınmaktadır. Bunun için kullanılan parametreler ise E değeri ve benzerlik yüzdesi baz alınmaktadır.

En iyi alternatif ağacın belirlenebilmesi için; MEGA programında mesafe hesaplama modellerinin veriye uyacak biçimde seçilebilmesi için mesafe matris metodu kullanılarak komşu hizamala yapılmıştır. Bu yüzden de takson mesafelerine dayalı bir şekilde takson çiftleri seçilerek çalışılmıştır. Yani karşılaştırmalarda mesafe temel alınmıştır.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında Ankara ili ve Anadolu-Kafkas bal arıları toplanmıştır. Arıların mide-bagırsak sistemlerinin bakteri izolasyonu yapılarak saf kültürler elde edilmiştir. Tezde kullanılan izolatlar koloni morfolojisi ve gram özelliklerine göre belirlenmiştir. Çalışmalar sonucunda 22 farklı bakteri izolatının genomik DNA'sı elde edilmiş. RAPID-PZR ve 16S PZR çalışmaları sonucunda farklı fenotipe sahip 10 PZR ürünü Sanger Dizleme metodu ile dizilemesi yapılmıştır.

Yürütülen bu tez çalışmasında bal arısı (*Apis mellifera L.*) NCBI veri tabanından 15 farklı bakteri türünün dizileri kullanılarak, balarısı mikrobiyotasında 10 adet bakteri türü belirlenmiştir. Belirlenen bakteri türleri, LBA2/2, LBA6/5, FYPA1/10, FYPA3/11, FYPA4/12, TSAA5/14, TSAA7/16, MRSG/18, TOS8/20, TOS9/21 dir.

Çizelge 5.1 Sekanslanan DNA örnekleri

SUŞ NO	KOD	*DİZİ SONUÇLARI*
2	LB A2	*Enterococcus faecalis*
5	LB A6	*Enterococcus faecalis*
11	FYP A3	*Enterococcus faecalis*
12	FYP A4	*Bacillus subtilis*
14	TSA A5	*Enterococcus faecalis*
16	TSA A7	*Staphylococcus sp.*
18	MRS G STOK	*Bacillus subtilis*
20	TOS 8	*Enterococcus faecalis*
21	TOS 9	*Lactobacillus pentosus*
22	TOS 10	*Enterococcus faecalis*

Bu tez çalışmasındaki amaç bal arılarının bağırsaklarında yerleşik olarak yaşayan total aerobik bakteri florasının kültüre edilebilen bir kısmının belirlenmesidir.

Bal arılarının bağırsaklarında sahip olduğu total bakteri florasının belirlenmesi sonucu bal arısı bağırsak mikrobiyotasında tutarlı ve karakteristik bir topluluk keşfedilmiştir ve bu mikrobiyal türlerin işlevsel özellikteki rolü araştırılmıştır.

2017 yılında Serpil Uğraş'ın yaptığı çalışmada da olduğu gibi; laktik asit bakterileri arasında, Lactobacillus cinsi en önemlilerinden biridir ve yaklaşık 174 tür içermektedir. Farklı habitatlarda geniş bir dağılım gösteren Lactobacillus türleri, arıların ve diğer birçok hayvanın gastrointestinal yolunda bulunmaktadır (Uğraş, 2017).

Bu güne kadar, bal arısı bağırsağındaki mikrobiyota ile ilgili yapılan çalışmalar mikrobiyotanın; beslenmeyi, kilo alınımını, endokrin sinyalizasyonunu, bağışıklık fonksiyonunu ve patojen direncini etkilediğini göstermektedir. İnsanlarda olduğu gibi, mikrobiyota bağırsakların distal kısmında yoğunlaşmakta ve bu bölgede bitki hücre duvarı bileşenlerinin sindirilmesine ve fermentasyonuna katkıda bulunmaktadır. Benzer şekilde, birçok arı bağırsak bakterisi arı bağırsağına özgüdür ve bireyler arasında sosyal etkileşim yoluyla doğrudan aktarılabilmektedir (Zheng ve ark. 2018).

Bal arılarının özel bağırsak mikrobiyal yapısı, tıpkı memeli mikrobiyotasında ki gibi çoğunlukla konakçıya uyarlanmış, fakültatif anaerobik ve mikroaerofilik bakterilerden oluşmaktadır. Bununla birlikte, arı bağırsağının mikrobiyal yapısı, arılara özgü olan ve bireyler arasındaki sosyal etkileşimler yoluyla aktarılan, sadece dokuz bakteri (*Bartonella apis, Parasaccharibacter apium, Frischella perrara, Snodgrassella alvi, Gilliamella apicola, Bifidobacterium spp., Lactobacillus Form-4, Lactobacillus Form-5*, Diğer) türünün egemen olduğu memeli mikrobiyotasından çok daha basittir (Kwong ve Moran, 2016; Raymann ve Moran, 2018).

Bal arılarının (*Apis ceranaindica Fabricius, Apis melliefra Linnaeus, Apis florea Fabricius, Apis dorsata Fabricius, Tetragonula iridipennis Smith*) farklı türlerinden

elde edilen bal midesi, bal, arı ekmeği, arı poleni ve arı sütü, LAB varlığı açısından incelenmiştir. Sonuçlar, analiz edilen örneklerde zengin bir LAB çeşitliliğini göstermiştir. 42 izolat, 7 LAB genusunda *Enterococcus* (% 23.8*), Micrococcus* (% 18.8), *Streptococcus* (% 13.8), *Pediococcus* (% 13.8), *Lactobacillus* (% 10.0), *Lactococcus* (% 10.0) ve *Leuconostoc* (% 10.0) olarak gruplanmıştır (Mathialagan ve ark., 2018).

Arılardaki mikrofloranın kovandan kovana, mevsimden mevsime ve yemden yeme farklı olabileceğinin keşfedilmesinin yanında her daim bir temel mikrobiyal topluluğun bulunduğu belirtilmektedir (Anderson v.d. 2011).

Bizim çalışmamızda da sekans sonucu ulaşılan *Staphylococcus* sp.,*Bacillus subtilis, Lactobacillus pentosus ve Enterococcus faecalis* türleri tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ile örtüşmektedir.

Daha önce Neşe ÖZMEN ve Emine ALKIN tarafından yapılan çalışmalarda; balın hastalık ve enfeksiyonlara neden olan mikroorganizların gelişimini engellediği kanıtlanmış olmakla beraber laboratuvar deneyeleri sonucu balda yer alan *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, ve Salmonella enterica, Ser. typhimurium* gibi yaralarda bulunan bakterilere karşı etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu yüzden de balın antimikrobiyal ve antioksidant özellerine ulaşılmıştır (Özmen ve Alkın 2006).

1. *Enterococcus: Enterococcus* cinsi bakterilerin morfolojileri oval ve uzun zincir şeklindedir. Genel olarak hareket etmezler. Hayvan ve insan bağırsak sisteminden bulunurlar bununla birlikte fermente gıdalar ve süt ürünleri içindeki laktik asit bakterileri olarak da yer alırlar. Süt ürünlerinde en sık rastlanan türleri; enterococcus faecium, *E. Faecalis, E. Durans* 'dır. Akdeniz de çiğ ve patörize sütlerden yöresel olarak yapılan peynirlerde fazlaca yer alır (Suzzi vd. 2000, Andrighetto vd. 2001, Giraffa 2003).

Okjijen bakımından da fakültatif anaerob bakterilerdir. Karbonhidrat çeşitlerini metabolize ederek gaz oluşturmadan L(+) laktik asite dönüştürürler. Gelişim sıcaklıkları optimum 37°C dir. 10-45°C sıcaklık aralığında, pH; 9,6'da %6,5 NaCI'de ve %40 tuzda gelişmektedir. (Doming vd. 2003). Gıda endüstrisinde önemli bir yeri vardır Güney Avrupa yöresel peynirlerinde de tespit edilmiştir. Tuza ve yüksek sıcaklıkta toleransı kuvvetli olması, hızlı asit üretmesi nedeniyle starter kültür ve probiyotik kültürlerde kullanım açısından elverişlidir (Franz vd. 2003).

2. *Lactobacillus:* Lactobacillus cinsi bakterilerin morfolojileri; düz yada hafif kıvrık çubuk şeklindedir. Zincir şeklinde veya tek tek hücerelere sahiptir. Ayrıca, mikroaerofilik, fakültatif anaerobik, katalaz negatif ve gram- pozitif özellik gösterirler. Biyokimyasal ve fizyolojik açıdan çeşitliliğe sahiptir. Kompleks beslenme eğilimindedirler (Krieg ve Holt 1984, Wood ve Holzapfel 1995).

Lactobacillus türü DNA olarak, %50 den daha fazla adenin+timin (A+T)'e sahiptir ve homofermantatif veya heterofermantatif özellik gösteren lactobasiller, karbon kaynağı açısından glukoz kullanırlar. Habitatları ise karbonhidrat bulunduran subsratalrın ortamlarıdır. Bu yüzden; hayvan ve insan mukozal membranalarında (ağız içi, bağırsak gibi) bitkiler, gübreler, lağım pisliği, fermente olan ve bozulan gıdalar gibi çok çeşitli bir yelpazade bulunurlar (Hammnes ve Vogel 1995).

Üç alt gruba sahiptir; *Thermobacterium, Streptobacterium ve Betabacterium'*dur. (Klein vd. 1998).

3. *Staphylococcus*: Micrococcaceae familyasına ait olan Staphylococcus cinsinin bazıları insanlarda gıda zehirlenmelerinde önemli mikroorganizmalardan biridir. Bu bakteri, insanlarda besin zehirlenmelerinden hariç septisemi, toksik şok sendromu (TSS), otoimmün hastalıklar ve süt ineklerinde mastitise sebep olmaktadır (Omoe ve ark. 2004, Stevens ve ark. 2007).

Staphylococcus aureus; Gr-pozitif, kok, sporsuz, hareketsiz, aerobik ya da fakültatif aerobik, katalaz (+), koagulaz (+), lesitinaz (+) bir bakteridir. Oksijenli ortamı, üreme ve toksin üretme bakımından tercih edilebilmektedir. Belay ve Rasooly (2002)'nün çalışmasında aerobik koşullarda 9- 17 kat daha hızlı bir üreme ve toksin sentezi yaptığı belirlenmiştir. Sporsuz bakteriler arasında dış etkenlere ve dezenfektanlara en çok dayanan bakteridir. Patojen *S. aureus*, dört ana özelliği ile tanımlanmaktadır. Bunlar, lesitinaz ve koagulaz aktivitesi, termonükleaz enzimi salgılaması ile enterotoksin oluşturmasıdır. S. aureus salgıladığı lesitinaz enzimi ile yumurta sarısının emülsiyon halinde katıldığı besiyerlerinde lesitini hidrolize ederek koloni etrafında oluşturduğu aydınlık zon ile tanımlanır (Ünlütürk ve Turantaş 2003).

4. *Bacillus* doğada yaygın olarak bulunabilen, saprofitik bir bakteridir. Bacillus'lar özellikle spor oluşturdukları için hemen her yerde örneğin toprak, toz, saman, gıda, su, deniz ve tatlı su sedimentleri, balık ve su ürünleri, inek gübresi, bitki rizosferi, bazı böceklerin larvaları ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinden izole edilebilirler (Kaynar ve Beyatlı, 2006).

Bal arısı bakteri genleri arasındaki evrimsel ilişkiyi değerlendirmek için, MEGA v.7 programı kullanılarak filogenetik analiz yapılmıştır (Tamura vd. 2016). Bal arısında bulunan *lactobasil* bakteri genleri 3 ana grup oluşturacak şekilde dallanma göstermiştir. Bu tez çalışmasıyla bal arısı mikrobiyasındaki bakteri genlerinin biyoinformatik yöntemler kullanarak karakterizasyonu yapılmıştır.

Türkiye' de son yıllarda artan arı kayıpları ve bal veriminin düşmesinin en büyük nedenlerinden biri, arı hastalıkları ve zararlılarıdır (Doğaroğlu, 2009). Arılarda görülen Nosema, Dizanteri, Septisemi, Akut ve Kronik Arı Felci gibi hastalıkları; arılarda ki verimliliği azaltan, arı ve insan sağlığına etki eden ürün ve koloni kayıplarına neden olan önemli bir problemdir (Tutkun ve ark., 2003). Bu sebepten ötürü arı hastalıkları ve zararlı bakterin sağlıklı kolonilere bulaşması engellenmelidir.

Bugün arılar üzerinde belki toplu ölümlere sebebiyet veren bakteriler ciddi ölçüde olmasada, gelecekte olmayacağı anlamına da gelmez. Arı ürünlerinde ki verimliliğin

giderek azalması gelecekte kayıpların artarak devam etmesini sağlayabilir. Böceklerde veya arıların floralarında bulunan bakteri toplulukları birbirlerini etkileyerek arı ırklarına zarar verebilirler. Bu tez çalışması da gelecekte bu alanda yapılacak araştırmalarda bir ön veri olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

Böttger, E.C. 1989. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. FEMS Microbiology Letter, 53(1-2), 171–176.

Böttger 1989, Giovannoni vd. 1990, Ward vd. 1990, Muyzer vd. 1993, Ludwig ve Schleifer 1994, Amann vd. 1995, Head vd. 1998, Harmsen ve Karch 2004).

Corby-Harris, V., P. Maes & K. E. Anderson, (2014). The bacterial communities associated with honey bee (Apis mellifera) foragers, 9 (4).

Crane, E. & P. Walker, (1984). Pollination Directory for World Crops, International Bee Research Association, London,183.

Edwards, M. C., & Briers, G. E. (1998). Assessing the Inservice Needs of Entry-Phase Agriculture Teachers in Texas: A Discrepancy Model versus Direct Assessment.

Engel, P., James, R. R., Koga, R., Kwong, W. K., McFrederick, Q. S., & Moran, N. A. (2013). Standard methods for research on Apis mellifera gut symbionts. Journal of Apicultural Research, 52(4), 1-24.

Engel, P., Martinson, V.G., Moran, N.A., (2012) Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. 109, 11002-11007.

Hall, AB, Tolonen, AC, Xavier, RJ 2017. Human genetic variation and the gut microbiome in disease. Nature Reviews Genetics, 18(11), 690–699. DOI: 10.1038/nrg.2017.63.

Jill, E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clinical Microbiology Reviews, 17, 840-862.

Kence, A. (Proje Koordinatörü),1987. Türkiye'nin Biyolojik Zenginlikleri, 316p, 1987. TÇSV yayını, Ankara.

Khan, K. A., Ansari, M. J., Al-Ghamdi, A., Nuru, A., Harakeh, S., & Iqbal, J. (2017). Investigation of gut microbial communities associated with indigenous honey bee (Apis mellifera jemenitica) from two different eco-regions of Saudi Arabia. Saudi journal of biological sciences, 24(5), 1061-1068.

Kolbert, C.P. and Persing, D.H. 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. Current Microbiology, 2, 299-305.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology and evolution, 33(7), 1870-1874.

Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2013). Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: description of Snodgrassella alvi gen. nov., sp. nov., a member of the family Neisseriaceae of the Betaproteobacteria, and Gilliamella apicola gen. nov., sp. nov., a member of Orbaceae fam. nov., Orbales ord. nov., a sister taxon to the order ‘Enterobacteriales’ of the

Gammaproteobacteria. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 63(6), 2008-2018.

Mattila, H.R., Rios, D., Walker-Sperling, V.E., Roeselers, G., Newton, I.L., (2012). Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse.

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

Moran, N.A., Hansen, A.K., Powell, J.E., Saree, Z.L., (2012) Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees.

Naug, D., (2009) Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honey bee colony collapsesBiol. Conserv., 142, 2369-2372.

Omoe, K., Imanishi, K., Hu, D.L., Kato, H., Omoe, H.T., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K. 2004. Biological properties of Staphylococcal enterotoxin-like toxin type R. American society for microbiol. Infection and Immunity .72(6): 3664-3667.

Özbek, H., (2002). Bees and Nature. Apicultural Research, 22-25.

ÖZMEN, N., & ALKIN, E. (2006). Balın antimikrobiyel özellikleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. Uludağ Arıcılık Dergisi, 6(4), 155-160.

Raymann, K. and Moran, N.A. (2018) The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. Current Opinion in Insect Science, 26, 97–104.

Romero, S., Nastasa, A., Chapman, A., Kwong, W. K., & Foster, L. J. (2019). The honey bee gut microbiota: strategies for study and characterization. Insect molecular biology, 28(4), 455-472

Sambrook, J. (2001). russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harb Lab Press Cold Spring Harb NY, 999.

Southwick, E. E. & Southwick, L., Jr. 1992. Estimating the Economic value of honey bees (Hymenoptra, Apidae) as Agricultural pollinators in the United States. J. Econ. Entomol. 85, 621–633.

Tamura, K., M. Nei & S. Kumar, 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101 (30): 11030-11035.

Toxicon, Elsevier- 2020

Thorne, J.L., Kishino, H. and Painter, I.S. 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. Moleculer Biology Evolutation, 15, 1647-1657.

Trüper, H. G., & de'Clari, L. (1998). Taxonomic note: erratum and correction of further specific epithets formed as substantives (nouns)‘in apposition’. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 48(2), 615-615.

Uğraş, 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.

Uludağ Arıcılık Dergisi-Kasım 2006 / Uludag Bee Journal November 2006

Ünlütürk, A., Turantaş, F. 2003. Staphylococcus aureus intoksikasyonu: Gıda Mikrobiyolojisi,Beta Matbaacılık hizmetleri, Bornova, İzmir, 141-145s.

Woese, C.R., 1985. Study Evolutionary Relationship among Bacteria. Schleifer, K.H, Stackebrant, E. Evolutin of Procaryotes, Academic Press, London.

Zheng, H., Steele, M.I., Leonard, S.P., Motta, E.V.S. and Moran, N.A. (2018) Honey bees as models for gut microbiota research. Nature Laban, 47, 317– 325.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : G.Gül ÇEÇEN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 02.04.1990

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce, İtalyanca

Eğitim Durumu

Lise **:** Yahya Kemal Beyatlı Lisesi (2009)

Erasmus : Milano Üniversitesi, İtalya (Eylül 2015-Şubat 2016)

Lisans **:** Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Şubat, 2017)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Aralık 2020)