



20.yıl 62. sayı

ULUDAĞ ARICILIK DERGİSİ ULUDAG BEE JOURNAL

U. Arı D. - U. Bee J.

e-ISSN 2687-5594

Cilt: 20
Volume: 20

Sayı: 1
Number: 1

Mayıs 2020
May 2020

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

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



Bursa Uludağ Üniversitesi AGAM yayın organıdır.

This is a publication BÖRC of Bursa Uludağ University

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

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

İÇİNDEKİLER

ARAŞTIRMA MAKALELERİ

Bingöl'den Temin Edilen Ballarda ICP-MS İle Bazı Temel Ve Toksik Elementlerin Analizi

Aydın Şükrü BENGÜ, Mehmet Ali KUTLU

1

Bazı Ham Ve Ticari Ballarda Ayırt Edici Parametre Olarak İnvertaz Ve Glukoz-Oksidaz Aktivitesinin Karşılaştırılması
Hüseyin ŞAHİN, Sevgi KOLAYLI, Mehmet BEYKAYA

13

Tüketilebilir Propolis Ekstrelerinde Kullanılan Çözücülerin (Menstrumların) Değerlendirilmesi
Oktay YILDIZ

24

Farklı Çiçek Ballarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi
Aycan CİNAR

38

Arıcılık için Arazi Kullanım Değişikliklerinin Güneydoğu Anadolu İllerinde İncelenmesi
Fatih SARI, Fadimana KOYUNCU SARI

51

Türkiye'nin Farklı İllerinde Sonbahar Döneminde Üretilen Ana Arıların Kalite Kriterlerinin Değerlendirilmesi
Servet ARSLAN, Mahir Murat CENGİZ

62

Bingöl ve Yöresinde Üretilen Balların Kimyasal İncelenmesi
Yılmaz ATEŞ, Semih YAŞAR

72

Anadolu'nun Farklı İllerinden Toplanan Propolis Örneklerinin Kimyasal Karakterizasyonu
Şaban KESKİN, Levent YATANASLAN, Semiramis KARLIDAĞ

81

Tıbbi ve Aromatik Bitki Ekstraktlarının Balarısı (*Apis mellifera* L.) Kolonilerinin Bazı Fizyolojik Özellikleri Üzerine Etkisi
Yaşar ERDOĞAN, M. Murat CENGİZ

89

DERLEME MAKALELERİ

Bal Arılarında Gastrointestinal Bakteriyel Flora
Şeyma SUYABATMAZ, Arif BOZDEVECİ, Şengül ALPAY KARAOĞLU

97

Düzeltilme

114

CONTENTS

RESEARCH ARTICLES

Analysis of Some Essential and Toxic Elements by ICP-MS in Honey Obtained from Bingöl

Aydın Şükrü BENGÜ, Mehmet Ali KUTLU

Comparison of the Activity of Invertase and Glucose-Oxidase of Raw and Commercial Honey as a Distinguishing Parameter
Hüseyin ŞAHİN, Sevgi KOLAYLI, Mehmet BEYKAYA

Evaluation of Solvents (Menstruums) Used in Consumable Propolis Extracts
Oktay YILDIZ

Determination of Antimicrobial Activities of Different Flower Honeys
Aycan CİNAR

Land Use Change Assessment For Beekeeping In Southeast Anatolia
Fatih SARI, Fadimana KOYUNCU SARI

Evaluation of the Quality Criteria of Queens Produced in Different Provinces of Turkey in Autumn
Servet ARSLAN, Mahir Murat CENGİZ

Chemical Investigations On Honey Produced In Bingöl And Surroundings
Yılmaz ATEŞ, Semih YAŞAR

Chemical Characterization of Propolis Samples Collected from Different Provinces of Anatolia
Şaban KESKİN, Levent YATANASLAN, Semiramis KARLIDAĞ

The Effects Of Medical And Aromatic Plant Extracts On Some Physiological Characteristics Of Honeybee (*Apis mellifera* L.) Colonies
Levent ALTINTAŞ, Neslihan BEKTAŞ

REVIEW ARTICLES

Gastrointestinal Bacterial Flora in Honey Bees
Şeyma SUYABATMAZ, Arif BOZDEVECİ, Şengül ALPAY KARAOĞLU

Erratum

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

BİNGÖL'DEN TEMİN EDİLEN BALLARDA ICP-MS İLE BAZI TEMEL VE TOKSİK ELEMENTLERİN ANALİZİ

Analysis of Some Essential and Toxic Elements by ICP-MS in Honey Obtained from Bingol

Aydın Şükrü BENGÜ¹, Mehmet Ali KUTLU²

¹Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0002-7635-4855, Yazışma yazarı /
Corresponding author: E-mail: abengu@bingol.edu.tr

²Bingöl Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu Arıcılık Programı, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0003-0862-9690, E-posta: kutlular@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received: 11.11.2019

Kabul Tarihi / Accepted: 28.01.2020

DOI: 10.31467/uluaricilik.648631

ÖZET

Araştırma Bingöl'de 2019 yılı bal hasat sonrası elde edilen süzme ballardaki bazı elementlerin ve ağır metallerin tespitine yönelik olarak yapılmıştır. Bal üretim alanlarından temin edilen 11 adet süzme bal örneklerinde bazı elementlerin ve ağır metallerin düzeyleri ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi) ile belirlenmiştir. Bal örneklerinde As, Cd, Cs, Hg, Li, Pb, Se elementlerine rastlanmamış olup diğer elementler ve ağır metaller ortalama; Al 14,10 ±12,68 ppb, Ca 157,69±42,40 ppb, Cr 2,51±0,58 ppb, Cu 0,98±0,38 ppb, Fe 28,84±12,92 ppb, K 3920,12±1806,12 ppb, Mg 128,66± 33,08 ppb, Mn 3,93±2,61 ppb, Na 138,98±61,21 ppb, Ni 2,02±0,65 ppb ve Zn 9,71±6,74 ppb olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları bazı uluslararası limitlerle karşılaştırıldığında maksimum kalıntı limitlerinin altında olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın yapıldığı ballar insan sağlığı açısından herhangi bir tehlike oluşturmayacağı sonucuna varılmıştır. Ayrıca ağır metallerin tespit edilmemesi de memnuniyet vericidir.

Anahtar Kelimeler: Bingöl, Bal, Ağır Metaller, Bazı Elementler, ICP-MS

ABSTRACT

The research was carried out in Bingöl for the determination of some elements and heavy metals in the extracted honey obtained after 2019 honey harvest. The levels of some elements and heavy metals were determined by ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer) in 11 extracted honey samples obtained from honey production areas. As, Cd, Cs, Hg, Li, Pb and Se were not found in honey samples. Other elements and heavy metals were found to have the following ranges: Al 14.10±12.68 ppb, Ca 12.79±42.40 ppb, Cr 2.51±0.58 ppb, Cu 0.98±0.38 ppb, Fe 28.84±12.92 ppb, K 3920.12±1806.12 ppb, Mg 128.66± 33.08 ppb, Mn 3.94±2.61 ppb, Na 140.62±61.21 ppb, Ni 2.02±0.65 ppb and Zn 9.71±6.74 ppb. When the results of the study were compared with some international limits for honey consumption. It was concluded that the honey in which the study tested would not pose any danger to human health from consumption. It is also comforting to find that no heavy metals have been detected in these honey samples.

Key words: Bingol, Honey, Heavy Metals, Some Elements, ICP-MS

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

EXTENDED ABSTRACT

Purpose: Honey is a traditional and healing food that humans have consumed for centuries. Although most of the honey is sugar and its derivatives, it contains plenty of minerals that are extremely beneficial for human health. Minerals such as iron, copper, zinc, calcium, sodium, potassium are the most common found in honey and are important for human health. In addition to these extremely useful minerals, they can also contain heavy metals harmful to health caused by environmental factors such as pollution. Therefore, when analyzing the essential minerals in honey, it is more and more important as the environment becomes more polluted from development to also measure heavy metal content. Bingol is an unindustrialized province of eastern Anatolia and hosts a significant degree of apiculture. In recent years, parallel to the development of elemental analysis methods, more reliable results have been obtained for heavy metal analysis. ICP-MS technology is considered to be the most sensitive and reliable method for elemental analysis. For this reason, the ICP-MS technique was selected and used in the study. There were 11 different kinds of honey which acted as samples for this study that were obtained from Bingol.

Material and Methods: Honey produced in the Bingol center and the surrounding districts were used in this study. A total of 11 honey samples were obtained in July of 2019 from the Karlıova and Solhan plateaus, which are known to be important in honey production. In this study, 18 minerals were analyzed in addition to the heavy metals. The analysis was performed using a Perkin Elmer Axion 2000 model ICP-MS device at the Bingol University Central Research Laboratory. Honey samples were burned in acid with a microwave and then analyzed after necessary dilution. After daily calibration tests, the ICP-MS device was ready for analysis and samples were quantified using a standard curve.

Results and Conclusion: In Bingöl honey As, Cd, Cs, Hg, Li, Pb, Se were not detected. It is comforting that the heavy metals Pb, Hg, Cd and As were not detected. This was somewhat surprising given that Bingol is becoming an industrialized city. Mean and standard deviation values of other minerals in the honey were as follows: Al 14.10 ± 12.68 , Ca 157.69 ± 42.40 , Cr 2.51 ± 0.58 , Cu 0.98 ± 0.38 , Fe 28.84 ± 12.92 , K 3920.12 ± 1806.12 , Mg 128.66 ± 33.08 , Mn 3.93 ± 2.61 , Na 138.98 ± 61.21 , Ni 2.02 ± 0.65 and Zn at 9.71 ± 6.74 ppb levels. When compared with

the results of Yilmaz v.d. (1999), Ca, Mn, Fe were found to be at similar levels, but K and Na were found to be at significantly different levels. Because Na and K are the minerals most affected by soil diversity, this difference was considered to be due to difference in geographic origin. Relatively speaking, Bingol honey is rich in terms of Fe and Zn content which is very important for human health. We were pleased to find that there were no heavy metals in any of the honey samples.

GİRİŞ

Çevre kirliliğinin günümüzde küresel bir sorun haline geldiği ve etkilerini de her geçen gün artırarak devam ettiği tehlikeli bir boyuta ulaşmaktadır. Doğayı kirlüten başlıca etmenler, ağır metaller, zirai amaçla kullanılan çeşitli pestisitler ve organik bileşikler ve radyoaktif hidrokarbon yanma ürünleridir (Doelsch v.d. 2005). Ağır metaller topraktan bitki dokularına geçerek birikim yapmakta ve uzun yıllar yok olmadan kirletici olarak varlığını sürdürmektedir. Nüfus artışına paralel olarak yeni yerleşim birimlerinin oluşması, sanayileşme, tarımsal üretimde kullanılan alanlardan fazla ürün elde edebilmek adına kimyasal kullanımı sorunun boyutlarını artırmaktadır. Gıdalarda bulunan toksik maddeler içerisinde insan sağlığına en fazla zarar veren grup ağır metallerdir. Limitin üzerinde alınımı söz konusu olduğunda toksik etki göstererek canlı da kanserojen, mutajenik ve teratojenik etkileri gözlenmiştir (Rether 2002). Ağır metaller insanın vücuduna solunum ve sindirim yoluyla girmektedir.

Bal, TS 3036 Bal Standardı'na göre; "Bitkilerin çiçeklerinde ya da diğer canlı kısımlarında bulunan nektar bezlerinden salgılanan nektarın ve bitki üzerinde yaşayan bazı böceklerin, bitkilerin canlı kısımlarından yararlanarak salgıladığı tali maddelerin, bal arıları (*Apis mellifera* L.) tarafından toplanması, vücutlarında bileşimlerinin değiştirilip petek gözlerine depo edilmesi ve buralarda olgunlaşması sonucunda meydana gelen tatlı bir ürün" olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2010).

İçeriğinde 200 civarında bileşeni bir arada bulunduran bal, mineral maddeler, vitaminler, asitler ve enzimler sebebiyle oldukça zengin bir gıdadır. Her yaş grubu tarafından severek tüketilen bal, bu özelliklerinin yanı sıra, kolay sindirilebilmesi ve çeşitli hastalıklara karşı koruyucu ve iyileştirmeye katkı sağlaması açısından fonksiyonel bir arıcılık ürünüdür (Özmen ve Alkın 2006). Bal, insan yaşamı için

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

önemli olan fosfor, sodyum, potasyum, magnezyum, demir, mangan, iyot, klor ve kükürt gibi mineral maddeleri içeren bir besin maddesidir. Bal Tebliği'ne (2012/58) göre bal; kendine özgü tat ve kokuya sahip, herhangi bir katkı maddesi içermeyen, yapısında bulunan polen ve bala özgü maddeler içeren nitelikte olmalıdır (Karadal ve Yıldırım 2012, Anonim 2012, Cengiz v.d. 2018). Arılar ağır metalleri, nektar alımı sırasında bitkilerden almaktadırlar. Bitkilere ağır metaller bulundukları toprak yapısından, bitkilere uygulanan tarımsal mücadele ilaçlarından, verim artırıcı kimyasallardan ve bölgede bulunan ağır sanayi atıklarından bulaşmaktadır. Metaller sadece kovanın dışındaki çevreden değil aynı zamanda teknolojik işleme esnasında metal yüzeylerin ve tel ile peteğin teması sonucu da bala geçebilir (Özcan ve Juhaimi 2012). Ayrıca depolama ve taşınma esnasında plastik veya galvanize metal eşyanın kullanımı durumunda da metaller bala geçebilir.

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda balda ağır metaller rastlanmaktadır. Bunların canlı tarafından belirli bir konsantrasyonun üzerinde alınması durumunda hücre metabolizmasına ve gelişimine zarar verdiği, toksik etki yaptığı bildirilmiştir (Rether 2002). İnsanlar tarafından böyle arı ürünlerin tüketilmesi halk sağlığı için bir risk oluşturur.

Bu çalışmanın amacı, Bingöl ili ve ilçelerinde üretilen balların bazı faydalı mineral maddeler ve zararlı ağır metal düzeyleri açısından incelenmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada Bingöl ili ve ilçelerinde üretimi yapılan ballar kullanılmıştır. Bu amaçla, bal üretiminde önemli yeri olan Karlıova ve Solhan yaylaları başta olmak üzere diğer alanlardan toplamda 11 adet bal örneği 2019 yılı temmuz ayında temin edilmiştir. Bu çalışmada ağır metallerin yanı sıra toplamda 18 adet mineral maddenin tespiti de yapılmıştır.

ICP-MS için Numune Hazırlama ve Analiz Metodu

Yapılan çalışmada numunelerin element analizleri için quarz nebulizer gazlaştırıcı, cyclonic spray chamber ve entegre bir auto-sampler bulunduran ICP-MS NexION 2000 (PerkinElmer Inc., USA) cihazı kullanıldı. Human Power I cihazından elde edilen 18,3 MΩ ultra saf su kullanılarak %1 hidroklorik asit-ultra saf su içeren yıkama çözeltisi hazırlanarak ICP-MS metodu, numune hazırlanmasında bal numunelerinden yaklaşık 0,5 gram tartılarak Cem marka Mars 6 One Touch (USA) mikro dalga fırının teflon kaplarına aktararak her bir numunenin üzerine derişik 10 mL nitrik asit eklenerek mikro dalgada hazırlandı. ICP-MS kalibrasyon çözeltileri ticari olarak satılan çoklu element standartları %1'lik (nitrik asit-ultra saf su) ile seyreltilerek tablo 1'de belirtilen konsantrasyonlarda hazırlandı. Ayrıca, her ölçümden önce ICP- MS kalibrasyonu yapıldı. Element analizlerinin kontrolü için 100 ppb ⁴⁵Sc, ⁸⁹Y, ²⁰⁹Bi internal standart olarak kullanılmıştır.

Tablo 1. Kalibrasyon standartları

Table 1. Calibration standards

	1.Standart 0,1 (ppb)	2.Standart 1 (ppb)	3.Standart 10 (ppb)	4.Standart 50 (ppb)	5.Standart 125 (ppb)	6.Standart 250 (ppb)	7.Standart 500(ppb)	Internal standart
Analitler	⁷ Li, ²³ Na, ²⁴ Mg, ²⁷ Al, ³⁹ K, ⁴³ Ca, ⁵² Cr, ⁵⁵ Mn, ⁵⁶ Fe, ⁶³ Cu, ⁶⁶ Zn, ⁶⁹ Ni							⁴⁵ Sc
	⁷⁵ As, ⁷⁹ Se, ¹¹¹ Cd, ¹³³ Cs							⁸⁹ Y
	²⁰² Hg, ²⁰⁸ Pb							²⁰⁹ Bi

Bir peristaltik pompa yardımıyla numuneler argon gazı akışı ile cyclonic spray chamber'e gönderildi. Ölçümlerde ayarlama, girişimler, veri toplama ve veri analizi dahil olmak üzere cihazı kontrol etmek için

ICP-MS NexION cihaz yazılımı kullanıldı. Girişimleri önlemek için argon gazına ek olarak yüksek oranda helyum gazı kullanıldı. ICP-MS cihazının çalışma koşulları aşağıdaki Tabloda gösterilmiştir.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Tablo 2. ICP-MS cihazının çalışma koşulları

Table 2. Operating conditions of the ICP-MS

Parametre	Açıklama/ Değer
Nebulizatör	Cam Tip C
Spren Odası ve Sıcaklığı	Cam, 2 °C
Enjektör	2.0 mm i.d.
Nebulizatör Akışı	< 2% oksit için optimize
RF Gücü	1600 W
Konlar	Ni
Tekrar Sayısı	3
Bekleme Süresi	50 ms
Aerosol Dilüsyon	Set to 2.5x
Numune Dağıtım Hızı	350 µL/min
Durulama Süresi	45 saniye
Nebulizatör Gaz Akış Hızı	0,93 L/min
Deflektör Gerilimi	-12 V
Analog Kademe Gerilimi	-1750 V
Sinyal Kademe Gerilimi	1100 V
Ayrımcı Eşiği	26
Alternatif akım (AC) Çubuk Ofseti	-4

BULGULAR

Tablo 3. 2019 yılı Bingöl ballarında elementel analiz sonuçları

Table 3. Elemental analysis results of Bingöl honey in 2019

Sıra no	As (ppb)	Cd (ppb)	Cs (ppb)	Hg (ppb)	Li (ppb)	Pb (ppb)	Se (ppb)	Al (ppb)	Ca (ppb)
1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	30,76	199,97
2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1,56	110,59
3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	10,68	129,77
4	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	9,75	187,58
5	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	27,50	150,44
6	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	5,93	98,50
7	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	3,34	104,78
8	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	5,68	111,61
9	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	36,84	162,46
10	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	21,02	126,01
11	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2,04	52,90
Ortalama	-	-	-	-	-	-	-	14,10	157,69
Standart sapma	-	-	-	-	-	-	-	12,68	42,40

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Sıra no	Cr (ppb)	Cu (ppb)	Fe (ppb)	K (ppb)	Mg (ppb)	Mn (ppb)	Na (ppb)	Ni (ppb)	Zn (ppb)
1	3,86	1,47	35,67	3654,28	165,72	7,573	132,45	3,80	7,52
2	1,72	0,30	10,90	3189,33	117,13	1,71	279,10	1,25	3,49
3	2,79	1,66	30,45	6870,67	166,32	2,89	196,62	2,18	4,04
4	2,15	0,97	21,51	5339,06	117,05	9,88	89,47	1,75	2,24
5	2,92	1,08	61,15	2919,15	143,81	4,13	190,67	1,97	3,79
6	2,83	0,86	30,25	2186,95	93,13	2,45	111,37	1,90	21,22
7	2,16	1,20	19,24	2769,23	121,12	3,90	99,13	1,69	9,25
8	2,50	0,57	22,83	1947,14	107,03	3,21	100,05	1,82	17,85
9	2,49	0,77	33,18	3511,83	179,91	4,18	129,06	1,84	7,09
10	2,05	0,92	22,79	7128,76	132,45	1,8	135,16	1,71	18,56
11	2,13	1,02	24,69	2611,95	71,84	1,46	65,70	2,32	11,72
Ortalama	2,51	0,98	28,84	3920,12	128,66	3,93	138,98	2,02	9,71
Standart sapma	0,58	0,38	12,92	1806,39	33,08	2,61	61,21	0,65	6,74

Tablo 3’de görüldüğü gibi çalışılan Bingöl ballarında; As, Cd, Cs, Hg, Li, Pb, Se elementlerine rastlanmadı. Bulunmayan bu elementlerin özelliklerine bakıldığında; Arsenik (As) atom numarası 33 olan elementtir. Birçok mineralin yapısında saf bir element kristali olarak bulunduğu gibi diğer minerallerle bir arada da bulunabilmektedir. Kadmiyum (Cd) yumuşak, mavimsi bir metaldir. Nemli havada yavaş yavaş oksitlenir, oksit kararlı olup, metali kaplar. Atom numarası 48 ve atom ağırlığı 112,40’tır. Kadmiyum mineralleri yer kabuğunun yaklaşık %0,01’den azını teşkil eder. Sezyum (Cs) periyodik cetvelin 1A grubunda yer alan atom numarası 55 olan gümüş beyazı renkte alkali metal elementtir. Doğada başlıca polüsit mineralinde bulunur ve sezyum klorürün indirgenmesiyle elde edilir. Cıva sembolü “Hg” ve atom numarası 80 olan kimyasal element. Cıva, hava, su ve toprakta birkaç şekilde bulunur. En tehlikeli ağır metallerdendir. Lityum (Li) atom numarası 3 olan kimyasal elementtir. Alkali metal olarak bulunur ve yoğunluğu en düşük olan metaldir. Lityum doğada saf halde bulunmaz. Yumuşak ve gümüşsü beyaz metaldir. Kurşun (Pb) atom numarası 82 olan mavi-gümüş rengi karışımı bir elementtir ve ağır metal olarak son derece zararlıdır. Selenyum (Se) atom numarası 34, kütle numarası 78.96 olan elementtir.

TARTIŞMA

Alüminyum (Al) Atom numarası 13 olup renk olarak gümüş görünümlüdür. Yapılan bu çalışmada ortalama $14,10 \pm 12,68$ ppb seviyesinde tespit edilmiştir. Oksidasyona karşı yüksek direnç gösteren bu element boksit cevheri şeklinde bulunmaktadır. Bir ağır metaldir ve vücuda içme suyu veya diğer kaynaklardan alınması sonucu Alzheimer hastalığına yakalanma ihtimali artar. Alzheimer hastalarında beyindeki alüminyum oranının arttığı tespit edilmiştir (Dissanayake ve Chandrajith 1999). Akciğerler ve sinir sistemi üzerinde de olumsuz etkileri tespit edilmiştir (Nordberg ve Cherian 2005). Bazı antiasit ilaçlar ve ter önleyici ürünlerde bulunan alüminyuma karşı gelişen alerjik reaksiyonlar da bildirilmiştir.

Kalsiyum (Ca) toprak alkalileri grubundan metalik bir elementtir. Yapılan bu çalışmada ortalama $157,69 \pm 42,40$ ppb düzeyinde tespit edilmiştir. Kalsiyum; kas fonksiyonları ve sinir sistemi düzenlenmesinde görev almasının yanı sıra kemik ve dişlerde yapıtaşı olarak bulunur. Kan pıhtılaşmasında protrombinin trombine dönüşümünü aktive eder. Enzim aktivasyonunda hayati bir rol oynar. Kalsiyum, adenosin trifosfat (ATPase), süksinik dehidrojenaz, lipaz vb. gibi çok sayıda enzimi aktive eder. Ayrıca kasılma, sinir uyarılarının normal iletimi ve nöromusküler eksitabilite kasta yer

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

alan membran geçirgenliği için de gereklidir. Kanda kalsiyum düzeylerinin azalması sinir sisteminde birçok olumsuzluğu beraberinde getirir (Hays ve Swenson 1985, Malhotra 1998, Murray v.d. 2000). Kalsiyum eksikliği, büyüme çağındaki çocuklarda kemiklerin kalsiyum fosfat ile yetersiz kalsifikasyon nedeniyle raşitizme sebep olur. Kemikler bu nedenle yumuşak kalır ve vücut ağırlığı ile deforme olur. Yetişkinlerde, kemiklerin genel bir demineralizasyonu olan osteomalaziye sebep olur. Aynı zamanda, kalsiyumun kemiklerden çekildiği ve kemiklerin zayıf ve gözenekli hale geldiği ve sonra kırıldığı durum osteoporoza da katkıda bulunabilir. (Hays ve Swenson 1985). Kalsiyum kaynakları süt ve ürünleri, mercimek, fasulye, fındık, yapraklı sebzeler, sardalya gibi küçük balıklar sayılabilir.

Krom (Cr) Atom numarası 24 olan metalik bir elementtir. Çalışmamızda ortalama $2,51 \pm 0,58$ ppb seviyesinde bulunmuştur. Krom, hayvanlar ve insanlar için vazgeçilmez bir unsurdur (Frieden 1984). Sığır karaciğerinden izole edilen nükleoproteinlerde ve ayrıca RNA preparatlarında bulunmuştur (Uppala v.d. 2005). Kromun özellikle RNA molekülünün konfigürasyonunun korunmasında ve kollajenin çapraz bağlama maddesi olarak rol oynadığı gösterilmiştir (Eastmond v.d. 2008). Krom eksikliğinin lipid metabolizmasını olumsuz etkileyerek ateroskleroz oluşumuna sebep olduğuna dair insan ve hayvan çalışmaları vardır (Frieden 1984). Cr eksiklikleri özellikle çocuklarda protein kalorili malnütrisyona sebep olabilir (Mertz 1974). Gıda maddelerinin Cr içeriği geniş çeşitlilik gösterir ve küçük bir organik molekül olan glikoz tolerans faktörü ile kombinasyon halinde bulunur. İnsanlarda krom zehirlenmesi, genellikle kromik asit veya kromatların yanlışlıkla yutulması ile sınırlıdır. Böbrek, karaciğer, sinir sistemi ve kan için toksisite en önemli ölüm nedenleridir (Langard 1980). Kaynaklar arasında et, karaciğer, bira mayası, kepekli tahıllar, fındık ve peynir sayılabilir.

Bakır (Cu) atom numarası 29 olan elementtir. Yapılan bu çalışmada ortalama $0,98 \pm 0,38$ ppb düzeylerinde tespit edilmiştir. Bakır, sitokrom c oksidaz, amin oksidaz, katalaz, peroksidaz, askorbik asit oksidaz, sitokrom oksidaz, plazma monoamin oksidaz, eritrokuprin (seruloplazmin), laktaz, ürikaz, tirozinaz, sitozol süperoksid diseroz, vb. enzimlerin yapısına katılır ve demir emiliminde rol alır (Chandra 1990). Cu, hematolojik ve nörolojik sistemler için gerekli temel bir mikro besindir. (Tan v.d. 2006). Kemik oluşumu ve büyümesi, sinir sistemlerinde miyelin kılıflarının oluşumu, hemoglobine demirin

dahil edilmesine yardımcı olur. Ayrıca demirin gastrointestinal sistemden (GIT) emilimine ve dokulardan demirin plazmaya transferinde görev alır (Malhotra 1998, Murray vd. 2000). Albümin tarafından taşınarak seruloplazmine bağlanır. Seruloplazmin, oksidaz aktivitesine sahiptir ve böylece ferrik demirin transferrine dahil edilmesini kolaylaştırır. Cu içeren kaynaklar arasında karaciğer, kepekli tahıllar, melas, baklagiller, kabuklu yemişler ve deniz ürünleri bulunur.

Demir (Fe) yer kabuğunda en çok bulunan dördüncü mineral olup atom numarası 26 olan kimyasal elementtir. Yaptığımız çalışmada ortalama $28,84 \pm 12,92$ ppb seviyelerinde bulunmuştur. Demir, oksijen taşınmasında hemoglobinin yapısında işlev görür. Hücre solunumda, sitokrom c, c1, a1, vb. gibi biyolojik oksidasyona katılan enzimlerin temel bileşeni olarak işlev görür (Malhotra 1998). Fe, hemoglobin, miyoglobin ve sitokromlardaki *hemin* bir parçası olarak süksinat dehidrojenazın da önemli bir bileşenidir (Chandra 1990). Omurilik ve beyindeki serebellar kıvrımların beyaz maddesinin uygun şekilde miyelinlenmesi için demir gereklidir, ayrıca nörotransmitter sentezinde yer alan bir dizi enzim için de bir kofaktördür. Fe, nörotransmitterlerin sentezi ve paketlenmesi, bunların alımını ve diğer demir içeren proteinlere ayrışmasında rol oynayarak doğrudan veya dolaylı olarak beyin fonksiyonlarına etki eder (Larkin ve Rao 1990). Biyolojik olarak önemli demir bileşikleri hemoglobin, miyoglobin, sitokromlar, katalaz ve peroksidazdır. Adrenokortikal hormonlar (glukokortikoidler) plazma demir seviyesinin düzenlenmesinde rol oynar. Stres esnasında, hipotalamus, adenohipofiz ve adrenal korteks aktive edildiğinde plazma demiri azaltılır. Demirin ferröz formu (Fe^{+2}), ferrik formu (Fe^{+3})'na göre daha kolay çözülebilir ve absorblanabilir. Kandaki demir eksiliğine anemi, fazlalığına ise polisitemi denir. (Malhotra 1998; Murray v.d. 2000). Fe eksikliğinin beyin gelişiminde ve huzursuz bacak sendromunun patofizyolojisinde rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca, Fe eksikliği, nörotransmitter metabolizması, protein sentezi, organogenez vb gibi aralarında beyin işlevini etkileyebilecek birçok metabolik süreçteki değişikliklerle de ilişkilidir (Sadrzadeh ve Saffari 2004). Demir kaynakları arasında kırmızı et, dalak, kalp, karaciğer, böbrek, balık, yumurta sarısı, fındık, baklagiller, pekmez, koyu yeşil yapraklı sebzeler bulunur.

Potasyum (K) atom numarası 19 olan yumuşak, alkali metaldir. Yapılan bu çalışmada ortalama $3920,12 \pm 1806,39$ ppb düzeylerinde tespit edilmiştir.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Potasyum, hücre içi sıvıdaki temel katyondur ve asit-baz dengesinde önemli işleve sahiptir. Ayrıca ozmotik basıncın düzenlenmesi, sinir impulslarının iletimi, kas kasılması (ve özellikle kalp kasılması), hücre zarı işlevi ve Na^+/K^+ ATPaz fonksiyonlarında önemli işlevler görür. Potasyum, glikojenez sırasında da gereklidir. Ayrıca ATP'den pirüvik aside fosfatın transferinde rol alır ve muhtemelen birçok diğer temel hücresel enzimatik reaksiyonlarda da görev alır. Potasyum metabolizması aldosteron hormonu tarafından düzenlenir. Serum potasyum seviyesinin arttığı durumlara hiperkalemi denir ve bu ilerlemiş kronik böbrek yetmezliği, şok ve dehidrasyon semptomları ile Addison hastalığında ortaya çıkar. Hipokalemi düşük serum potasyum düzeyidir ve bu ishal, metabolik alkaloz ve ailesel periyodik paralizlerde ortaya çıkar. Bitki ürünleri, sodyumdan çok daha fazla potasyum içerir. Potasyum kaynakları arasında sebzeler, meyveler ve fındık bulunur (Hays ve Swenson 1985, Malhotra 1998, Murray v.d. 2000).

Magnezyum (Mg) atom numarası 12 olan en hafif metallerden biridir. Başka maddelerle karıştırılarak kullanılır. Yapılan bu çalışmada ortalama $128,66 \pm 33,08$ ppb seviyesinde tespit edilmiştir. Magnezyum, timin pirofosfatın bir kofaktör olduğu çeşitli enzim sistemlerinin aktif bir bileşenidir. Magnezyum eksikliğinde oksidatif fosforilasyon büyük ölçüde azalır. Mg aynı zamanda fosfat transfer eden enzimler miyokinaz, difosfopiridin nükleotid kinaz ve kreatin kinaz için temel bir aktivatördür. Aynı zamanda sitrik asit döngüsündeki reaksiyonların önemli enzimleri olan pirüvik asit karboksilaz, pirüvik asit oksidazı aktive eder. Aynı zamanda kemikler ve dişlerin bileşenidir (Murray v.d. 2000). Sindirim sisteminin sağlığı ve böbrekler magnezyum durumunu önemli ölçüde etkiler. Diyetteki magnezyumun yaklaşık üçte biri ile yarısı vücutta emilebilir. Crohn hastalığı gibi emilimini bozan gastrointestinal bozukluklar, vücudun magnezyum emebilme kabiliyetini sınırlandırabilir. Bu bozukluklar vücudun magnezyum depolarını tüketebilir ve aşırı durumlarda magnezyum eksikliğine sebep olabilir. Kronik veya aşırı kusma ve ishal de magnezyumun tükenmesine sebep olabilir. Magnezyum eksikliğinin semptomları, emilim bozukluğu veya ishal ve alkolizmdir. Akut magnezyum eksikliği vazodilatasyonla sonuçlanır. Toksikite hastalığı veya insanlarda magnezyum eksikliği semptomları arasında depresif derin tendon refleksleri ve solunum yer alır (Murray v.d. 2000).

Magnezyumun kaynakları klorofil içeren yeşil yapraklı sebzelerdir.

Mangan (Mn) atom numarası 25 olan elementtir. Grimsi metal renklidir. Yapılan çalışmada $3,93 \pm 2,61$ ppb olarak bulunmuştur. Mangan, hidrolaz, dekarboksilaz ve transferaz enzimlerinin bir kofaktörüdür (Murray v.d. 2000). Glikoprotein ve proteoglikan sentezinde rol oynar ve mitokondriyal süperoksit dismutazın bir bileşenidir. Mn, kırkıdaktaki proteoglikanların sentezinde rol alan fosfohidrolazlarda ve fosfotransferazların da kofaktörüdür. Ayrıca Mn, üre oluşumunda, pirüvat metabolizmasında ve bağ dokusu biyosentezinin galaktotransferazında yer alan enzimlerin bir parçasıdır (Chandra 1990). Mn, bazı önemli enzim sistemlerini aktive eder ve bu kapasitede, kemik matrislerini oluşturmak için kondroitin sülfat gibi mukopolisakaritlerin sentezi için gereklidir. Sonuç olarak, iskelet deformasyonları, mangan alımı yetersiz olduğunda ortaya çıkar (Gruden 1977). Manganın mitokondride yoğunlaşmış olması, *in vivo* olarak manganın oksidatif fosforilasyonun kısmi regülasyonunda yer aldığına dair fikir vermektedir. Manganın absorpsiyonu, diyetdeki kalsiyum ve fosforun aşırı miktarlarının varlığı ile inhibe edilir. Manganın süt gibi düşük demir içeren yiyeceklerden emilimi ve tutulması nispeten yüksektir. Süt demirle desteklenirse, emilen mangan yüzdesi azalır (Gruden 1977). Manganın kaynakları arasında kepekli tahıllar, çay, baklagiller, fındık ve tohumlar bulunur.

Sodyum (Na) 11 atom numaralı elementtir. Yaptığımız çalışmada $138,98 \pm 61,21$ ppb olarak bulunmuştur. Sodyum, hücre dışı sıvıların ana katyonudur. Plazma hacmini ve asit-baz dengesini düzenler, vücut sıvılarında ozmotik basıncın korunmasında hayati rol oynar. Ayrıca, kasların normal iritabilitesini korur ve hücre geçirgenliği, sinir ve kas fonksiyonunu aktive eder; membran potansiyellerinin korunması, sinir uyarılarının iletimi ve monosakkaritlerin, amino asitlerin, pirimidinlerin ve safra tuzlarının emilim fonksiyonlarında rol oynar. Ozmotik basınçtaki değişiklikler büyük ölçüde sodyum konsantrasyonuna bağlıdır. Metabolizması aldosteron tarafından düzenlenir. Sodyum kolayca sodyum iyonu olarak emilir ve dolaşıma katılır. Serumda sodyum düzeylerinin artışına hipernatremi denir ve Cushion hastalığına sebep olur iken serum düzeylerinin azalmasına hiponatremi denir ve Addison hastalığına sebep olur (Hays ve Swenson 1985, Malhotra 1998, Murray v.d. 2000).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Nikel (Ni) atom numarası 28 olan kimyasal bir elementtir. Yaptığımız çalışmada $2,02 \pm 0,19$ ppb olarak bulunmuştur. Nikel, hayvanlarda önemli bir unsurdur (Nielsen 1976). Nikelin, membran yapısının korunmasında, prolaktin kontrolünde, nükleik asit metabolizmasında ya da enzimlerde kofaktör olarak rol oynayabileceği düşünülmektedir. Çoğu diyet alımının bu elementin yeterli miktarını sağlayacağı anlaşılmaktadır (Hurley 1976).

Çinko (Zn) periyodik tabloda geçiş elementleri arasında bulunur. Düşük sıcaklıkta kaynar. Kırılgan olup 120°C 'de şekil değiştirebilir. Yaptığımız çalışmada $9,71 \pm 6,74$ ppb olarak bulunmuştur. Çinko, bitki ve hayvansal dokularda yaygın olarak görülür ve tüm canlı hücrelerde bulunur. Kofaktör olarak laktat dehidrojenaz, alkol dehidrojenaz, glutamik dehidrojenaz, alkalik fosfataz, karbonik anhidraz, karboksipeptidaz, süperoksit dismutaz, retinen redüktaz gibi birçok enzimde işlev görür. İlave DNA ve RNA polimeraz gibi birçok enzimin de bir bileşenidir. Zn bağımlı enzimler makro besin metabolizmasında ve hücre replikasyonunda rol oynar (Hays ve Swenson 1985, Arinola v.d. 2008). Vitamin A ve E metabolizması ve biyoyararlanımı çinko durumuna bağlıdır. Çinko doku onarımı ve yara iyileşmesi için gereklidir, protein sentezi ve sindiriminde hayati bir rol oynar. Çinko optimum insülin etkisi için gereklidir ve insülinin ayrılmaz bir bileşenidir. İnsanlarda, eksikliğinde ortaya çıkan semptomlar arasında hipogonadizm, büyüme yetersizliği, geç yara iyileşmesi, azalmış tat duygusu ve kokuların keskinliğinin artması sayılabilir. Sekonder olarak da akrodermatit enteropatikaya ve parenteral beslenmeye sebep olabilir (Murray v.d. 2000). Çinko kaynakları arasında kırmızı et, balık unu, karaciğer, yumurta, süt ürünleri, sebzeler ve bazı deniz ürünleri bulunur.

Çinko ve demir aslında insan, hayvan ve bitkiler için yaşamsal öneme sahip elementlerdir. Çinko ve demir için insanların gıdalarıyla alabileceği günlük miktarlara yönelik National Academy of Science (NAS) ve diğer bazı kaynaklarda değerler bulunmaktadır. NAS'a göre erişkin bir insan (19-70 yaş) için gıdalarla alınabilecek günlük çinko ve demir değerleri sırasıyla 40 ve 45 mg'dır. Diğer kaynaklarda ise bu değerler Zn için 5,00-12,0 mg/100g, Fe için 10,0-27,0 mg/100g'dır (Demirezen ve Aksoy 2005).

Balın, tekniğine uygun ve hijyenik şekilde hazırlanması, işlenmesi, depolanması, nakledilmesi ve pazarlanması aşamalarında taşınması gereken

özellikleri belirleyen 17.12.2005 tarih ve 26026 sayılı "Bal Tebliği" madde 8'deki bulaşanlar bölümünde; "Bu Tebliğ Kapsamında yer alan ürünlerde bulaşanların miktarı Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nin Bulaşanlar bölümüne uygun olmalıdır" ifadesi yer almaktadır (T.C. Resmi Gazete, 2005). Ancak "Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğde (T.C. Resmi Gazete, 2008) bal örneklerindeki metal düzeyleriyle ilgili bir değer bulunmamakla birlikte ballardaki metal düzeyleri Ulusal Kalıntı Kontrol Planı çerçevesinde değerlendirilmektedir. Bu plan çerçevesinde 2006, 2007, 2008 ve 2010 yıllarında alınan bal örneklerinde kurşun, bakır, kadmiyum ve çinko analizleri yapılmaktadır (KKGM, 2010).

Türkiye'deki ballarda ağır metal ve iz element miktarları ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Geleneksel tarım ürünleri halk sağlığını yakından ilgilendiren çeşitli metalleri yetiştikleri topraktan, çevreden, egzoz gazları, endüstriyel faaliyetler vb. ile atmosferden, kullanılan kimyasallardan veya gübrelerden alarak bünyelerinde biriktirirler (Vural 1993). Çevre kirliliğinin en önemli göstergesi olan ağır metaller, havayı, toprağı ve suyu büyük oranda kontamine edebilirler. Topraktaki ağır metal düzeyinin artışı bitki dokularındaki ağır metal birikimini artırmaktadır. Arılar bitkilerden nektar alımı sırasında ağır metalleri kovana taşımakta, bala dönüştürmekte ve sonrasında bu bal insan beslenmesinde kullanılmaktadır. Balın besin olarak tüketilmesi sonucu ağır metaller tüketenlerin dokularında birikmektedir. Bal önemli bir arıcılık ürünü olup bal arılarınca bitkilerin nektar salgıları veya bazı bitkiler üzerinde yaşayan canlı böceklerin salgılarından elde ettikleri bir gıdadır. Ülkemizin birçok bölgesinde geleneksel ürünler arasında yer alan önemli bir arıcılık ürünüdür. İnsan beslenmesi açısından önemli bir gıda olan balın elde edildiği kaynaklar ve sonrasındaki üretimi aşamalarında birçok zararlı kimyasallara mazur kalma ihtimali de maalesef ki bulunmaktadır.

Türkiye'nin 6 farklı bölgesinden alınan bal örneklerinde Cu, Zn, Fe, Pb ve Cd düzeylerinin (sırasıyla 0,23-2,41 ppm, 1,1-12,7 ppm, 1,8-10,2 ppm, 8,4-106 ppb ve 0,9-17,9 ppb) belirlendiği çalışmada, Doğu Anadolu Bölgesi'nden alınan örneklerdeki metal düzeylerinin daha düşük olduğu gözlenmiştir (Tüzen ve Soylak 2005). Çalışmamızda Cu 0,30-1,65 ppb, Zn 3,48-21,21 ppb, Fe 10,90-61,15 ppb aralığında tespit edildi ve buna göre Tüzen ve Soylak'ın çalışmalarından daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte Pb ve Cd

elementlerine ise rastlanmamış olması son derece sevindiricidir.

Karadeniz Bölgesi'nde üretilen deli bal (Rhododendron) ve çiçek balından alınan toplam 20 örnekte metal düzeylerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada, analiz edilen deli bal örneklerindeki Cu ve Zn düzeylerinin çiçek balındaki düzeylerden daha yüksek, Fe düzeylerinin ise daha düşük olduğu belirlenmiştir (Silici v.d. 2008). Muş, Ağrı, Bitlis ve Erzurum illerinden nektar akımı dönemlerinde gezginci arıcılık yapan ve çoğunlukla yol güzergahına 50 m ile 2 km mesafede arı bulunduran üreticilerden alınan çiçek balı örneklerinde ortalama metal düzeyleri miktar yönünden azalan sırayla $Fe > Zn > Cu > Pb > Cd$ şeklinde sıralandığı saptanmıştır (Güleç 2007). Çalışmamız Güleç (2007) tarafından yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında, sırası ile ortalamaları bakımından $Fe 28,82 > Zn 9,91 > Cu 0,98 > Pb 0 > Cd 0$ aynı benzerliği göstermiştir.

Tüzen ve Soylak (2005) tarafından Orta Anadolu'nun 15 farklı yerinden alınan toplam 60 bal örneğinde ağır metal analizi yapılmış (Pb, Cd, Cu, Zn) ve ortalama metal düzeyleri (Pb 0,0176- 0,0321 ppm, Cd 0,0109-0,0212 ppm, Cu 0,25-1,10 ppm, Fe 1-5,2 ppm ve Zn 1,1- 24,2 ppm) $Zn > Fe > Cu > Pb > Cd$ şeklinde bulunmuştur. Çalışmamız ağır metal düzeyleri bakımından Tüzen ve Soylak (2005) çalışmalarında var olan Pb ve Cd elementine rastlanmamıştır. Cu 0,30-1,65 ppm, Fe 10,909-61,152 ppm ve Zn 3,48- 21,22 ppm olarak biraz yüksek çıkmıştır.

Türkiye'nin 6 farklı (Orta Anadolu, Karadeniz, Ege, Akdeniz, Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu) bölgesinden alınan 45 bal örneğinde Fe düzeyi $3,71 \pm 2,76$ - $5,43 \pm 3,53$ ppm ve Zn düzeyi $6,24 \pm 2,81$ - $11,53 \pm 1,46$ ppm olarak tespit edilmiştir (Yarsan vd. 2007). Kayseri Erciyes Dağı ve çevresindeki 6 farklı arılıktan alınan bal örneklerinde yapılan çalışmada, yerleşim bölgesine yakın olan arılıklardan alınan örneklerdeki ağır metal içeriğinin genelde daha yüksek olduğu Zn $2,2 \pm 0,01$ - $11,0 \pm 0,04$ ppm oranını olarak tespit etmişlerdir (Demirezen ve Aksoy 2005).

Araştırmamızdaki sonuçlara göre Fe ve Zn düzeylerinin Yarsan v.d. (2007)'inin çalışmalarından yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmamızda Zn miktarı ortalaması ise Kayseri Erciyes Dağı çevresinde yapılan çalışmanın alt limitinden yüksek üst limitinden düşük olduğu görülmektedir.

Fransa'da yapılan bir çalışmada 86 bal örneğinde minimum ve maksimum değerler Cu (0,06-1,71 mg/kg), Pb (280,00-1080,00 µg/kg), Ni (0,09-0,34 mg/kg), Al (0,18-9,72 mg/kg), Ag (0,09-0,16 ppm), Ca (8,90-130,90 ppm), Cr (0,08-0,36 ppm), Co (0,10-0,23 ppm), Fe (0,56-86,76 ppm), Li (0,03-0,05 ppm), Mg (3,62-68,78 ppm), Mn (0,11-42,81 ppm), Mo (0,15-0,33 ppm), P (84,39-354,45 ppm), S (9,61-118,10 ppm), Zn (0,17-6,42 ppm) ve Cd (0,08-0,25 ppm) olarak bulunmuştur (Devillers vd. 2002).

Çin'de 48 bal örneğinde Hg ($46,18 \mu g kg^{-1}$), Zn ($1329,5 \mu g kg^{-1}$), Cd ($1,34 \mu g kg^{-1}$), Pb ($33,98 \mu g kg^{-1}$), As ($13,44 \mu g kg^{-1}$), Cu ($46,18 \mu g kg^{-1}$) olarak tespit edilmiştir (Ru vd. 2013). Bulgaristan'da 2019 yılında 30 bal örneğinde yapılan bir çalışma sonucu Al ($0,4$ - $4,4 mg kg^{-1}$), Cd ($<0,01 mg kg^{-1}$), Cr ($<0,01$ - $0,04 mg kg^{-1}$), Pb ($<0,08$ - $0,25 mg kg^{-1}$), Ni ($0,01$ - $0,92 mg kg^{-1}$), As ($<0,01$ - $0,32 mg kg^{-1}$), Ca (43 - $178 mg kg^{-1}$), Fe ($1,1$ - $13,1 mg kg^{-1}$), K ($892,4$ - $2114 mg kg^{-1}$), Mg ($25,7$ - $182 mg kg^{-1}$), Na ($7,3$ - $42 mg kg^{-1}$), P ($59,3$ - $210 mg kg^{-1}$), S ($25,3$ - $104 mg kg^{-1}$), Co ($<0,01 mg kg^{-1}$), Cu ($0,2$ - $1,1 mg kg^{-1}$), Sr ($0,2$ - $0,7 mg kg^{-1}$), V ($<0,05 mg kg^{-1}$), Zn ($0,28$ - $4,6 mg kg^{-1}$), Mn ($3,4$ - $27 mg kg^{-1}$) olarak bulunmuştur (Atanassova vd. 2016). Yılmaz ve Yavuz (1999), tarafından Güneydoğu Anadolu ballarında Mg ($33 \pm 14,3 mg/kg$), Cu ($1,8 \pm 1,7 mg/kg$), Fe ($6,6 \pm 3,12 mg/kg$), Mn ($1,0 \pm 0,7 mg/kg$), Co ($1,0 \pm 0,6 mg/kg$), Zn ($2,7 \pm 2,5 mg/kg$), Ni (tespit edilmemiş) mikro elementlerine ve Na ($118 \pm 54,4 mg/kg$) K ($296 \pm 153 mg/kg$), Ca ($51 \pm 42,6 mg/kg$) makro elementlerine bakılmıştır.

Hernandez vd. (2005) tarafından Kanarya adalarının 5 farklı bölgesinden elde edilen toplamda 116 adet balda bu bölgelere ait sırasıyla Fe ($3,78 \pm 7,59$, $3,41 \pm 2,27$, $69,1 \pm 8,37$, $1,52 \pm 0,3 mg/kg$), Cu ($0,44 \pm 0,28$, $0,36 \pm 0,17$, $0,20 \pm 0,06$, $0,32 \pm 0,23$, $0,27 \pm 0,19 mg/kg$), Zn ($1,65 \pm 2,90$, $1,18 \pm 0,46$, $2,43 \pm 2,40$, $1,89 \pm 1,75$, $1,40 \pm 0,81 mg/kg$), K (122 ± 724 , 1353 ± 257 , $555 \pm 63,2$, 1022 ± 462 , $792 \pm 598 mg/kg$), Na ($89,6 \pm 57,8$, $86,1 \pm 25,3$, $51,8 \pm 8,29$, $74,4 \pm 31,7$, $32,7 \pm 30,6 mg/kg$), Mg ($49,6 \pm 33$, $35,2 \pm 12,7$, $30,6 \pm 8,67$, $38,6 \pm 25,6$, $28,4 \pm 29,7 mg/kg$), Ca ($74,4 \pm 37,5$, $82 \pm 24,6$, $57,3 \pm 18$, $76 \pm 34,8$, $74,5 \pm 31,5 mg/kg$), Sr ($0,37 \pm 0,25$, $0,89 \pm 0,35$, $0,33 \pm 0,07$, $0,38 \pm 0,3$, $0,33 \pm 0,17 mg/kg$), Li ($8,53 \pm 8,42$, $11,1 \pm 6,37$, $11,96 \pm 1,62$, $9,08 \pm 5,61$, $19,41 \pm 24,9 mg/kg$), Rb (606 ± 625 , 1423 ± 603 , $228,4 \pm 323$, 123 ± 119 , $322 \pm 600 mg/kg$) olarak tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada lityum ve rubidyum elementleri bazı örneklerde tespit edilememiştir.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Bunun sebebinin toprak kaynaklı coğrafik şartlardan olduğu düşünülmektedir.

Kaygusuz v.d. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, Anadolu'dan temin edilen 20 adet balları püren, meşe, kestane, çam, geven, akasya ve lavanta şeklinde kategorize edilerek, bitki çeşidinin balın mineral içeriği üzerindeki etkisini gösterilmiştir.

Mohammed v.d. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, Yemen balları 3 yıllık bir periyotta (2014-2016) 11 element (Fe, K, Ca, P, Mn, Mg, Na, Cr, Cu, Zn, Pb) profili açısından izlenmiş ve yıllar arasında ciddi farklar oluşmadığı tespit edilmiştir. Bu da balın mineral içeriğinin yıldan yıla önemli derecede değişmediğini göstermesi açısından önemlidir.

Bu araştırma sonuçları (Zn ve Fe için) (organik bal örneklerinde ortalama Zn 1,79 mg/100g ve Fe 1,04 mg/100g, geleneksel balda ise ortalama Zn 3,49 mg/100g ve Fe 1,23 mg/100g) insanların günlük gıdalarıyla alabileceği miktarlar bakımından değerlendirildiğinde, çok aşağıda kaldığı görülmektedir. Dolayısıyla bu metaller yönünden analiz edilen tüm bal örnekleri güvenli olarak kabul edilmiştir. Hatta demir ve çinko içeriği açısından zengin olan Bingöl balının bu minerallerin sağlık açısından önemi de göz önüne alınarak önemli bir gıda takviyesi olarak kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

Ayrıca en tehlikeli ağır metaller olarak kabul edilen As, Cd, Hg ve Pb gibi metallerin çalışmaya konu olan Bingöl ballarında tespit edilmemesi de sevindiricidir. Bingöl bu konuda çevre kirliliğine sebep olacak sanayi ve endüstri tesislerine uzak olduğundan bu sonuç olağandır. Ama yine de, sunulan çalışmada bu elementlere de bakılmasının literatüre katkı sağlaması bakımında uygun olarak değerlendirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2010. TSE 3036 Bal Standardı. 19 Ocak 2010 Kabul Tarihli Bal Standardı, Ankara.
- Anonim, 2012. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (2012/58). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 27 Temmuz 2012 Tarih ve 28366 Sayılı Resmi Gazete, Ankara.
- Arinola OG., Badmos SO., Ademowo OG. 2008. Trace elements and anti-oxidant status in Gravid BALB/c mice infected with *Plasmodium yoelii* malaria parasites at

different gestational periods. Pak. J. Nutr. 7(6): 757-762.

- Atanassova, J., Lazarova, M., Yurukova, L. 2016. Significant Parameters Of Bulgarian Honeydew Honey. Journal of Central European Agriculture, 17(3).
- Cengiz, MM., Tosun, M., Topal, M. 2018. Determination of the physicochemical properties and ¹³C/¹²C isotope ratios of some honeys from the northeast Anatolia region of Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 69, 39-44.
- Chandra RK. 1990. Micro-nutrients and immune functions: An overview. *Annal New York Acad. Sci.* 587: 9-16.
- Demirezen, D., Aksoy, A. 2005. Determination of Heavy Metals in Bee Honey Using by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES), *G.U. J Sci.*, 18: 569-575.
- Devillers, J., Dore, JC., Marengo, M., Poirier-Duchene, F., Galand, N., Viel, C. 2002. Chemometrical Analysis Of 18 Metallic And Nonmetallic Elements Found In Honeys Sold In France. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 50(21), 5998-6007.
- Dissanayake CB., Chandrajith R. 1999. Sri Lanka–Madagascar Gondwana Linkage: Evidence for a Pan-African Mineral Belt, *The Journal of Geology*, 107(2):223-235.
- Doelsch, E., Saint Macary H., Van Kerchove V. 2005. Sources of very heavy metal content in soils of volcanic island (La Reunion). *Journal of Geochemical Exploration*, in press, corrected prof, available on line 7 Nov.2005.
- Eastmond DA, MacGregor JT, Slesinki RS. 2008. Trivalent Chromium: Assessing the genotoxic risk of the essential trace element and widely used human and animal nutritional supplement. *Crit. Rev. Toxicol.* 38: 173-190.
- Frieden E. 1984. Biochemistry of the essential ultratrace elements. Plenum press, New York.
- Gruden, N. 1977. Suppression of transduodenal manganese transport by milk diet supplemented with iron. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 21(5), 305-309.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Güleç, M. 2007. Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki Bazı bölgelerden Toplanan Bal Örneklerinde Metal Düzeylerinin Belirlenmesi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.
- Hernandez OM., Fraga JMG., Jimenez AI., Jimenez F., Arias JJ. 2005. Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry, Food Chemistry, 93, 449-458.
- Hays VW, Swenson MJ. 1985. Minerals and Bones. In: Dukes' Physiology of Domestic Animals, Tenth Edition pp. 449-466.
- Hurley LS. 1976. Manganese and other Trace Elements. In: Present Knowledge in Nutrition (Nutrition Reviews'), Fourth Edition. The Nutrition Foundation, Inc. New York, Washington.
- Karadal, F., Yıldırım, Y. 2012. Balın kalite nitelikleri, beslenme ve sağlık açısından önemi. Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi 9(3): 197-209.
- Kaygusuz H, Tezcan F, Erım FB, Yıldız O, Sahin H, Can Z, Kolaylı S. 2016. Characterization of Anatolian honeys based on minerals, bioactive components and principal component analysis, Food Science and Technology, 68, 273-279.
- Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü (KKGM, 2010). T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Birim Faaliyetleri. Erişim: [<http://www.kkgm.gov.tr/genel/birimfaal.html>]. Erişim Tarihi: 27.08.2010.
- Langard S. 1980. Chromium, in Metals in the Environment, H.H. Waldron (ed.), Academic Press, London pp. 111-132.
- Larkin EC., Rao CA. 1990. Importance of fetal and neonatal iron; adequacy for normal development of central nervous system, In: Brain behavior and iron in the infant diet (Dobbing J ed), London, UK pp. 43-63.
- Malhotra VK. 1998. Biochemistry for Students. Tenth Edition. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, New Delhi, India.
- Mertz W. 1974. Chromium as a dietary essential for man. In: WG Hoekstra *et al* eds., Trace Element Metabolism in Animals, 2nd ed. University Park Press, Baltimore.
- Mohammed, F., Abdulwali, N., Guillaume, D., Bchitou, R. 2018. Element content of Yemeni honeys as a long-time marker to ascertain honey botanical origin and quality, Food Science and Technology, 88, 43-46.
- Murray, RK., Granner, DK., Mayes, PA., Rodwell, VW. 2000. Harper's Biochemistry, 25th Edition, McGraw-Hill, Health Profession Division, USA.
- Nielsen, FH., 1976. In: Trace Elements in Human Health and Disease. A Prasad, Editor, Academic Press, New York 2: 379-399.
- Nordberg, M., Cherian, MG. 2005. Biological responses of elements. In: Selinus, O., Alloway, B., Centeno, J.A., Finkelman, R.B., Fuge, R., Lindh, U., Smedley, P. (eds.). Essentials of Medical Geology. Amsterdam, Elsevier, 179-200.
- Özcan, MM., Juhaimi, FYA. 2012. Determination Of Heavy Metals In Bee Honey With Connected And Not Connected Metal Wires Using Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (Icp-Aes). Environmental Monitoring And Assessment, 184(4), 2373-2375.
- Özmen, N., Alkın, E. 2006. Balın antimikrobiyel özellikleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. Uludağ Arıcılık Dergisi 2006(4): 155-160.
- Rether, A. 2002. Entwicklung und Charakterisierung ungewässerlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen, Münch. Technik Universität, Doktora Tezi, Münch, Almanya.
- Ru, QM., Feng, Q., He, JZ. 2013. Risk Assessment Of Heavy Metals In Honey Consumed In Zhejiang Province, Southeastern China. Food And Chemical Toxicology, 53, 256-262.
- Sadrzadeh, SM., Saffari, Y. 2004. Iron and brain disorders. Am. J. Clin. Pathol, pp. 64-70.
- Szabo, G., Chavan, S., Mandrekar, P., Catalano, D. 1999. Acute alcoholic consumption attenuates IL-8 and MCP-1 induction in response to *ex vivo* stimulation. J. Clin. Immunol. 19: 67-76.
- Silici, S., Uluözlü, ÖD., Tüzen, M., Soylak, M. 2008. Assessment of Trace Element Levels in Rhododendron Honeys of Black Sea

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Region, Turkey, J Hazard Mater., 156: 612-618.
- Tan, JC., Burns, DL., Jones, HR. 2006. Severe ataxia, myelopathy and peripheral neuropathy due to acquired copper deficiency in a patient with history of gastrectomy. J. Paenteral Nutr. 30: 446-450.
- T.C. Resmi Gazete. 2005. Bal Tebliği, Tarih: 17.12.2005, Sayı: 26026, Ankara.
- T.C. Resmi Gazete. 2008. Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ, Tarih: 17.05.2008, Sayı: 26879, Ankara.
- Tüzen, M., Soylak, M. 2005. Trace Heavy Metal Levels in Microwave Digested HoneySamples from Middle Anatolia, Turkey, J Food Drug Anal., **13**: 343-347.
- Uppala, RT., Roy, SK., Tousson, A., Barnes, S., Uppala, GR., Eastwood DA. 2005. Induction of cell proliferation micronuclei and hyperdiploidy/diploidy in the mammary cells of DDT and DMBA-treated pubertal rats. Environmental and Molecular Mutagenesis 46: 43-52.
- Vercruysse, A. 1984. Hazardous Metals in Human Toxicology. Amsterdam, The Netherlands, 238 p.
- Vura, I H. 1993. Ağır Metal İyonlarının Gıdalarda Oluşturduğu Kirlilikler, Çevre Dergisi, **8**: 3-8.
- Yarsan, E., Karacal, F., İbrahim, IG., Dikmen, B., Köksal, A., Daş, YK. 2007. Contents of Some Metals in Honeys from Different Regions in Turkey, Bull Environ Contam Toxicol., 79: 255-258.
- Yılmaz, H., Yavuz, Ö. 1999. Content of some trace metals in honey from south-eastern Anatolia, Food Chemistry, 65, 475-476.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

BAZI HAM VE TİCARİ BALLARDA AYIRT EDİCİ PARAMETRE OLARAK İNVERTAZ VE GLUKOZ-OKSİDAZ AKTİVİTESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Comparison of the Activity of Invertase and Glucose-Oxidase of Raw and Commercial Honey as a Distinguishing Parameter

Hüseyin ŞAHİN^{1*}, Sevgi KOLAYLI², Mehmet BEYKAYA³

¹Giresun Üniversitesi, Espiye Meslek Yüksekokulu, 28600, Espiye, Giresun, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0002-6018-1494, E-posta: huseyin.sahin@giresun.edu.tr

²Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 61080, Trabzon, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0003-0437-6139, E-posta: skolayli61@yahoo.com

³Iğdır Üniversitesi, Turizm Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, 76000, Iğdır, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0003-2594-5011, E-posta: mb-kaya@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received: 09.12.2019

Kabul Tarihi / Accepted: 28.01.2020

DOI: 10.31467/uluaricilik.656842

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, herhangi bir işlem görmemiş ve doğrudan üreticiden alınan bazı ham bal numuneleri ile ticari etiketle satılan bazı balların invertaz ve glukoz-oksidadz aktiviteleri açısından karşılaştırılması ve ham bal için ayırt edici bir analiz ve kalite parametresinin ortaya konulmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, 2 adet monofloral kestane balı ve 4 adet multifloral çiçek balının oluşturduğu ham bal grubu ile 6 adet çam balı ve 6 adet multifloral çiçek balının oluşturduğu ticari bal etiketli grubun spektrofotometrik olarak invertaz ve glukoz-oksidadz aktiviteleri hesaplanarak karşılaştırıldı. Uygulanan deneysel yöntemlere göre ham bal numunelerinin invertaz (135,028-238,878 U/kg bal ve 18,416-32,579 IN) ve glukoz-oksidadz aktiviteleri (Tespit Edilmedi-11.207 µg H₂O₂/g bal.h) ticari ballara göre daha yüksek bulundu. Her iki grubun sahip olduğu değerlerin istatistiki analizi, $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde test edildi ve edinilen sonuçların ham ballar için ticari ballara göre ayırt edici bir kalite parametresi olduğu görüldü ($p < 0,05$). Böylece piyasadaki ham balların tanımlanmasında özellikle invertaz aktivitesi değerinin ön plana çıkarılmasının önemi vurgulandı.

Anahtar Kelimeler: Ham Bal, Ticari Bal, İnvertaz, Glukoz-oksidadz

ABSTRACT

The objective of this study was to compare raw honey in terms of the activity of invertase and glucose-oxidase, in order to present a distinctive analysis and quality parameters that could be used as an indicator of raw honey. Currently, this method is not being included in any commercial procedure, and it could be used on honey directly supplied from the beekeepers, or honey obtained from commercial sources. We tested the activity of invertase and glucose-oxidase on a raw honey group which consisted of 2 types of monofloral chestnut honey and 4 types of multifloral blossom honey. The commercial honey group consisted of 6 different types of pine honey and 6 different types of multifloral blossom honey. The results were analyzed spectrophotometrically. According to applied experimental methods, the invertase activity was 135.028 -238.878 U/kg honey and 18.416 - 32.579 IN. The glucose-oxidase activity was Not Detected - 11.207 H₂O₂/g honey.h Honey from raw sources were found to have significantly higher invertase and glucose-oxidase activity in comparison to commercial sourced honey. Statistical analysis of all values between the two groups was tested at the $\alpha = 0.05$ significance level. Thus, invertase and glucose-oxidase activity could be potentially used as a test to identify raw honey from commercially sourced honey.

Key Words: Raw Honey, Commercial Honey, Invertase, Glucose-oxidase

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

EXTENDED ABSTRACT

Goal: Enzymes play a significant role in making up the properties of honey. Invertase and glucose-oxidase are a few examples of the enzymes found in honey. Although the literature on the activity of these enzymes found in commercial honey is available, a comprehensive study on raw honey samples still does not exist. We propose that if we can determine what the level of invertase and glucose oxidase activity is in raw honey samples when compared with commercial honey then this could be a distinctive marker for where the honey is coming from and potentially its quality. Hence, the current study investigated the level of the invertase and glucose oxidase activity in raw and commercial honey. The goal was to find a marker that could be used to identify raw honey when it is compared to commercially sourced honey.

Material and Methods: In this study, 6 raw honey samples and 12 commercial honey samples were tested. Raw honey was supplied from local Turkish beekeepers during the 2018 harvest period. Their botanic classification was achieved by a beekeepers' declaration and a classification was performed and the honey was determined to be a monofloral chestnut variety along with multifloral blossom honey. For commercial honey there were 12 different kinds of 6 pine honey and 6 different types of multifloral blossom honey. These were purchased from the local market regardless of company brand names. The company's names remained anonymous. Invertase and glucose-oxidase activity of each honey type was measured spectrophotometrically. While the value of the invertase activity was given as the invertase enzyme unit per kg honey (U/kg honey) and invertase number (IN), the glucose-oxidase level was expressed as $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g honey.h}$

Results: Our results indicate that commercial honey has a low enzymatic activity because they are produced under some consistent conditions such as heating, storing, and pasteurization in comparison to raw honey. Moreover, not only does the raw honey have the highest invertase activity 135.028 - 238.878 U/kg honey and 18.416 - 32.579 IN, but it also has the highest glucose-oxidase activity Not Detected - 11.207 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g honey.h}$ as well.

Conclusion: According to our obtained data, it was revealed that the high invertase and glucose-oxidase activity could be used as a marker to determine if the honey is raw honey or if it is from a

commercial source. The statistical analysis between the two groups was confirmed at the $\alpha = 0.05$ level. The invertase of raw honey samples had approximately three times higher activity in comparison to the commercial sourced honey, so perhaps this could be used as an indicator of its freshness. Moreover, we believe that the storage conditions should not exceed approximately 45°C as it may affect the stability of the enzyme activity of raw honey.

GİRİŞ

Bal, tarihten günümüze değin gerek besin ögesi olarak gerekse içerdiği biyokimyasal bileşenlerden ötürü terapötik etkili ürün olarak bilinmektedir. Terapötik etken balın antioksidan, antimikrobiyal, antimutajenik gibi özelliklerinden ileri gelmektedir (Geană v.d. 2020). Ana bileşen olarak su ve çeşitli karbonhidrat (şeker) birimlerinden oluşan bal, proteinden müteşekkil enzimleri, aminoasitleri, vitaminleri, mineralleri, organik ve aromatik bileşenleri de içermektedir (da Silva v.d. 2016). Bala renk, aroma ve tat gibi kendine has özellik katan bu bileşimler, bal arısının türüne, nektarın toplandığı flora, iklim, yükselti gibi coğrafik koşullara göre farklılık gösterir (Akyol v.d. 2015, da Silva v.d. 2016, Doğan v.d. 2014). Ayrıca ürünün içeriğindeki mevcut bileşenler, operasyonel işlemlerden, paketlenme-muhafaza koşullarından ve depolama süresinden de etkilenir (Escuredo v.d. 2014, Şahinler v.d. 2009). Asidite artışı, fermantasyon, oksidasyon ve termal etkiyle sonuçlanan bu süreçlerde mevcut bileşenlerin ya aktivitesini yitirmelerini ya da başka bir forma dönüşmelerini gözlemlemek mümkündür (da Silva v.d. 2016, Moreira v.d. 2007).

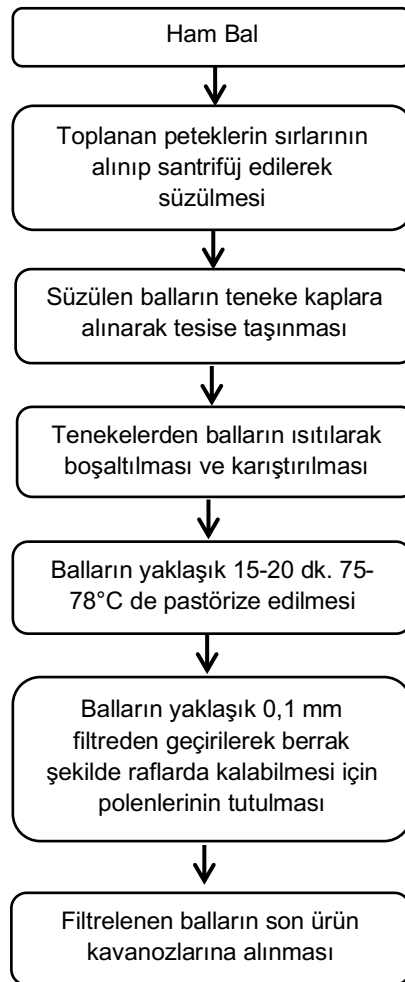
Balda miktar ve çeşitlilik açısından çok fazla gözlemlenmeyen bal enzimleri biyo-çeşitlilikte yer alan tüm enzimler gibi bazı spesifik görevler yürütmektedir. İinvertaz, glukoz oksidaz, diastaz, katalaz ve asit fosfataz enzimleri balın majör enzimleri olarak bilinmekte bir kısmı doğrudan bitki kaynaklı bir kısmı da bal arılarınınca bala ilave edilmektedir (Ömür, 2015; White, 1975).

Özellikle bu enzimlerden invertaz ve glukoz oksidaz bal arılarının hipofarengeal salgı bezleri aracılığıyla salınan, balın olgunlaşması aşamasında aktivitesi en üst düzeyde olan enzimlerdir (Al-Sherif v.d. 2017, Li v.d. 2008). Balın tazelik ölçütü olarak karşımıza çıkan bu enzimlerden invertaz, sukrozu daha basit karbonhidrat birimlerine hidroliz ederken, glukoz oksidaz ise olgunlaşmamış balda bulunan glukozun, glukonik asit ve hidrojen perkoksit

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

oksidasyonundan sorumludur (Al-Sherif v.d. 2017, Sajid v.d. 2019, Şahinler v.d. 2009). Ayrıca glukoz oksidazın bir diğer önem arz eden özelliği ise enzimatik kataliz esnasında oluşturduğu ara ürünlerle balın antimikrobiyal etkinliğini artırması olgusudur (Li v.d. 2008, Mandal ve Mandal, 2011). Balın üreticiden tüketiciye aktarılması sürecinde birçok basit ve/veya ileri teknik barındıran yöntemlerin kullanıldığı işlem basamaklarına ihtiyaç duyulur (Şekil 1). Bu ihtiyaç, balın daha berrak bir görüntüye sahip olması, raf ömrünün uzatılması ve çabuk fermantasyona uğramaması gibi vb.

etkinliklerden ötürü elzem bir süreç olarak değerlendirilebilir. Ancak bahsi geçen tüm bu enzimatik etkinlikler, balın işlenmesi aşamasında (özellikle süzme ve ısıtma etkinliklerinde) ya tamamen ya da kısmen aktivitesini yitirmektedir. Balın işlenmesi aşamasında kullanılan bu sistematik basamaklarda ısıtma yerine ikame bir teknik olmamasına rağmen, filtrasyon basamağında enzimatik etkinliklerin deaktivasyona uğramasını engellemek adına araştırmacılar mikrofiltrasyon ya da ultrafiltrasyon tekniklerini tavsiye etmişlerdir (Subramanian v.d. 2007).



Şekil 1. Bal işlenmesinde kullanılan sistematik basamaklar

Figure 1. Systematic steps used in honey processing

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Ham bal, tüm bu işlem süreçlerinin öncesinde elde edilen birinci basamak ürünü olmakla birlikte sahip oldukları bazı biyoetkinlik özellikler (antibakteriyel, antioksidan ve antikanser) açısından da ticari ballarla nazaran üstünlük arz etmektedir (Aumeeruddy v.d. 2019; Blasa v.d. 2006). Biyokimyasal etkinlikleri araştırılan ve terminolojik açıdan bilimsel literatürde henüz tanınmış olan bu ürünün ticari ballardan ayırt edici fizikokimyasal parametreleri tam olarak belirtmemiş ve literatüre sunulmamıştır. Bu bilimsel boşluğun doldurulabilmesi adına ilgili çalışmada, bazı ham bal numuneleri ile bazı ticari bal etiketli numunelerin invertaz ve glukoz oksidaz aktivitelerinin karşılaştırılması ve edinilmesi olası farklı sonuçlarla ham balların ticari ballardan ayırt edici bir analiz parametresinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

GEREÇ-YÖNTEM

Kullanılan Kimyasallar

Çalışma kapsamında kullanılan tüm kimyasallar (*p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosidin (pNPG), tris-hidroksimetil aminometan, glukoz, *o*-dianisidin, yaban turbu peroksidazı, hidrojen peroksit) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasının Türkiye satış temsilcilerinden temin edildi. Ayrıca bu kimyasallar analitik saflık düzeyinde olup ekstra saflaştırma işlemine gerek duyulmadan kullanıldı.

Çalışmada Kullanılan Bal Örnekleri ve Ekstraksiyon İşlemleri

Çalışma kapsamında kullanılan bal örnekleri öncelikle ham bal ve ticari işlem görmüş bal sınıflandırmasıyla iki gruba ayrıldı. Bu kapsamda değerlendirilen birinci grup, 2 adet monofloral kestane, 4 adet multifloral çiçek balı ile toplam 6 adet herhangi bir işlem görmemiş ham bal numunelerinden oluşurken; ikinci grup ise 6 adet çam balı ve 6 adet multifloral çiçek balı ile toplamda 12 adet ticari bal numunelerinden oluştu. Çalışma kapsamında kullanılan hiçbir bal örneğine mikroskobik polen analizi uygulanmadı. Dolayısıyla grup içerisinde bulunan bal numunelerinin kendi içerisindeki bal tür sınıflandırılması, ham bal numuneleri için doğrudan üreticilerin beyanıyla; ticari ballar için ise etiket bilgilerinin vermiş olduğu tanımlamayla gerçekleştirildi.

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen analizlerde, numunelerin ekstraktları her ne kadar sulu olarak hazırlansa da analiz metoduna göre bazı farklılıkları da içerdiği bilinmektedir. Bu farklılıklardan ötürü her bir analiz için numuneler metodolojiye göre

hazırlandı. İnvertaz aktivitesi analizi için 10 g numune yaklaşık 40 mL saf su ile oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımıyla 12 saat boyunca ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonunda numune öncelikle adi süzgeç kâğıdı ardından da mavi bant süzgeç kâğıdı kullanılarak olası katı partiküllerden arındırıldı. Filtrasyon işlemi sonunda son hacim 50 mL'ye saf suyla tamamlanarak nihai konsantrasyonun 0,2 g/mL olması sağlandı. Glukoz-oksidad analizinin içerdiği yegâne farklılık ekstraksiyon işleminin saf su ile değil pH 6,1 olan 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisiyle gerçekleştirilmiş olmasıdır. Bu farklılığın ötesinde geriye kalan tüm işlem süreci invertaz aktivitesiyle aynı olup numunenin son konsantrasyonu 0,2 g/mL ilgili tampon çözeltiyle ayarlandı.

İnvertaz Aktivitesi Tayini

Gerek ham bal numunelerinde gerekse ticari etiketli satılan bal numunelerinde invertaz aktivitesi Bogdanov (2009)'un çalışmasıyla tanımlanan *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosidin (pNPG) substrat olarak kullanıldığı yöntem öncülüğünde gerçekleştirildi. İlgili metotta esas alınan reaksiyon, pNPG'nin invertaz ile glukoz ve *p*-nitrofenole ayrışması akabinde bu reaksiyonun pH 9,5'te durdurulurken oluşan nitrofenolün nitrofenolat anyonuna dönüşmesi ve nihayetinde spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda analizin 5 dakika öncesinde 40°C'deki su banyosunda bekletilmiş ve 0,1 M pH 6 fosfat tamponunda hazırlanmış 0,02 M pNPG substrat çözeltisinin 2,5 mL'si ile 0,2 g/mL olarak ekstrakte edilmiş bal örneğinin 0,25 mL'si karıştırılmıştır. İlgili hacimlerin ilavesinden sonra tüp içeriğinin inkübasyonu yine 40°C'deki su banyosunda 20 dk. olarak belirlendi. Mevcut inkübasyonun akabinde enzimatik süreç reaksiyon 0,25 mL durdurma çözeltisi (3 M, pH 9,5 tris-hidroksimetil aminometan) ilave edilip vorteks karıştırıcıda tüp içeriği karıştırılarak durduruldu. Spektrofotometrik ölçümün esas alındığı bu tayınde her bir numune için hazırlanan kör çözelti yine aynı reaktantlar kullanılarak hazırlanmış olup sadece tüp içeriğine tatbik sırası farklılaştırıldı. Dolayısıyla analizden 5 dakika önce 40°C'de inkübe edilmiş substrat çözeltisinin 2,5 mL'sine 0,25 mL reaksiyon durdurma çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı akabinde 0,25 mL ilgili bal çözeltisi ilave edilerek tüp içeriğindeki hacim değerleri tamamlandı. Tüm bu hazırlanan tüp içerikleri 400 nm'ye ayarlı spektrofotometre yardımıyla (Shanghai Mapada Instruments Co., China) ölçüldü. Edinilen sonuçlar

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

iki farklı sonuç birimi ile hesaplanarak verildi. İlk Unite/kg (1 kg bal tarafından dakikada parçalanmış *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosidin μ mol miktarı) (Formül 1), ikincisi ise Duisberg ve Hadorn (1966) tarafından tanımlanan, Hadorn ünitesi olarak da bilinen ve ΔA_{400} değerinin 21,64 Hadorn sabiti ile çarpılması sonucu ortaya çıkan İnvertaz Numarası (IN) (Formül 2) şeklinde ifade edildi.

$$1U/kg = \frac{1 \mu\text{mol } p - NPG}{\text{Dakika} \times \text{kg Bal}}$$

Formül 1: Kg bal başına düşen invertaz ünite değerinin hesaplanması

Formula 1: Calculation of invertase unit value per kg of honey

$$IN = 21.64 \times \Delta A_{400}$$

Formül 2: İnvertaz numarası (IN) değerinin hesaplanması

Formula 2: Calculation of the invertase number (IN) value

Glukoz-Oksidaz Aktivitesinin Tayini

Çalışılan tüm bal numunelerindeki glukoz oksidaz aktivitesi yaban turpundan izole edilmiş peroksidaz enzimi ve bir diğer reaktan olan *o*-dianisidin substratı öncülüğünde belirlendi (Flanjak v.d. 2016). Esasında yöntem, bal içeriğinde mevcut bulunan glukoz-oksidadazın D-glukoza D-glukonolaktone oksidasyonunun oluşumunu ve ardından da glukonik asit ile hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşümünün katalizini ihtiva eder. H_2O_2 , ko-substrat olarak bilinen *o*-dianisidin ile suya indirgenirken oluşan renkli ürünün ortaya çıkardığı maksimum absorbans bir spektrofotometre yardımıyla ölçülür.

Metot için gerekli olan reaktif içeriği ilavesi izah edildiği şekilde yapıldı. Bunun için; pH 6,1 100 mM sodyum fosfat tamponu içerisinde çözünmüş 2,14 mM 0,7 mL glukoz çözeltisi, 1 mg/mL olarak etanolik olarak hazırlanan 0,1 mL *o*-dianisidin, pH 6,1 100 mM sodyum fosfat tamponu içerisinde 60 U olarak hazırlanan 0,1 mL yaban turpu peroksidazı ve 0,2 g/mL olan 0,1 mL bal ekstraktı karıştırıldı. Bal ekstraktı ilavesi ardından reaksiyon karışımı 30 dk. 37°C'deki su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Bekletilme süresi akabinde 1 M hidroklorik asit

çözeltisinden 0,1 mL ilave edilerek reaksiyon süreci sonlandırıldı. Tüm bal örneklemeleri için hazırlanan kör çözeltisi içeriği ise reaktanların ilave sırasının son kademesinde farklılaştırıldı. Bunun için 0,1 mL ilave edilen bal ekstraktı, sonlandırma çözeltisinin ardından ilave edildi. Gerek kör çözeltilerin gerekse ana reaktif karışımını içeren numune içeriklerinin maksimum absorbansı 400 nm'de ölçüldü (Shanghai Mapada Instruments Co., China).

Bu ölçümler neticesinde elde edilen absorbans değerleri, 10-100 μ mol/L olarak hazırlanan standart H_2O_2 ile peroksidaz ve *o*-dianisidin verdiği sonuçların ortaya çıkardığı kalibrasyon eğrisi yardımıyla μ g H_2O_2 /g bal.h'a dönüştürüldü.

İstatistiksel Analiz

Uygulanan analiz metodundaki sonuçlara dair elde edilen tüm veriler, üç tekrarlı olarak verildi. İstatistiksel analizler, SPSS Statistic 11.5 (IBM SPSS Statistics, Armonk, New York, USA) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz edilen verilerin nicel analizlerini desteklemek adına ortalama $\pm$ standart sapma ve minimum-maksimum verileri de sunuldu. Belirlenen gruplar arasındaki istatistiki ilişki, Anova Post Hoc Tukey ile $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi temel alınarak hesaplandı.

BULGULAR

İnvertaz Aktivitesi

Çalışılan tüm bal numunelerinin invertaz değerleri Tablo 1'de detaylı olarak verildi. Elde edilen değer aralıkları invertaz ünitesi açısından 8,965-238,878 U/kg bal, invertaz numarası açısından 1,223-32,579 IN olarak bulundu. Mevcut sonuçların ortaya koyduğu bilimsel doğrulama ham balların ticari ballara nazaran en yüksek enzimatik değere sahip olması olarak görüldü. Bu yüksek değer istatistiki olarak da test edildi. Ham balların invertaz ünitesi ve invertaz numarası açısından ticari ballarla olan kıyasındaki istatistiki fark, anlamlı düzeyde bulundu ($p < 0,05$). Böylelikle invertaz aktivitesinin ham bal için ayırt edici bir parametre olduğu test edilerek vurgulandı.

Farklı yörelere ait iki adet monofloral kestane ve dört adet multifloral çiçek balının oluşturduğu ham bal grubunun en düşük değeri (135,028 U/kg; 18,416 IN) RH4 örneklem kodu ile tanımlanan çiçek balında gözlemlendi. İlgili grubu oluşturan bal türlerinin ortaya çıkardığı ortalama sonuçların ise sırasıyla kestane balı için 157,004 U/kg-21,413 IN, çiçek balı

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

için 178,187 U/kg-24,302 IN olduğu görüldü. Ancak grup içerisinde analiz edilen monofloral kestane ve multifloral çiçek balının invertaz aktivitesi açısından istatistiki değerlendirilmesinde anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,610$).

Çalışma kapsamında ikinci grup olarak adlandırılan ve ticari bal etiketiyle satılan bal örneklerinin oluşturduğu grubun invertaz değerlikleri gerek grup içerisindeki farklı bal türüne göre gerekse grubun tümünü içine alan toplam sayısal verilere göre değerlendirildi. Bu açıdan irdelendiğinde tüm grubun sahip olduğu invertaz değer aralığı; 8,965-71,243 U/kg-1,223-9,716 IN olarak verildi. İlgili örneklem içerisinden en yüksek enzimatik değere sahip olan numune **CH9** koduyla tanımlanan çam balı numunesinin olduğu görüldü. Mevcut grup için bahsedilen ikinci değerlendirme ise grup içindeki bal türlerinin sahip olduğu değerliklerini kıyaslama olarak ortaya konuldu. Bu değerlendirmeye göre farklı ticari markanın ürünü olan altı adet çam balı ve altı adet multifloral çiçek balı konu edinildi. Çam ballarının sahip olduğu ortalama invertaz aktivitesi değeri 47,680 U/kg-6,413 IN iken çiçek ballarının değerleri 21,658 U/kg-2,954 IN olarak hesaplandı. Ticari balların içerisindeki mevcut grupların oluşturduğu ve çam ballarının daha yüksek verilere sahip olduğu bu değerlendirme istatistiki olarak da anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Glukoz-Oksidaz Aktivitesi

Invertaz aktivitesindeki veri düzenlemesi glukoz-oksidad aktivitesinde de geçerli olup Tablo 1'de çalışılan tüm bal türlerinin sonuçları detaylı olarak verildi. Elde edilen sonuçların ifadesinin genel enzim sonuçları için kullanılan ünite ifadesinden farklı olduğu bilinmekte olup konsantrasyon aralığı belli standart kimyasalın (H_2O_2) referansında çizilen kalibrasyon eğrisinden faydalanıldığı için $\mu g H_2O_2/ g$ bal.h olarak ifade edildi.

Çalışılan tüm bal örneklerinin bazılarında bu aktivite tespit edilemezken tespit edilen değerler açısından en yüksek değerin $11,207 \pm 0,354 H_2O_2/ g$ bal.h ham bal örneklem grubuna dahil olan çiçek balında gözlemlendi. Bu grup içerisinde invertaz aktivite değeri en düşük olan **RH4** kodlu bal numunesinin glukoz-oksidad aktivitesi adına tayin edilemediği görüldü. İlgili grupta çalışılan diğer 5 bal numunesindeki mevcut enzimatik değer aralığı $0,159-11,207 H_2O_2/ g$ bal.h olarak hesaplandı. Ticari bal örneklem grubunda ise tespit edilemeyen aktiviteye sahip numune sayısının oldukça fazla olduğu görüldü. Hatta çiçek balı etiketiyle çalışmaya dahil edilen altı adet bal örneğinden sadece birinde (**CH17**: $0,197 \pm 0,021 H_2O_2/ g$ bal.h) aktivite gözlemlendi. Yine çalışılan altı adet çam balı içerisinde dört adet numunenin glukoz-oksidad aktivitesine cevap verdiği, bu değerliğin de $2,894 \pm 0,064 H_2O_2/ g$ bal. h ile **CH12** kodlu bala ait olduğu gözlemlendi.

Tüm bu verilerin ortaya koyduğu sonuçlar, istatistiksel olarak da test edildi. Bu değerlendirmelerde üç temel grup analizi istatistiki veri setini oluşturdu. Birinci analiz, genel analiz olup glukoz-oksidad açısından ham balların ticari ballara göre istatistiki kıyasını vermektedir. Birinci analizde edinilen sonuç, anlamlılık düzeyinde bulundu ($p<0,05$) ve böylece ham balların ticari ballarla olan tasnif ayrımında glukoz-oksidad aktivitesinin de bir belirteç olabileceği test edildi. İkinci ve üçüncü analiz ise grup içi analiz olup ham balların içerisindeki monofloral kestane ballarıyla multifloral çiçek ballarının kıyasını ($p=0,854$) ve ticari balların içerisinde bulunan multifloral çiçek ballarının çam ballarıyla kıyasını ($p=0,067$) konu edindi. Grup içerisindeki her iki istatistiki değerlendirmede fark anlamlılık düzeyinde görülmedi ($p>0,05$).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Tablo 1. Analiz edilen ham ve ticari balların invertaz ve glukoz oksidaz sonuçları
Table 1. Results of invertase and glucose oxidase of the analyzed raw and commercial honeys

Numune Kodu Sample Code	Numune Türü Type of Samples	Bal Türü Type of Honey	Invertaz Ünitesi Invertase Unit	Invertaz Numarası Invertase Number	Glukoz-oksidadaz Glucose-oxidase
			U/kg*	IN*	$\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g bal.h}^*$ $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g honey.h}^*$
RH 1	Ham Bal Raw Honey	Monofloral Kestane Balı/ Monofloral Chestnut Honey	159,622±0,673	21,770±0,092	5,046±0,064
RH 2		Monofloral Kestane Balı/ Monofloral Chestnut Honey	154,386±1,571	21,056±0,214	3,978±0,096
RH 3		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	201,987±2,020	27,548±0,275	11,207±0,354
RH 4		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	135,028±2,693	18,416±0,367	T.E./N.D.
RH 5		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	238,878±1,010	32,579±0,138	10,320±0,064
RH 6		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	136,853±2,356	18,665±0,321	0,159±0,032
Min.-Mak. Min.-Max.			135,028-238,878	18,416-32,579	T.E./N.D.-11,207
Ortalama/Mean			171,113	23,339	5,118**
CH 7	Ticari Bal Commercial Honey	Çam Balı/Pine Honey	56,645±0,898	7,725±0,122	0,616±0,040
CH 8		Çam Balı/Pine Honey	34,590±1,346	4,178±0,184	T.E./N.D.
CH 9		Çam Balı/Pine Honey	71,243±0,898	9,716±0,122	1,948±0,075
CH 10		Çam Balı/Pine Honey	35,066±1,122	4,782±0,153	0,621±0,064
CH 11		Çam Balı/Pine Honey	29,830±0,898	4,068±0,122	T.E./N.D.
CH 12		Çam Balı/Pine Honey	58,708±0,673	8,007±0,092	2,894±0,064
CH 13		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	19,516±0,673	2,662±0,092	T.E./N.D.
CH 14		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	33,638±1,795	4,588±0,245	T.E./N.D.
CH 15		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	15,946±0,337	2,175±0,046	T.E./N.D.
CH 16		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	8,965±0,112	1,223±0,015	T.E./N.D.
CH 17		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	17,612±1,571	2,402±0,214	0,197±0,021
CH 18		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	34,273±0,449	4,674±0,061	T.E./N.D.
Min.-Mak. Min.-Max.			8,965-71,243	1,223-9,716	T.E./N.D.-2,894
Ortalama/Mean			34,669	4,683	0,523**

*Tüm analizler üç tekrarlı yapıldı, All results were performed in triplicate; **T.E./N.D.** Tespit edilemedi, Not Detected

**Glukoz-oksidadaz için ortalama değeri hesaplanırken tespit edilemeyen tüm değerler sıfır (0) kabul edilmiştir. All not detected values were accepted as zero (0) for the mean calculation of glucose-oxidase.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

TARTIŞMA

Doğal ürünler, içerdikleri biyo-yararlı bileşenler sayesinde geçmişten günümüze daima tercih sebebi olmuştur. Ancak doğal ürün diye etiketlenen ve tüketicilerle buluşturulan bu ürünlerin ne denli bu tanımlamayı hak ettikleri de özellikle son yıllarda tartışma konusu olarak görülmektedir. Bilim dünyasında doğal ürünlerin tanımını, tercih edilme nedenini, daha az işlenmiş ürünlerin neden önemli olduğunu vb. izah eden araştırma çalışmalarına rastlamak mümkündür. Örneğin Román v.d. (2017)'in derleme çalışmasında bilimsel veri tabanlarında taranan doğal gıda ürünü, tüketiciler, tüketici algısı, tüketici kaygısı, tüketici tercihleri, asgari düzeyde işlenmiş gıdalar, organik gıdalar gibi terimleri içeren bilimsel çalışmaları belirli dışlama ölçütleri nispetinde araştırmış, binin üzerinde güncel çalışmanın varlığını ispatlamıştır. 1950'li yıllarda özellikle gelişmiş ülkelerde uzun raf ömürlü ürünlerin piyasaya sürülmesinin ardından bir diğer tartışma konusu da bilimsel literatürlerde yerini almıştır. Bu tartışma, aşırı düzeyde işlenmiş gıdalar ve sentetik ürünlerle karıştırılan gıdaların getirdiği problemler olarak görülmektedir. Roininen v.d. (1999)'nın yürüttüğü doğal ürün algısında işlenmemiş veya katkı maddesi içermeyen gıdaların tüketilmesinin önemini dikkate alan bir tutum ölçeği çalışmasında, bu ürünlerle genel sağlık algısı arasında güçlü bir istatistiki ilişki bulunmuştur.

Mevcut çalışmamızda, tüm numuneler adına her birinin doğal ürün olduğuna inanılan ancak bazılarının daha az işlenmiş ürün olması hasebiyle insanlar tarafından tercih edilme nedeni olabilecek olan Türk balları kullanılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen invertaz değerlerinin Uluslararası Bal Komisyonun (IHC) balın ısıtma işlem görmemesinin kanıtı ve tazeliği açısından tavsiye ettiği $IN \geq 10$ ve $IU \geq 73,45$ (Bogdanov, 2009) oranlar nispetinde kıyaslandığında; ticari ballar dışında ham bal etiketli numunelerin bu ölçüm skalasına son derece uyumlu bir korelasyon gösterdiği görülmüştür (Tablo 1).

Mevcut çalışma ile son derece uyumlu olan bir başka çalışmada aynı amaç dâhilinde problem tanımı yapılmıştır (Vorlov ve Piidal, 2002). Otuz yedi adet doğrudan arıcıdan ve 17 adet ise marketten temin edilen numunelerde invertaz, HMF ve diastaz aktivitesi araştırılmış, bulunan invertaz değerlerinin diastaz ve HMF değerlerine göre balın tazeliği ortaya koyması açısından daha duyarlı bir ölçüt olduğunu vurgulamıştır. İlgili çalışmada doğrudan arıcılardan alınan ballar ham bal olarak nitelenirse de, taze

ballar olarak nitelendirilmiş ve market ballarından ayırt edilmiştir. Otuz yedi taze balın; 13 tanesi çiçek, 15 tanesi monofloral ve 9 tanesi de salı balı numunesidir. Edinilen invertaz değerliklerinin ortalamaları sırasıyla çiçek balında; 12,12 IN, monofloral balda; 17,46 IN ve salı balında; 18,22 IN olarak bulunmuş olup bizim çalışmamızla elde ettiğimiz değerin bu değerle uyum içerisinde olduğu görülmüştür (Vorlov ve Piidal, 2002). İlgili çalışmanın göstermiş olduğu ikinci uyum ise market ballarının sonuçlarıdır. On yedi adet market balın invertaz değeri aralığını 0,6-7,4 IN ve ortalama değerliğini 3,1 IN olarak ifade edilmiştir (Vorlov ve Piidal, 2002). Söz konusu tazelik ölçütünün bir belirteci olması hasebiyle atıf yapılan bu çalışma her ne kadar sonuçlarımızla uyum gösterse de gerek ham bal numunelerimiz ve gerekse market balları numunelerimiz bu çalışmanın ortalama sonuçlarına göre üstünlük göstermiştir (Tablo 1: RH 1-6 23,339 IN; CH 7-18 4,683 IN).

Elli adet taze ve 15 adet markalı balın invertaz aktivitesinin araştırıldığı başka bir bilimsel çalışmada; taze ballar için invertaz değerleri 58,55-81,9 IN iken markalı balların değeri aralığının 3,10-9,66 IN olarak bulunmuştur (Sajid v.d. 2019). Araştırmacılar, markalı ballara göre araştırdıkları taze balların bu değeri üstünlüğünü balların tazelik ölçütü olarak vurgulamış, ısıtma ve depolama etkinliğine de vurgu yapılmıştır.

İlgili enzimle termal etkinliğin ilişkili olduğunu ispat eden bir diğer çalışma da İtalyan ballarının konu edildiği çalışmadır (Spano v.d. 2008). Çalışma kapsamında kullanılan materyaller bal, polen ve bal peteğinin karışımından elde edilen ve 100°C'lik işlem sürecine tabi tutulan yöresel ürünlerden oluşmaktadır. Dokuz tanesi marketten temin edilen 13 adet ballı numune örneğinde invertaz aktivitesi ölçülmüş ve değeri aralıkları 0-1,2 U/kg olarak bulunmuştur. Araştırmacılar bu düşük sonucun 100°C'lik ısıtmadan kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir (Spano v.d. 2008).

Literatür açısından özellikle ham balların konu edildiği ve glukoz oksidaz aktivitesinin araştırıldığı çalışmalar son derece kısıtlıdır. Mevcut çalışmamızdaki glukoz oksidaz aktivitesi için kullanılan birimle aynı olan 45 balın araştırıldığı çalışmada enzim aktivitesi 40,3-347,6 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g bal.h}$ olarak bulunmuştur (Flanjak v.d. 2016). Flanjak v.d. (2016)'nın sonuçlarına uyum gösteren bir başka çalışma da Strelec v.d. (2018) tarafından gerçekleştirilmiş olup 20 balın glukoz oksidaz

sonuçlarını 25,6-402,5 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g bal.h}$ olarak bulmuştur. Refere edilen her iki çalışmadaki yüksek değerler, ilgili çalışmamız sonucu ile uyum göstermemiş olmasının nedeni, bir başka bilimsel çalışma ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmadaki ifade; balda bulunan enzimlerin aktivitesi bal arısı ırklarına, yaşlarına, koloninin durumuna, nektar akışına ve çevresel koşullara göre farklılık göstereceği şeklindedir (Anklam 1998, Belay v.d. 2017).

Ancak çalışmamızda görülen glukoz oksidaz aktivitesindeki mevcut durum, ham balların göstermiş olduğu göreceli üstünlüktür (Tablo 1: **RH 1-6** T.E.-11,207 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g bal.h}$; **CH 7-18** T.E.-2,894 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g bal.h}$). Glukoz oksidaz aktivitesinde ham balların ticari ballara göre gözlemlenen en yüksek değerlerinin kıyası açısından (**RH3/CH12**; 11,207 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g bal.h}$ /2,894 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g bal.h}$ =2,87) yaklaşık 3 katlık üstünlük, balların tazeliğiyle ilişkilendirilmiştir. Ancak yine de aynı grup içerisinde tespit edilemeyen (**RH4**) ve düşük (**RH6**) değerlerin de olması raf ömürleri içerisindeki olası sıcaklık değişimlerinin bu aktivitenin kaybına neden olmuş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Bu yorum, depolama süresindeki sıcaklık değişimlerinin glukoz oksidaz aktivitesini tedrici olarak düşürdüğünü vurgulayan Dimiňš v.d. (2006)'nin değerleriyle desteklenmektedir. Göreceli bu olumsuz duruma rağmen tüm bu veriler ışığında bazı ham balların göstermiş olduğu yüksek glukoz oksidaz aktivitesinin daha önce yapılan bilimsel çalışmaların da belirttiği üzere antimikrobiyal aktiviteyi de artırması beklenmektedir (Li v.d. 2008, Mandal ve Mandal 2011). Bu itibarla refere edilen bu kanıt, ham balların ticari ballara göre terapötik etkenlere daha duyarlılığı olduğunu ortaya koymaktadır.

ÖNERİLER VE SONUÇ

Çalışma kapsamında edinilen sonuçlara göre son zamanlarda piyasada yerini almaya başlamış, terminolojik olarak da ham bal olarak tanımlanan, ısıtılma ve ileri seri üretim süreçlerine maruz kalmayan balların invertaz ve glukoz-oksidad değerleri muadilleri olan ticari ballara göre yüksektir. Her iki enzimatik değerlendirmede elde edilen bu yüksek sonuçlar, istatistiki olarak da test edilmiş gerek invertaz gerekse glukoz-oksidad aktivitesi ham ballar için ticari ballara göre ayırt edici bir parametre olarak görülmüştür ($p<0,05$). Özellikle ısıtılma ve uzun süreli saklama koşullarına karşı son derece duyarlı olan bu enzimler, hızlı bir şekilde inaktif forma geçer ve aktivitelerini tedrici olarak

kaybederler. Invertazın oda sıcaklığından 50°C'ye kadar yavaş; 50°C'nin üzerinde hızlı aktivite kaybı göstermesi bu söylemin bir dayanağıdır (Dimiňš v.d. 2014; Vorlov ve Piidal 2002). Hatta Bogdanov (2008)'göre 30°C'nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde invertaz aktivitesinin yarılanma ömürleri hızlı bir düşüş sergilemektedir. İlgili kaynak invertazın yarılanma ömrünü; 30°C'de 83 gün, 40°C'de 9,6 gün, 50°C'de 1,3 gün, 60°C'de 4,7 saat ve 70°C'de ise 47 dakika olarak belirtmiştir (Bogdanov 2008). Dolayısıyla ballar ısıtılma işlemine maruz kalması bu enzimlerin yıkımı için gerekçeli bir nedendir. Özellikle Almanya, Belçika ve İspanya'nın aralarında bulunduğu bazı Avrupa ülkelerini özellikle invertaz değerlerini ısıtılma ve uzun süreli saklama etkinliğine karşı balın tazeliğinin ölçütü olarak kullanmakta iken (Bogdanov v.d. 2004) diğer ülkelerin de bu ölçütü tartışması olasıdır. Çalışmamızın istatistiki değerlendirmeli mevcut sonuçlarına göre ortaya konulabilecek öneri, gerek invertaz ve gerekse glukoz oksidaz değerlerinin ham bal numunelerinde göstermiş olduğu dereceli üstünlük ham ballar adına diğer ballardan ayırt edilebilecek bir analiz ve dolaylı olarak bir kalite parametresi olarak görülebileceğidir. Ayrıca yararlanılan kaynaklar göz önünde bulundurulduğunda ilgili enzim aktivitelerinin raf ömrü boyunca göreceli olarak sabit kalması adına ısıtmaya dair kullanılan işlem tekniklerine dikkat edilmelidir. Hatta ham bal özellikli ballarda ~12 saatten fazla süreyle ~45°C'nin üzerindeki sıcaklıklara çıkılmaması gerekmektedir. Aksi halde enzimatik aktivitenin kaybı ile sonuçlanacak olan bu durumda, ham bal tanımı pastörize bal ile yer değiştirmelidir. Tüm bu bilgiler ışığında, kalite parametresi olarak gördüğümüz bu değerler nispetinde tüketicinin hangi ürünü aldığını bilmesi adına, piyasa sunulan balların tanımlarının tam olarak yapılması ve bala dair tebliğlerde ham bal ve pastörize bal tanımlarının açıkça belirtilmesi gerekmektedir. Ayrıca mevcut çalışmamız, ilgili enzimlerin kalite parametresinin sayısal değerlerini tam olarak belirlenmesi adına ham balların konu edineceği daha geniş örneklem grubuyla yapılacak olan çalışmalara ışık tutması açısından önemlidir.

Beyanname

Çalışma kapsamında satın alımlarında herhangi bir kısıtlama olmayan market balları ticari etiketli numuneler olarak kullanılmış ve ilgili firma bilgileri saklı tutulmuştur. Elde edilen sonuçlarda tanımlayıcı ve reklama giren herhangi bir ifade kullanılmamıştır. Bu bağlamda, çalışmada ismi olan yazarlar, konuya

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

ve çalışmanın tümüne dair herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

- Akyol, E., Doğan, H., Selamoğlu Talas, Z., Akgül, H., Unalan, A. 2015. Determining the total antioxidant status and oxidative stress indexes of honey samples obtained from different phytogeographical regions in Turkey. *Fresenius Environ. Bull.* 24(4):1204-1208.
- Al-Sherif, AA., Mazeed, AM., Ewis, MA., Nafea, EA., Hagag, ESE., Kamel, AA. 2017. Activity of salivary glands in secreting honey-elaborating enzymes in two subspecies of honeybee (*Apis mellifera* L). *Physiol Entomol.* 42(4): 397–403. <https://doi.org/10.1111/phen.12213>
- Anklam, E. 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00057-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00057-0)
- Aumeeruddy, MZ., Aumeeruddy-Elalfi, Z., Neetoo, H., Zengin, G., Blom van Staden, A., Fibrich, B., Lambrechts, S., Rademan, S., Szuman, KM., Lall, N., Mahomoodally, F. 2019. Pharmacological activities, chemical profile, and physicochemical properties of raw and commercial honey. *ISBAB.* 18:101005. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2019.01.043>
- Belay, A., Haki, GD., Birringer, M., Borck, H., Lee, YC., Kim, KT., Baye, K., Melaku, S. 2017. Enzyme activity, amino acid profiles and hydroxymethylfurfural content in Ethiopian monofloral honey. *Int. J. Food Sci. Tech.* 54(9): 2769–2778. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2713-6>
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, MP., Albertini, MC., Piatti, E. 2006. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chem.* 97(2): 217–222. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.03.039>
- Bogdanov, S. 2008. Storage, Crystallisation and Liquefaction of Honey. *Bee Products Science.* 1-5.
- Bogdanov, S. 2009. *Harmonised methods of the international honey commission.* Retrieved from <http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>
- Bogdanov, S., Ruoff, K., Persano Oddo, L. 2004. Nectars and the salivary fluids, and pharyngeal gland secretions of honeybees can be cited as the source of these enzymes, but the degree of enzyme activities can show noticeable differences in honey types. *Apidologie.* 35: S4–S17. <https://doi.org/10.1051/apido:2004047>
- da Silva, PM., Gauche, C., Gonzaga, LV., Costa, ACO., Fett, R. 2016. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* 196: 309–323. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.09.051>
- Dimiņš, F., Kūka, P., Kūka, M., Čakste, I. 2006. The Criteria of Honey Quality and Its Changes during Storage and Thermal Treatment. *LLU Raksti.* 16(311): 73-78.
- Dimiņš, F., Mikelsone, V., Kūka, P., Jefremovs, AN. 2014. Effects of different types of heat treatment on invertase activity in honey. In Evita Straumite (Ed.), *Foodbalt 2014* (pp. 284–288). Jelgava, Latvia: LLU, Faculty of Food Technology.
- Doğan, H., Akyol, E., Akgül, H., Selamoğlu Talas, Z. 2014. Biologic activity of honeybee products obtained from different phytogeographical regions of Turkey. *TURJAF.* 2(6): 273-276. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v2i6.273-276.151>
- Duisberg, H., Hadorn, H. 1966. Welche anforderungen sind an handelshonige zu stellen? *Mitt Geb Lebensmittelunters Hyg.* 57: 386–407.
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., Seijo, M C. 2014. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chem.* 149: 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.097>
- Flanjak, I., Strelec, I., Kenjeric, D., Primorac, L. 2016. Croatian produced unifloral honey characterized according to the protein and proline content and enzyme activities. *J. Apic. Res.* 60(1): 39–48. <https://doi.org/10.1515/jas-2016-0005>
- Geană, E. I., Ciucure, C. T., Costinel, D., Ionete, RE. 2020. Evaluation of honey in terms of quality and authenticity based on the general physicochemical pattern, major sugar composition and $\delta^{13}\text{C}$ signature. *Food*

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Control.* 109 (106919): 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106919>
- Li, J., Feng, M., Zhang, Z., Pan, Y. 2008. Identification of the proteome complement of hypopharyngeal glands from two strains of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 39(2): 199–214.
<https://doi.org/10.1051/apido:2007059>
- Mandal, MD., Mandal, S. 2011. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 1(2): 154–160.
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60016-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6)
- Moreira, RFA., De Maria, CAB., Pietroluongo, M., Trugo, LC. 2007. Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chem.* 104(3): 1236–1241.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.055>
- Ömür, B. 2015. *Investigation of the biochemical properties of the chestnut (Castanea sativa Mill.) honeys produced in the Black Sea region*. Ordu University, Institute for Graduate Studies in Natural and Technology.
- Roininen, K., Lähteenmäki, L., Tuorila, H. 1999. Quantification of consumer attitudes to health and hedonic characteristics of foods. *Appetite*. 33(1): 71–88.
<https://doi.org/10.1006/appe.1999.0232>
- Román, S., Sánchez-Siles, LM., Siegrist, M. 2017. The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. *Trends Food Sci Tech.* 67: 44–57.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.010>
- Sajid, M., Yamin, M., Asad, F., Yaqub, S., Ahmad, S., Mubarik, MAMS., Ahmad, B., Ahmad W., Qamer, S. (2019). Comparative study of physio-chemical analysis of fresh and branded honeys from Pakistan. *Saudi J. Biol. Sci.*
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.014>.
Article in Press
- Spano, N., Ciulu, M., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, MI., Piu, PC., Scanu, R., Sanna, G. 2008. Chemical characterization of a traditional honey-based Sardinian product: Abbamele. *Food Chem.* 108(1): 81–85.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.046>
- Strelec, I., Crevar, B., Kovac, T., Rajs, B. B., Primorac, L., Flanjak, I. 2018. Glucose oxidase activity and hydrogen peroxide accumulation in Croatian honeys. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 10(1): 33–41.
<https://doi.org/10.17508/CJFST.2018.10.1.06>
- Subramanian, R., Umesh Hebbar, H., Rastogi, N. K. 2007. Processing of honey: A review. *Int. J. Food Prop.* 10(1): 127–143.
<https://doi.org/10.1080/10942910600981708>
- Şahinler, N., Gül, A., Akyol, E., Öksüz, A. 2009. Heavy metals, trace elements and biochemical composition of different honey produced in Turkey. *Asian J. Chem.* 21(3): 1887–1896.
- Vorlov, L., Piidal, A. 2002. Invertase and Diaastase Activity in Honeys of Czech Provenience. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 5: 57–66.
- White, JWJ. 1975. Composition of Honey. In C. Eva (Ed.), *Honey – A Comprehensive Survey* (pp. 157–206). London: Heinemann.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

TÜKETİLEBİLİR PROPOLİS EKSTRELERİNDE KULLANILAN ÇÖZÜCÜLERİN (MENSTRUMLARIN) DEĞERLENDİRİLMESİ

Evaluation of Solvents (Menstruums) Used in Consumable Propolis Extracts

Oktay YILDIZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilimdalı, Trabzon, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0003-0436-682X, E-posta: oktayyildiz@ktu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 15.12.2019

Kabul Tarihi / Accepted: 28.01.2020

DOI: 10.31467/uluaricilik.659556

ÖZ

Bu çalışmada propolis ekstraksiyonunda farklı çözücüler kullanarak elde edilen ekstraktların özellikleri araştırıldı. Su, gliserol, glikol ve etanolik ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri kıyaslandı. İstatistiksel olarak etanolik ekstraktlar fenolik madde miktarı, flavonoid madde miktarı ve FRAP antioksidan kapasitesi bakımından diğerlerinden yüksek bulundu. Ekstraktların antioksidan kapasiteleri ile çözücülerin dielektrik sabitleri arasında paralellik gözlemlendi. Numunelerin toplam fenolik madde miktarları 0,79-87,56 mg GAE/mL; toplam flavonoid madde miktarları 0,73-24,72 mg KE/mL arasında ve FRAP antioksidan kapasite 7,52-870,121 mM Trolox E/mL arasında bulundu. Bulgular etanolik ekstraktlara glikol ekstraktlarının alternatif olabileceğini göstermiştir. Ekstrelerin farklı biyoaktif özellikleri ile birlikte çözücülerin kullanım limitlerinin göz önüne alınması gerekliliği tartışıldı.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Ekstraksiyon, Çözücü, Antioksidan Aktivite

ABSTRACT

In this study, properties of extracts obtained by using different solvents in propolis extraction were investigated. The antioxidant activities of water, glycerol, glycol and ethanolic extracts were compared. Statistically ethanolic extracts were higher than others in terms of phenolic content, flavonoid content and FRAP antioxidant capacity. A parallelism was observed between the antioxidant capacities of the extracts and the dielectric constants of the solvents. Total phenolic amount of samples was 0.79-87.56 mg GAE/mL; total flavonoid substance amounts were between 0.73-24.72 mg KE/mL and FRAP antioxidant capacity was between 7.52-870.112 mM Trolox E / mL. Findings showed that glycol extracts may be an alternative to ethanolic extracts. The different bioactive properties of the extracts, along with the need to consider the limits of the use of solvents were discussed.

Key words: Propolis, Extraction, Solvent, Antioxidant Activity

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Propolis is a natural compound widely used in apitherapy since ancient times. In terms of its physical and chemical structure, direct consumption is not common and it is considered scientifically unsuitable. The main purpose of the consumption of propolis is to take advantage of particular useful components. Therefore, it is

necessary to separate the bioactive components from the non-bioactive waxy part of the propolis. This separation can be carried out by different extraction methods. The solvent used in the extraction process is the most important factor in the isolation of certain bioactive components. In addition, factors such as the extraction method (traditional or modern methods), temperature, and time are also important

in determining which bioactive components are extracted.

Today, the most widely used propolis extraction method is performed with ethyl alcohol. Ethanolic propolis extracts have a very high biological value. However, there are individuals who do not want to consume ethyl alcohol and children cannot consume these extracts because of the alcohol toxicity. Around the world, the tendency towards ethyl alcohol-free propolis extracts is increasing day by day. Water, olive oil, other vegetable oils, essential oils, polyalcohols/polyols (glycols), and vinegar, among others, are used as alternative solvents for propolis extraction.

The most important biologically active constituents in propolis are phenolic acids and flavonoids. Volatile components, organic acids, protein/peptides, and enzymes are also present. The polarity of each of these components is different. The most important factor in the dissolution of a component in the solvent is its polarity. An effective extraction cannot be obtained if the component-solvent pair has distant polarity levels. Therefore, it is very important and difficult to choose an effective extraction method and solvent. As a result, the biological activity of some propolis extracts on the market is quite low.

The most important risks in the solvents used are the toxicity of the solvent, the daily intake limits, and absorption excretion of the solvent in the body and the digestion products of the solvent in the body. Legal regulations and scientific findings should be taken into consideration in the production and consumption of propolis extracts which are considered to be food supplements.

Materials and Methods: Propolis samples collected from Maçka, Trabzon, in 2019, were used in this study. Propolis produced by Caucasian bees were taken from traps and frozen within the same day. On the day of extraction, the propolis was ground in a laboratory type blender. Samples were extracted with a propolis: solvent ratio of 1:10. Extraction was carried out at 40 degrees C, in the dark, for 24 hours, in a water bath. The mixture was first filtered through a coarse filter followed by a fine filter. The antioxidant capacity of the samples was determined by total phenolic content, flavonoid content, and FRAP antioxidant power determination methods. Our findings were evaluated using SPSS statistical software.

Results and discussion: The antioxidant capacities of the extracts were correlated with the dielectric constants of the solvents. The total phenolic content of the samples was 0.79 - 87.56 mg GAE/mL, the total flavonoid contents were between 0.73 - 24.72 mg KE/mL and the FRAP antioxidant capacity was between 7.52 – 870.121 mM Trolox E/mL. The results revealed that glycol extracts could be a viable alternative to ethanolic extracts. However, it is important to consider the usage limits of glycol as a solvent.

Conclusion: In this study, we compared different solvents to be used in the extraction of propolis and determined the consumable doses. In the propolis extraction industry, care must be taken so that the solvent used in the extraction is permitted. When preparing propolis standards, the relevant authorities should not focus solely on the biological activities of the final products. The solvents used must be included as part of the standard. The full name of the solvent (such as mono propylene glycol or polypropylene glycol) should be reported exactly on the label, and not be vaguely reported such as mentioning the solvent is only glycol.

GİRİŞ

Balarılarının (*Apis mellifera*) ve bazı iğnesiz arı türlerinin değişik ağaç ve bitkilerden topladığı reçine benzeri maddeleri, balmumu, polen ve kendi sekresyonları ile karıştırarak oluşturduğu farklı renklerdeki (yeşil, kırmızı, sarı, kahverengi) yapışkan madde olarak bilinen propolis (Mot v.d. 2010) oldukça yüksek tıbbi, ekonomik ve tarihe değere sahip biyolojik bir üründür (Pobiega v.d. 2019, Saral v.d. 2019, Freires v.d. 2016, Sforcin 2007). Kavak, kızılgağaç, huş, okaliptüs, akasya, imza ağacı, kestane dahil çok sayıda ağacın yaprak, kabuk, çiçek, tomurcuk, çatlak ve saplarından toplanan oldukça yapışkan maddeler propolisin ana maddesini teşkil ederler (Baltas v.d. 2016, Bankova v.d. 2014a,). Arılar propolisi kovanlarını dış etkilere karşı korumak, kovan içi dezenfeksiyonu sağlamak, petek gözlerini temizlemek ve bal/yavru koymaya hazır hale getirmek, haşere ve hastalıklarla mücadele etmek için kullanırlar (Wagh 2013, Kartal v.d. 2003, Prytyk v.d. 2003, Hikmet ve Nazime 2006).

Propolis insanlık tarafından antik çağlardan beri kullanılmış, mumyalama ritüellerinde, halk hekimliğinde yer bulmuştur. Daha yakın zamanda ise yiyecek ve içecek endüstrisinde, kozmetik

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

sektöründe, gargaralarda ve diş macunlarında kullanım alanına girmiştir (Wagh 2013, Banskota v.d. 2001). Propolis bu kadar geniş kullanım alanı bulmasının sebebi oldukça yüksek antioksidan aktivite, antimikrobiyal etki, anti inflamatuvar etki, antikanser etki, antitüberküloz etki, analjesik etki, doku yenileyici etki, antihepatotoksik etki, anti ülser etki, yüksek enzim inhibitör potansiyeli göstermesinden kaynaklanmaktadır (Turkut v.d. 2019, Widelskiv.d. 2018, Saral v.d. 2016, Kolayli v.d. 2016, Can v.d. 2015, Doğanyigit 2013, Cottica v.d. 2011, Sahin v.d. 2011, Oliveira v.d. 2010, Dalben-Dota v.d. 2010, Kambur v.d. 2009, Marcucci v.d. 2008, Silici ve Kutluca 2007, Oliveira v.d. 2006, Silici v.d. 2005, Özcan v.d. 2003, Banskota v.d. 2001, Miyataka v.d. 1997, Burdock 1998). Propolis içeriğinden dolayı iyi bir doğal immünomodülatör (bağışıklık düzenleyici) ajan (Sforcin 2007, Watson v.d. 2018) olup son yıllarda özellikle bu özelliğinden dolayı aileler tarafından ekstraktları çocukları için sıklıkla tercih edilmektedir.

Propolis farmakolojik özelliklerinden dolayı terapötik bir madde olmasının yanında ekstraktlarında biyoaktif bileşiklerin bulunması nedeniyle aynı zamanda fonksiyonel bir gıdadır (Medić-Šarić v.d. 2009). Türk Gıda Kodeksi de bu ekstraktları "Takviye Edici Gıda" olarak nitelemektedir (Tebliğ No: 2013/49). Kaynağı bitkiler olmasına rağmen arılar tarafından işlendiği ve kendi sekresyonları ile karıştırıldığı için hayvansal gıda sınıfındadır.

1945 yılından bugüne kadar 5000'den fazla nitelikli bilimsel çalışmada (Wos) propolis kimyasal kompozisyonu, fiziksel özellikleri, biyokimyasal özellikleri çalışılmıştır. Çalışmalar *in vitro*, *in vivo*, pre-klinik ve klinik seviyelerde yapılan apiterapiye yönelik çalışmalar olup her geçen gün propolis hakkında yeni bilgiler bilimsel yazına kazandırılmaktadır.

Arıların da sıkça sorduğu propolis ham hali ile tüketimi önemli bir konudur. İçeriğinde oransal olarak çok az miktarda bulunan biyoaktif bileşenlerin vücuda faydalı olacak miktarda alınabilmesi için tüketilebilecek ham propolis miktarı oldukça fazladır. Arıcının kovanla ilgilenirken kazıdığı küçük propolis parçalarını çiğnemesi sıkça rastlanılan bir uygulamadır. Ham propolis küçük parçalar halinde çiğnenebilir ancak büyük miktarlarda tüketimi mide rahatsızlıklarına/karın ağrısına neden olabileceğinden tavsiye edilmemektedir (Krell 1996).

Propolis kullanım amacı ne olursa olsun en önemli ve zor husus propolis yapısında bulunan şimdiye kadar tespiti yapılabilmemiş 420'den fazla kimyasal

maddenin (Milojković-Opsenica v.d. 2016), %80-90 oranlarını bulan mumsu maddeler (Juliano v.d. 2007, Cavaco v.d. 2008) içerisinden ekstrakte edilmesidir. Çünkü ham propolis direk tüketimi bu mumsu maddelerin/waksların yoğunluğu, biyoaktif bileşimin oransal olarak çok düşük olması ve kirlilikler nedeniyle uygun değildir. Propolis tüketiminde ana amaç, içerisinde bulunan yararlı bileşenlerin alınmasıdır. Bu nedenle bu kompleks yapının içerisinden biyoaktif maddelerin ayrılması yani ekstrakte edilmesi gereklidir. Ekstraksiyon işlemine kullanılan ekstraksiyon tekniği ve kullanılan çözücü çok önemlidir. Çünkü mumsu yapı nedeniyle oldukça apolar karakterde olan kompleks yapıdan biyoaktif maddeleri alıp çıkarmak oldukça güçtür. Günümüzde en yaygın kullanım alanı bulan ekstraksiyon çözücüsü etil alkoldür. Etil alkolün polaritesi propolisteki ekstraksiyonu yapmak için uygun aralıktadır. Etanolik propolis ekstraktları yüksek biyolojik aktiviteye sahip olmasına rağmen etil alkol tüketmek istemeyen bireyler, etil alkolün zararlı olduğunu düşünenler ve çocuklar yeni çözücü alternatiflerine yönelmektedir. Dünyada oldukça iyi bir ekonomik pazar oluşmasında bu yönelimin etkisi büyüktür. Etil alkol içermeyen propolis ekstraktlarının sayısı piyasada hızla artmaktadır. Bunlar su ekstraktları, zeytinyağı başta olmak üzere bitkisel yağ ekstraktları, uçucu yağ ekstraktları, çoklu alkollerin ekstraktları (gliserol, glikol vb.) ile daha az kullanılan içeceklerde bekletme, sirke gibi ürünlerde çözme, değişik sıvı karışımlarında demleme ve/veya bütün bunların kombinasyonlarıdır. Günümüzde yaygın olmamakla birlikte propolis ekstraksiyonunda modern ekstraksiyon yöntemleri de (süper kritik akışkan ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrasonik ekstraksiyon, alkali ekstraksiyon, vakum ekstraksiyon vb.) kullanılmaktadır. Propoliste çözgen olarak kullanılan bu maddelerin propolis içerisinden koparıp alabileceği biyoaktif bileşen sayısı ve miktarları değişiktir. Öyle ki bazılarında biyolojik aktivitenin aynı miktar meyve sularından bile daha düşük seviyelerde olduğu bulunmuştur. Çözücü, propolis en önemli biyoaktif bileşenleri olan fenolik maddeleri çözüp alabilecek nitelikte olmalıdır. Propolis yapısında bulunan fenolik asitler ve esterleri, flavonoidler, uçucu organik bileşenler, alkoller, ketonlar, steroidler, terpenoidler, aminoasitler vb. (Cunha v.d. 2018, Havsteen v.d. 2002, Bankova v.d. 2000, Marcucci v.d. 2000, Line 2018) bileşenlerin polariteleri farklıdır. Bir molekülün herhangi bir çözücü içerisinde çözünürlüğünde en önemli faktör polariteleridir. Yaygın bilinen şekli ile benzer benzeri çözer ilkesi propolis ekstraksiyonunda

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

da geçerlidir. Polariteleri uzak olan çözünen: çözücü çiftlerinde ekstraksiyon zor olmaktadır.

Uygun ekstraksiyonun yapılması ve etkili ekstraktın elde edilmesinde yüksek biyolojik aktiviteli ürün elde etmek kadar kullanılan çözücünün non-toksik olması, tüketilebilir olması, ekstraksiyon sonrası uzaklaştırılıp uzaklaştırılamayacağı hususu, günlük alım miktarları, vücutta emilimi ve metabolize olduğunda açığa çıkan ürünler ve bunların atılımı son derece önemlidir. Bu nedenle ticari olarak üretilen ve takviye edici gıda olarak piyasada satılan propolis ekstraktlarının üzerinde hiçbir şüphe bulunmamalıdır. Ekstraktlara ait standartlar hazırlanırken çözücünden bağımsız standardizasyon ciddi hatalar oluşturmaktadır. Yasal düzenlemeler ve bilimsel çalışmalar ekstrakt hazırlanmasında ve tüketiminde dikkate alınmalı ve tüketici için her şey şeffaf olmalıdır.

Çözücüler (Menstrumlar)

Ham propolislerden tüketilebilir ekstraktlar elde etmek için kullanılan farklı ekstraksiyon yöntemlerinde birçok menstrum kullanılmaktadır. Elde edilen ekstrakt isimlendirilirken çözücüler üzerinden yapılmaktadır /yapılmalıdır. Oysa piyasada ciddi isimlendirme hataları mevcuttur. Bugün piyasada çözücüye bağlı yapılan isimlendirmelerle değişik ürünlere rastlanmaktadır. Etanol kullanılarak üretilen propolis ekstraktı, "etanolik propolis ekstraktı" ismiyle; sadece su kullanılarak hazırlananlar "propolis su ekstraktı" ismiyle ya da yaygın kullanımı ile "sulu propolis ekstraktı" ismi ile anılmalıdır. Su bazlı propolis ifadesi daha geniş bir ifade olup bu ürünü nitelememektedir. Genel literatürde "su bazlı" ifadesine bakıldığında yapıda suyun olması ya da suda çözünür olması durumu için kullanılır. Mesela; jelatin bazlı yenilebilir film, jelatin temelinde hazırlanan, yapısında jelatin bulunan ve jelatinin özelliklerine dayanılarak üretilen film demektir. Su bazlı boya ifadesi ise suda çözünebilir anlamına gelmektedir. Glikoller kullanılarak elde edilen propolis ekstraktı da suda çözüldüğünden su bazlı propolis tanımının bu ürünü de kapsamaması gerekmektedir. Halbuki su bazlı ifadesi ile piyasada kastedilmek istenen sadece su ile hazırlanmış ekstraktlardır.

Halk arasındaki yanlış algılardan biri de suda çözünür propolis "sulu propolis" olarak algılanmasıdır. Suda çözünür propolis su içerisinde çözünebilir glikoller (mono etilen etilen glikol, polietilen glikol v.b) ya da suda çözünebilir başka bir çözücü ile hazırlanmış ekstraktlardır.

Yine bitkisel yağlarda hazırlanan propolislerde de

isimlendirmeye dikkat edilmelidir. Zeytinyağı içerisinde hazırlanmış propolis ekstraktı "propolis zeytinyağı ekstraktıdır". İsimlendirmelerde ekstrakt yerine ekstre kullanımı da yanlış bir kullanım değildir.

Yalnızca bir çözücünün kullanılmadığı ekstraksiyon yöntemlerinde yardımcı maddelerin de etikette belirtilmesi tüketici sağlığı ve bilinçlendirmesi açısından önemli bir konudur. Bazı kombine yöntemlerde değişik kimyasal maddeler (mesela alkali ekstraksiyonda pH ayarlamada) ya da gıda katkı maddelerinin (lesitin, şeker alkoller v.b.) kullanıldığı bilinmektedir. Bu yardımcı maddelerin ürün isimlendirmesinde olmasa bile içerikte mutlaka belirtilmesi gereklidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç:

2019 yılı Haziran- Eylül ayları arasında kovanlara takılı propolis tuzaklarından elde edilen propolisler çalışmada materyal olarak kullanıldı. Propolisler sezon sonunda tuzaklardan söküldü ve -18°C'da muhafazaya alındı. Ekstraksiyon zamanı tüm kovanlardan hasat edilen propolisler homojen bir örnek profili oluşturmak için iyice öğütüldü ve karıştırıldı. Kullanılan temel kimyasal maddeler Sigma Aldrich'ten (Germany) temin edildi.

Yöntem:

Ekstraksiyon:

Örnek karışımı ekstraksiyon yapılacak metotlara göre gruplara ayrıldı. Her gruptaki propolislerin homojenliğinin kontrolü ham propolislerde toplam fenolik madde miktarı tayini yapılarak gerçekleştirildi. Gruplar arası toplam fenolik madde miktarları arasında %1'in altında bir fark ana ham propolis homojen olduğunu gösterdi. Öğütülmüş ve homojen hale getirilmiş propolis menstrumun (çözücü) %20'si (v/v) olacak şekilde ağız kapalı, ısı geçiirgenliğini önlemek için alüminyum folyo ile izole edilmiş kavanozlara çözücü ile birlikte alındı. Ekstraksiyon yöntemlerinden dekoksasyon metodu uygulandı. Çözücü olarak saf su, gliserol (%70), etanol (%70), glikol (%70) kullanıldı (Krell, 1996). Su banyosu içerisine alınan kavanozlar 40 ±1°C'da 60 rpm'de 24 saat sürekli çalkalandı. Karışım önce kaba krom filtreden, ardından 50 µm gözenek çaplı süzgeçten filtre edildi. Saf su ile ekstraksiyon yönteminde uygulanan yöntemde klasik

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

ekstraksiyon uygulandı, patente konu olan ve yüksek aktivite elde edilebilen yöntemlere (Patent 2019) başvurulmadı. Filtratlar antioksidan testler için kullanıldı.

Antioksidan Kapasite Tayinleri:

Numunelerin antioksidan testleri toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı, demir indirgeme antioksidan güç (FRAP) tayini ile yapıldı.

Örneklerin toplam fenolik madde miktarı analizi bu maddelerin yapısında bulunan fenol halkasının bazik ortamda Folin-Ciocalteu ayırıcını indirgeyip,

kendisinin okside forma döndüğü bir oksidasyon-redüksiyon reaksiyonu esasıyla yapılır. Reaktif, indirgenmiş halinde 760 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilebilen farklı şiddette mavi renk verir. Renk şiddeti fenolik madde miktarı ile orantılıdır. Çalışma Tablo 1'deki ölçeklendirilmiş analiz reçetesine uygun şekilde çalışma yapıldı. Gallik asit (GA) referans fenolik madde olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak absorban grafik oluşturuldu. Fenolik madde içeriği bilinmeyen ekstraktın ölçülen absorbanından yola çıkılarak bu grafikten konsantrasyonu bulundu ve sonuçlar mg GAE/mL olarak ifade edildi (Slinkard ve Singleton 1977).

Tablo 1. Toplam fenolik madde miktarı tayini analiz reçetesi

Table 1. Analysis recipe for determination of total phenolic contents

	Kör Tüpleri	Standart Tüpleri	Test Tüpleri
Saf su(mL)	0,1	-	-
Gallik asit standartları (mL)	-	0,1	-
Ekstrakt numunesi(mL)	-	-	0,1
Saf su (mL)	5	5	5
0,2 N Folin Reaktifi (mL)	0,5	0,5	0,5
Tüpler vorteks ile karıştırılır ve 3 dakika sonra			
%2 Na ₂ CO ₃ (mL)	1,5	1,5	1,5
2 saat inkübasyon ve 760 nm'de köre karşı absorban okunur			

Propolis ekstraktlarının toplam flavonoid miktarı analizinde Kuarsetin referans flavonoid olarak kullandı. Artan bir seri konsantrasyon ile hazırlanan Kuersetinin (K) ölçülen absorbanları ile oluşturulan grafik derişimi bilinmeyen numunenin flavonoid

miktarını bulmada kullanıldı ve sonuçlar kuarsetin eşdeğeri (mg KE/mL)cinsinden ifade edildi. Tablo 2'de Toplam flavonid tayininde kullanılan analiz reçetesi verilmiştir (Fukumoto v.d. 2000).

Tablo 2. Toplam flavonol tayini için analiz reçetesi

Table 2. Analysis recipe for determination of total flavonoids

	Kör Tüpleri	Standart Tüpleri	Test Tüpleri
Ekstrakt (mL)	-	-	0,5
Kuarsetin standardı (mL)	-	0,5	-
Metanol (mL)	4,8	4,3	4,3
%10 Al(NO ₃) ₃ (mL)	0,1	0,1	0,1
1 M NH ₄ .CH ₃ COO (mL)	0,1	0,1	0,1
40 dk. oda sıcaklığında inkübasyon ve 415 nm'de saf suya karşı absorban tespiti.			

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Propolis ekstraktlarının Demir (III) indirgeme / FRAP yöntemi ile antioksidan kapasite tayini, Fe(III)-TPTZ (2,4,6-tris (2-piridil)-S-triazin) kompleksinin propoliste bulunan antioksidan aktiviteli bileşiklerin bulunması halinde indirgenip, mavi renkli Fe(II)-TPTZ kompleksini oluşturması ve oluşan renkli yapının 593 nm'de maksimum absorbanı vermesi esasına dayanmaktadır (Benzie v.d. 1999).Referans

antioksidan madde olarak Troloks®'un farklı konsantrasyonları ile çalışma grafikleri oluşturuldu ve sonuçlar mM Troloks® eşdeğeri antioksidan güç olarak ifade edildi. Taze FRAP reaktifinin [300 mM pH 3.6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl₃ (10: 1: 1)] kullanıldığı yöntemin analiz reçetesi Tablo 3'de gösterildi.

Tablo 3.FRAP yöntemi ile antioksidan tayini analiz reçetesi

Table 3. Analysis recipe for determination of antioxydant by FRAP method

	Kör	Propolis Ekstraktları	Troloks®
FRAP Reaktifi (mL)	3	3	3
Numune (µL)	-	100	-
Troloks (Değişen kons.) (µL)	-	-	100
FeSO ₄ .7H ₂ O (Değişen kons)	-	-	-
Destile Su (mL)	-	-	-
Metanol	100 µL	-	-

İstatistiksel analiz

Bütün veriler 5 değer in ortalaması ve $\pm$ standart sapma olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıklar SPSS paket programı kullanılarak ANOVA testi ile analiz edildi. $P < 0.05$ seviyesinde farklılık anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışılan propolis ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri Tablo 4'de sunulmuştur. Tablo incelendiğinde farklı dielektrik sabitlere sahip menstrumlardan elde edilen ekstraktların farklı antioksidan aktivite gösterdikleri anlaşılmaktadır. Ürünlerin antioksidan madde sonuçları tüketilebilir sıvı ekstraktın mL'si üzerinden verildi. Bu doğrudan tüketimde vücuda alınacak antioksidan miktarını

göstermesi açısından önemlidir. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları arasında istatistiki olarak dört farklı çözücü için de anlamlı farklılık bulundu ($P=0,01$; $P < 0.05$). 0,79-87,56 mg GAE/mL arasında fenolik madde miktarı tespit edildi. Fenolik maddeler içerisinde bir grup olan flavonoidlerin miktarları 0,73-24,22 mg KE/mL arasında değişti, saf su ve gliserol ekstraktları arasında istatistiki açıdan anlamlı bir farklılık görülmedi ($P=0.01$; $P<0.05$). Yine propolislerin demir indirgeme antioksidan güç tayin (FRAP) bulgularının 7,520-870,121 mM Troloks E/mL arasında olduğu ve her çözücü için istatistiki olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p=0,1$; $P > 0.05$).

Her tip menstrum için dekoksasyon ile ekstraksiyonda sıcaklık ve süreler, uygulanan işlemler aynı olduğu için elde edilen ürünlerin özelliklerinin kıyaslanması anlamlı olmaktadır.

Tablo 4.Propolis ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri*

Table4. Antioxidant capacity of propolis extracts*

Örnek Kodu (sayısı:n)	Çözücü (Menstrum)	Dielektrik sabiti (δ)	Oranı (%)	Toplam fenolik madde miktarı (mgGAE/mL)	Toplam flavonoid miktarı (mg KE/mL)	FRAP antioksidan güç (mM Troloks E/mL numune)
PSE (5)	Saf su	78,5	100	0,79±0,11 ^a	0,73±0,09 ^a	7,520±1,54 ^a
PGE (5)	Gliserol	46	70	3,72±0,04 ^b	1,06±0,49 ^a	35,823±2,48 ^b
PEE (5)	Etil alkol	24,3	70	87,56±6,88 ^d	24,22±1,34 ^c	870,121±25,23 ^d
GGLE (5)	Glikol	32,1	70	49,78±2,55 ^c	6,81±0,83 ^b	420,543±15,23 ^c

*Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiş olup, aynı küçük harf (a,b,c) $P < 0.05$ seviyesinde istatistiki fark olmadığını göstermektedir.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

TARTIŞMA

Ekstraksiyon olayı tam bir çözünme olayı olmasa da çözücünün ekstrakte ettiği bileşenlerle etkileşimi açısından önemlidir. Çözünme olayında çözünen molekülleri tıpkı çözücü moleküllerinde olduğu gibi belirli moleküller arası kuvvetler (dipol-dipol etkileşimleri, iyon-iyon etkileşimleri vb.) ile bir arada tutulurlar. Propolisteki etken bileşenlerin çözücü içerisinde çözünürlüğü, büyük ölçüde çözücü polaritesinin bir fonksiyonudur. Çözücüler polar, yarı polar ve apolar olabilirler. Polar çözücüler polar ve iyonik çözünenleri çözerler. Yarı polar çözücüler (örneğin alkoller) bir dereceye kadar apolar moleküllerde polariteye neden olabilir ve böylece polar-apolar moleküllerin karışabilirliğini sağlar. Polarite ve çözünürlük arasındaki ilişki, bir ilacın farmasötik bir çözeltide çözünürlüğünü değiştirmek için pratikte kullanılabilir. Çözünme olayında birçok yaklaşım ile çözünürlük artırılabilir. Propolis ekstraksiyonunda başvurulabilecek/başvurulan başka bir yaklaşım, çözüneni çözmek için optimum polariteye sahip bir çözücü sistemi oluşturmak üzere farklı polaritedeki çözücülerini karıştırmaktır. Bir bileşiğin dielektrik sabiti (δ) polaritesinin bir göstergesi olup polaritenin artışı ile dielektrik sabiti de artış gösterir (Mukerjee v.d. 1982). En düşük dielektrik sabite sahip olanlar apolar karakterdeki çözgenlerdir. Orta polarite derecesine sahip çözgenler propolis için daha uygundur. Tek başına apolar karakterli çözgenler tıpkı polar çözgenler gibi etkili bir çözme sağlayamamaktadır. Çözücüler sahip oldukları dielektrik sabitlerine göre sınıflandırılırken polar olanlar ($\delta > 50$), yarı-polar olanlar ($\delta = 20-50$) ve apolar olanlar ($\delta = 1-20$) şeklinde gruplandırılırlar.

Tablodaki çözücülerden tüketilebilir propolis ekstraksiyonlarında ana çözücü olarak kullanılan çözücüler yaygın olarak etanol, su, polialkoller (glikoller, monopropilen glikol, polietilen glikol, monoetilen glikol, gliserol vb.) ve sıvı yağlardır. Gelişmiş ekstraksiyon yöntemlerinden süperkritik ekstraksiyonda ise CO₂ kullanılmakta, ancak bu sistemde CO₂ sistem sonrasında uzaklaştığı için üründe kalmamaktadır. Literatür eter kullanımından da bahsedilmekte olup (Krell 1996) piyasada bu ekstraktlara pek rastlanmamakta ve toksisitesinden dolayı tarafımızca kesinlikle tavsiye edilmemektedir. Etanolik ekstraktların en yüksek, sulu ekstraktların en düşük aktivite göstermesi bu çözücülerin polariteleri ile ilgilidir.

Propolis ekstraktlarında farklı ekstraksiyon metodları ve çözücüler kullanılarak yapılan bazı çalışmalar literatürde mevcut olup (Chen v.d. 2019, Turkut v.d. 2019, Keskin ve Kolaylı 2019, Trusheva v.d. 2007, Bankova v.d. 2014b, Lim v.d. 1994) bulgular etanolik ekstraktların, süper kritik akışkanla elde edilen ekstraktların, modifiye edilmiş sulu propolis ekstraktlarının değişik antioksidan kapasite gösterdiğini belirtmektedir. Araştırmamıza benzer ancak maserasyon ile uygulanan etanolün kullanıldığı bir çalışmada toplam fenolik madde miktarı 43-44 mg/mL; 8,6-8,8 mg/mL toplam flavonoid madde tespit edilmiştir (Trusheva v.d. 2007). Bulguların çalışmamızda elde ettiğimiz değerlerin yarısına yakın olmasını çalışmamızda maserasyona ilaveten eklenen 40°C'lık sıcaklık ile dekoksiyon işleminin farkıdır. Buradan hareketle sıcaklık artışının ekstraksiyonda verimi artırdığı anlaşılmaktadır. Fakat çok yüksek sıcaklıkların fenoliklere nasıl bir etki yapabileceği hususu daha detay çalışmalara ihtiyaç duymaktadır.

Cottica v.d. (2011) yaptıkları çalışmada 48-87 mgGAE/mL arasında toplam fenolik madde içeriği, 10-26 mg KE/mL toplam flavonoid içeriği ve FRAP değeri 528-2068 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ propolis ekstrakt olarak bulmuştur. Sonuçlardan fenolik madde miktarı ve flavonoid içeriğinin bulgularımızla uyumlu olduğu görülmektedir. Frap değeri ise Troluks cinsinden ifade edilmediği için kıyaslama yapılamamıştır. Yine Keskin ve Kolaylı (2019) yaptıkları çalışmada Türkiye piyasasından topladıkları değişik çözgenlerle üretilen propolis ekstraktlarını analiz etmiş ve antioksidan parametrelerini belirlemişlerdir. Etanolik ekstraktlarda 10-77 mg GAE/mL; sulu ekstraktlarda 0,09-12 mgGAE/mL fenolik madde içeriği bulmuşlardır. Toplam flavonoid madde miktarları ise etanolik ekstraktları en fazla 11,83 mg KE/mL; sulu ekstraktlarda ise 0,06 mg KE/mL bulunmuştur. Araştırmacıların bulgularının piyasada çok geniş bir aralıkta antioksidan içeriğine sahip propolis ekstraktları olduğunu, bazılarının içeriğinin meyve sularından dahi düşük olduğu görülmektedir. Araştırmacıların bulguları çalışma bulgularımızla örtüşmekte olup gerek tartıştığımız menstrumlar gerekse yöntemlerin ekstraktların içeriğini direkt etkilediğini göstermektedir.

Dünyada da farklı çözücüler içerisinde üretilen propolis ekstraktları piyasada satılmaktadır. Yine bulgularımızla paralel bulguları içeren, bir çalışmada ekstraktların polifenol içerikleri 9-85 mg GAE/mL olarak bulunmuştur (Herrera v.d. 2010). Litvanya propolislerinin su, alkol, glikol ve bunların karışımları

ile yapılan ekstraksiyonlarında ekstrelerin fenolik madde miktarları kalite parametresi olarak çalışılmış ve %5 propolis kullanılması ile elde edilen ürünlerde su ile ekstraksiyonda 17; etanol ile ekstraksiyonda 175; glikol ile ekstraksiyonda 118 mg/g ferulik asit cinsinden toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiştir (Ramanauskienė v.d. 2013). Çalışmamızda gallik asit cinsinden sonuç vermiş olsak bile bu sonuçlar da aslında elde edilen ürünlerin içeriklerindeki farklılıkları yansıtmaktadır.

Yapılan ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan bu çözücüler içerisinde bakterisidal etken maddelerin çoğunluğunun sulu ve etanolik ekstraktlarda olduğu bildirilmektedir. Kullanılabilecek onlarca organik çözücünden çok azı toksik değildir. Bunlardan toksik olmayanlar insan ve hayvan uygulamalarında kullanılabilir. Uzman kişiler (eczacı, kimyager, mühendis vb.) tarafından ekstraksiyonun yapılması bu açıdan çok önemlidir. Bazı durumlarda kullanılan çözücünün uzaklaştırılması, azaltılması gereklidir. Mesela etanolik ekstraksiyonda etanolün uzaklaştırılması gibi. Liyofilizasyon, vakum evaporasyon, distilasyon bu amaçla faydalanılabilecek uzmanlık gerektiren işlemlerdir (Krell 1996).

Propoliste tespit edilen aktif bileşenlerin büyük çoğunluğu glikol ve etanolde çözünmekte, sulu ekstraksiyon yöntemlerinden ise geliştirilmiş kombine metotlarla aktif bileşenlerin büyük miktarı alınmaktadır (Patent 2019, Krell 1996). Aseton ekstrelerinin şampuan, losyon gibi kozmetik ürünlerinde kullanılabilir. Alkol ekstraksiyonunda etkili yöntemin %70'lik etil alkol ile yapılan ekstraksiyon olduğu bildirilmektedir. Sürenin uzatılması propolise geçen madde miktarını artırmakla birlikte 2-3 haftadan fazla bekletmenin etkinliği daha fazla artırmadığı bildirilmektedir (Debuyser 1984). Ekstraksiyon öncesi propolisın dondurulması ve toz haline getirilmesi ekstraksiyon verimini artırmada son derece önemlidir.

Etanolün vücuda alımı propolis ekstraktlarında da olduğu gibi çoğunlukla oral yoldadır. Alkollü bir içkiye oranı %0,5–95 arasındadır. Ağız yıkama sıvılarında ve toniklerde %10–18, muhtelif soğuk algınlığı ilaçları %4–10, reçete edilen bir antitussif olarak terpin hidratın eliksiri %40 oranında etil alkol içerebilir (Baduroğlu ve Durak 2010, Hunsaker ve Hunsaker. 2004, Logan ve Distefano 1998, Modell v.d. 1993). %70'lik propolis ekstraktlarındaki etil alkol oranı alkol uzaklaştırılıp konsantre aşamasına getirilmemiş, çözünen propolis miktarına bağlı olarak

%50'den fazladır. Biyoaktif bileşenlerin toksik dozunun hiç olmadığı varsayılsa bile bu oranda alkol içeriği tüketim için ciddiye alınması gereken, hatta çocuklarda daha da önemsenmesi gereken bir husustur. Etil alkol gastrointestinal mukozal yüzeyden derhal emilir. %20–25 i mideden, %75-80'i ince bağırsaklardan emilir. Etil alkolün farmakokinetiği (absorbsiyon, distribsiyon ve eliminasyon) kişiye göre değişir. Maksimum absorbsiyon oranı %20'lik etil alkol ile mümkündür (Denney v.d. 2000). Etil alkol, merkezi sinir sistemine etki yapan diğer maddelerle beraber alındığında kandaki 150- 200 mg/100 ml etil alkol değeri minimal letal doz olarak kabul edilmektedir (Baduroğlu ve Durak 2010, Kugelberg ve Jones 2007). Yıldız v.d. (2014) farklı çözücülerle hazırlanan propolis ekstraktlarının biyoyararlılıkları hakkındaki çalışmada sulu ekstraktlar için bulgularımızla paralel (0,20-1 mg GAE/ml) veriler elde etmişlerdir.

Tüketilebilir propolis ekstraksiyonunda metanol kesinlikle kullanılmamalıdır. Etanol kullanımında ise en büyük risklerden biri de teknik etanol da denilen daha ziyade laboratuvar çalışmaları ve hijyen amaçlı kullanılan etanolün propolis ekstraksiyonunda kullanılmasıdır. Uygun olmayan alkollerle hazırlanan propolis ekstraktları kaynaklı ölümlere dünyada rastlanmıştır (Krell 1996). Günümüzde birçok ülkede kullanılan ve ülkemizde de 2017 yılında yürürlüğe giren mevzuatla evsel kullanım amaçlı etil alkolün bu tip ekstraktlarda kullanımının veya evlerde içki yapımının önüne geçilmiştir. İlgili mevzuata göre (Resmi Gazete 2017) gıda amaçlı kullanılacak etil alkol dışındaki etil alkollere oldukça acı bir madde olan ve analitik olarak tespiti yapılabilen Denatonyum benzoattan 1,2 g/HLkatılma zorunluluğu getirilmiştir. Bu düzenleme propolis etanol ekstraktlarında kontrolsüz üretimin kısmen önüne geçecektir. Bütün bunlar dikkate alındığında alkol ekstraktlarının evde veya yetkin olmayan kişilerce üretimi kesinlikle uygun değildir. Zaten Avrupa İlaç Ajansı (EMA)'nın EMA/HMPC/85114/2008 nolu raporu, etil alkollü propolis ekstraktlarının çocuklarda, formülasyonunda etanol bulunan preparatlarla birlikte kullanılmasının uygun olmadığı bildirmektedir (EMA, 2009).

İnsanların alkol ekstraktlarına gerek sağlık kaynaklı gerek inanç kaynaklı olan mesafesi, alkolsüz (alkol free) ekstraktlara ilgisini artırmıştır. Sulu veya suda çözünür propolis ekstraktlarının son yıllarda popüler olmasının nedeni de budur. Bu popülerlik, çoklu

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

alkollerin ekstraktlarına yönelmeye neden olmuştur. Etanol (C_2H_5OH) tek OH içerirken poli alkoller birden fazla OH grubu içeren alkollerdir. İki hidroksil grubu içeren bileşikler glikol, üç hidroksil grubu içerenler ise triollerdir. Gliserol, gliserin yada propantriol 3 OH içeren ($C_3H_8O_5$) bir alkol olup propolis ekstraksiyonunda kullanılır. Etilenglikol ya da 1,2 etandiol ve propilen glikol iki hidroksil içeren alkollerdir. Propolis ekstraksiyonunda kullanılan etilen glikolde etilenler uzayarak n sayıda bir polialkole döner. Bu molekül polietilen glikol olup ekstraksiyonda başvurulmuş bir çoklu alkoldür.

Avrupa İlaç Ajansının EMA/CHMP/704195/2013 raporuna göre propilen glikol santral sinir sistemi, kardiyovasküler sistem ve /veya solunum sisteminde meydana getirebileceği potansiyel toksisite riskleri göz önüne alındığında, normal doğal yolla doğan 0-1 aylık bebeklerde 1 mg/kg; 1 ay-4 yaş arası çocuklarda 50 mg/kg; 5-7 yaş arası çocuklar ve yetişkinlerde 500 mg/kg maksimum günlük kullanım limitleri verilmiştir. Gliserol için ise çocuklarda bir limit verilmemişken, yetişkinlerde 1,5 mg/kg kullanım limiti verilmiştir (EMA, 2013). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) 414, 1-22 raporuna göre polietilen glikol (EFSA, 2006) günlük alım limitleri gıda takviyesi olarak 2 mg/kg seviyelerindedir. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinin ve Gıda Bileşenlerinin Üretiminde Kullanılan Ekstraksiyon Çözücülerine Tebliği (Tebliğ no: 2013/45) incelendiğinde hekzanın bulunduğu ancak tamamen uzaklaştırılması gerektiği görülmektedir. Ancak, Gıda Katkı Maddeleri Tebliğinde (Tebliğ no: 2013/49) polietilen glikol (E 1521) ve propilen glikolün (E1520) katkı maddesi olarak limitleri verilmiştir. Her ne kadar burada çözücü durumları yerine katkı maddesi limitleri verilmiş olsa da günlük tüketilebilir limitlerine de yorum yapılabilir. Bu tebliğde, E1520 için gıdalarda tüm kaynaklardan gelen E 1518 ve E 1520 için maksimum miktar 3000 mg/kg (kişinin toplamı) olarak bildirilmiştir. Yine propilen glikolün taşıyıcı olarak kullanılması durumunda son üründe en çok 1000 mg/kg olması gerektiği bildirilmiştir. Bütün bunlarla birlikte Türk Gıda Kodeksinde EFSA ve EMA'daki gibi bir limit belirlenmesi bulunmamakta, ivedi olarak hazırlanması gerekmektedir.

Süper kritik ekstraksiyonda yüksek akışkanlığı nedeniyle ve basınç kaldırılınca ortamdan uzaklaşma yeteneği ile CO_2 iyi bir çözücüdür. Bu yöntemle elde edilen propolis ekstraktlarının biyoaktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalar (Pessoaa v.d. 2019, Fachri v.d. 2019, Di Capua v.d. 2018, Machado v.d. 2015, Catchpole v.d. 2004) oldukça

yüksek aktivitede ve verimde ekstra elde edildiğini göstermiştir.

Bitkisel yağlar dielektrik sabitleri bakımından apolar özellikte çözücülerdir. Bu yönleri ile propolis ekstraksiyonunda apolar bölgedeki bileşenler için iyi bir çözücü özelliği göstermektedir. Bu anlamda zeytinyağının, kanola yağının, palm yağının, soya yağının, keten tohumu yağının ve bazı bitkisel yağların kullanıldığı ve değişik seviyelerde biyoaktivitenin tespit edildiği çalışmalar mevcuttur (Fingerv.d. 2013, Abdulrhmanv.d. 2012, Carvalho v.d.2011, Pujirahayu v.d. 2005, Biavatti v.d. 2003, Biavatti v.d. 2003, Lim v.d. 1994).

Yaygın olmamasına rağmen sirkenin içerisindeki asetik asitten kaynaklanan çözücü özelliğinden yola çıkarak değişik sirkelerin propoliste çözücü olarak kullanıldığı akademik olmayan çalışmalar ekstraksiyon çözücüsü olarak bu ürünün de kullanıldığını göstermektedir.

Analitik çalışmalarda sıkça rastlanılan dimetilsülfoksit (DMSO) ile propolis ekstraksiyonu (Al-Shaher v.d. 2004, Uğur ve Arslan 2004, Aso v.d. 2004, Amaros v.d. 1992) daha çok metod öncesi bir işlem olarak görülmektedir. DMSO en güçlü organik çözücülerden biri olarak uzun zamandır kullanılmaktadır. Suda çözünür olmayan birçok terapötik ajan DMSO'da çözünür. Ancak tüketimi durumunda DMSO'nun toksisitesi ile ilgili ciddi şüpheler vardır. Halen DMSO'nun onaylanmış veterinerlik uygulamaları sınırlıdır ve onaylanmış/onaylanmamış bu uygulamaları üzerindeki tartışmalar devam etmektedir (Brayton 1986). Mevcut bilimsel bulgular ışığında DMSO'nun tüketilebilir propolis ekstraktlarında kullanımının bu nedenlerle uygun olmadığı düşünülmektedir.

Hangi ekstrenin tercih edilmesi gerektiği konusunda dikkate alınması gereken bir diğer durum da ekstraktların biyoyararlanımlarının/emilimlerinin incelenmesidir. Bazen yüksek aktivitedeki ekstraktlarda vücudun kullanabildiği kısım çok düşük olabilmektedir.

Bütün bu genel bakışla birlikte propolisin halen araştırılmaya ihtiyaç duyulan yönleri, çözücülerin vereceği potansiyel etkiler göz önüne alınarak propolis ekstraktlarının 2 yaş altı çocuklarda hekim tavsiyesi olmadan kullanılmaması gerektiğini şiddetle ifade ediyoruz.

Hangi çözücü kullanılırsa kullanılsın gerek bilimsel literatürde gerekse bilimsel olmayan kaynaklarda son ekstre içerisindeki propolis konsantrasyonunun

verilmesinde iki yöntem kullanılmaktadır. Bilimsel olan birinci yöntemde son ekstrakt içerisinde çözünmüş madde miktarı (kuru madde olarak) çözücü ağırlığına/hacmine oranlanır ve konsantrasyon verilir. Çözünen ekstrakt miktarının belirlenmesinin analitik bir işlem ile (kuru madde tayini gibi) yapıldığı bu yöntem temel kimya bilimi açısından da kabul edilebilen yöntemdir. Bilimsel olmayan ikinci yöntemde ise çözücünün içine ilk başta atılan ham propolis miktarı çözücü miktarına oranlanır ve konsantrasyon verilir. Oysa bu çalışmada sıkça değinilen propolisin tam olarak çözülmemesi, mum/vaks oranlarının değişik olması, ekstraksiyon yöntemi, çözücü tipi, propolisin içeriği vb. çok parametre ile değişken olması nedeniyle ikinci konsantrasyon verme yöntemi bilimsellikten uzaktır. Propolis ekstraktlarında standardizasyon işleminde de bu husus dikkate alınmalıdır (Krell 1996).

SONUÇ

Bu çalışmada, dünyada tartışılan ekstraksiyon sıvılarından etanol, su, gliserol ve glikol kullanılarak elde edilen propolis ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri üç farklı metotla belirlendi. Bulgular etanolük ekstraktlar yanında gliserol ve glikolün de etil alkolsüz ekstraktlar için iyi bir tercih olabileceğini ortaya koymuştur. Bunun yanında çalışmada etkin bir şekilde tüketilebilmesi için propolislerde kullanılan çözücüler ve ekstraksiyon yöntemleri genel bir çerçevede bir arada incelenmiştir. Kullanılan çözücülerin değişik standartlarda kabul edilebilir tüketilme limitlerinin de tartışıldığı çalışmada propolis için klasik ekstraksiyon metotlarının yaygın kullanıldığı ve su, çoklu alkoller (bunlardan gliserol ve glikoller) ile etanolün en yaygın çözücüler olduğu ancak bunlar içerisinde su dışındakiler hakkında halen bazı tartışmaların devam ettiği anlaşılmıştır. Bilimsel çalışmaların her geçen gün hızlanarak devam ettiği bir süreçte yeni ekstraksiyon metodlarının, çözücü/çözücü birlikteliklerinin, kombine ekstraksiyon yöntemlerinin propolis ekstraksiyonuna katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Propolis hakkında son yıllarda yapılan yeni çalışmalarda yeni özellikleri ortaya çıkmaktadır. Buna rağmen, halen tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Bu nedenle, takviye edici bir gıda olarak kullanılan propolis ekstraktlarına bundan fazla bir anlam yüklemek, ilaç yerine koymak ya da ilaç tedavilerine alternatifmiş gibi sunmak da bilimsel

açıdan etik olmadığı gibi uygun öneriler değildir. Standartlarda günlük tüketim limitleri verilmesine rağmen, bilhassa belli hastalığı/rahatsızlığı olan bireylerde, ilaç tedavisi görenlerde, çocuklarda ve özel beslenme ihtiyacı duyan kişilerde mutlaka hekim önerisi/kontrolünde kullanılmalıdır.

Ticari propolislerde gerekli standardın oluşması ve etiketleri üzerinde kritik bilgilerinin mutlaka yer alması tüketicisi sağlığı ve gıda güvenliği açısından elzem bir durumdur. Propolis gibi oldukça değerli bir ürünün amacına uygun ve kontrollü tüketimi ile tıbbi ve ekonomik açıdan katma değer üretilmesi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdulrhman, M., Samir Elbarbary, N., Ahmed Amin, D., Saeid Ebrahim, R. 2012. Honey and a mixture of honey, beeswax, and olive oil–propolis extract in treatment of chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized controlled pilot study. *Pediatric hematology and oncology*, 29(3), 285-292, doi.org/10.3109/08880018.2012.669026.
- Al-Shaher, A., Wallace, J., Agarwal, S., Bretz, W., Baugh, D. 2004. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *Journal of endodontics*, 30(5), 359-361.
- Amoros, M., Sauvager, F., Girre, L., Cormier, M. 1992. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*, 23(3), 231-240, doi.org/10.1051/apido:19920306.
- Aso, K., Kanno, S., Tadano, T., Satoh, S., Ishikawa, M. 2004. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(5), 727-730, doi.org/10.1248/bpb.27.727.
- EFSA, 2006. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) 414, s: 1-22.
- Baduroğlu, E., Durak, D. 2010. Alkol ile ilgili adli tıp sorunları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 36(2), 65-71,
- Baltas, N., Yıldız, O., Kolaylı, S. 2016. Inhibition properties of propolis extracts to some clinically important enzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31 (sup1), 52-55, doi.org/10.3109/14756366.2016.1167049.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Bankova, V., Galabov, AS., Antonova, D., Vilhelmova, N., Di Perri, B. 2014a. Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine*, 21(11), 1432-1438.
- Bankova, V., Popova, M., Trusheva, B. 2014b. Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: A review. *Chemistry Central Journal*, 8, 24, doi:10.1186/1752-153X-8-28.
- Bankova, VS., de Castro, SL., Marcucci, MC. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15, doi.org/10.1051/apido:2000102.
- Banskota, AH., Tezuka, Y., Adnyana, IK., Ishii, E., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S. 2001. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, 8 (1), 16-23, doi.org/10.1078/0944-7113-00004.
- Banskota, AH., Tezuka, Y., Kadota, S. 2001 b. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy research*, 15(7), 561-571, doi.org/10.1002/ptr.1029.
- Benzie, IF., Strain, JJ. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid Concentration. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 15-27). Academic Press.
- Biavatti, MW., Bellaver, MH., Volpato, L., Costa, C., Bellaver, C. 2003. Preliminary studies of alternative feed additives for broilers: Alternanthera brasiliana extract, propolis extract and linseed oil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 5(2), 147-151.
- Brayton, CF. 1986. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *The Cornell Veterinarian*, 76(1), 61-90.
- Burdock, G A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical toxicology*, 36(4), 347-363.
- Can, Z., Yildiz, O., Şahin, H., Asadov, A., Kolaylı, S. 2015. Phenolic profile and antioxidant potential of propolis from Azerbaijan. *Mellifera*, 15(1), 16-28.
- Carvalho, AA., Finger, D., Machado, CS., Schmidt, EM., da Costa, PM., Alves, APNN., dos Santos, J. MT. 2011. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chemistry*, 126(3), 1239-1245.
- Catchpole, OJ., Grey, JB., Mitchell, KA., Lan, JS. 2004. Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture. *The Journal of supercritical fluids*, 29(1-2), 97-106.
- Cavaco, AM., Cruz, C., Ferreira, AL., Guia, MD., Antunes, MD., Miguel, MG. 2008. Pigments, protein and activity of antioxidant enzymes in propolis collected at various sites of Algarve. In R. Oria, J. Val, A. Ferrer (Eds.), *Avances en maduración y post-recolección de frutas y hortalizas* Acibia, S.A.: Zaragoza, pp. 286-293
- Chen, CT., Chien, YH., Yu, YH., Chen, YW. 2019. Extraction and Analysis of Taiwanese Green Propolis. JoVE; *Journal of Visualized Experiments*, (143), e58743. doi: 10.3791/58743.
- Cottica, SM., Sawaya, AC., Eberlin, MN., Franco, SL., Zeoula, LM., Visentainer, JV. 2011. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(5), 929-935.
- Cunha, A., Alves, H., Araújo, C., Barroso, L., Cruz, M., Freitas, AS., Passão, C., Peixoto, M., Pereira, H., Silva-Carvalho, R., Valença, I., Ferreira, AM., Baltazar, F., Pinto-Ribeiro, F., Cardoso, S., Oliveira, R., Almeida-Aguiar, C. 2018. Portuguese Propolis: A Source of Valuable Bioactivities. *Journal of Apitherapy and Nature* (Apiterapi ve Doğa Dergisi), 1(3), 27.
- Dalben-Dota, KF., Faria, MG., Bruschi, ML., Pelloso, SM., Lopes-Consolaro, ME., Svidzinski, TI. 2010. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 16(3), 285-290.
- Debuyser, E. 1984. La propolis. These pour diplôme de docteur en Pharmacie. Fac. Pharmacie, Univ. Nantes, France, 34 pp.
- Denney, RC. 2000. Body Fluids. In: Siegel JA, Saukko PJ, Knupfer GC. *Encyclopedia of Forensic Sciences*. UK: Harcourt Publishers Ltd, 80-6.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Di Capua, A., Bejarano, A., Adami, R., Reverchon, E. 2018. Preparation and characterization of Chilean propolis coprecipitates using Supercritical Assisted Atomization. *Chemical Engineering Research and Design*, 136, 776-785.
- Doğanyığıt, Z. 2013. Propolis ve karaciğere koruyucu etkisi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 13(2), 70-78.
- EMA, 2009. (European Medical Agency), 2009. Reflection paper: formulations of choice for the pediatric population (EMA/CHMP/PEG/194810/2005). Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003782.pdf
- EMA, 2013. (European Medical Agency), 2013. Reflection paper: formulations of choice for the pediatric population (EMA/CHMP/704195/2013). Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-propylene-glycol-used-excipient-medicinal-products-human-use_en.pdf
- Fachri, BA., Sari, P., Yuwanti, S., Subroto, E. 2019. Experimental Study and Modeling on Supercritical CO₂ Extraction of Indonesian Raw Propolis using Response Surface Method: Influence of Pressure, Temperature and CO₂ Mass Flowrate on Extraction Yield. *Chemical Engineering Research and Design*.
- Finger, D., Machado, CS., Torres, YR., Quináia, SP., Thomaz, ACG., Gobbo, AR., Eberlin, MN. 2013. Antifungal Bioassay Guided Fractionation of an Oil Extract of Propolis. *Journal of Food Quality*, 36(5), 291-301.
- Freires, IA., de Alencar, SM., Rosalen, PL. 2016. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 110, 267-279.
- Fukumoto LR., Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 48: 3597-3604.
- Havsteen, BH. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol. Ther.* 96, 67–202.
- Herrera, CL., Alvear, M., Barrientos, L., Montenegro, G., Salazar, LA. 2010. The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida* spp., *Cien. Inv. Agr.* 37(1):75-84.
- Hikmet, K., Nazime, M. 2006. Turkish propolis from different regions. *Afr. J. Biotechnol.* 5 (2006) 1151–1153.
- Hunsaker, DM., Hunsaker, JC. 2004. Postmortem alcohol interpretation. In *Forensic Pathology Reviews* (pp. 307-338). Humana Press, Totowa, NJ.
- Juliano, C., Pala, CL., Cossu, M. 2007. Preparation and characterisation of polymeric films containing propolis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 17(3), 177-182.
- Kanbur, M., Eraslan, G., Silici, S. 2009. Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3), 909-915.
- Kartal, M., Yıldız, S., Kaya, S., Kurucu, S., Topçu, G. 2003. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(1), 69-73.
- Keskin, M., Kolaylı, S. 2019. Ticari Propolis Ekstraktlarının Kalite Parametreleri Açısından Karşılaştırılması. *Uludağ Bee Journal*, 19(1): 43-49.
- Kolayli, S., Ebru Cakir, H., Sahin, H. 2016. Anti-Inflammatory Activities of Some Bee Products by Inhibition of Bovine Testes Hyaluronidase. *Current Enzyme Inhibition*, 12(2), 183-187.
- Krell, R. 1996. Value-Added Products From Beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124 Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- Kugelberg, FC., Jones, AW. 2007. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature. *Forensic science international*, 165(1), 10-29.
- Lim, DK., Choi, U., Shin, DH., Jeong, YS. 1994. Antioxidative effect of propolis extract on palm oil and lard. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 26(5), 622-626.
- Line, HCCC. 2018. In vitro Assessments of Cytotoxic and Cytostatic Effects of Propolis in Cells from the Human Colon Carcinoma Cell Line (HCT 116). *Journal of Apitherapy and Nature/Apiterapi ve Doğa Dergisi*, 1(3), 51-51.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Logan, BK., Distefano, S. 1998. Ethanol content of various foods and soft drinks and their potential for interference with a breath-alcohol test. *Journal of Analytical Toxicology*, 22(3), 181-183.
- Machado, BAS., de Abreu Barreto, G., Costa, AS., Costa, SS., Silva, RPD., da Silva, DF., Padilha, FF. 2015. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. *PLoS One*, 10(8), e0134489.
- Marcucci, MC., Ferreres, F., Custodio, AR., Ferreira, MMC., Bankova, VS., Garcia-Viguera, C., Bretz, WA. 2000. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions, *Z. Naturforsch. C*, 55, 76–81.
- Marcucci, MC., Sawaya, ACHF., Custodio, AR., Paulino, N., Eberlin, MN., 2008. In Scientific Evidence of the Use of Propolis in Ethnomedicine, Orsolic, N.; Basic, I. eds., *Transworld Res Network: Kerala, India*, pp. 33-54.
- Medić-Šarić, M., Rastija, V., Bojić, M., Maleš, Ž. 2009. From functional food to medicinal product: Systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. *Nutrition Journal*, 8, 33, doi:10.1186/1475-2891-8-33.
- Miljković-Opsenica, D., Ristivojević, P., Trifković, J., Vovk, I., Lušić, D., Tešić, Z. 2016. TLC Fingerprinting and pattern recognition methods in the assessment of authenticity of poplar-type propolis. *Journal of Chromatographic Science*, 54(7), 1077–1083.
- Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H., Fujimoto, T., Matsuka, M., Satoh, T. (1997). Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 20(5), 496-501.
- Modell JG, Taylor JP, Lee JY., 1993. Breath alcohol values following mouthwash use. *JAMA*. Dec 22-29; 270(24):2955-6
- Moş, AC., Soponar, F., Sârbu, C. 2010. Multivariate analysis of reflectance spectra from propolis: geographical variation in Romanian samples. *Talanta*, 81(3), 1010-1015.
- Mukerjee, P., Ramachandran, C., Pyter, RA. 1982. Solvent effects on the visible spectra of nitroxides and relation to nitrogen hyperfine splitting constants. Nonempirical polarity scales for aprotic and hydroxylic solvents. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(16), 3189-3197.
- Oliveira, ACP., Shinobu, CS., Longhini, R., Franco, SL., Svidzinski, TIE. 2006. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(5), 493-497.
- Oliveira, AP., França, HS., Kuster, RM., Teixeira, LA., Rocha, LM. 2010. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16(1), 121-130.
- Özcan, M., Ceylan, DA., Ünver, A., Yetişir, R. 2003. Türkiye'nin Çeşitli Bölgelerinden Sağlanan Polen ve Propolis Ekstraktlarının Antifungal Etkisi. *Uludağ Bee Journal*, 27.
- Pessoaa, BA., de Souzaa, LABS., Machadoa, JJIHD., de Oliveira Fernando Reisb, LP. 2019. Extraction of propolis using supercritical carbon dioxide. *Green Sustainable Processes for Chemical and Environmental Engineering and Science: Supercritical Carbon Dioxide As Green Solvent*, 169.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., Gniewosz, M. 2019. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality—A review. *Trends in food science & technology*, 83, 53-62.
- Pujirahayu, N., Ritonga, H., Uslinawaty, Z. 2015. Antibacterial activity of oil extract of trigona propolis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 419-422.
- Ramanauskienė, K., Inkėnienė, AM., Petrikaitė, V., Briedis, V. 2013. Total phenolic content and antimicrobial activity of different lithuanian propolis solutions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Resmi gazete, 2017. Etil Alkol ve Metanolün Üretimi ile İç ve Dış Ticaretime İlişkin Usul ve Esaslar Hakkında Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik (RG 30.12.2017 - 30286)
- Sahin, H., Aliyazicioglu, R., Yildiz, O., Kolayli, S., Innocenti, A., Supuran, C. T. 2011. Honey, polen, and propolis extracts show potent inhibitory activity against the zinc

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- metalloenzyme carbonic anhydrase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 26(3), 440-444.
- Saral, Ö., Kilicarslan, M., Şahin, H., Yildiz, O., Dincer, B. 2019. Evaluation of antioxidant activity of bee products of different bee races in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 43(4), 441-447, doi:10.3906/vet-1901-3.
- Saral, Ö., Yildiz, O., Aliyazicioğlu, R., Yuluğ, E., Canpolat, S., Öztürk, F., Kolaylı, S. 2016. Apitherapy products enhance the recovery of CCL4-induced hepatic damages in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46(1), 194-202, doi:10.3906/sag-1411-35.
- Sforcin, JM. 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1-14, doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012.
- Silici, S., Kutluca, S. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 69-73.
- Silici, S., Ünlü, M., Vardar-Ünlü, G. 2007. Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(12), 1797-1803.
- Slinkard, K., Singleton, VL. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V. 2007. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1(1), 13.
- Turkut, G. M., Mehtap, E. R., Degirmenci, A. 2019. Evaluating Bioactivity and Bioaccessibility Properties of Turkish Propolis Extracts Prepared with Various Solvents. *Apiterapi ve Doğa Dergisi*, 2(1), 7-11, doi.org/10.35206/jan.577616.
- Türk Gıda Kodeksi, Gıda Maddelerinin ve Gıda Bileşenlerinin Üretiminde Kullanılan Ekstraksiyon Çözücülerini Tebliği (Tebliğ No: 2013/45).
- Türk Gıda Kodeksi, Takviye Edici Gıdalar Tebliği (Tebliğ No: 2013/49).
- Ugur, A., Arslan, T. 2004. An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Journal of Medicinal Food*, 7(1), 90-94.
- Wagh, V D. 2013. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013, 308249, doi:10.1155/2013/308249.
- Watson, DG., De Koning, H., Ebloma, G., Igoli, J., Siheri, W., Alenzi, N., Harnett, SAW. 2018. The Immune Modulatory and Anti-protozoal Effects of Different Propolis Samples. *Journal of Apitherapy and Nature/Apiterapi ve Doğa Dergisi*, 1(3), 7-7.
- Widelski, J., Golus, J., Okręnczyk, P., Sawicki, R., Ginalska, G., Mroczek, T., Skalska-Woźniak, K. 2018. Antituberculosis Activity of Propolis. *Apiterapi ve Doğa Dergisi*, 1(3), 77-77.
- Yildiz, O., Kolaylı, S. 2015. Ham Propolisden Biyoaktif Potansiyeli Yüksek Sulu Propolis Ekstraktı Hazırlama Yöntemi", Türkiye, Patent, 2015/04984, Mayıs 2019.
- Yildiz O., Can Z., Hotaman HE., Kolaylı S. 2014. Farklı Çözücülerle Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Biyoyararlılıkları, 4. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi eşzamanlı olarak 20. Apisilavia Kongresi, Muğla, Türkiye

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

FARKLI ÇİÇEK BALLARININ ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Determination of Antimicrobial Activities of Different Flower Honeys

Ayca CİNAR

Bursa Teknik Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa, TÜRKİYE, E-mail: Ayca.cinar@btu.edu.tr, ORCID NO: <https://orcid.org/0000-0003-2038-725X>

Geliş Tarihi / Received: 01.02.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 15.03.2020

DOI: 10.31467/uluaricilik.687207

ÖZ

Bal, besleyici özelliği yüksek, biyoaktif bileşence zengin fonksiyonel bir gıdadır. Balın biyolojik aktivitesinin botanik orijin, coğrafya ve iklim özelliklerine göre farklılık göstermesi, ülkemizde üretilen monofloral ve multifloral balların kapsamlı olarak ele alınmasını gerekli kılmaktadır. Doğal koruyucuların sentetik ürünlerle yer değiştirme anlayışının benimsenmesi, balın alternatif kullanım olanaklarının araştırılmasını sağlamaktadır. Bu amaçla, çalışmamızda lavanta, limon çiçeği, kekik ve multifloral balların antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiş ve antimikrobiyal etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, genel olarak multifloral balın monofloral ballardan daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, monofloral ballardan limon çiçeği balının test edilen mikroorganizmalara karşı güçlü inhibisyon gösterdiği, kekik balının ise en zayıf antibakteriyel etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Tüm bal çeşitlerinde antimikrobiyal aktivitenin (*Bacillus cereus* DSM 4312 hariç) sırasıyla bakteri > maya > küf olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, istatistiksel olarak en dirençli bakterinin *B. cereus* DSM 4312, en duyarlı bakterilerin ise *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032 olduğunu söylemek mümkündür.

Anahtar kelimeler: Bal, Antibakteriyel Aktivite, Antifungal Aktivite, Monofloral, Multifloral

ABSTRACT

Honey is highly nutritious, and a functional food rich in bioactive components. The biological activity of honey differs according to its botanical origin, geographic properties, and climate characteristics. Therefore, it is necessary to handle the monofloral and multifloral honey produced in our country in a comprehensive manner. Adopting the understanding of displacement of natural preservatives with synthetic ones enables the exploration of alternative uses of honey. For this purpose, in our study, the antimicrobial activity of lavender, lemon, thyme and multifloral honey were determined and compared with each other. According to the results obtained, it was found that multifloral honey has higher antimicrobial activity than monofloral honey, but lemon honey which is one of the monofloral honey types, shows strong inhibition against microorganisms tested, and thyme honey had the weakest antibacterial effect. Antimicrobial activity (except for *Bacillus cereus* DSM 4312) was found to be strongest against bacterial then yeast and then mold in all honey varieties. In addition, we found that the most resistant bacteria statistically was *B. cereus* DSM 4312, while the most sensitive bacteria was *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032.

Keywords: Honey, Antibacterial Activity, Antifungal Activity, Monofloral, Multifloral

EXTENDED ABSTRACT

Purpose: Our country is one of the leading countries in the production of monofloral honey due to its rich plant diversity. In recent years, monofloral honey production has gained importance for reasons such as the change in nutritional awareness of consumers, interest in natural products, and the increasing popularity of alternative medicine in addition to modern medicine. Particularly, in the struggle against antibiotic resistant microorganisms, the search for natural products as an alternative to synthetic drugs is more likely to be adopted. The fact that honey is the most used natural product in traditional medicine, since ancient times, has led to the scientific examination of the biological activities of different types of honey. In this study, it was aimed to investigate the antibacterial and antifungal effects of lavender, lemon, thyme and multifloral flower honey, which are widely produced in our country.

Material and Method: The Agar Well Diffusion Method and Liquid Microdilution Method were used to determine antimicrobial activity. In the study, three Gram negative (*Acinetobacter baumannii* AYE, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032) and three Gram positive (*Bacillus cereus* DSM 4312, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) bacteria were used. To study the antifungal effects, *Candida albicans* ATCC 10351 and *Schizosaccharomyces pombe* were used as a test for yeast, while *Alternaria alternata* and *Penicillium italicum* were included as a test for molds.

Results: In the study, it was determined that multifloral flower honey generally showed the highest antimicrobial activity on the test microorganisms (except *A. baumannii* AYE, *B. cereus* DSM 4312, and *K. pneumoniae* ATCC 700603). Lemon honey has statistically the highest antimicrobial effect against nine of the ten test microorganisms (except *A. baumannii* AYE) compared to the other monofloral honeys which are lavender and thyme honey ($P < 0.05$). On the other hand, when the antibacterial effect was evaluated, thyme honey showed the weakest effect compared to the other honey types ($P < 0.05$). The current study reveals that the antibacterial activity does not depend on the gram properties of bacteria. We found that 10 - 60% (v / v) concentrations of honey solutions are sufficient to inhibit all bacteria, while this same effect is only achieved at higher

concentrations [20 - 90% (v/v)] for yeasts and molds. In addition, the inhibition zone diameters and Minimum Inhibition Concentration (MIC), Minimum Bacteriasidal / Fungisidal Concentration (MBC/MFKC) values are consistent with each other.

Conclusion: Honey is an important beehive product due to its biological properties with many functions. In this study, the antimicrobial activity of monofloral honey with different botanic origin (lavender, lemon flower, thyme) and multifloral honey were evaluated. The present work displayed the potent efficacy of different honey types against different target microorganisms. Considering the impressive results we obtained, the antimicrobial activity of honey produced in Turkey may prove to be an attractive attribute that will gain commercial prestige on a global trade level.

GİRİŞ

Bal; arılar tarafından polen ve bitki salgıları kullanılarak üretilen, besleyici özelliği yüksek bir gıdadır. Elde edilen bitkilerin çeşitliliğine bağlı olarak değişmekle birlikte, balda 200'ün üzerinde bileşiğin yer aldığı bilinmektedir. Temel bileşen olarak kurumaddenin 95'ini şekerler oluştururken, geri kalan kısmını proteinler, serbest amino asitler, fenolik bileşikler, vitaminler, mineraller ve organik asitler oluşturmaktadır. Minör bileşenlerin miktar ve çeşitliliğinin aynı zamanda arı türüne, mevsimsel ve çevresel faktörlere göre de değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir (Bogdanov v.d. 2004, Mahmoodi-Khaledi v.d. 2017, Samarghandian v.d. 2017, Leyva-Jimenez v.d. 2018, Ramsay v.d. 2019). Bal, sahip olduğu besleyici değerinin yanı sıra antik çağlardan bu yana birçok kültürde tedavi amaçlı kullanılmıştır. Özellikle son yıllarda sentetik ilaçların yan etkilerinin getirdiği olumsuzluklar nedeniyle, doğal ürünlere olan yöneliş artış göstermiştir. Halk arasında öksürük, soğuk algınlığı, bronşit, yanıklarda ve yaraların tedavisinde balın yaygın olarak kullanıldığı ve alternatif tıpta da bu amaçla yararlanıldığı bilinmektedir. Bu yönüyle, kullanımı nesilden nesile aktarılan en önemli doğal ürünlerden biridir (Subrahmanyam 1998, Molan ve Betts 2004, Young 2005, Cohen v.d. 2012, Eteraf-Oskouei ve Najafi 2013, Onbaşlı v.d. 2019).

Yapılan bilimsel çalışmalar, insan sağlığı açısından önemi olan antioksidan, antidiyabetik, antimikrobiyal, antienflamatuar, antiproliferatif, antikanser ve antimetastatik etkilerin balın sahip

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

olduğu çok sayıda biyoaktif bileşenler sayesinde gösterdiğini bildirmiştir (Gheldof v.d. 2003, Pérez v.d. 2007, Jaganathan ve Mandal 2009, Fauzi v.d. 2011, Pimentel v.d. 2013, Borsato v.d. 2014, Erejuwa v.d. 2014, Kustiawan v.d. 2014, Rao v.d. 2016, Aziz v.d. 2017, Saranraj ve Sivasakthi 2018, Ávila v.d. 2019, Nolan v.d. 2019). Belirtilen biyolojik özelliklerinden antimikrobiyal aktivitesinin, hidrojen peroksit, ozmolarite, asitlik, aromatik asitler ve fenolik bileşiklerden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Molan 1992, Anand v.d. 2019).

Antibakteriyel etkinin incelendiği çalışmalarda balın, aerobik/anerobik özellik gösteren, Gram negatif ve Gram pozitif yaklaşık 60 bakteri türü üzerinde engelleyici etki gösterdiği bildirilmiştir (Asadi-Pooya v.d. 2003, Bansal v.d. 2005). Bildirilen bakteri türleri arasında antibiyotiğe dirençli suşlar üzerinde geniş spektrumlu aktivite gösterdiği, özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerinde balın bakterisidal etkisi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca biyofilm oluşturan *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın klinik suşları üzerinde de etkili olduğu bildirilmiştir (Alandejani v.d. 2009, Wang v.d. 2012). Bununla birlikte birçok *Candida* spp., *Trichosporon* spp. ve küf türüne (*Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus*) karşı antifungal aktiviteye de sahip olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Koç v.d. 2009, El-Gendy 2010, Feás ve Estevinho 2011, Candiracci v.d. 2012, Zafar ve İsraili 2014).

Ballar, elde edildikleri bitki kaynağı ve bunun çeşitliliğine, bulundukları coğrafya ve üretim şekillerine göre isimlendirilmektedir. Genel olarak nektarın elde ediliş şekline göre çiçek ve salgı balı olmak üzere ikiye ayrılmakta, çiçek balları ise içerdikleri floral kaynaklara göre monofloral ve multifloral olarak adlandırılmaktadır. Monofloral ballar; farklı tatlılara sahip olmaları, sağladıkları biyolojik yararlar sebebiyle günümüz tüketicileri tarafından tercih edilmektedir. Antimikrobiyal aktivite ve diğer biyolojik yararların atfedildiği aromatik ve fenolik bileşikler gibi minör bileşenlerin floral kaynağa göre değişiklik göstermesi nedeniyle çeşitli kullanım amaçları için farklı monofloral ballar bulunmaktadır (Alvarez-Suarez v.d. 2010).

Ülkemiz, sahip olduğu uygun ekoloji, zengin bitki örtüsü ve faunistik çeşitliliği sebebiyle farklı çeşit monofloral balların üretimi için son derece elverişlidir. Bunlar arasından kekik, lavanta ve narenciye cinsi ballar, geçmişten günümüze kadar

üretimi giderek yaygınlaşan ballar arasındadır. Akdeniz ülkelerinde 70 farklı kekik türünün bulunduğu ve bu türlerin 38'inin Türkiye'de yetiştiği ifade edilmiştir (Seçmen v.d. 2000). Kekiğin bileşiminde yer alan polifenoller ve uçucu bileşikler (timol, karvakrol, borneol, simol, pinen, tanen ve flavonlar) sebebiyle güçlü antioksidan ve antimikrobiyal özellik gösterdiği belirtilmiştir (Özkök v.d. 2016).

Kekik ve lavanta aynı botanik aileden gelen, benzer karakteristiklere sahip, akdeniz bitki örtüsünde yaygın olarak görülen bitki türleridir. Bu bitkilerden elde edilen monofloral ballar üzerinde yapılan çalışmalarda, her iki balın da antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Anthimidou v.d. 2013, Estevinho v.d. 2011, Kacaniova v.d. 2010, Wilkinson ve Cavanagh 2005). Limon çiçeği balı, narenciye ballarına genel anlamda benzemekle birlikte, uçucu bileşenleri ve fizikokimyasal özellikleri ile bu ballardan ayrılmaktadır. Diğer narenciye ballarında olduğu gibi antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Kadar v.d. 2011).

Bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde, multifloral ve monofloral balların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde genellikle inhibisyon zonu ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) belirleme üzerine durulmuştur. Bu çalışma ile, Türkiye'de yaygın olarak üretildiği bilinen lavanta, limon çiçeği, kekik gibi monofloral ballar ile multifloral balın antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde inhibisyon zonu ve MİK değerinin yanı sıra, balların mikroorganizmaları öldürücü etki gösterdiği Minimum Bakterisidal/Fungisidal Konsantrasyonları (MBK/ MFK) da belirlenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bal Örneklerinin Temini ve Denemeye Hazırlanması

Bu çalışmada, dört farklı çiçek balı (lavanta, limon çiçeği, kekik ve multifloral) kullanılmıştır. Lavanta balı Isparta, limon çiçeği balı Mersin, kekik balı Muğla ve multifloral çiçek balı Bursa'nın deneyimli arıcılarından temin edilmiştir. Bal örnekleri analiz başlangıcına kadar karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Test Mikroorganizmaları ve İnokulumların Hazırlanması

Balların antimikrobiyal özellikleri Tablo 1’de verilen bakteri, maya ve küfler üzerinde test edilmiştir. Bakteriler (Mueller Hinton Broth) ve mayalar (Sabouraud Dekstroz Broth) sırasıyla 37°C ve 25°C’de 24 saatlik inkübasyon sonrasında, uygun besiyeri ile 0.5 McFarland bulanıklığına

ayarlanmıştır (CLSI M07-A10 2015, NCCLS M27-A2 2002).

Küfler, Sabouraud Dekstroz Agarda (SDA) 25°C’de 3-5 gün süre ile inkübe edilmiştir. Oluşan küf sporlarının yüzeyden toplanması amacıyla; steril %0,1’lik Tween 80 çözeltisi kullanılmıştır. Petri yüzeyi yıkanarak sporlar steril tüpe aktarılmış ve spor süspansiyonu 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmıştır (EUCAST 2015).

Tablo 1. Antimikrobiyal aktivite belirlemede kullanılan test mikroorganizmaları.

Table 1. Test microorganisms used for antimicrobial activity.

Bakteri	Maya	Küf
<i>Acinetobacter baumannii</i> AYE	<i>Candida albicans</i> ATCC 10351	<i>Alternaria alternata</i> *
<i>Bacillus cereus</i> DSM 4312	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> *	<i>Penicillium italicum</i> *
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 35032		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		

* Gıda orijinli

Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi

Ayarlanan 100 µL inokulum; bakteriler için Mueller Hinton Agara (MHA), mayalar ve küfler için SDA besiyeri yüzeyine aktarılmış ve drigalski spatülü ile yayılmıştır. Çapı 5 mm olan bir uç ile steril olarak açılan kuyucuklara, %70’lik (v/v) bal örneğinden 50 µL ilave edilmiştir (Magaldi v.d. 2004, Valgas v.d. 2007). Bakteriler 37°C’de 24 saat, mayalar 25°C’de 48 saat ve küfler 25°C’de 3 ila 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan inhibisyon zon çapları (mm) ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak steril su kullanılmıştır.

Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Her bir bal örneği steril su ile %10-90 (v/v) aralığında dokuz farklı doza ayarlanmış ve 180 µL örnek mikro plakaya aktarılmıştır. 0,5 McFarland bulanıklık standardında hazırlanan inokulumlar 1:20 oranında seyreltilerek, 20 µL inokulum mikro plakaya eklenmiştir (Balouri v.d. 2016, Wiegand v.d. 2008). Bakteriler 37°C’de 18-24 saat, maya ve küfler 46-72 saat inkübasyona bırakılmış, mikro plak okuyucu ile 600 nm de mikroorganizma yoğunluğu ölçülmüştür (BioTek Instruments, Inc. EPOCH SN 15062915).

İstatistiksel Analizler

Zon çapları ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Elde edilen zon çapları istatistiksel olarak IBM SPSS versiyon 22.0 istatistik programı ile

kıyaslanmıştır. Öncelikle verilerin normal dağılıma uyup uymadığı test edilmiş (Shapiro-Wilk Testi), ardından normal dağılıma uyan verilerde istatistiksel farklılık parametrik bir test olan Tek Yönlü – ANOVA analizi ile Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanarak belirlenmiştir. Normal dağılıma uymayan verilerde Kruskal Wallis H testi ve gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesinde Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Bal örneklerinin bakteri, maya ve küfler üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları Tablo 2’de verilmiştir. Buna göre, seçilen mikroorganizmalar üzerinde tüm bal örneklerinin antibakteriyel ve antifungal aktivite sergilediği ve kullanılan her iki yöneme ait sonuçların birbiriyle tutarlı olduğu görülmüştür. Bal çeşitlerinin farklı mikroorganizmalar üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak farklı olduğu belirlenmiştir (P <0,05).

Çalışmada yer alan çiçek ballarından multifloral bal örneğinin, *P. aeruginosa* ATCC 35032, *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşları üzerine en yüksek zon çapı göstermesi ile en etkili bal olduğu, benzer şekilde küf ve mayalar üzerinde de antifungal etkinin istatistiksel olarak en yüksek olduğu belirlenmiştir (P <0,05).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Bunu takiben, diğer monofloral ballardan limon çiçeği balının *A. baumannii* AYE haricindeki diğer tüm test mikroorganizmalarında en yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Multifloral bal örneği *P. aeruginosa* ATCC 35032 üzerinde en yüksek inhibisyon zonunu oluştururken, monofloral ballardan kekik balı *A. baumannii* AYE, limon çiçeği balı *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve lavanta balı ise *B. cereus* DSM 4312 üzerinde en yüksek inhibisyon zonunu oluşturmuştur (Tablo 2).

Kekik balı *K. pneumoniae* ATCC 700603, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *P. aeruginosa* ATCC 35032, *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans* ATCC 10351, *S. pombe* mikroorganizmaları için diğer ballara kıyasla en düşük antimikrobiyal etkiye sahiptir. Benzer şekilde, lavanta balının *A. baumannii* AYE üzerindeki antibakteriyel etkisi en

düşüktür. Antifungal etkinliği en düşük balın mayalar için kekik, küfler için ise lavanta balı olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

Ballar arasındaki antibakteriyel özelliğin bakterilerin gram özellikleri arasında belirgin bir farklılığa neden olmadığı belirlenmiştir ($P < 0,05$). Gram pozitif bakteriler arasında *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. monocytogenes* ATCC7644 üzerinde multifloral bal en iyi antibakteriyel etkiyi gösterirken, bir diğer gram pozitif bakteri olan *B. cereus* DSM 4312 üzerine multifloral bal en az etkiyi göstermiştir. Buna paralel olarak, çalışmada yer alan gram negatif bakteriler üzerinde de kekik balı *A. baumannii* AYE üzerinde güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahipken, *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve *P. aeruginosa* ATCC 35032 üzerinde en küçük inhibisyon zonu oluşturmuştur.

Tablo 2. Balların test mikroorganizmaları üzerindeki inhibisyon zon çapı (mm).

Table 2. Inhibition zone diameter of honey samples on test microorganisms (mm)

	Mikroorganizmalar	Lavanta	Limon Çiçeği	Kekik	Multifloral
Bakteri	<i>A. baumannii</i> AYE*	12,0±0,28 ^{dEF}	12,8±0,55 ^{cE}	19,9±0,74 ^{aA}	18,5±0,32 ^{bD}
	<i>B. cereus</i> DSM 4312	12,03±0,50 ^{aE}	10,9±0,57 ^{bcF}	11,6±0,45 ^{abD}	10,4±0,65 ^{cG}
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	18,4±0,36 ^{cC}	25,0±0,43 ^{aA}	13,5±0,33 ^{dC}	20,4±0,57 ^{bC}
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC7644*	15,6±0,73 ^{bD}	16,7±0,39 ^{abD}	12,2±0,33 ^{cD}	17,3±0,40 ^{aE}
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 35032*	21,7±0,61 ^{cA}	24,1±0,27 ^{bB}	13,0±0,60 ^{dC}	25,6±0,42 ^{aA}
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	19,5±0,21 ^{cB}	20,6±0,17 ^{bC}	18,5±0,42 ^{dB}	21,5±0,29 ^{aB}
	<i>C. albicans</i> ATCC 10351	7,9±0,16 ^{cG}	8,4±0,36 ^{bG}	7,3±0,22 ^{dF}	9,7±0,34 ^{aH}
Maya	<i>S. pombe</i> *	11,7±0,29 ^{abF}	11,3±0,48 ^{bF}	9,2±0,39 ^{cE}	12,5±0,53 ^{aF}
	<i>A. alternata</i> *	6,0±0,12 ^{cl}	6,3±0,18 ^{bl}	6,2±0,22 ^{bcH}	8,3±0,29 ^{al}
Küf	<i>P. italicum</i> *	6,6±0,34 ^{ch}	6,9±0,47 ^{bH}	6,7±0,18 ^{bcG}	9,9±0,24 ^{aGH}

Satırlardaki farklı harfler (abc) bal çeşitleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları temsil etmektedir ($P < 0,05$).

Sütünlardaki farklı harfler (ABC) mikroorganizmalar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları temsil etmektedir ($P < 0,05$).

* Parametrik olmayan istatistiksel analizler uygulanmıştır.

Farklı 4 çeşit balın en yüksek inhibisyon zon çapı oluşturduğu mikroorganizmalar, istatistiksel olarak birbirleri içinde kıyaslandığında (Lavanta – *P. aeruginosa* ATCC 35032, Limon – *K. pneumoniae* ATCC 700603, Kekik- *A. baumannii* AYE, Multifloral- *P. aeruginosa* ATCC 35032); *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve *P. aeruginosa* ATCC 35032'nin en duyarlı mikroorganizmalar olduğu tespit edilmiştir. En

dirençli bakteri suşunun ise *B. cereus* DSM 4312 olduğu görülmüştür ($P < 0,05$).

Bu çalışmada kullanılan ballardan multifloral bal haricinde, antimikrobiyal etkinin sırasıyla bakteri> maya>küf olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Bu yönüyle monofloral balların antibakteriyel aktivitesinin, antifungal özelliğine göre daha yüksek olduğu söylenebilir. Limon çiçeği balının, bakteriler arasından *K. pneumoniae* ATCC 700603 (25,0±0,43

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

mm), mayalardan *S. pombe* (11,3±0.48 mm) ve test küfleri arasından *P. italicum* (6,9±0.47 mm) üzerinde en iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bal örneklerinin *S. pombe* üzerindeki antifungal

aktivitesi *C.albicans*'a kıyasla fazla olduğu, küfler üzerinde de *P. italicum*'un diğer küf suşuna göre daha duyarlı olduğu söylenebilir (P <0,05).

Tablo 3. Balların MİK ve MBK/MFK değerleri (% v/v).

Table 3. MIC, MBC and MFC of honey samples (% v/v).

Mikroorganizmalar		MİK				MBK /MFK			
		La	Li	Ke	Mf	La	Li	Ke	Mf
Bakteri	<i>A. baumannii</i> AYE	30	30	10	20	40	30	10	20
	<i>B.cereus</i> DSM 4312	40	50	40	60	40	60	50	60
	<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	20	10	30	10	30	10	40	20
	<i>L.monocytogenes</i> ATCC7644	30	20	40	20	30	30	50	20
	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 35032	20	10	30	10	20	20	40	10
	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	20	10	30	10	20	20	40	10
Maya	<i>C.albicans</i> ATCC 10351	50	40	60	40	50	50	60	40
	<i>S.pombe</i>	30	40	40	20	40	40	50	30
Küf	<i>A.alternata</i>	90	80	90	80	90	90	90	80
	<i>P italicum</i>	80	70	80	70	80	80	90	70

La: Lavanta, Li: Limon çiçeği, Ke: Kekik, Mf: Multifloral

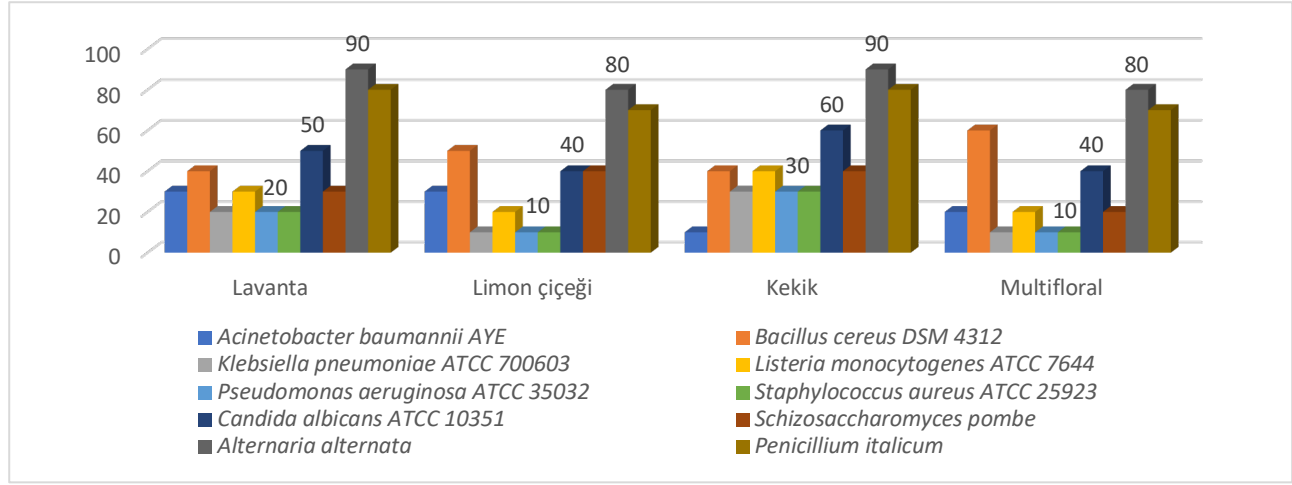
Ballara ait MİK, MBK ve MFK değerleri Tablo 3'te verilmiştir. Bal örneklerinin %10-60 (v/v) konsantrasyonlarının tüm bakterileri inhibe etmede yeterli olduğu görülmüştür. Maya ve küfler üzerinde, bu etkinin daha yüksek olan %20-90 (v/v) bal konsantrasyonlarında sağlanabildiği tespit edilmiştir (Şekil 1).

Bakterilerden *A. baumannii* AYE ve *B. cereus* DSM 4312, mayalardan ise *S. pombe* haricindeki diğer test mikroorganizmalarında limon çiçeği ve multifloral balları eşit ve en düşük MİK değerlerine sahiptir. İnhibisyon zon çapı en yüksek olan *A. baumannii* AYE en düşük MİK değeri ile (%10 v/v) kekik balına en duyarlı bakteri olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile benzerlik gösterdiğini vurgulamaktadır. Buna ilaveten, kekik balının genel olarak yüksek MİK değeri göstererek düşük antimikrobiyal aktiviteye

sahip olduğu söylenebilir. Yapılan sıvı mikrodilüsyon analiz sonuçlarına göre MİK değerleri küf > maya > bakteri olarak sıralanmış olup, küflerin en dirençli mikroorganizma grubu olduğu görülmektedir. Bu sonuç, agar kuyucuk difüzyon yöntemini destekler niteliktedir.

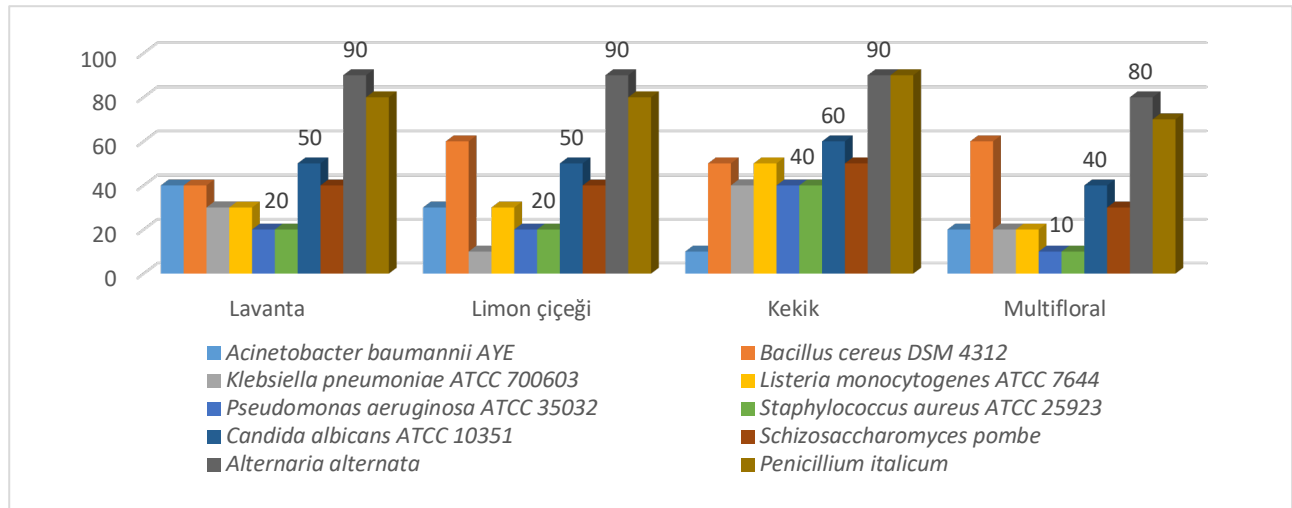
Multifloral balın, çalışmada yer alan *A. baumannii* AYE, *B.cereus* DSM 4312 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 hariç diğer tüm mikroorganizmaları en düşük MBK/MFK değeri ile tamamen öldürdüğü belirlenmiştir. Bu durumda, monofloral ballarla kıyaslandığında test mikroorganizmalarına (10 mikroorganizmanın 7'sinde) bakterisidal/fungisidal etkide en başarılı balın multifloral bal olduğu söylenebilir. Kekik balının *A. baumannii* AYE hariç en yüksek MBK/MFK değerine sahip olduğu, çalışmada yürütülen diğer antimikrobiyal aktivite sonuçları ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



Şekil 1. Bal örneklerinin minimum inhibisyon konsantrasyonları (% v/v).

Figure 1. Minimum inhibition concentration of honey samples (% v/v).



Şekil 2. Bal örneklerinin minimum bakterisidal / fungisidal konsantrasyonları (MBK / MFK) (% v/v).

Figure 2. Minimum bactericidal / fungicidal concentration of honey samples (MBC / MFC)(% v/v).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Lavanta balının, test bakterileri arasında en dirençli suş olan *B. cereus* DSM 4312'yi %40 (v/v) gibi düşük bir konsantrasyonda bakterisidal etki göstermesi dikkat çekicidir. Bunun yanı sıra hastane enfeksiyonlarında son derece önemli bir yere sahip *K. pneumoniae* ATCC 700603'ün canlılığının yitirilmesinde en etkili balın %10 (v/v) konsantrasyon ile limon çiçeği balı olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada, balların bakterisidal etki oluşturmada bakterilerin Gram özelliğinin belirleyici olmadığı tespit edilmiştir. Şekil 2'de görüldüğü gibi, Gram pozitif özellikte olan *L. monocytogenes* ATCC7644 ve *S. aureus* ATCC 25923 üzerine en güçlü bakterisidal etkinin multifloral bal ile elde edilmesine rağmen, diğer bir Gram pozitif bakteri olan *B. cereus* DSM 4312'de ise en düşük etkinin görülmesi Gram özelliğinin bu konuda etken olmadığını ortaya koymaktadır. Gram negatif bakterilerde de aynı durum kekik balında gözlenmiştir [MBK; *A. baumannii* AYE %10 (v/v), *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve *P. aeruginosa* ATCC 35032 %40 (v/v)].

TARTIŞMA

Balın, bakteriler ve birçok maya/küf türüne karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Ertürk v.d. 2014, Irish v.d. 2006, Mandal ve Mandal 2011, Taormina v.d. 2001). Multifloral ve monofloral balların antimikrobiyal aktivitesinin ve etki mekanizmasının incelendiği bir çalışmada, bal örneklerinin tamamında *P. aeruginosa* ATCC 27853 dışındaki tüm bakteriler üzerinde farklı konsantrasyonlarda antibakteriyel etki görülmüştür. Bununla birlikte *L. monocytogenes* ATCC 15313, *B. cereus* ATCC 9634 ve *Streptococcus mutans* ATCC 25175 gibi bakteriler üzerinde bazı multifloral ballar ile monofloral balların %100 (v/v)'lük konsantrasyonlarının inhibisyon sağladığı belirlenmiştir (Gallardo-Chacón v.d. 2008). Balın yapısında bulunan hidrojen peroksitin ve yüksek şeker konsantrasyonunun antimikrobiyal aktivitenin sağlanmasında temel unsurlar olduğu, fenolik bileşikler ve diğer bileşen çeşitliliğinin ise balın geniş bir spektrumda etkinlik göstermesine sebep olduğu düşünülmektedir (Allen v.d. 1991, Bogdanov 1997, White v.d. 1963).

Çalışmamızda multifloral balın, diğer bal örneklerine kıyasla antibakteriyel ve antifungal aktivitesi yüksek bulunmuştur. Multifloral çiçek balında bulunan bileşen çeşitliliğinin, antimikrobiyal aktiviteye katkı sağladığı ve böylece daha fazla sayıda

mikroorganizma üzerinde inhibisyon etkisi bulunduğu öngörülmektedir. *C. albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* ve *Trichosporon* cinsini içeren kırk farklı maya suşu üzerinde farklı floral kaynaklara (multifloral, okaliptüs, portakal ve orman gülü) sahip balların antifungal aktivitelerinin değerlendirildiği çalışmada, multifloral çiçek balı *C. albicans* üzerindeki MİK değeri %35,56 (v/v) iken, orman gülü, portakal ve okaliptüs ballarında sırasıyla MİK değerleri %40,00, %62,22, %44,44 olarak bildirilmiştir (Koc v.d. 2009). Bu bulgular, çalışmamızdaki multifloral çiçek balının diğer ballara kıyasla yüksek antifungal aktivite göstermesini desteklemektedir.

Literatürde lavanta ve kekik balının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde; lavanta balının *S. aureus* ATCC 43300-25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *C. albicans* üzerindeki MİK değerlerinin sırasıyla %25, %21 ve %40 olduğu bildirilmiştir (Alzahrani v.d. 2012). Elde edilen sonuçlar çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Kekik balının, metisiline dirençli *S. aureus* MRSA ATCC 33591, vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* VRE ATCC 51575, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 17978 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde; %6,3-12,5 (v/v) arasındaki konsantrasyonların izolatların tamamında gelişmeyi inhibe ettiği ifade edilmiştir (Özkök v.d. 2016). Bu çalışmada %10 (v/v) konsantrasyonda kullanılan kekik balının *A. baumannii* AYE üzerinde inhibisyon sağladığı, diğer bakterilerde ise benzer etkinin %30 ve %40 (v/v) konsantrasyonlarda sağlandığı belirlenmiştir.

Benlyas v.d (2016) agar difüzyon yöntemi kullanarak, kekik ve lavanta ballarının bakteri (*S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella abony*) ve mayalar (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida neoformans*, *C. albicans*) üzerinde oluşturduğu antimikrobiyal aktiviteyi inceledikleri çalışmada, kekik balının lavanta balından daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Kekik balı tüm mayalar üzerinde inhibisyon zonu oluşturmaya karşın, lavanta balının sadece *C. neoformans* üzerinde inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir. Her iki bal örneğine ait MİK değerlerinin 5,5-12,5 mg/mL arasında değişmekte olduğu, beklendiği gibi kekik balının test mikroorganizmaları üzerindeki MİK değerlerinin lavanta balından daha düşük olduğu görülmüştür. Buna karşın, yapılan başka bir çalışmada kekik balının %75 (v/v) değerindeki konsantrasyonunun *C. albicans* ATCC 1223 ve

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Saccharomyces cerevisiae BC 5461 üzerinde inhibisyon etkisi oluşturmadığı belirtilmiştir (Sagdic v.d. 2013). Çalışmamızda, kekik balının kullanılan *Candida* suşu üzerinde inhibisyon etki göstermesi kekik balının farklı bölgeden temin edilmiş olması, farklı suş kullanımı ve balın sahip olduğu biyolojik özelliklerin farklılığı ile açıklanabilir.

Çalışmamızda yer alan mayalar ve küfler üzerinde lavanta ve kekik balının antifungal aktivitesinde anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Tablo 2) ($P < 0,05$). Kekik ve lavanta ballarının %70 (v/v) konsantrasyonlarının *P. italicum* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları sırasıyla $6,7 \pm 0,18$ ve $6,6 \pm 0,34$ mm olarak ölçülmesine karşılık, *Penicillium* cinsi küfler üzerinde %50 (v/v)'lik kekik balının denendiği bir diğer çalışmada, daha yüksek inhibisyon zonları (*P. expansum*; 21,91 mm, *Penicillium raistrickii*; 32,55 mm) gözlenmiştir (Kacaniova v.d. 2010).

Kekik ve narenciye balının yer aldığı bir başka çalışmada, klinik ve referans bakteri suşları üzerinde kekik balının oluşturduğu inhibisyon zonları 1,85-12,98 mm, narenciye balının ise 1,83-11,73 mm arasında değişen zon çapları oluşturduğu bildirilmiştir. Her iki balın antibakteriyel aktivitelerinin birbirine yakın olduğu, bununla birlikte tüm mikroorganizmalar değerlendirildiğinde kekik balının daha yüksek zon çapına sahip olduğu görülmüştür (Voidarou v.d. 2011). Yaptığımız çalışmada ise genel olarak kekik balının diğer bal çeşitlerine kıyasla en düşük antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür ($P < 0,05$).

Limon çiçeği balı, narenciye ballarına genel anlamda benzemekle birlikte, uçucu bileşenleri ve fizikokimyasal özellikleri ile bu ballardan ayrılmaktadır (Kadar v.d. 2011). Diğer narenciye ballarında olduğu gibi antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiş, *K. pneumoniae* üzerinde denendiğinde inhibisyon zon çapı 23 mm olarak ölçüldüğü ifade edilmiştir (Ali v.d. 2018). Benzer şekilde, çalışmamızda yer alan limon çiçeği balının *K. pneumoniae* ATCC 700603 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu $25,0 \pm 0,43$ mm olarak ölçülmüştür.

SONUÇ

Mevcut çalışmada elde edilen veriler; monofloral ve multifloral balların kıyaslanmasının yanı sıra, monofloral balların spesifik mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesine

katkı sağlamıştır. Birçok çalışmada olduğu gibi, bu çalışmada da multifloral balın test edilen diğer bal çeşitlerinden daha yüksek antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip olması dikkat çekicidir. Çalışılan ballara karşı en dirençli ve sporlu bir bakteri olan *Bacillus cereus* DSM 4312'ye karşı, lavanta ve kekik balının bakterisidal etki göstermesi çalışmanın önemini ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra, monofloral ballar içerisinde limon çiçeği balının genel olarak çalışmada yer alan mikroorganizmalar üzerinde güçlü inhibisyon etki göstermesi sebebiyle, patojen ve gıdalarda arzu edilmeyen mikroorganizmalarla mücadelede önerilebilir. Ülkemizde farklı botanik orjinli monofloral ve multifloral balların biyolojik özelliklerini inceleyen çalışmalara yer verilmesi, ülkemiz ballarının uluslararası platformda ticari değer kazanmasına öncülük edecektir.

KAYNAKLAR

- Alandejani, T., Marsan, J., Ferris, W., Slinger, R., Chan, F. 2009. Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 141(1): 114–118, doi.org/10.1016/j.otohns.2009.01.005
- Ali, SAM., Mahdi, WM., Altai, SH. 2018. Antibacterial Activities of Natural Iraqi and Commercial Honey Against *Klebsiella pneumoniae* *Journal of Tikrit University For Agriculture Sciences.* 18(4): 164-169.
- Allen, KL., Molan, PC., Reid, GM. 1991. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 43(12): 817-822., doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb03186.x
- Alvarez-Suarez, JM., Tulipani, S., Diaz, S., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, P., Astolfi, S., Bompadre, S., Batting, M. 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with colour, polyphenol content and others chemical compounds *Food and Chemical Toxicol.* 48: 2490- 2499., doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.021
- Alzahrani, HA., Alsabehi, R., Boukraâ, L., Abdellah, F., Bellik, Y., Bakhomah, BA. 2012. Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins *Molecules.* 17(9): 10540-

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- 10549.,
doi.org/10.3390/molecules170910540
- Anand, S., Deighton, M., Livanos, G., Morrison, P.D., Pang, ECK., Mantri, N. 2019. Antimicrobial activity of Agastache Honey and characterization of its bioactive compounds in comparison with important commercial honeys *Frontiers in Microbiology*. 10: 269-285., doi.org/10.3389/fmicb.2019.00263
- Anthimidou, E., Mossialos, D. 2013. Antibacterial activity of Greek and Cypriot honeys against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in comparison to manuka honey *Journal of medicinal food*. 16(1): 42-47., doi.org/10.1089/jmf.2012.0042
- Asadi-Pooya, AA., Pnjehshahin, MR., Beheshti, S. 2003. The antimycobacterial effect of honey: an in vitro study *Riv. Biol.* 96(3), 491-495.
- Ávila, S., Hornung, PS., Teixeira, GL., Malunga, LN., Apea-Bah, FB., Beux, MR., Beta, T., Ribani, RH. 2019. Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin *Food Research International* 123: 1-10., doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.068
- Aziz, MSA., Giribabu, N., Rao, PV., Salleh, N. 2017. Pancreatoprotective effects of Geniotrigona thoracica stingless bee honey in streptozotocin-nicotinamide-induced male diabetic rats *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 89: 135-145., doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.026
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibensouda, SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review *Journal of pharmaceutical analysis*. 6(2): 71-79., doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Bansal, V., Medhi, B., Pandhi, P. 2005. Honey—a remedy rediscovered and its therapeutic utility *Kathmandu Univ. Med. J.* 3(3): 305-309.
- Benlyas, M., Alem, C., Filali-Zegzouti, Y. 2016. Evaluation of antioxidant, antibacterial and antifungal activities of eleven monofloral honey samples collected from Morocco *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 8(3): 299-306.
- Bogdanov, S. 1997. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *LWT-Food Science and Technology*. 30(7): 748-753., doi.org/10.1006/fstl.1997.0259
- Bogdanov, S., Ruoff, K., Persano, Oddo L. 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: A review *Apidologie*, 35(1): 4-17., doi.org/10.1051/apido:2004047
- Borsato, DM., Prudente, AS., Döll-Boscardin, PM., Borsato, AV., Luz, CFP., Maia, BHLNS., Miguel, OG. 2014. Topical anti-Inflammatory activity of a monofloral honey of *Mimosa scabrella* provided by *Melipona marginata* during winter in Southern Brazil *Journal of Medicinal Food*. 17(7): 817-825., doi.org/10.1089/jmf.2013.0024
- Candiracci, M., Citterio, B., Piatti E. 2012. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans* *Food Chem.* 131(2): 493 - 499., doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.012
- CLSI. 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA.
- Cohen, HA., Rozen, J., Kristal, H., Laks, Y., Berkovitch, M., Uziel, Y., Kozar, E., Pomeranz A., Efrat H. 2012. Effect of Honey on Nocturnal Cough and Sleep Quality: A Double-blind, Randomized, Placebo-Controlled Study *Pediatrics*. 130(3): 465-471. doi.org/10.1542/peds.2011-3075
- El-Gendy, MMA. 2010. In vitro evaluation of medicinal activity of Egyptian honey from different floral sources as anticancer and antimycotic infective agents *J. Microbiol. Biochem. Technol.* 2, 118-123., doi.org/10.4172/1948-5948.1000035
- Erejuwa, OO., Sulaiman, SA., Wahab, MS. 2014. Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer *Molecules*. 19(2): 2497-522., doi.org/10.3390/molecules19022497
- Ertürk, Ö., Şahin, H., Kolaylı, S., Ayvaz, M. Ç. 2014. Antioxidant and antimicrobial activity of East Black Sea Region honeys *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi*. 39(1): 99-106.
- Estevinho, ML., Afonso, SE., Feás, X. 2011. Antifungal effect of lavender honey against *Candida albicans*, *Candida krusei* and

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Cryptococcus neoformans* *Journal of food science and technology*. 48(5): 640-643.
- Eteraf-Oskouei, T., Najafi, M. 2013. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: A review *Iran. J. Basic Med. Sci.* 16, 731-742.
- EUCAST. 2015. Method for susceptibility testing of moulds; For the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. Copenhagen, Denmark
- Fauzi, AN., Norazmi, MN., Yaacob, NS. 2011. Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines *Food. Chem. Toxicol.* 49(4):871-878., doi.org/10.1016/j.fct.2010.12.010
- Feás, X., Estevinho, LM. 2011. A survey of the in vitro antifungal activity of heather (*Erica* sp.) organic honey *J Med Food*.14(10), 1284-1288., doi.org/10.1089/jmf.2010.0211
- Gallardo-Chacón, JJ., Caselles, M., Izquierdo-Pulido, M., Rius, N. 2008. Inhibitory activity of monofloral and multifloral honeys against bacterial pathogens *Journal of apicultural research*. 47(2): 131-136., doi.org/10.1080/00218839.2008.11101439
- Gheldof, N., Wang, XH., Engeseth, NJ. 2003. Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans *J. Agric. Food Chem.* 51(5):1500-1505., doi.org/10.1021/jf025897t
- Irish, J., Carter, D. A., Shokohi, T., Blair, SE. 2006. Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Medical Mycology*. 44(3): 289-291., doi.org/10.1080/13693780500417037
- Jaganathan, SK., Mandal, M. 2009. Honey constituents and their apoptotic effect in colon cancer cells *J. ApiProduct ApiMedical Sci.* 1(2): 29-36.
- Kacaniova, M., Fatrcova-Sramkova, K., Nozkova, J., Melich, M., Kadasi-Horakova, M., Knazovicka, V., Mariassyova, M. 2010. Antiradical activity of natural honeys and antifungal effect against *Penicillium* genera *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 46(1): 92-96., doi.org/10.1080/03601234.2011.534416
- Kadar, M., Juan-Borrás, M., Carot, J. M., Domenech, E., Escriche, I. 2011. Volatile fraction composition and physicochemical parameters as tools for the differentiation of lemon blossom honey and orange blossom honey *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91(15): 2768-2776., doi.org/10.1002/jsfa.4520
- Koc, AN., Silici, S., Ercal, BD., Kasap, F., Hörmet-Öz, HT., Mavus-Buldu, H. 2009. Antifungal activity of Turkish honey against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp: an in vitro evaluation *Sabouraudia*, 47(7): 707-712., doi.org/10.3109/13693780802572554
- Kustiawan, PM., Puthong, S., Arung, ET., Chanchao, C. 2014. In vitro cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(7): 549-556., doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2013-0039
- Leyva-Jimenez, FJ., Lozano-Sanchez, J., Borrás-Linares, I., Cadiz-Gurrea, ML., Mahmoodi-Khaledi, E. 2018. Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria *LWT- Food Science and Technology*, 101: 236-245., doi:10.1016/j.lwt.2018.11.015.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, CH., Perez, C., Colella, MT., Olaizola, C., Ontiveros, Y. 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing *International Journal of Infectious Diseases*. 8(1): 39-45., doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002
- Mahmoodi-Khaledi, E., Lozano-Sánchez, J., Bakhouch, A., Habibi-Rezaei, M., Sadeghian, I., Segura-Carretero, A. 2017. Physicochemical properties and biological activities of honeys from different geographical and botanical origins in Iran *European Food Research and Technology*, 243(6): 1019-1030., doi.org/10.1007/s00217-016-2811-0
- Mandal, MD., Mandal, S. 2011. Honey: its medicinal property and antibacterial activity *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 1(2): 154-160., doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6
- Molan, PC. 1992. The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity *Bee World*. 73(1): 5-28., doi.org/10.1080/0005772X.1992.11099109

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Molan, PC., Betts, JA. 2004. Clinical usage of honey as a wound dressing: an update *J Wound Care*. 13(9): 353–6., doi.org/10.12968/jowc.2004.13.9.26708
- NCCLS. 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- Nolan, VC., Harrison, J., Cox, JAG. 2019. Dissecting the Antimicrobial Composition of Honey *Antibiotics*. 8(4): 251., doi.org/10.3390/antibiotics8040251
- Onbaşlı, D., Çelik GV., Kahraman, S., Kanbur, M. 2019. Apiterapi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri *Erciyes Üniv. Vet Fak. Derg.* 16(1): 49-56., doi.org/10.32707/ercivet.538001
- Özkök, A., Koru, Ö., Sorkun, K. 2016. Microbiological analysis and antibacterial effects of Turkish thyme honey *Bee World*. 93(4): 98-101., doi.org/10.1080/0005772X.2016.1275489
- Pérez, RA., Iglesias, MT., Pueyo, E., Gonzalez, M., de Lorenzo, C. 2007. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys *J. Agric. Food Chem.* 55(2):360-365., doi.org/10.1021/jf062055b
- Pimentel, RB. de Q., da Costa, CA., Albuquerque, PM., Junior, SD. 2013. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1): 151., doi.org/10.1186/1472-6882-13-151.
- Ramsay, El., Rao, S., Madathil, L., Hegde, SK., Baliga-Rao, MP., George, T., Baliga MS. 2019. Honey in oral health and care: A mini review *Journal of Oral Biosciences*. 61: 32-36., doi.org/10.1016/j.job.2018.12.003
- Rao, PV., Krishnan, KT., Salleh, N., Gan, SH. 2016. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: A comparative review *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 26(5): 657–664., doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.012
- Sagdic, O., Silici, S., Ekici, L. 2013. Evaluation of the phenolic content, antiradical, antioxidant, and antimicrobial activity of different floral sources of honey *International Journal of Food Properties*. 16(3): 658-666., doi.org/10.1080/10942912.2011.561463
- Samarghandian, S., Farkhondeh, T., Samini, F. 2017. Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research *Pharmacognosy Research*. 9(2): 121-127., doi.org/10.4103/0974-8490.204647
- Saranraj, P., Sivasakthi, S. 2018. Comprehensive Review on Honey: Biochemical and Medicinal Properties *J. Acad. Ind. Res*, 6, 165–181.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E. 2000. Systematic of seeded plants. Bornova, İzmir: Ege Üniversitesi, Faculty of Science.
- Subrahmanyam, M. 1998. A prospective randomised clinical and histological study of superficial burn wound healing with honey and silver sulfadiazine *Burns*. 24(2): 157–61., doi.org/10.1016/S0305-4179(97)00113-7
- Taormina, PJ., Niemira, BA., Beuchat, LR. 2001. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power *International journal of food microbiology*. 69(3): 217-225., doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00505-0
- Valgas, C., Souza, SMD., Smânia, EF., Smânia JrA. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products *Brazilian Journal of Microbiology*. 38(2): 369-380., doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034
- Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., Bezirtzoglou, E. 2011. Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria *Anaerobe*. 17(6): 375-379., doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.012
- Wang, R., Starkey, M., Hazan, R., Rahme, LG. 2012. Honey's ability to counter bacterial infections arises from both bactericidal compounds and QS inhibition *Front. Microbiol.* 3: 144-150., doi.org/10.3389/fmicb.2012.00144
- White Jr, JW., Subers, MH., Schepartz, AI. 1963. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects*. 73(1): 57-70.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, RE. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances *Nature protocols*. 3(2): 163-175.
- Wilkinson, JM., Cavanagh, HM. 2005. Antibacterial activity of 13 honeys against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* *Journal of medicinal food*. 8(1): 100-103., doi.org/10.1089/jmf.2005.8.100
- Young, T. 2005. Honey: rediscovering an ancient healer *Practice Nursing*. 16(11): 542-547., doi.org/10.12968/pnur.2005.16.11.19972
- Zafar, H., Israili, MS. 2014. Antimicrobial Properties of Honey *American Journal of Therapeutics*. 21(4): 304-323., doi.org/10.1097/MJT.0b013e318293b09b

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

LAND USE CHANGE ASSESMENT FOR BEEKEEPING IN SOUTHEAST ANATOLIA

Arıcılık için Arazi Kullanım Değişikliklerinin Güneydoğu Anadolu İllerinde İncelenmesi

Fatih SARI¹, Fadimana KOYUNCU SARI²

Selçuk University, Cumra Applied Sciences, Department of Geomatic Information Systems, Konya, TURKEY, ORCID NO: 0000-0001-8674-9028, Yazışma yazarı/Corresponding author: E-mail: fatihsari@selcuk.edu.tr

Selcuk University, Faculty of Agriculture, Department of Landscape Architecture, Konya, TURKEY ORCID NO: 0000-0001-5829-0061, E-mail: fdmnkync90@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 04.02.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 08.04.2020

DOI: 10.31467/uluaricilik.684608

ABSTRACT

In this study, land use changes in Mersin, Adana, Osmaniye and Hatay provinces were determined. The study area has vital importance on honey production (citrus, cotton, etc.) for the Turkish beekeeping sector and it is very vulnerable to land use changes due to urbanization and climate change. The land use changes were determined by using 2000, 2006, 2012 and 2018 land cover maps in the Geographical Information Systems (GIS) platform. Moreover, 2000, 2006, 2012 and 2018 beekeeping statistics were retrieved to compare the land use changes and honey production. The results indicate that the fruit trees land use class has increased 1210 km² from 2000 to 2018 because of these suitable lands for citrus production. In total, 3170 km² natural plant areas have been destroyed within 18 years which threaten natural beekeeping activities. The study area includes 42 districts and when evaluating the beekeeping statistics, total honey production has increased from 6500 tons to 15000 tons from 2000 to 2018. For the purpose of evaluating land use change and its effects, transitions were determined for the 2000-2018 period to understand the change in land-use trends. The transitions revealed that fruit tree and agricultural lands are being enlarge by destroying the natural plant areas and other complex patterns which are important for beekeeping activities.

Keywords: Land Use Change, Beekeeping, Geographical Information Systems

ÖZ

Bu çalışmada Mersin, Adana, Osmaniye ve Hatay illerindeki arazi değişimleri incelenmiştir. Çalışma alanı Türkiye bal üretimi (narenciye, pamuk vb.) için oldukça büyük öneme sahip olup şehirleşme ve iklim değişikliği kaynaklı arazi kullanım değişikliğine oldukça yatkındır. Arazi değişimleri, 2000, 2006, 2012 ve 2018 arazi kullanım haritaları kullanılarak Coğrafi Bilgi Sistemleri (CBS) platformunda değerlendirilmiştir. Ayrıca 2000, 2006, 2012 ve 2018 arıcılık istatistikleri kullanılarak arazi değişimleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlara göre meyve ağaçları arazi örtüsü, 2000 yılından 2018 yılına kadar bölgenin narenciye üretim uygunluğundan dolayı 1210 km² genişlemiştir. Toplamda 18 yıl içinde arıcılık için önemli olan 3170 km² doğal bitki alanlarının yok olduğu gözlemlenmiştir. Çalışma alanı 42 ilçeyi barındırmakta olup bal üretimi 6500 tondan 15000 tona yükselmiştir. Arazi kullanım değişikliği ve etkilerini anlamak için arazi geçişleri 2000 yılından 2018 yılına kadar hesaplanmıştır. Arazi kullanım dönüşümleri, meyve ağaçları ve tarımsal alanların doğal bitki alanlarını yok ederek genişlediği sonucunu ortaya çıkartmıştır.

Anahtar kelimeler: Arazi Kullanım Değişikliği, Arıcılık, Coğrafi Bilgi Sistemleri

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Amaç: Arazi kullanım değişiklikleri, tüm dünya genelinde doğal alanların yok olmasına neden olan bir oluşumdur. Arazi kullanımları, artan nüfus, endüstrileşme, artan gıda ve barınma ihtiyacı, tarımsal alanların artırılması ihtiyacı ve doğal afetler gibi nedenlerle hızlı bir şekilde değişmektedir. Özellikle yerleşim alanları hızlı bir şekilde büyümekte ve doğal alanlar üzerinde baskı yaparak büyüme eğilimine girmektedir. Ayrıca ekonomik kaygılar nedeniyle doğal alanların büyük bir kısmı tarımsal alanlar ve meyve bahçelerine dönüştürülmektedir. Arıcılık faaliyetleri doğrudan arazi kullanımına bağlı olduğundan, arazi değişiklikleri aynı zamanda arıcılık faaliyetlerini de doğrudan tehdit etmektedir. Bu amaçla sürdürülebilir arıcılık faaliyetleri ve doğal kaynakları korumak için arazi kullanım değişiklikleri ve trendleri önemle izlenmeli ve arazi kullanım planları oluşturulmalıdır. Böylece yakın gelecekte bölgeyi ve diğer tüm arıcılık faaliyetlerini tehdit eden arazi değişimleri öngörülebilir ve şimdiden gerek arazi kullanım planları gerekse yasal sınırlamalar ile arıcılık için önemli bölgelerin korunması sağlanabilecektir.

Yöntem: Arazi kullanım değişikliklerinin incelenmesi amacıyla 2000, 2006, 2012 ve 2018 arazi kullanım haritaları kullanılarak 18 yıllık arazi kullanım değişiklikleri hesaplanmıştır. Toplamda 45 adet arazi sınıfı barındıran CORINE arazi kullanım verisi, 13 sınıfta (Yerleşim, Tarım, Meyve Bahçeleri, Meralar, Sklerofil, Seyrek Bitki Alanları, Su Kaynakları, Karışık Bitki Alanları, Ormanlar, Zeytinlikler, Yarı Tarım-Orman Alanları, Çıplak Alanlar ve Orman Geçiş Alanları) gruplandırılarak her bir arazi sınıfının belirtilen periyotlardaki kapsadığı alanlar hesaplanmıştır. Buna ek olarak, arazi kullanımlarının değişmesinde birbirlerine dönüşen arazi türleri hesaplanarak değişimin en çok hangi sınıflarda gerçekleştiği ve artan-azalan arazi sınıfları belirlenmiştir. Tüm analizlerin yapılabilmesi, periyotlar arasındaki arazi değişimlerinin hesaplanabilmesi için Coğrafi Bilgi Sistemi yazılımlarından olan ArcGIS 10.5 kullanılmıştır. Her bir sınıfa ait kapsama alanları ve arazi türlerinin birbirleri arasındaki geçişler "Zonal Statistics" aracı ile hesaplanmıştır. Arıcılık istatistikleri de kullanılarak bal üretimi artan ilçelerdeki arazi değişimleri incelenmiş ve sonuçlar paylaşılmıştır.

Sonuç: Arazi kullanım değişiklikleri incelendiğinde, en büyük artışın meyve ağaçları arazi kullanım sınıfında olduğu görülmektedir. Çalışma bölgesinin

narenciye üretiminde en büyük paya sahip olduğu düşünüldüğünde daha fazla narenciye üretim sahası oluşturmak için çeşitli arazi sınıflarının meyve bahçesine dönüştürüldüğü görülmektedir. Her ne kadar bu durum narenciye balı üretimine olumlu etkisi olsa da arazi değişimlerinin sadece doğal bitki alanlarından meyve bahçelerine dönüştüğü göz önüne alındığında doğal alanlarda yapılan arıcılık faaliyetlerini tehdit ettiği görülmektedir. Ayrıca meraların ve doğal bitki alanların büyük kısmının da tarımsal arazilere dönüştüğü ve toplamda 3170 km² doğal bitki alanının tarımsal arazilere ve meyve bahçelerine dönüştüğü ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla 18 yıllık arazi değişimleri göz önüne alındığında, arazi kullanım değişikliği trendi bu şekilde devam ederse bölgenin büyük çoğunluğunun narenciye bahçesine dönüşeceği ve 10 yıllık zaman diliminde doğal bitki alanlarının da büyük ölçüde yok olacağı ön görülmektedir.

INTRODUCTION

Honey bees are the main pollinators of agricultural crops (Klein et al. 2007; Brown and Paxton 2009) and this role results in beekeeping activities to be a rural development indicator which can be derived from assessing bee products (honey, pollen, propolis, royal jelly, and bee venom) (Estoque and Murayama 2010; 2011; Damián 2016).

The current transformation of natural areas to agricultural lands is mainly caused by land fragmentation (DeFries et al. 2004; Murray et al. 2009) and land use change which can affect the quantity and quality of pollen and nectar sources (Requier et al. 2019). Land use change is the main reason of habitat loss which results in declines of natural resources (Pimm et al. 2001; Guan et al. 2011). Land cover change rate usually increases from human causes such as need for new agricultural lands, urbanization and industrialization (Halmy et al. 2015). Although agricultural lands can provide a high amount of pollen, pesticide usage can also have damaging effects (Johansen, 1977; Murray et al., 2009).

In recent studies, there are a large number of studies about land use change detection in the field of urban, agricultural, natural resources, water surfaces and moors (Muller 1994; Lambin 1997; Thomas and Laurence 2006; Huang et al. 2008; Ye and Bai 2008; Guan et al. 2011; Subedi et al. 2013; Halmy et al. 2015). However, currently there is no study that

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

focuses on land use change detection for beekeeping activities. Because beekeeping activities have a close relationship with water surfaces, floral resources, urban and agricultural lands, all the land use classes must be considered in this context from other studies. Thus, this study proposes a more comprehensive approach for detecting land use changes as it relates to beekeeping activities.

For the purpose of deciding what land use changes are beneficial or not for beekeeping, each land use transition must be evaluated. The land use transition reveals the reasons for the land use change and what might be its future projection. Generally, urban areas tend to be enlarged at the expense of forests, pastures, and agricultural lands. However, agricultural lands and fruit tree areas are also increasing and covering up natural plant areas and pastures. While enlarging agricultural lands and fruit tree areas provide high amount of pollen and nectar sources, destroyed natural plant areas are also valuable pollen sources which are decreasing at the same time. To balance the land use changes, land use plans must be established to sustain productivity of beekeeping activities by determining the impact of the land use changes. In this study, land use

changes and transitions were examined for Adana, Mersin, Hatay and Osmaniye provinces, which are central to the citrus and citrus honey production.

MATERIALS and METHODS

Study Area

The study areas were Adana, Mersin, Osmaniye and Hatay provinces located in the South of Turkey and border the north east coasts of the Mediterranean Sea basin. In total, these provinces have 42 districts with an area of 39662 km². The study area is one of the main centers of the citrus and cotton production, are valuable lands, and have suitable climate for citrus and cotton production. There is a high potential of increased industrial activity due to the urbanization of the Mersin Port. Especially, the Adana province has the highest urbanization potential because of intensive agricultural and industrial activities that are already ongoing in this region. According to the 2018 beekeeping statistics, 14997 tons of honey have been produced in the study area and have an increasing trend in honey production. The study area boundaries are given in Figure 1.

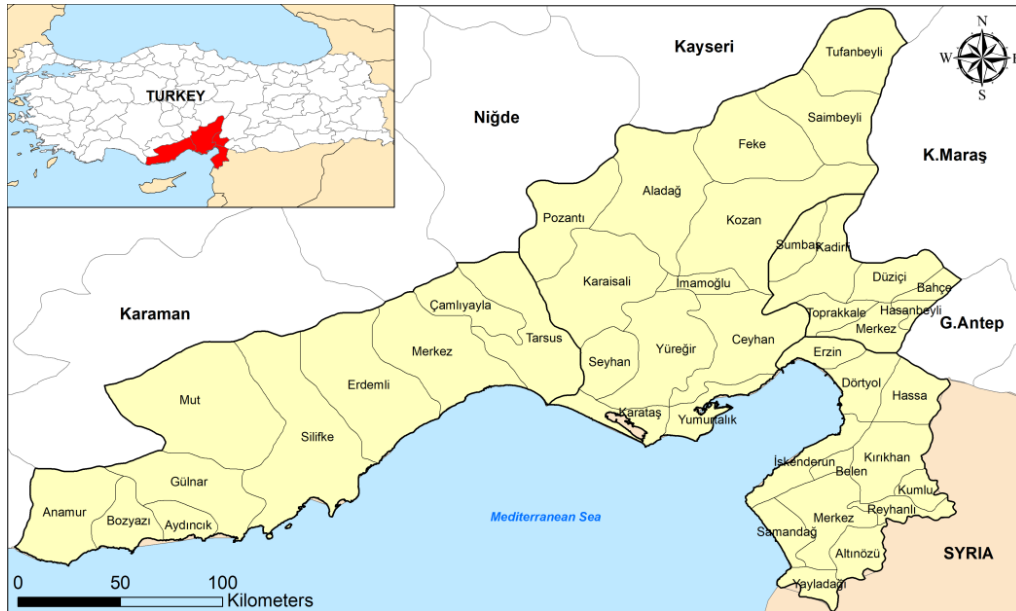


Figure 1. The study area boundaries

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Spatial Dataset

The land use changes were determined by using CORINE 2000, 2006, 2012 and 2018 Land Cover raster data at 100 x 100 meters resolution. CORINE maps have 45 land use classes and for this study, the classes were clustered into 13 classes. The beekeeping statistics were retrieved from Turkish Statistical Institute web site for 2000, 2006, 2012 and 2018 years. ArcGIS 10.5 software was used to generate spatial analyses and land use changes determination.

Methodology

The land use changes and transition probabilities are the main decisive data when detecting the trends of land use changes (Huang et al. 2008; Halmy et al. 2015). For the purpose of determining land use changes, transition probabilities were specified via the IDRISI software. The land use change calculation was based on a comparison of CORINE map pixels from 2000 to 2018. The result of this

comparison provides both land use area and transitions between land use classes. Cross Table in the IDRISI software and the Tabulate Area analyses in the ArcGIS software were combined to detect land use changes and transitions for the study area.

DETERMINATION OF LAND USE CHANGES

Land use changes

For the purpose of determining land use changes, four land use cover map were classified into 13 main classes and area of each class were determined using the km² unit. The land use changes revealed that urban, fruit trees, sclerophyll and shrubs are increasing rapidly on average. Agriculture, pastures, agro-natural and complex patterns tend to decrease. These classes were found to have both negative and positive associations with beekeeping activities and honey production. The land use maps in 2000, 2006, 2012 and 2018 are given in Figure 2.

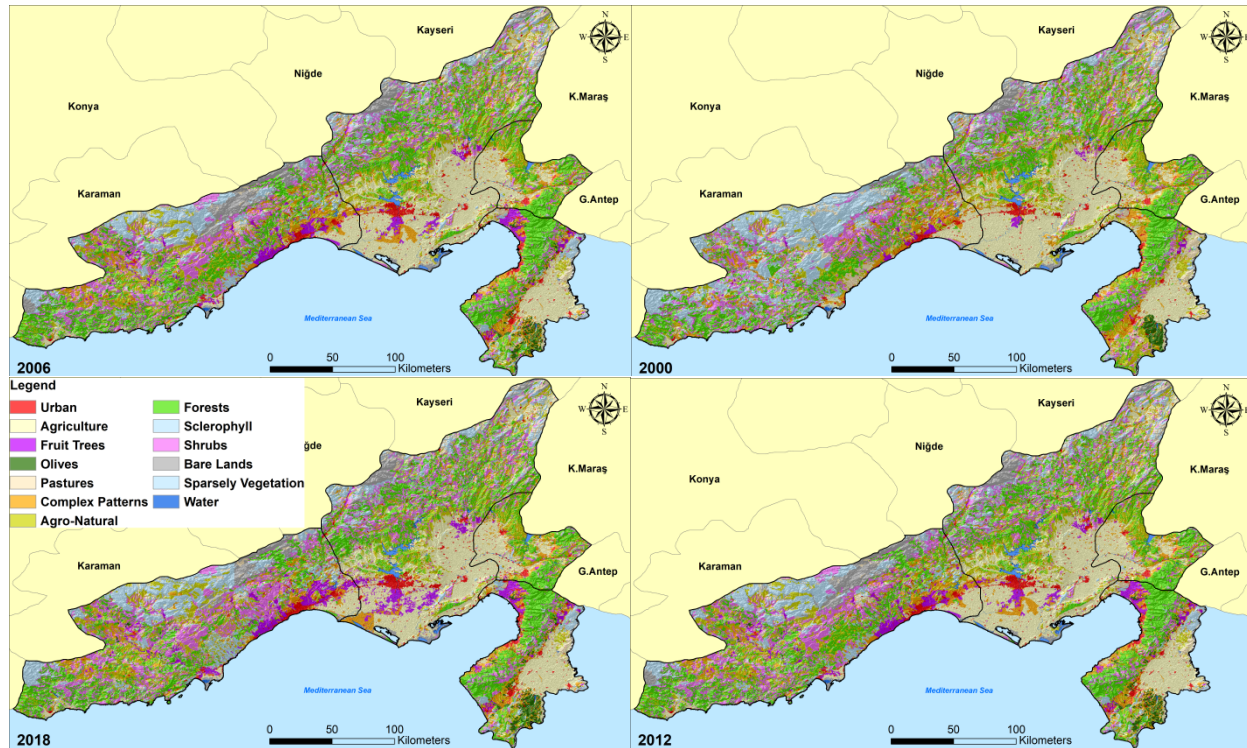


Figure 2. 2000, 2006, 2012 and 2018 land use cover maps

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

When evaluating the land use changes, fruit tree area has enlarged approximately 1200 km² from 2000 to 2018, which is very important for citrus honey production. The study area is the main center of citrus production and this production appears to be increasing over time. Similarly, as the rest of Turkey, urban areas have been increasing rapidly and include residential and industrial areas which have negative effects on beekeeping activities. Urban areas have been enlarged 341 km² and this enlargement has mostly occurred in the Mersin and Adana provinces. There is also a valuable decrease in complex patterns and pastures within the study area, which means that the natural plant areas have been transformed to the other land use classes. In the study area, complex patterns and pastures are the main source of natural plant areas in which beekeepers tend to be intensively located. The pastures have decreased 852 km² and complex patterns have decreased 285 km² from 2000 to 2018 and this translates to approximately 1100 km² of natural plant areas that have been destroyed from the transformation of this land for other uses. While agricultural lands are decreasing (by 375 km²), the annual change rate is quite low in comparison to other land use classes. Agricultural lands are an indicator of cotton honey production in the study area. Agricultural lands tend to decrease over time.

The percent of change in the rate of the land use change for each class is given in Table 1 (%1 = 400 km²).

Table 1. Percent coverage of land use classes according to the 2000, 2006, 2012 and 2018 years

Land Use Class	2000	2006	2012	2018
Urban	1,9	2,2	2,3	2,7
Agriculture	18,5	17,8	17,7	17,6
Fruit Trees	0,8	2,7	2,8	3,8
Olives	0,6	0,9	0,9	1,0
Pastures	5,0	3,4	3,3	2,9
Complex Patterns	7,6	7,6	7,7	6,8
Agro-Natural	11,9	12,5	12,4	11,7
Forests	21,1	22,5	22,0	21,2
Sclerophyll	1,0	2,0	2,0	2,9
Shrubs	14,8	15,5	15,9	16,9
Bare Lands	2,4	4,0	4,0	3,0
Sparsely Vegetation	13,6	8,0	8,0	8,5
Water	0,9	0,9	0,9	1,0

The gain and loss is given in Figure 3 which summarizes the land use changes. The high losses have occurred in sparsely vegetated areas, pastures, and complex patterns. The largest gain occurred in the fruit tree land use class.

Total Gains and Losses

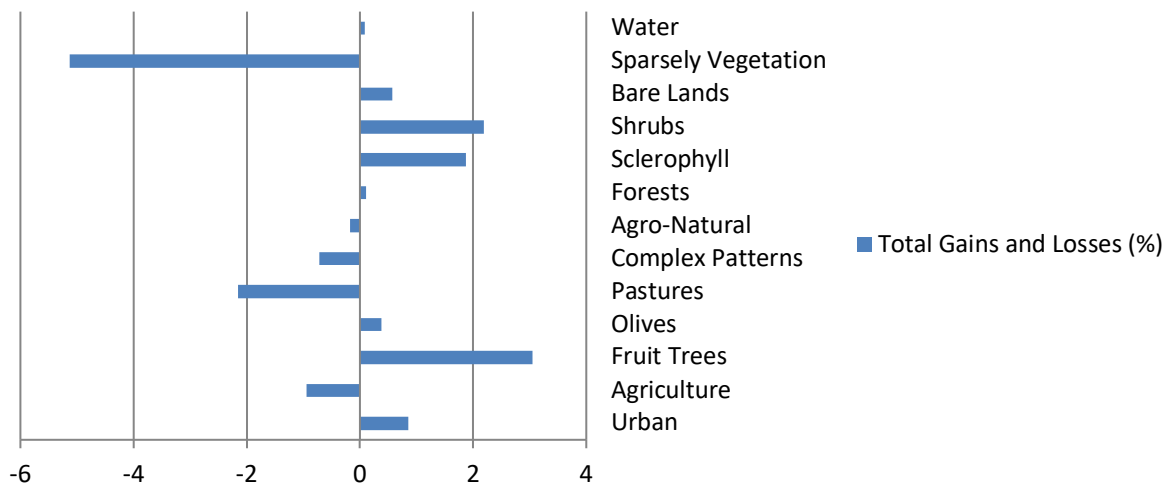


Figure 3. Gains and losses of land use area from 2000 to 2018

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

When evaluating the changes year by year, shrubs, fruit trees, urban areas and sclerophyll land use classes are increasing and agriculture, complex patterns and pastures are decreasing continuously. These continuous changes suggest that there is a systematic effect of land use changes. For instance, the economic income of the citrus production have been effecting other land use classes to transform areas into ones suitable for fruit tree production for

the purpose of establishing new citrus areas. Similarly urban areas have been enlarging due to the increasing population and industrial activities in the study area. Although continuous land use changes are affecting land use regimes, they also affect the beekeeping activities. A discontinuous increase and decrease of land use generally occurred for different reasons such as natural disasters, changing climatic conditions and land use plans (Figure 4).

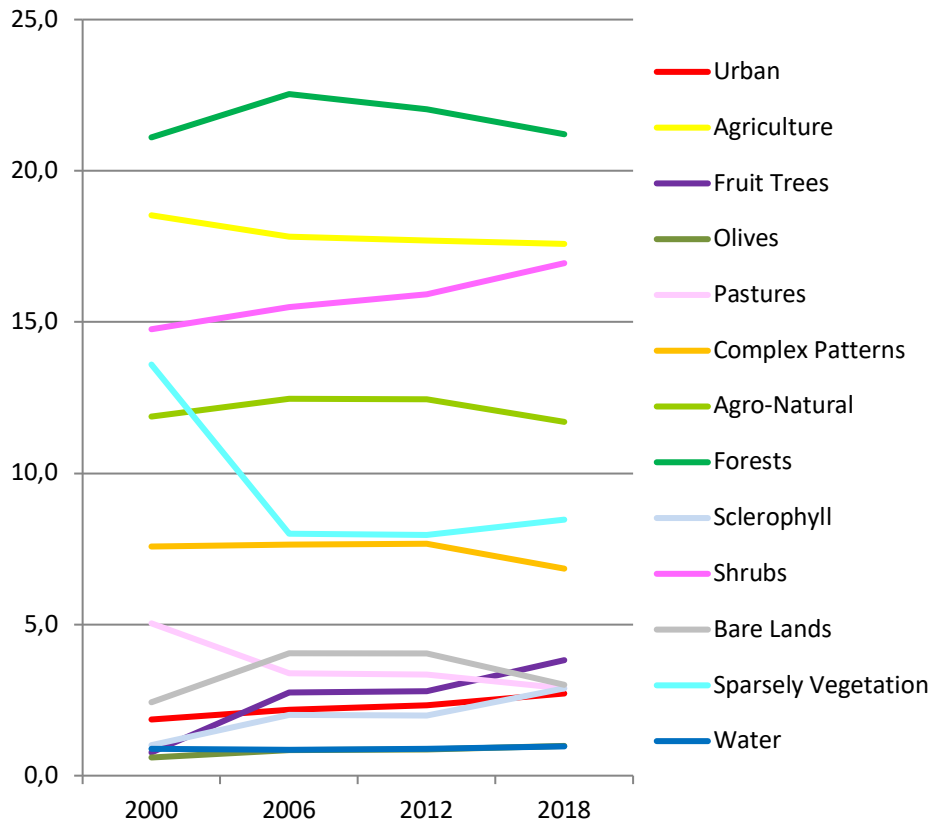


Figure 4. Changes of land use classes from 2000 to 2018

Transitions of land use classes

Understanding the reasons and effects of land use changes requires evaluating the land use transitions. For example, if bare lands transformed into urban areas, this status change will not affect beekeeping activities and other land use classes because bare lands in the first place have no economic and

environmental impact on beekeeping activities. However, if pastures, agricultural lands and fruit trees are transforming into urban areas, this can be evaluated as a threat for beekeeping activities. Thus, the transitions from 2000 to 2018 have been generated to evaluate if the transitions will have a large impact or not. The transitions are given in Figure 5.

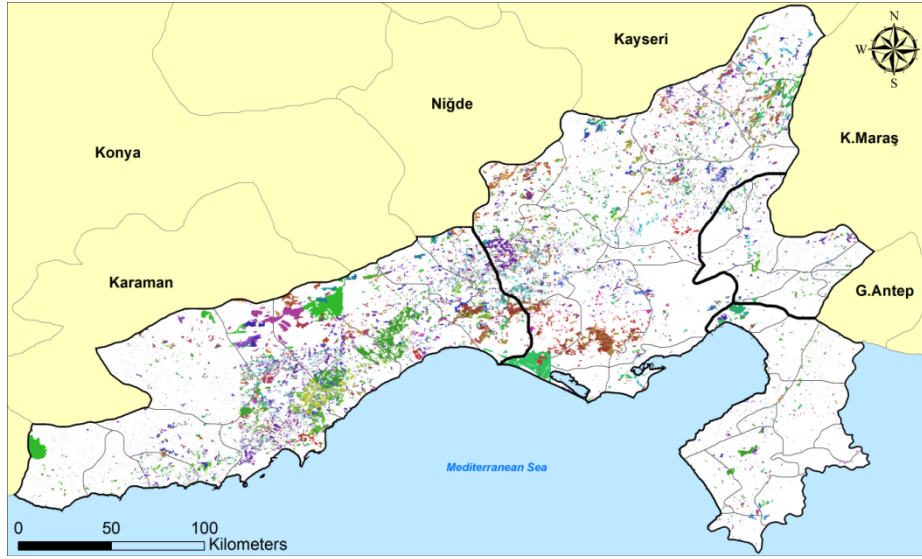


Figure 5. Transitions of land use classes from 2000 to 2018

Because 13 land use classes have been used in this study, 169 transitions were calculated (13×13) and due to this high number of transitions, the legend was not provided for Figure 5. However, important transitions for beekeeping activities are given in Table 2 instead. As can be seen in Table 2, the gains in agricultural lands are mostly from the conversion of pastures, complex patterns and agro-natural land, which means that natural areas are generally getting transformed into agricultural lands. Moreover, complex patterns, agriculture and agro-natural land use classes are also being transformed into fruit tree land use. At this point, two disadvantages can be underlined for fruit trees. The high amount of transitions from agriculture to fruit trees implies that fruit trees and agricultural lands are located in adjacent lands to one another. Thus, pesticide use in agricultural lands could affect the fruit trees and impact the honey bees responsible for the citrus honey production.

Table 2. Transitions of some land use classes

Land Use Class		Change
Transitions from	To	(km ²)
Agriculture	Urban	59,8
Complex Patterns	Urban	79,4
Pastures	Agriculture	5,6
Complex Patterns	Agriculture	210,9
Agro-Natural	Agriculture	218,1
Agriculture	Fruit Trees	148,3
Complex Patterns	Fruit Trees	246,6
Agro-Natural	Fruit Trees	85,1

Beekeeping statistics

The beekeeping statistics revealed that the honey production in the study area have been increasing from 6496 tons to 14998 tons within 18 years. Seyhan, Yüreğir, İmamoğlu, Karaisalı, Kozan, Mersin (center), Çamlıyayla, Silifke, Tarsus and Osmaniye Merkez districts have the highest contribution to the total honey production in the study area, with 11833 tons in 2018. Moreover, the Kozan district has the 33% of the total production in the study area. The honey production statistics are given in Figure 6.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

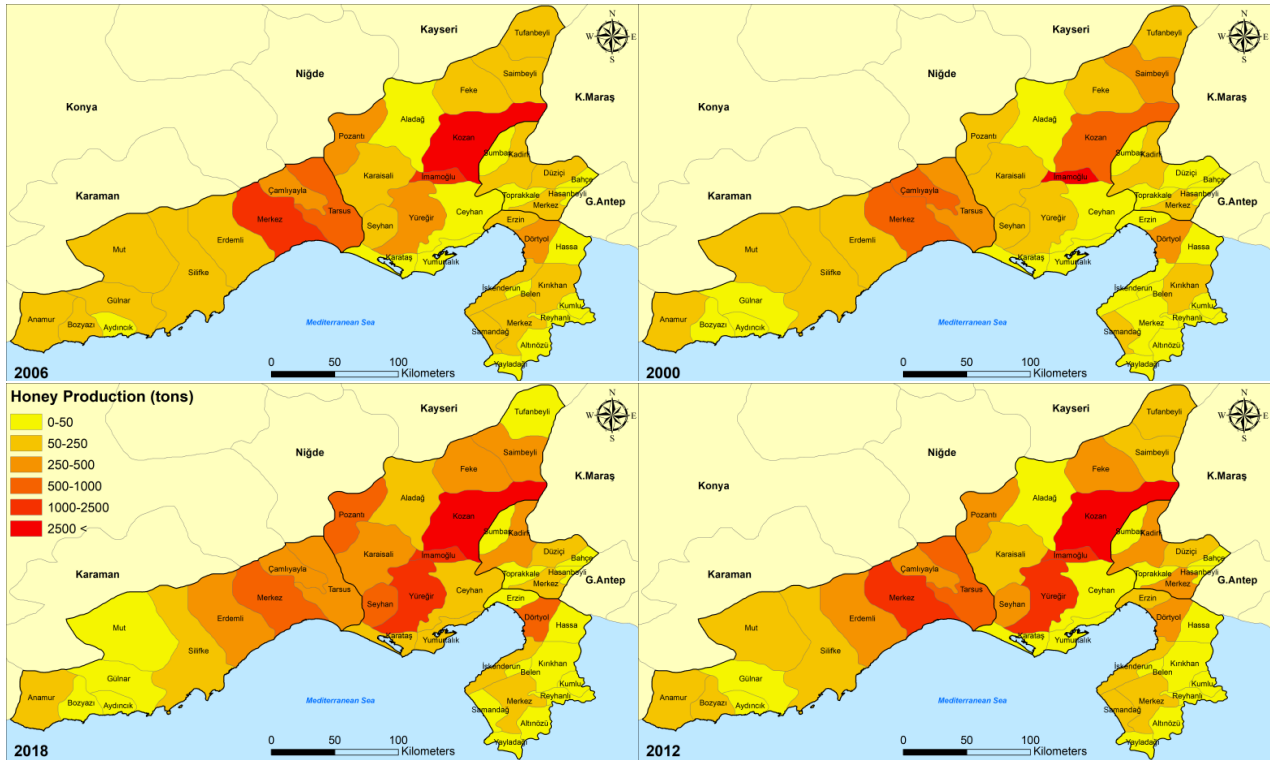
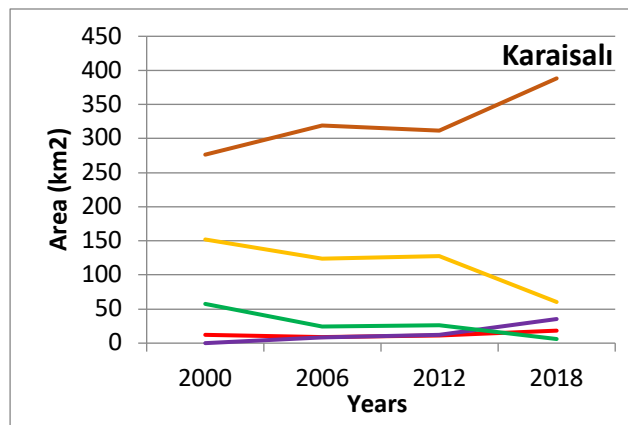
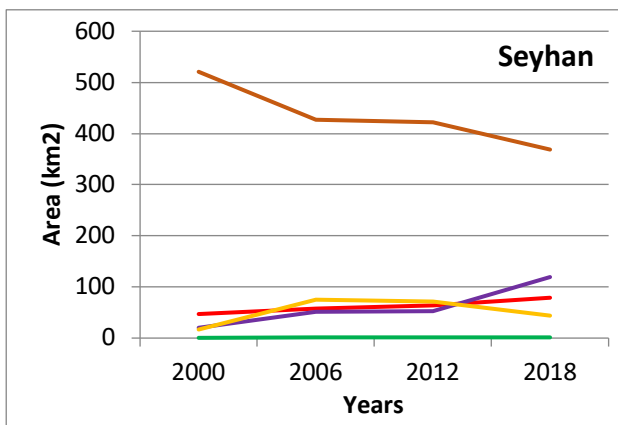


Figure 6. 2000, 2006, 2012 and 2018 beekeeping statistics (total honey production)

When evaluating the land use changes in these districts, as can be seen in Figure 7, the fruit trees land use class has been increasing along with the honey production. While fruit trees are increasing in all districts, pastures and complex patterns are decreasing. Thus, the honey production increasing

can most likely be attributed to the fruit tree lands in these districts. However, we would like to point out that the decreasing pastures and complex patterns will reduce the natural plant areas so the urban and residential enlargement patterns must be monitored carefully.



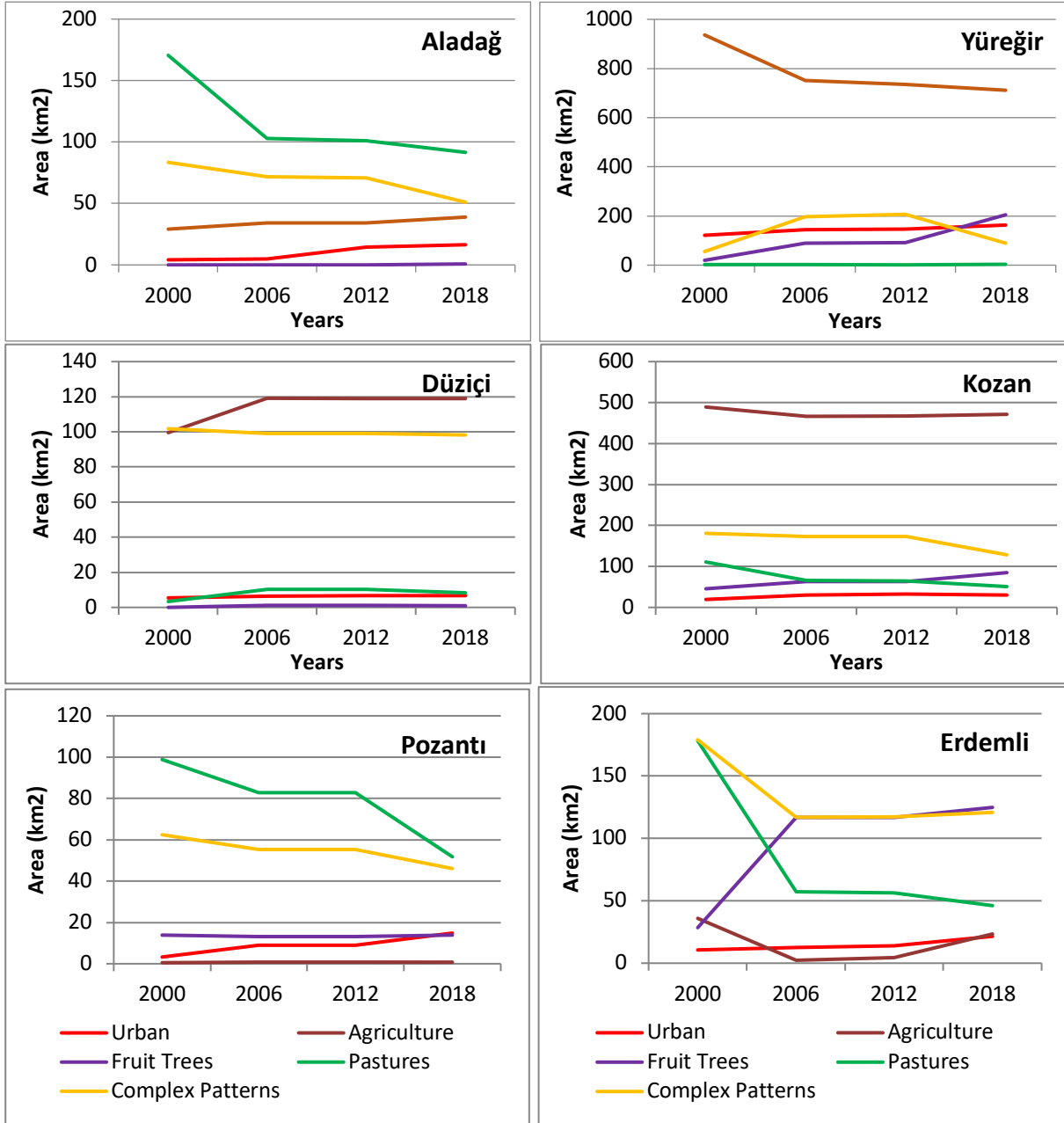


Figure 7. Land use changes in some districts which have high honey production

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

CONCLUSIONS

Land use changes are considered to be the primary threat for beekeeping activities all around the world. Sustainable beekeeping and ensuring productivity requires that urbanization and agricultural lands are managed with explicit plans that should be arranged by authorized institutes. Sustainable beekeeping activity requires high quality and quantity of nectar, pollen, propolis and water in natural areas. The natural plant areas are especially decreasing and this may be a potential threat for future beekeeping activities. Establishing new fruit tree areas should be transformed from bare lands or sparsely vegetated areas which do not have an economic impact on beekeeping. We determined that a large number of fruit tree land use cover expansion results in high economic stress for beekeeping activities and this can occur rapidly. The future land use maps can be used as predictive models to aid in determining effective land use regimes to balance and sustain both economic income and beekeeping activities.

The land use changes also should be evaluated together with climate change, rural development and environmental factors for comprehensive and applicable land use management establishment. Using past and present land use cover data can act as a guide for future land use change models which might aid in optimizing land use when considering a multifactorial profession such as beekeeping. Thus, the future land use models and related beekeeping activities could guide us on how to best manage the use of land and estimate the projection of the best areas for beekeeping activities. This application can be expanded to cover all of Turkey so that we can understand and monitor how land use changes are impacting the beekeeping industry.

REFERENCES

- Brown, M.J.F., Paxton, R.J. (2009). The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie*, (40), 410–416. DOI: 10.1051/apido/2009019.
- Damián, G.C. (2016). GIS-based optimal localisation of beekeeping in rural Kenya Master degree thesis, 30/ credits in Master in Geographical Information Sciences Department of Physical Geography and Ecosystems Science, Lund University
- DeFries R.S., Foley J.A., Asner G.P. (2004) Land-use choices: balancing human needs and ecosystem function, *Frontiers Ecol. Environ.* 2, 249–257. DOI: 10.1890/1540-9295(2004)002[0249:LCBHNA]2.0.CO;2
- Estoque, R.C., Murayama, Y. (2010). Suitability Analysis for Beekeeping Sites in La Union, Philippines, Using GIS and Multi-Criteria Evaluation Techniques. *Research Journal of Applied Sciences*, 5(3), 242-253. DOI: 10.3923/rjasci.2010.242.253
- Estoque, R.C., Murayama, Y. (2011). Suitability Analysis for Beekeeping Sites Integrating GIS & MCE Techniques. *Spatial Analysis and Modeling in Geographical Transformation Process*. 978-94-007-0670-5. Springer Netherlands.
- Guan, D., L, H., Inohae, T., Su, W., Nagaie, T., Hokao, K. (2011). Modeling urban land use change by the integration of cellular automaton and Markov model. *Ecological Modelling*, 222, 3761-3772. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2011.09.009
- Halmy, M.W., Gessler, P.E., Hicke, J.A., Salem, B.B. (2015). Land use/land cover change detection and prediction in the north-western coastal desert of Egypt using Markov-CA. *Applied Geography*, 63, 101-112. DOI: 10.1016/j.apgeog.2015.06.015
- Huang, W., Liu, H., Luan, Q., Jiang, Q., Liu, J., Liu, H. (2008). Detection and prediction of land use change in Beijing based on remote sensing and GIS. *The International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, XXXVII, 75–82.
- Johansen, C.A. (1977). Pesticides and pollinators. *Annual Review of Entomology*, 22, 177–192.
- Klein A.-M., Vaissière B., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremer C., Tscharntke T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops, *Proc. R. Soc. London B* 274, 303–313. DOI: 10.1098/rspb.2006.3721
- Lambin, E.F. (1997). Modeling and Monitoring Land-Cover Change Processes in Tropical Regions. *Progress in Physical Geography*, 21, 375-393.
- Muller, M.R., Middleton, J. (1994). A Markov model of land-use change dynamics in the Niagara Region, Ontario, Canada. *Landscape Ecology*, 9, 151-157.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Murray, E.T., Kuhlmann, M., Potts, S. (2009). Conservation ecology of bees: populations, species and communities. *Apidologie*, Springer Verlag, 40 (3), ff10.1051/apido/2009015ff. DOI: ff10.1051/apido/2009015.
- Pimm S.L., Ayres M., Balmford A., Branch G., Brandon K., Brooks T., Bustamante R., Costanza R., Cowling R., Curran L.M., Dobson A., Farber S., da Fonseca G.A., Gascon C., Kitching R., McNeely J., Lovejoy T., Mittermeier R.A., Myers N., Patz J.A., Raffle B., Rapport D., Raven P., Roberts C., Rodriguez J.P., Rylands A.B., Tucker C., Safina C., Samper C., Stiassny M.L., Supriatna J., Wall D.H., Wilcove D. (2001) Can we defy nature's end? *Science* 293, 2207–2208. DOI: 10.1126/science.1061626
- Requier, F., Garnery, L., Kohl, P.L., Njovu, H.K., Pirk, C.W., Crewe, R.M., & Steffan-Dewenter, I. (2019). The Conservation of Native Honey Bees Is Crucial. *Trends in ecology & evolution*. DOI: 10.1016/j.tree.2019.04.008
- Subedi, P., Subedi, K., Thapa, B., (2013). Application of a Hybrid Cellular Automaton – Markov (CA-Markov) Model in Land-Use Change Prediction: A Case Study of Saddle Creek Drainage Basin, Florida. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 1(6), 126-132.
- Thomas, H., Laurence, H.M. (2006). Modeling and projecting land-use and land-cover changes with a cellular automaton in considering landscape trajectories: An improvement for simulation of plausible future states; *EARSeL eProc.* 5 63–76.
- Ye, B., Bai, Z. (2008). Simulating land use/cover changes of Nenjiang County based on CA-Markov model. *International Federation for Information Processing Publications IFIP*, 258, 321-330.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

TÜRKİYE'NİN FARKLI İLLERİNDE SONBAHAR DÖNEMİNDE ÜRETİLEN ANA ARILARIN KALİTE KRİTERLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Evaluation of the Quality Criteria of Queens Produced in Different Provinces of Turkey in Autumn

Servet ARSLAN¹, Mahir Murat CENGİZ²

¹Akdeniz Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Organik Tarım Bölümü, Antalya, TÜRKİYE- ORCID NO: 000-0003-3892-8130. E-mail: servetarслан@akdeniz.edu.tr

²Atatürk Üniversitesi, Erzurum Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Erzurum, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0002-9844-4229, Yazışma yazarı / Corresponding author: mcengiz@atauni.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 29.03.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 22.04.2022

DOI: 10.31467/uluaricilik.710209

ÖZ

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı illerinde (Ankara, Antalya, Konya, Mersin, Ordu) ticari ana arı yetiştiriciliği yapan altı işletmeden Ağustos–Eylül 2018 tarihlerinde üretilen ve tesadüfi olarak toplanan 30 adet ana arı kullanılmıştır. Ana arılarda kalite özellikleri olarak kabul edilen canlı ağırlık, spermateka çapı, spermateka hacmi ve spermatozoa sayısı değerlendirilmiştir. Ölçümler sonucunda sırasıyla ortalama 167,20±3,68 mg, 1.015±0.007 mm, 0,55±0,01mm³ ve 0.374±0.058 milyon/ana olarak belirlenmiştir. Ölçümü yapılan özelliklerden spermatozoit sayısı bakımından işletmeler arasında önemli derecede istatistiki fark belirlenirken (P<0.01), diğer özellikler bakımından farklılık bulunmamıştır. Kaliteli bir ana arıda canlı ağırlığın 200 mg ve üzeri, spermateka çapının 1.2 mm ve üzeri, spermateka hacminin 0.90 mm³ ve üzeri, spermatekada depolanan spermatozoit sayısının 5 milyon ve üzeri olması istenmektedir. Ana arıların canlı ağırlık, spermateka çapı, spermateka hacmi ve spermatekada depolanan spermatozoit miktarı yönünden kalite ve standart değerlerin çok altında belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Bal arısı, ana arı, ana arı yetiştirme, kalite kriteri, sonbahar

ABSTRACT

In this study, 30 queen bees which were produced, and randomly collected between August-September 2018, were used from 6 enterprises that produce commercial queens in different cities (Ankara, Antalya, Konya, Mersin, Ordu) of Turkey. The live weight of the queens, spermatheca diameter, spermatheca volume, and the number of spermatozoa, were evaluated as quality criteria. As a result of the measurements, the mean values of 167.20 ± 3.68 mg, 1.015 ± 0.007 mm, 0.55±0.01mm³ and 0.374±0.058 million/queen were determined, respectively. While there was a statistically significant difference in terms of number of spermatozooids (P<0.01), no difference was found in terms of other characteristics among the commercial businesses. A high quality queen bee is required to weigh 200 mg or more, 1.2 mm and or more of spermatheca diameter, 0.90 mm³ and above for the volume of the spermatheca, and 5 million or more of spermatozooids stored in the spermatheca. It was determined that the quality in terms of live weight, spermatheca diameter, spermatheca volume and the amount of spermatozoid stored in the spermatheca of queen bees were much lower than the standard values.

Keywords: Honeybee, queen bee, queen rearing, quality criteria, autumn

EXTENDED ABSTRACT

Goal: Queen bees have an indisputable value in the beekeeping activity. The importance of a queen bee stems from selecting certain breeding features and quality. Seasonal first queen bee production in Turkey is carried out in coastal areas because of their warmer climates, usually occurring in the April to May time period. Enterprises producing queen bees continue to produce queen bees in higher regions until mid-autumn by moving from the coastal areas to the inland areas due to the increase in temperature and the decrease of flora towards the end of May. In this study, a comparison of the queen bees raised in different establishments producing queen bees in autumn conditions in terms of live weight, diameter of spermathecae, spermathecae volume and the amount of spermatozoa stored in spermathecae was made.

Materials and Methods: In this study, 30 queens, which were produced and randomly collected between August-September 2018, were used from 6 enterprises that produce commercial queens in different cities (Ankara, Antalya, Konya, Mersin, Ordu) of Turkey. The queen bees that were collected and caged from the enterprises were brought to Akdeniz University the next day. In a laboratory, the live weights of the queen bees (mg/queen), the diameters of their spermathecae (mm) and amount of spermatozoa in the spermathecae (million/queen) were determined. The live weights of the egg-laying queens were measured using precision scales (to the mg level). Then, their spermathecae were removed, tracheas were cleaned, and sperm sacs were placed on a slide and the diameters of the sacs were measured using a microscope with a total magnification of 45x. The spermathecae diameters of the queens were then calculated by using the sphere formula of sperm sac volumes (mm^3). The spermathecae were then discharged into 1 mL of saline solution (0.9%) using a fine insect needle and forceps. Tap water was added to make a final volume of 10 mL. The sample that was taken from this mixture was placed between the lamella and the lamella slide and the image from the microscope was transferred to a closed-circuit television monitor. Then, the number of the spermatozoa in the square part of the Thoma slide were counted, and the total amount of spermatozoa (million/queen) found in the 10 mL mixture was calculated. In addition, the sperm sac volume and diameter of the queens was calculated.

Results: The live weight of the queens, spermathecae diameter, spermathecae volume and the number of spermatozoa were evaluated as the quality criteria. As a result of the measurements, the mean values were 167.20 ± 3.68 mg, 1.015 ± 0.007 mm, 0.55 ± 0.01 mm^3 and 0.374 ± 0.058 million respectively. There was no statistical difference between live weights, diameters of spermathecae and spermathecae volumes of queen bees reared in different enterprises. However, a significant difference ($P < 0.01$) was found between the enterprises in terms of the number of spermatozoa stored in the spermathecae of queens. The average amount of stored spermatozoa was 0.374 ± 0.058 (million/queen), while the exchange between enterprises were determined between 0.751 ± 0.191 (million/queen) and 0.140 ± 0.059 (million/queen). The queen bees that stored the most spermatozoa were determined to be from the 3rd enterprise and the one with the least amount of stored spermatozoa was from the 1st queen bee group.

Conclusion: It was observed that queen bees reared in autumn are insufficient in terms of standard criteria quality characteristics. The ability of the queen bees to store a sufficient number of spermatozoa depends on the climatic conditions and sufficient amounts along with the quality of the drones. According to the data obtained from this study, it is recommended that queen bee production should be made during a suitable season that has sufficient nectar and high quality pollen.

GİRİŞ

Türkiye 8,1 milyon (TÜİK, 2019) arı varlığı ile dünyada ikinci, bal arısı alt türlerinin %22'sini barındırması bakımından ise birinci sırada yer almaktadır. Bu genetik zenginlik ve arı kolonisi varlığının yanı sıra uygun iklim koşulları, topoğrafik yapısı ve flora zenginliğinden dolayı arıcılık için oldukça elverişli bir ülkedir. Türkiye'de 8 milyon civarında koloni, 80.675 arıcılık yapan işletme sayısı ve 109330 ton bal üretimi ile büyük bir sektör olmasına rağmen koloni başına bal veriminin (13,45 kg/koloni) dünya ortalamasından (21 kg/koloni) düşük olduğu görülmektedir. Bu olumlu etkenlerin zamanında ve yeterince değerlendirilememesi, koloni başına verim düşüklüğü, var olan arıcılık potansiyelinden yeterince yararlanılamadığını göstermektedir. Arıcılıkta ekonomik yetiştiricilik için kaliteli damızlık ve nitelikli ana arı kullanımı ile işe başlamak çok önemli avantaj sağlamaktadır. Ana

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

arıların gelecek kuşaklara sahip olduğu genler aracılığı ile aktaracağı özellikler koloni davranış ve verimliliğinde büyük önem taşımaktadır (Büchler v.d. 2013; Köseoğlu v.d. 2017; Genç ve Cengiz 2019).

Arıcılık faaliyeti içerisinde ana arı tartışılmaz bir konuma sahiptir (Adgaba v.d. 2019; Dolasevic v.d. 2020). Ana arının bu önemi, damızlık özelliği ve kalitesinden kaynaklanır. Ana arı kalitesini genetik ve çevresel olmak üzere birçok faktör etkilemektedir (Lee v.d. 2019). Uygulanan melezleme ve seleksiyon çalışmaları sonucunda elde edilen uygun yapıdaki ırk ve ekotipler, ana arı kalitesini etkileyen genetik faktörler olarak ortaya çıkmaktadır (Genç ve Cengiz 2019; Güler 2017; Arslan v.d. 2018).

Çevresel faktörler ise mevsim, flora, beslenme, koloninin gücü, temel yüksük özellikleri, larva sayısı ve yaşı gibi unsurları ihtiva etmektedir (Okuyan ve Akyol 2018). Diğer taraftan, ana arı yetiştirme mevsimi ve tekniği, transfer edilen larvanın yaşı, sayısı, bakıcı kolonilerin özellikleri, çiftleştirme kolonilerin yapısı, erkek arı miktarı ve kalitesi ana arı kalitesini etkileyen özelliklerdir (Doğaroğlu ve Doğaroğlu 2015; Arslan v.d. 2015; Güler 2017; Genç ve Cengiz 2019). Bahsi geçen çevresel ve genetik faktörler, ana arının çıkış ağırlığı, yumurtlama ağırlığı, spermateka kesesi çapı ve hacmi, spermatozoa sayısı, yumurta tüpü sayısı gibi kalite kriterlerini etkilemektedir (Woyke 1971; Güler ve Alpaz 2005; Kahya v.d. 2008; Hatjina v.d. 2014).

Dünyadaki birçok ülkeye göre Türkiye’de kontrollü ticari ana arı yetiştiriciliği yeni sayılır. Ülkemizde kontrollü olarak ticari ana arı yetiştiriciliği, 1978 yılında başlamış olup nitelik ve nicelik yönünden talebi karşılayacak düzeye maalesef henüz gelinebilmiştir. Türkiye, koloni varlığı (8 milyon) açısından kolonilerdeki ana arılarının iki yılda bir yenilenmesi hesabıyla 4 milyon/yıl ana arıya ihtiyaç duymaktadır. Tarım ve Orman Bakanlığı’ndan izinli 138 adet ana arı üretim işletmesi bulunmaktadır. Bu işletmelerin tam kapasiteyle çalışması halinde bir yılda 515.100 ana arı üretimi yaparak mevcut talebin yaklaşık olarak %13’ünü karşılayabildiği belirlenmiştir (Anonim 2019). Talebin karşılanamaması dışında damızlıkla ilgili sorunların da çözülmemiş olduğu anlaşılmaktadır. Hâlbuki Türkiye, birçok balarısı ve doğal ekotiplerin farklı ekolojik bölgelerine adapte olduğu genetik açıdan zengin bir ülkedir (Kandemir v.d. 2000). Bu bağlamda, Türkiye’de üretilen ana arıların damızlık değeri bilinmemekle beraber yetiştirilen ana arıların

kalite ölçümleriyle ilgili çalışmalarda yok denecek kadar azdır.

Ana arı yetiştiriciliğinde genç larva kullanımının spermateka büyüklüğünü etkilediğini, larva yaşı küçüldükçe spermatekanın büyüdüğü birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir (Woyke 1971; Gilley v.d., 2003; Tarpy v.d., 2000). Ana arının, spermateka kesesi büyüklüğüne bağlı olarak spermatozoa depolayabilme kabiliyeti, ana arının verimliliği ve ömür uzunluğu karakterleri arasında pozitif ilişki bulunmuştur (Öztürk 2014; DeSouza v.d. 2013; Hatjina v.d. 2014). Diğer taraftan bazı araştırmacılar; ana arının sperm kesesi büyüklüğünün bir kalite faktörü olabileceğini, daha büyük sperm kesesinde daha fazla spermatozoit depolayan ana arıların daha uzun süre fertilize olmuş yumurta yumurtlayabileceğini ve daha uzun yaşayabileceğini bildirmişlerdir (Woyke 1971; DeSouza v.d. 2013; Payne ve Rangel 2018).

GEREÇ-YÖNTEM

Türkiye’nin değişik illerinde (Ankara, Antalya, Konya, Mersin, Ordu) farklı miktarlarda üretim kapasitesine sahip 6 işletmeden Ağustos-Ekim 2018 tarihinde araştırmada kullanılan ana arılar temin edilmiştir. Her bir işletmeden 5 ana arı olacak şekilde ve toplamda 30 ana arı şansa bağlı olarak seçilmiştir. Ana arı numunesi alınan işletmelerin illere dağılımı şu şekildedir; Ankara 1 nolu işletme, Konya 2 nolu işletme, Antalya 3 ve 4 nolu işletmeler, Ordu 5 nolu işletme, Mersin 6 nolu işletme. İşletmelerden toplanıp kafeslenen ana arılar, bir sonraki gün Akdeniz Üniversitesi Teknik Bilimler MYO Organik Tarım Programı Laboratuvarı’na getirilmiş ve burada canlı ağırlıkları (mg), sperm kesesi çapları (mm) ve sperm kesesinde depolanan spermatozoa sayıları (milyon) belirlenmiştir.

Yumurtlayan ana arıların canlı ağırlıkları hassas terazide (mg seviyesinde) tartıldıktan sonra sperm keseleri çıkarılmış ve üzerindeki trake ağı temizlenerek lam üzerine 4,5x10 büyütme stereo mikroskopta oküler mikrometre aracılığı ile çapları ölçülmüştür (Cengiz v.d. 2019). Çapları ölçülen sperm keseleri, küre formülü kullanılarak hacimleri (mm³) hesaplanmıştır (Woyke 1983; Güler v.d. 1999). Çapı ölçülen sperm kesesi, içerisinde 1 ml serum fizyolojik bulunan porselen bir kap içerisinde parçalanmış ve pastör pipeti ile karıştırılıp üzerine 9 ml çeşme suyu ilave edilerek spermatozoanın

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

kıvrılarak yuvarlak şekil almaları sağlanmıştır. Bu karışımdan alınan örnek Thoma lamı ile lamel arasına damlatılmış ve mikroskoptaki görüntü kapalı devre televizyon monitörüne aktarılmıştır.

Thoma laminin kareli kısmındaki spermatozoitler sayılarak 10 ml'lik karışımda ve aynı zamanda ana arının sperm kesesinde bulunan toplam spermatozoit miktarı (milyon adet/ana) hesaplanmıştır. Hesaplama şu şekilde yapılmıştır; Thoma laminin kareli kısmının hacmi = 1mm x 1mm x 0,1 mm = 0,1 mm³ olmaktadır. 1ml karışım içerisindeki spermatozoon miktarı
$$= \frac{\text{Gözlenen spermatozoon sayısı}}{\text{Gözlenen kare sayısı}} \times 10.000$$
 şeklinde hesaplanmıştır. Bulunan değer 10 ile çarpıldığında 10 ml içerisindeki spermatozoon sayısı bulunur bu ise spermathekadaki spermatozoon sayısını vermektedir (Woyke 1979; Koç ve Karacaoğlu 2005; Arslan v.d. 2015; Cengiz v.d. 2019).

Verilerin istatistik analizinde ilk önce verilerin dağılışının normale uygunluğunu test etmek için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı ve verilerin dağılışının normal dağılışa uygun olduğu için

işletmelerin canlı ağırlık, spermatheka çapı, spermatheka hacmi ve spermatozoon sayısına ait ortalamaların karşılaştırılmasında Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve önemli bulunan özelliklere ait ortalamaların karşılaştırılmasında Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı.

BULGULAR

Canlı Ağırlık

Farklı işletmelerde yetiştirilen ana arıların canlı ağırlıkları Tablo 1'e bakıldığında ortalama 161.00 ile 182,40 mg arasında değişim gösterdiği görülmektedir. Ana arıların canlı ağırlık ortalamaları arasındaki farklılık istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. En hafif canlı ağırlık ortalaması 148,00±3,78 mg ağırlıkla Konya'daki işletmede belirlenirken en ağır grubu ise 182,40±9,15 mg ağırlıkla Antalya'daki işletmeden elde edilmiştir. Diğer işletmeler ise bu iki grup arasında yer almışlardır (Tablo 1).

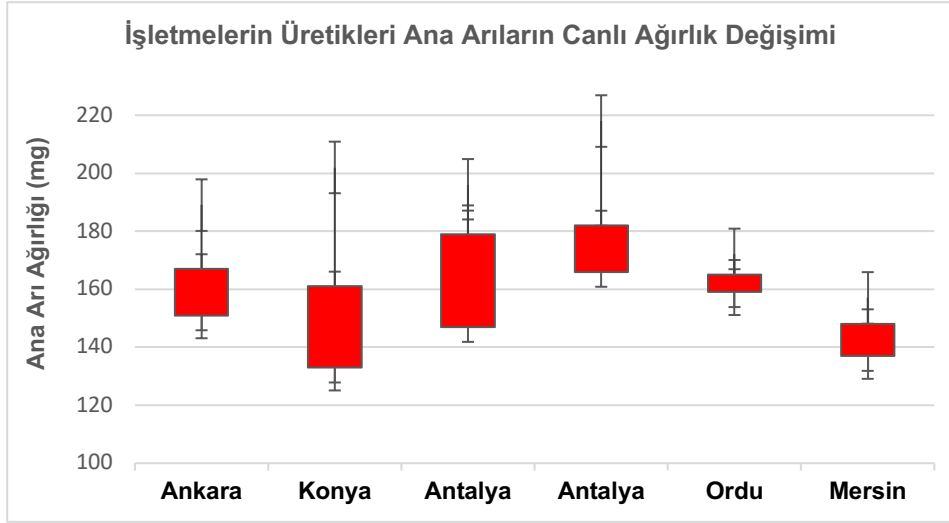
Tablo 1. Farklı ana arı üretim işletmelerinde yetiştirilen ana arılara ait canlı ağırlıkları, sperm kesesi çap, hacim ve spermatozoon sayılarına ilişkin ortalama (±Standart hata) değerleri.

Table 1. Average (±Standard error) values of live weights, diameters of spermathecae, spermathecae volumes and number of the spermatozoon in spermathecae of queen bees reared in different queen production enterprises.

İşletmeler	N	Canlı ağırlık (mg)	Spermatheka çapı(mm)	Spermatheka hacmi(mm ³)	Spermatozoon sayısı (1x10 ⁶)
1	5	167.00±7,48	1,015±0,024	0,55±0,04	0,140±0,059 ^c
2	5	161.00±12,42	1,020±0,024	0,56±0,04	0,218±0,023 ^{cb}
3	5	179,80±8,58	0,996±0,002	0,52±0,01	0,751±0,191 ^a
4	5	182,40±9,15	0,999±0,020	0,52±0,03	0,334±0,051 ^{cba}
5	5	165.00±2,51	1,044±0,021	0,60±0,04	0,650±0,128 ^{ba}
6	5	148.00±3,78	1,017±0,014	0,55±0,02	0,152±0,031 ^c
Ortalama		167,20±3,68	1,015±0,007	0,55±0,01	0,374±0,058

^{a,b,c} farklı harflerle gösterilen ortalamalar birbirlerinden farklıdır, Tukey HSD, (P<0.05).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



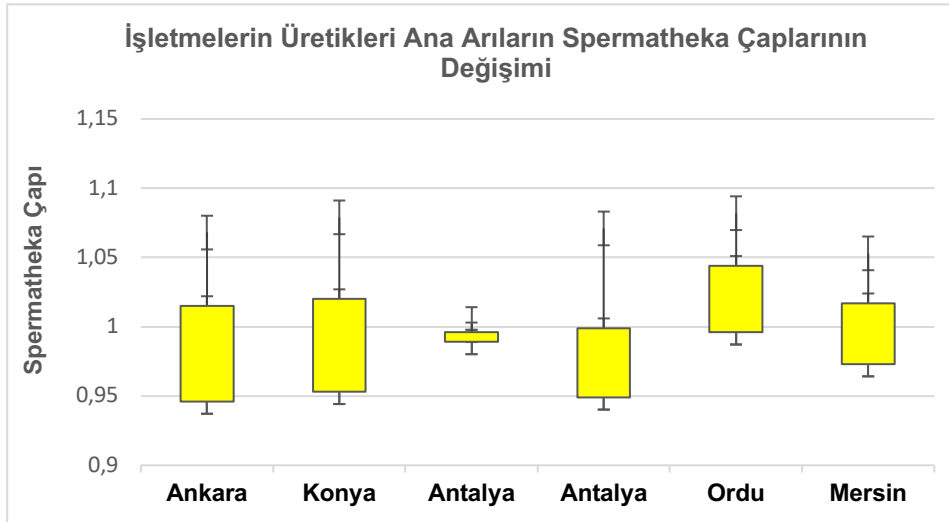
Şekil 1. İşletmelerin ürettikleri ana arıların canlı ağırlık değişimi

Figure 1. Live weight changes of queens produced by enterprises

Spermatheka Çapı

Altı işletmede yetiştirilen ana arıların spermatheka çap ortalamaları arasındaki farkın istatistik olarak önemsiz olduğu bulunmuştur. Ortalamalar arasındaki farklılığa bakıldığında en büyük

spermatheka çapı sırası ile Ordu ve Konya'daki işletmelerde en düşük ise Antalya'daki işletmede gözlenirken diğer işletmelerde yetiştirilen ana arıların spermatheka çapları ise bu iki grup arasında yer almıştır (Tablo 1).



Şekil 2. İşletmelerin ürettikleri ana arıların sperm kesesi çaplarının değişimi

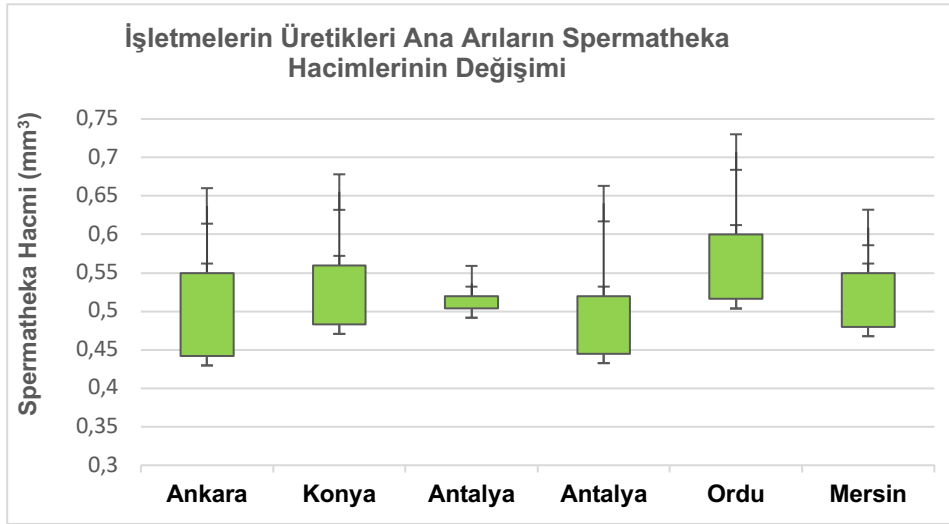
Figure 2. Change of sperm sac diameters of queens produced by enterprises

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Spermateka Hacmi

Ana arıların spermateka hacim ortalamaları arasındaki farklılık istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Ortalamalar arasındaki farklılığa

bakıldığında En büyük spermateka hacmi Ordu'daki işletmede belirlenirken en küçük spermateka hacmi ise Antalya'daki işletmelerde belirlenmiştir. Diğer işletmeler ise bunlar arasında değişim göstermiştir (Tablo 1).



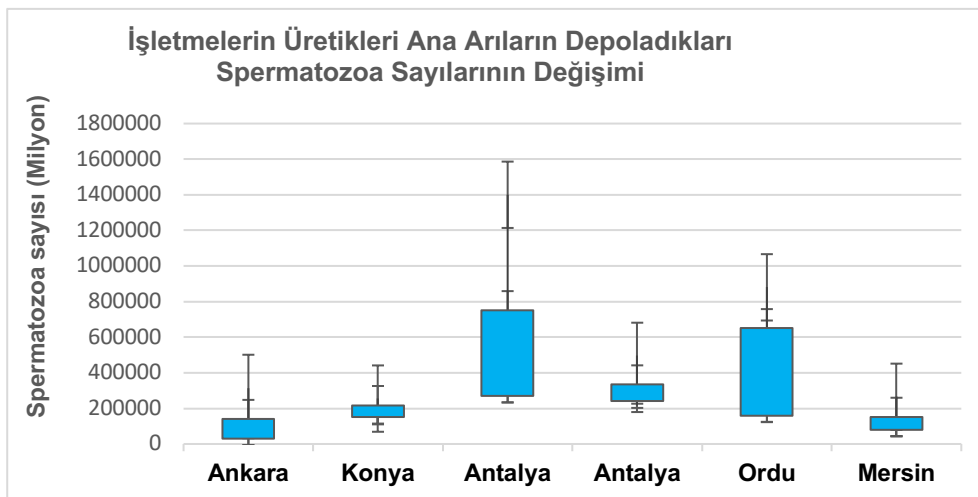
Şekil 3. İşletmelerin ürettikleri ana arıların sperm kesesi hacmi değişimi

Figure 3. Spermathecae volume changes of queens produced by enterprises

Depolanan Spermatozoa Sayısı

Farklı işletmelerde yetiştirilen ana arıların birbirlerinden önemli düzeyde ($P<0.01$) farklı miktarlarda spermatozoa depoladıkları görülmüştür. Ortalama depolanan spermatozoa miktarı

$0,374\pm0,058$ milyon adet/ana arı iken işletmeler arasındaki değişimi ise $0,751\pm0,191$ ile $0,140\pm0,059$ milyon/ana arı arasında belirlenmiştir. En fazla spermatozoa depolayan ana arılar Antalya'daki 3'nolu işletmede, en az ise Ankara'daki 1'nolu işletme grubunda belirlenmiştir.



Şekil 4. İşletmelerin ürettikleri ana arıların spermatozoa sayılarının değişimi

Figure 4. Change of spermatozoa numbers of queens produced by enterprises

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

TARTIŞMA

Türkiye’de mevsimsel ilk ana arı üretimi nisan-mayıs aylarında sıcak iklime sahip olmalarından dolayı sahil kesimlerinde yapılmaktadır. Ana arı üretimi yapan işletmeler, mayıs ayı sonlarına doğru sıcaklığın artması ve floranın azalmasından dolayı sahil kesimlerinden iç kesimlere doğru taşınarak daha yüksek bölgelerde sonbahar döneminin ortalarına kadar ana arı üretimini sürdürürler (Arslan v.d. 2015). Bu çalışmada sonbahar koşullarında ana arı üretimi yapan farklı işletmelerde yetiştirilen ana arıların canlı ağırlık, spermateka çapı, spermateka hacmi ve spermatekada depolanan spermatozoa miktarı yönünden karşılaştırılması yapılmıştır.

Ana arıda öncelikli bir kalite özelliği olan canlı ağırlık (mg/ana arı) hafif (190 mg altı), orta (190-200 mg arası) ve ağır (210 mg ve üstü) olmak üzere üç grupta değerlendirilmektedir. 200 mg ve üzeri ağırlığa sahip olan ana arılar kaliteli olarak kabul edilmektedir (Akyol v.d. 2008a; Hatjina v.d. 2014).

Altı farklı işletmede yetiştirilen ana arıların canlı ağırlık ortalaması $167,20 \pm 3.68$ mg/ana olarak belirlenmiş ve işletmeler arasında farklılık bulunmamıştır. Ölçüm yapılan işletmelerdeki ana arıların tamamı canlı ağırlık düzeyi çok kaliteli (>220 mg/ana) ve kalite olan (<190 mg/ana) sınıf değerlerinden düşük olarak belirlenmiştir. Ana arıda canlı ağırlığın yüksek olması genelde istenmekte ve bir kalite kriteri olarak kabul edilmektedir. Nitekim daha ağır olan ana arıların daha fazla spermatozoa depoladıkları, daha fazla yumurta proteini ürettikleri ve daha fazla yumurtladıkları ve koloniyi genelde daha iyi kontrol ettikleri belirlenmiştir (Tarpı v.d. 2000; Skowronek v.d. 2004; Hatjina v.d. 2014). Ortalama canlı ağırlık daha önce Akdeniz Bölgesi koşullarında yürütülen çalışmada (Güler v.d. 1999) farklı arı ırklarında belirlenen ortalama (167.8 mg/ana) değerleriyle uyumlu bulunmuştur (Arslan v.d. 2015; Arslan v.d. 2018). Antalya ilinde ilkbahar döneminde ve aynı işletmelerde yetiştirilen ana arıların ortalama ($206,23 \pm 20,150$ mg/ana arı ve $191,04 \pm 2,094$ mg/ana arı) değerlerinden düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu aslında yetiştiricilerin başlatma kolonisini iyi hazırladıkları, beslemeyi iyi yaptıkları ve dolayısı ile ana arı yetiştiriciliğini başarıyla uyguladıklarını göstermektedir. Daha önce birçok araştırmacının da belirttiği gibi ana arı çıkış ağırlığını, başlatma kolonisinin popülasyon miktarı, başlatma kolonisine verilen larva sayısı, hava koşulları ve genetik yapı gibi birçok faktörün etkilemesinin yanı sıra mevsim

ve başlatma kolonisine gelen nektar/polen miktarı ve kalitesi de oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Güler v.d. 1999; Genç v.d. 2000; Medina ve Gonçalves 2001; Akyol v.d. 2008b; Koç ve Karacaoğlu 2011). Bu çalışmada belirlenen ortalama canlı ağırlık, sonbahar döneminde (Ağustos-Ekim) kaliteli ana arı yetiştirilemeyeceğini göstermektedir.

Önceki çalışmalar da bu tespiti destekler yönde olup ilkbahar döneminde (Nisan-Mayıs) kaliteli ana arı yetiştirmenin mümkün olduğunu, ancak Ağustos ve Eylül aylarının ise uygun olmadığını ortaya koymaktadır (Güler v.d. 1999; Koç ve Karacaoğlu 2005).

Spermateka çapı ve hacmi yönünden işletmelerde üretilen ana arılar arasında bir farklılık bulunmamaktadır. Altı farklı işletmede üretilen ana arıların ortalama spermateka çapı ve spermateka hacmi sırasıyla $592,29 \pm 96,11$ mm/ana ve $0,55 \pm 0,01$ mm³/ana olarak belirlenmiştir. Kaliteli bir ana arıda spermateka hacminin 1 mm³/ana ve üzeri olması istenirken (Güler 2017) bu çalışmada elde edilen değerlerin istenilen değerlerden oldukça düşük olduğu görülmektedir. Önemli kalite kriterlerinden spermateka çap ve hacmi üzerinde özellikle mevsim ve koloniye gelen polen miktarı ve kalitesi etkili olmaktadır (Koç ve Karacaoğlu 2011; Chuda-Mickiewicz ve Samborski 2019).

Ana arı spermatekasında depolanan spermatozoa miktarı ortalama $0,374 \pm 0,058$ milyon/ana arı olup, işletmeler arasındaki değişimi ise $0,751 \pm 0,191$ ile $0,140 \pm 0,059$ milyon/ana arasında bulunmuştur. İşletmeler arasındaki farklılığın beş kat düzeyinde olduğu görülmektedir (Tablo 1). Bu farklılığın genetik yapı ve özellikle ana arı yetiştiricisinin beceri ve öngörüsünden kaynaklandığı düşünülmektedir. Standartlar ve kalite kavramı dikkate alındığında depolanan spermatozoa miktarının ortalama 5 milyon/ana üzeri olması istenmektedir. Ancak bu çalışmada görüldüğü gibi ana arıların depoladıkları spermatozoa miktarı, standart değerlerin oldukça altındadır. Ayrıca bu çalışmada belirlenen spermatozoa miktarı daha önce birçok araştırmacı (Dodoloğlu ve Genç 1997; Güler v.d. 1999; Güler ve Alpay 2005) tarafından yapılan çalışmalarda belirlenen ortalama spermatozoa miktarlarından (sırası ile $4,625$; $3,66 \pm 0,12$ ve $5,61 \pm 0,10$ milyon/ana arı) çok düşük bulunmuştur. Aynı işletmelerin ilkbahar döneminde yetiştirdikleri ana arılar üzerinde (Arslan v.d. 2015; Arslan v.d. 2018) yapılan çalışmada belirlenen ortalama ($2,2481 \pm 0,816$ ve $4,454 \pm 0,177$ milyon/ana arı) spermatozoa

miktarlarından da oldukça düşük bulunmuştur. Bu çalışmada depolanan spermatozoa miktarının, standartların çok altında olmasının nedeni mevsimsel farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonbahar döneminde nektar akımının ve polen kaynaklarının azalmasından dolayı koloniler, erkek arı üretimini durdurmakta mevcut yetişkin erkek arıları da kovan dışına atarak ölmelerini sağlamaktadır (Güler 2017). Dolayısıyla sonbahar döneminde çok az miktarda erkek arı oluşabilmektedir. Kaliteli ana arı yetiştiriciliğinde bu çalışmada ve daha önceki çalışmalarda da görüldüğü gibi iyi başlatma kolonisi hazırlama, uygun yaşta ve sayıda larva transfer etme gibi uygulamalar tek başına yeterli değildir. Uygun mevsim ve buna bağlı olarak yeterli erkek arı üretime de olmalıdır (Koeniger ve Koeniger 2007; Güler 2008). Bu sebeple ana arı yetiştiriciliğinde kaliteyi tamamlayıcı esas unsur erkek arı yetiştirmektir (Czekonska v.d. 2015). Bize göre kaliteli ve sağlıklı erkek arı yetiştirmeden kaliteli ve verimli ana arı yetiştirmek mümkün değildir. Daha da önemlisi bir ana arının bir üretim sezonunda (Mart-Ekim) döllü yumurta yumurtlamak için ortalama 3 milyon spermatozoa kullandığı (Woyke ve Jasinski 1973; Yu ve Omholt 1999; Güler 2017) dikkate alındığında bu çalışmada 6 ana arı üretim işletmesinin tamamlanmış yetiştirilen ana arıların yarım sezonda bile kullanabilecekleri düzeyde spermatozoa depolayamadıkları görülmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak başarılı ve kaliteli ana arı yetiştirebilmek için genetik ve çevresel faktörlere azami derecede dikkat ederek ana arı üretimi yapılmalıdır. Ana arı üretiminde genetik olarak damızlık değer kazanmış koloniler kullanılırken çevresel faktörlerden başlatma kolonilerinin popülasyonunu, beslenmesini, transfer edilen larvanın yaşını ve sayısını, erkek arı üretimi ve mevsim koşullarını optimum seviyeye çıkarmak gerekmektedir. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre ana arı üretiminin mutlaka yeterli miktarda nektar ve kaliteli polenin bulunduğu uygun mevsimde yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Adgaba, N., Al-Ghamdi, A., Tadesse, Y., Alsarhan, R., Single, A., Mohammed, S E., Khan, KA. 2019. The responses of *Apis mellifera*

jemenitica to different artificial queen rearing techniques. *Saudi journal of biological sciences*, 26(7): 1649-1654, DOI: 10.1016/j.sjbs.2018.08.028.

Akyol, E., Yeninar, H., Kaftanoglu, O. 2008a. Live weight of queen honey bees (*Apis mellifera* L.) predicts reproductive characteristics. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 81(2): 92-100, DOI: 10.2317/JKES-705.13.1

Akyol, E., Yeninar, H., Korkmaz, A., Çakmak, I. 2008b. An observation study on the effects of queen age on some characteristics of honey bee colonies. *Italian Journal of Animal Science*, 7(1): 19-25, DOI:10.4081/ijas.2008.19

Anonim, 2019. Türkiye Tarım ve Orman Bakanlığı verileri. www.tarimorman.gov.tr/Konular/Hayvancilik/Arıcılık

Arslan, S., Arslan, HS., Cengiz, MM., Karakuş, B., 2018. Akdeniz Bölgesinde Erken Dönemde Yetiştirilen Ana Arıların Kalite Kriterlerinin Standartlara Uygunluklarının Belirlenmesi. 6. Uluslararası Arıcılık ve Çam Balı Kongresi, 15-18 Ekim, Fethiye-Muğla, s 42-48.

Arslan, S., Güler, A. Arslan, HS. 2015. Quality criteria and standards compliance with grown queen bee at Mediterranean Region in Turkey. *International Conference on Engineering and Natural Science*, 21-23 January, Bangkok-Tayland, pp 211-220.

Büchler, R., Andonov, S., Bienefeld, K., Costa, C., Hatjina, F., Kezic, N., Wilde, J. 2013. Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, 52(1): 1-30, DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.07

Cengiz, MM., Yazıcı, K., Arslan, S. 2019. The Effect of the Supplemental Feeding of Queen Rearing Colonies on the Reproductive Characteristics of Queen Bees (*Apis mellifera* L.) Reared from Egg and Different old of Larvae. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 25(6): 849-855, DOI: 10.9775/kvfd.2019.21998

Chuda-Mickiewicz, B., Samborski, J. 2019. Effect Of Restricted Pollen Supply to Colonies on The Quality of Reared Queen Bees. *Acta Sci. Pol. Zootechnica*, 18(3): 21-26, DOI: 10.21005 / asp.2019.18.3.04

Czekońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., Samborski, J. 2015. Quality of honeybee drones reared in

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- colonies with limited and unlimited access to pollen. *Apidologie*, 46(1): 1-9, DOI:10.1007/s13592-014-0296-z
- De Souza, DA., Bezzera-Laure, MAF., Franco, TM., Gonçalves, LS. 2013. Experimental evaluation of the reproductive quality of Africanized queen bees (*Apis mellifera*) on the basis of body weight at emergence. *Genetics and Molecular Research*, 12(4): 5382-5391, DOI :10.4238/2013.November.7.13
- Dodologlu, A., Genç, F. 1997. Yetiştirme ve tohumlama yöntemlerinin ana arıların (*Apis mellifera* L.) bazı özelliklerine etkileri. *Türk J Vet Anim Sci*, 21: 379- 385.
- Doğaroğlu, M., Doğaroğlu, OK. 2015. Modern Arıcılık Teknikleri (Arıcılıkta Başarının Yolları). 6 Basım. Anadolu Matbaası, İstanbul. ISBN 975-94210-0-3. s 319.
- Dolasevic, S., Stevanovic, J., Aleksic, N., Glavinic, U., Deletic, N., Mladenovic, M., Stanimirovic, Z. 2020. The effect of diet types on some quality characteristics of artificially reared *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, 59(1):115-123, DOI: 10.1080/00218839.2019.1673965
- Genç, F., Cengiz, MM. 2019. Bal Arısı (*Apis mellifera* L.) Anatomisi, Genetik ve İslahı ile Ana Arı Yetiştiriciliği. Gece Kitaplığı, Ankara. ISBN: 978-605-288-857-5. s 203.
- Gençer, HV., Shah, SQ., Firatli, Ç. 2000. Effects of supplemental feeding of queen rearing colonies and larval age on the acceptance of grafted larvae and queen traits. *Pak. J. Biol. Sci.*, 3(8): 1319-1322.
- Gilley, DC., Tarpy, DR., Land, BB. 2003. Effect of queen quality on interactions between workers and dueling queens in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol*, 55: 190-196, DOI
- Güler, A. 2008. Erkek Arı Yetiştiriciliği ve Balarısı (*Apis mellifera* L.) Kolonileri İçin Önemi. *U.Bee J.*, 8(3):106-111.
- Güler, A., 2017. Bal arısı (*Apis mellifera* L.) Yetiştiriciliği Hastalıkları ve Ürünleri. 1.Basım. Azim Matbaacılık. Ankara, ISBN:978-605-84656-3-3. s 419.
- Güler, A., Alpay, H. 2005. Reproductive characteristics of some honeybee (*Apis mellifera* L.) genotypes. *J. Anim. Vet. Adv.*, 4 (10): 864-870.
- Güler, A., Korkmaz, A., Kaftanoğlu, O. 1999. Reproductive characteristics of Turkish honeybee (*Apis mellifera* L.) genotypes. *Hayvansal Üretim*, 40(1): 113-119.
- Hatjina, F., Bieńkowska, M., Charistos, L., Chlebo, R., Costa, C., Dražić, MM., Kopernicky, J. 2014. A review of methods used in some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical characters and the performance of their colonies. *Journal of Apicultural Research*, 53(3): 337-363, DOI: 10.3896/IBRA.1.53.3.02
- Kahya, Y., Gençer, HV., Woyke, J. 2008. Weight at emergence of honey bee (*Apis mellifera caucasica*) queens and its effect on live weights at the pre and post mating periods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2): 118-125, DOI: 10.1080/00218839.2008.11101437
- Kandemir, I., Kence, M., Kence, A. 2000. Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of Turkey. *Apidologie*, 31(3): 343-356, DOI: 10.1051/apido:2000126
- Koç AU., Karacaoğlu, M., 2005. Anadolu Arısı Ege Ekotipi (*Apis mellifera anatolica*) Ana arılarında Üreme Özellikleri. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2(1) : 73 – 77.
- Koç, A. U., Karacaoğlu, M. 2011. Effects of queen rearing period on reproductive features of Italian (*Apis mellifera ligustica*), Caucasian (*Apis mellifera caucasica*), and Aegean ecotype of Anatolian honey bee (*Apis mellifera anatolica*) queens. *Türk J Vet Anim Sci.*, 35(4):271-276, DOI: 10.3906/vet-1007-375
- Koeniger, N., Koeniger, G. 2007. Mating flight duration of *Apis mellifera* queens: As short as possible, as long as necessary. *Apidologie*, 38(6): 606-611, DOI: 10.1051/apido:2007060
- Kösoğlu, M., Yücel, BY., Özsoy, N., Topal, E., Engindeniz, S. 2017. Türkiye Arıcılığında Ana Arının Koloni Gelişimine ve Arıcılık Ekonomisine Etkisi. *Tarım Ekonomisi Dergisi*, 23(1): 55-60, DOI: 10.24181/tarekoder.325618
- Lee, KV., Goblirsch, M., McDermott, E., Tarpy, DR., Spivak, M. 2019. Is the Brood Pattern within a Honey Bee Colony a Reliable Indicator of Queen Quality?. *Insects*, 10(1): 12, DOI: 10.3390/insects10010012

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Medina, LM., Goncalves, LS. 2001. Effect of weight at emergence of Africanized (*Apis mellifera* L.) virgin queens on their acceptance and beginning of oviposition. *Amer. Bee J.*, 141(3): 213-215.
- Okuyan, S., Akyol, E. 2018. The effects of age and number of grafted larvae on some physical characteristics of queen bees and acceptance rate of queen bee cell. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(11): 1556-1561, DOI: 10.24925/turjaf.v6i11.1556-1561.1955
- Öztürk, Al. 2014. Ana Arıda Kalite Kavramı ve Ana Arı Kalitesini Etkileyen Faktörler. *Anadolu*, 24 (1): 59-65.
- Payne, AN., Rangel, J. 2018. The effect of queen insemination volume on the growth of newly established honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie*, 49(5): 594-605, DOI: 10.1007/s13592-018-0587-x
- Skowronek, W., Bieñkowska, M., Kruk, C. 2004. Changes in body weight of honey bee queens during their maturation. *Journal of Apicultural Science*, 48(2): 61-68.
- Tarpy, DR., Hatch, S., Fletcher, DJ. 2000. The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. *Animal behaviour*, 59(1): 97-101. DOI: doi.org/10.1006/anbe.1999.1311
- TÜİK, 2019. Hayvancılık İstatistikleri. Erişim Yeri: <http://rapory.tuik.gov.tr/07-04-2017-> 1:53:58-64048506413061954602122917994.html. Erişim Tarihi: 15.03.2020.
- Woyke, J. 1971. Correlations between the age at which honeybee brood was grafted, characteristics of the resultant queens, and results of insemination. *Journal of Apicultural Research*, 10 (1): 45-55. DOI: 10.1080/00218839.1971.11099669
- Woyke, J., 1979. Effect of the access of worker honey bees to the queen on the results of instrumental insemination. *Journal of Apicultural Research*, 19(2): 136-143. DOI: 10.1080/00218839.1979.11099957
- Woyke, J. 1983. Dynamics of entry of spermatozoa into the spermatheca of instrumentally inseminated queen honeybees. *Journal of Apicultural Research*, 22(3): 150-154. DOI: 10.1080/00218839.1983.11100579
- Woyke, J., Z., Jasinki, 1973. Influence of external conditions on the number of spermatozoa entering the spermatheca of instrumentally inseminated honeybee queens. *Journal of Apicultural Research*, 12(13): 145-151. DOI: 10.1080/00218839.1973.11099742
- Yu, R., Omholt, SW. 1999. Early developmental processes in the fertilised honeybee (*Apis mellifera*) oocyte. *Journal of insect physiology*, 45(8): 763-767. DOI: 10.1016/S0022-1910(99)00056-6

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

CHEMICAL INVESTIGATIONS ON HONEY PRODUCED IN BINGOL AND SURROUNDINGS

Bingöl ve Yöresinde Üretilen Balların Kimyasal İncelenmesi

Yilmaz ATEŞ¹, Semih YAŞAR^{2*}

¹Bingol University, Faculty of Science and Art, Department of Chemistry, Bingol, TURKEY, ORCID NO: 0000-0003-2105-094X, E-posta: atesyilmaz0012@gmail.com

² Van Yuzuncu Yıl University, Ozalp Vocational School, Department of Medical Laboratory Technician, Van, Turkey, ORCID NO: 0000-0003-2754-6030, E-posta: semihyasar@yyu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 02.04.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 06.05.2020

DOI:10.31467/uluaricilik.713308

ABSTRACT

Bingol and the surrounding vicinity with its climatic conditions and rich flora is a convenient area for beekeeping. In this region, beekeeping activities are increasing day by day. In this study, by analyzing saccharose, invert sugar, pH, moisture and diastase enzyme activity, it is aimed to determine the conformity of the flower honey with standards that are produced in Bingol and its surrounding area. For this purpose, 7 honey samples were collected from seven distinct areas of Bingol and its surrounding (Bingol - Central, Kigi, Solhan, Karlıova, Yayladere, Genc, Adakli) and analyzed. The average contents of sucrose, invert sugar, pH, moisture and amylase enzyme activity in honey samples were determined to be 1.65%, 80.23%, 2.81, 15.43% and 0.074 units mL⁻¹, respectively. When the biochemical analysis average of all the regions was taken into consideration, the honey was found to comply with the Turkish Food Codex, and TS 3036 criteria in terms of the examined parameters. In order to develop the beekeeping industry and high quality honey production in this region, educational activities and financial support -with various projects - should be increased. The next step is to announce the findings obtained here about Bingol honey to the whole country and even abroad, with adequate advertising activities.

Key Words: Flower honey, Invert sugar, pH, Moisture, Sucrose.

ÖZ

Bingöl ve yöresi zengin florası ve iklim koşulları ile arıcılığa oldukça elverişli bir bölgedir. Bölgede arıcılık faaliyetleri gün geçtikçe artmaktadır. Bu çalışmada Bingöl ve yöresinde üretilen çiçek ballarının sakkaroz, invert şeker, pH, nem ve diastaz enzim aktivitesi analizlerinin yapılarak sonuçların standartlara uygunluğunun belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla Bingöl ve yöresindeki 7 ayrı bölgeden (Bingöl Merkez, Kiğı, Solhan, Karlıova, Yayladere, Genç, Adaklı) 7 adet bal örneği toplanarak analizleri yapıldı. Bal örneklerindeki sukroz, invert şeker, pH, nem ve amilaz enzim aktivitesinin ortalama içeriği sırasıyla %1,65, %80,23, 2.81, %15,43 ve 0,074 birim mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Tüm bölgelerin biyokimyasal analizlerinin ortalaması incelendiğinde bakılan parametreler bakımından balların Türk Gıda Kodeksi ve TS 3036 kriterlerine uyduğu tespit edildi. Bölgede arıcılığın gelişmesini ve kaliteli bal üretimini sağlayabilmek için eğitimsel faaliyetlerin ve çeşitli projelerle mali desteğin artırılması gerekmektedir. Bundan sonraki en büyük adım Bingöl balı markasının yeterli reklam faaliyetleri ile tüm yurda ve hatta yurtdışına duyurulmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Çiçek balı, invert seker, Nem, pH, Sakkaroz.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Amaç: Bal, içeriğinde bulunan amino asitler, şekerler, karotenoidler, enzimler, mineraller, organik asitler, aromatik maddeler ve vitaminler gibi birçok yapı bulunan doğal bir besin maddesidir. Yapısında farklı biyolojik etkiler gösteren pek çok antioksidan madde içermektedir. Türkiye bal üretimi için çok uygun mevsim şartlarına ve bitki örtüsüne sahiptir. Bal, üretim esnasında üzerinde oynanması mümkün bir gıdadır. Bu sebeple üretilen balların kalitesi sağlık açısından da önem arz etmektedir. Bu çalışmada Bingöl ve yöresinde üretilen balların bazı kimyasal özelliklerinin tesbit edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Bingöl, Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesi sınırları içerisinde yer alan bir ilidir. Çalışma için bal numuneleri 2013 yılı Ağustos-Ekim ayları arasında bölgede bal üretimi yapan arıcılardan temin edildi. Bu çalışmada materyal olarak 7 adet çiçek balı örneği kullanıldı. Temin edilen bal numuneleri, ağız kapalı kaplar içersine alındı ve analizler bitinceye kadar oda ısısında (22°C'de) saklandı. Bu bal örneklerinde invert şeker, sakkaroz, diastaz enzim aktivitesi, pH ve nem değerleri incelendi.

Bulgular: Bingöl ve yöresinden temin edilen ballarda invert şeker, sakkaroz, pH, nem ve diastaz aktivitesi analizleri yapıldı. Analizler sonucunda ortalama invert şeker %80.23, sakkaroz %1.65, pH 2.81, nem %15.43 ve amilaz enzim aktivitesi 0.074 units mL⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada incelenen 7 farklı bal numunesinin tümü invert şeker, sakkaroz ve nem değerleri açısından standartlara uygun sonuçlar göstermiştir. Amilaz enzim aktivitesi için belirli bir standart yoktur, ancak tesbit edilen sonuçlar daha önce yapılmış çalışmalara yakın bulunmuştur. Ülkemizde işsizlik büyük bir problemdir. Bu sebeple doğu illerinden batıdaki büyük şehirlere göç gün geçtikçe artmaktadır. Arıcılık bölge insanı için iyi bir iş alanı oluşturmaktadır. Ancak bu işin bilinçsiz yapılması insan sağlığını tehlikeye atabilmektedir. Bu sebeple arıcılık yapmayı düşünen kişiler için eğitim kursları düzenlenerek konu hakkında bilgili kişilerin bu alanda çalışmaları sağlanmalıdır. Bölgede arıcılığın teşvik edilmesi bölge ekonomisini olumlu yönde etkileyecektir. Yaptığımız çalışmada sadece bu bölgede üretilen balların bazı kimyasal özellikleri ortaya konmuştur. Bölge balı ile ilgili daha farklı analizler içeren çalışmaların planlanarak yapılması ve Bingöl balının diğer bölge ballarından farklı yönleri olup olmadığı ortaya konmalıdır. Devlet

eli ile bölgeye gerekli yatırımların yapılmasıyla bölgede Bingöl balı markasının oluşumu şehrin ekonomisine olumlu etkiler yapacaktır.

INTRODUCTION

Honey is a sweet nutritional substance formed through the chemical transformation of nectar collected by bees from flowers and fruit buds. This transformation takes place in a specialized organ of the bee called "the honey stomach" (sometimes also called the "crop") and is performed by invertase enzyme activity. Bees then store this substance into honeycomb cells in their hives. The Turkish Food Codex defines honey as: "The natural product matured in the honeycomb by the honey bees (*Apis mellifera*), which is formed it by collecting the plant nectars or the secretions of the plant-sucking insects living on the organic parts of plants, and this is transformed using certain specific substances which reduce its water content" (TFC) (Rescript of Honey with date and no: 2012/58). According to this rescript, the sucrose content of the flower honey should not be higher than 5-10%, its invert sugar volume should higher than 60%, and its moisture content should not be above 20%. The rescript does not specify any pH or amylase enzyme activity limits for honey (TFC 2012).

Honey is a natural sustenance that contains numerous components like sugars, enzymes, amino acids, organic acids, carotenoids, vitamins, minerals, and aromatic substances. It is also quite rich in terms of flavonoids and phenolic acids, which have natural antioxidant properties in addition to their numerous biological effects (Alqarmi et al. 2012). The content, color, aroma, and taste of the honey are in essence dependent upon the flowers, geographical region, climate, and the honeybee species that produce it. The properties of honey are also influenced by environmental conditions, processing methods, adulteration and other types of manipulations, packaging, and the duration of its storage period (Tornuk et al. 2013, Escuredo et al. 2014).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 1: The specifications of honey according to the Rescript of Honey (2012/58; TFC, 2012)

Feature (per 100 g of honey)	Flower Honey	Secretion Honey	Mixture
Moisture (max, g)	20	20	20
Sucrose (max, g)	5-10	5-10	5-10
Fructose + glucose (at least, g) (at 100 g)	60	45	45
Water insoluble substance (max, g)	0.1	0.1	0.1
Free acidity (max, meq kg ⁻¹)	50	50	50
Number of diastasis (minimum)	8	8	8
HMF (max, ppm)	40	40	40
Proline (minimum, ppm)	300	300	300
Naphthalene (max, ppb)	10	10	10

Turkey is geographically quite suitable for honey production in terms of climate conditions and stands forth as one of the prominent honey producer countries due to its rich plant fauna. The province of Bingöl is located towards the eastern regions of Turkey, which has rich plant diversity. These properties help make it a province in which high-quality honey is produced in general (Bilgen Çınar 2010).

This study aims to determine certain chemical properties of honey produced in the Bingöl Province of Turkey.

MATERIALS AND METHODS

The province of Bingöl is located in the Eastern Anatolian region of Turkey and has a surface area of 8.004 m² and an altitude of 1159 m. To determine the invert sugar, sucrose, diastase enzyme activity, pH, and moisture content of the honey produced in the province, honey samples were obtained directly from producers between August – October, 2013. Honey samples were collected from producers in the provincial center, Adakli, Karliova, Genc, Solhan, Kigi and Yayladere regions. In the initial feeding of the bees, the producers in Kigi, Adakli and Genc regions said that they used honey, producers in other regions used sugar solutions. A total of 7 different types of honey samples were obtained, which were collected in lid cups and were kept at room temperature (22°C) during the analysis period. No physical or chemical process was applied to the honey samples during the storage.



Figure 1: Regions where honey samples were collected

Invert sugar content analysis of honey samples were determined according to the TS 3036 honey standard using Carrez-1, Carrez-2, Fehling-A and Fehling-B solutions (Anonymous 2002).

Determination of sucrose content in honey samples was performed according to the amount of invert sugar calculated using Fehling-A and Fehling-B solutions according to the TS 3036 honey standard (Anonymous 2002).

pH level analysis of honey samples was completed using a pH meter (Selecta Spain) (Anonymous 2002).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Moisture amounts in honey samples were determined using a refractometer (Optic Ivymen System Spain) (Anonymous 2002).

Determination of amylase enzyme activity was carried out using the Harmonized Methods of the International Honey Commission (Anonymous, 2020) method which involved using a UV-Spectrometer (Boeco S-22 UV/Vis Germany) method.

All analyzses were performed in 3 replicates. The results were averaged across the 3 replicates.

RESULTS

The results of the sucrose, invert sugar, moisture content, pH, and amylase enzyme activity of honey samples collected from the Bingol province are provided below.

Table 2: The analysis results for honey samples produced in the Bingol Province.

	Sucrose (%)	Invert Sugar (%)	pH	Moisture (%)	Amylase Activity (units mL ⁻¹)
Bingol Adakli	1.83	83.33	2.91	15.40	0.0043
Bingol Karliova	1.63	78.43	2.69	15.00	0.0100
Bingol Genc	1.61	79.68	2.71	15.60	0.0080
Bingol Solhan	1.58	79.05	2.91	16.20	0.0046
Bingol Downtown	1.86	84.03	2.88	15.80	0.0060
Bingol Kigi	1.76	81.63	2.68	15.20	0.0120
Bingol Yayladere	1.31	75.47	2.86	14.80	0.0067
Average value	1.65	80.23	2.81	15.43	0.0074

The sucrose percentage was found to be the highest in downtown areas whereas it was lowest in Yayladere. The average sucrose percentage for Bingol sampling sites was found to be 1,65%.

The highest invert sugar percentage was found in downtown areas, whereas the lowest was found in Yayladere. The average amount of invert sugar of all samples in the region was calculated to be 80.23%.

Among the regions, the pH value was measured to be the lowest in Kigi and the highest in Solhan and Adakli region. The average pH value of the entire region was found to be 2.81.

The humidity percentage was measured to be the highest in Solhan and the lowest from the Yayladere region. The average humidity value in the Bingol region was calculated to be 15.43.

According to the amylase enzyme activity results, the highest value was measured from the Kigi region and the lowest from the Adakli region. The average amylase enzyme activity was determined to be 0.0074 units mL⁻¹ across all of the regions.

DISCUSSION

Honey has been a valued sustenance consumed by humans for a long time. Its economic value makes it a target for certain types of adulteration that aim to cheat the consumers. Pure honey consists only of the honey produced by the bees from the flower nectars and contains no additives. Producers sometimes use various sugar syrups during the honey production to increase the yield (Pradkar and Irudayaraj 2001). All types of products obtained from bees represent a great importance in terms of human health. These products are called “honey products”, and include honey, pollen, royal jelly, beeswax, bee venom, and propolis (Armon 1980; Padilla et al. 1992). The quality and standardization of honey is therefore very important for public health. Considering this, Turkey has established quality control standards for honey. These are the Honey Rescript of the Turkish Food Codex (TFC 2012) and the Turkish Standards referred to as the 3036 Honey Standard (Anonymous 2002).

According to the specifications provided in these standards, flower honey can not have more than 5% sucrose, while this limit increases to 10% for

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

honeydew honey (TFC 2012). A high level of sucrose is an unwanted property in a high quality honey. The nectar that forms the basic content of honey usually contains around 20% sucrose. This ratio changes as the honey matures. This alteration occurs as a significant portion of sucrose hydrolyzes into fructose and glucose. During the maturation, therefore, the sucrose levels decrease, as the fructose and glucose levels increase (Aydoğan 1990.)

A study performed on honey samples collected from different regions of Turkey has presented the average sucrose level as 2.24%. The same study presents the sucrose levels for the Eastern Anatolian region of Turkey (consists of the provinces of Erzincan, Elazığ, Erzurum, Kars, Tunceli, Malatya, and Bingöl) as “between 1.06% and 23.20%” (Gül 2008). Another study performed on Eastern Region honey samples presents the sucrose levels for Semdinli and Yuksekova honey as 3.01% and 2.71%, respectively (Sunay 2006). A study performed on Black Sea Region honey samples present the average sucrose level as 1.54% (Güler 2005). Another study performed on Black Sea Region honey samples, however, reports the same value as 3.62% (Derebasi et al. 2014).

Hatay region sunflowers and highland honey samples were also evaluated in a study, which report the sucrose levels as 2.84% and 1.9%, respectively (Sahinler and Gül 2004). Blackthorn and sunflower honey samples of the Edirne province were also tested in another study, and the average sucrose level was given as 1.67% (Akdeniz et al. 2013). A study performed on Erzurum province honey samples presents the average sucrose level to be between 1.8 and 2.45% (Erdogan et al. 2005). A study focusing on Kars province honey presents the sucrose level to vary between 0.95% and 18.05% (Duman Aydın et al. 2008). Batu et al. (2013) have investigated the honey produced in Eastern Anatolia and Eastern Black Sea Regions and reported that average sucrose levels varied between 2.19% and 5.25% (Batu et al. 2013). Domestic and Iran-based honey offered for consumption in market in the province of Van were investigated in a study, which report the sucrose levels as 6.69% and 12.77%, respectively (Akyuz 1996). Another study which tested the honey in the market in the same province reports the sucrose level as 2.37% (Mis, 2010).

In the present study, the sucrose levels of all 7 different Bingöl region honey samples inspected

were found sucrose levels below 5%. The lowest sucrose level (1.31%) was found in the Bingöl-Yayladere sample, while the highest (1.86%) was found in the Bingöl-Downtown sample. The average of all samples in terms of sucrose levels was determined as 1.65%. None of the samples inspected in our study had sucrose levels beyond the limits set forth in the relevant standards.

When the sucrose levels of the regional honey are examined, it is seen that there are no big differences between the regions although there was only one sample from each site. This shows that the level of maturation of honey in the region is close to each other.

The primary content of honey consists of sugars. The majority of sugars found in honey are monosaccharides (glucose and fructose), while a small portion is made up of other sugars (disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides). The invert sugars found in the honey (glucose and fructose) are formed as the sucrose in the nectar is decomposed into glucose and fructose due to invertase enzyme activity. Approximately 69-78% of honey consists of invert sugars. Extended periods of storage cause the invert sugar levels of the honey to drop (Tolon 1999). Turkish Food Codex (TFC 2012) states that invert sugar content of honey should be above 60%.

Various studies performed at different times in our country report the average invert sugar level of honey as the following: Mis (2010) as 68.58%, Sahinler and Gül (2004) as 66.20% and 69% for highland and sunflower honey, respectively, Akyuz (1996) as 70.71% and 65.10% for domestic and Iran-based honeys, Gül (2008) as 72.16% for Eastern Anatolian region honey, Güler (2005) as 68.42% for the Black Sea Region honey, Unal and Kuşlu (2006) as 71.56% for honey sold at the market for consumption, Sunay (2006) as 73.16% and 72.88% for Semdinli and Yuksekova honeys, respectively, Erdogan et al. (2005) as “between 69.68% and 74.12%” for the honey samples obtained from Erzurum region, Duman Aydın et al. (2008) as “between 51% and 85%” for the honey samples of Kars province, while Batu et al (2013) reported the average invert sugar content for honey samples as “between 62.38% and 79.97%”.

In the present study, the highest invert sugar content for the Bingöl province honey samples were determined in the Bingöl-Downtown sample with 84.03%, while the lowest was determined in the

Bingol - Yayladere sample with 75.47%. Average invert sugar content in all the honey samples was determined as 80.23%. These results indicate that all the honey samples obtained from the region are in line with the specifications of the Turkish Food Codex (TFC 2012). Comparing these results to the findings of other studies performed on the Eastern Anatolian region honey samples reveals that the average invert sugar levels of the honey samples inspected as part of this study are higher than the findings of 72.16% determined by Gul (2008) and of 69.68% and 74.12% by Erdogan et al. (2005) for Erzurum region honey samples.

The calculated invert sugar levels of honey in all regions were very close to each other even though one sample was taken from each region. Since honey samples were taken directly from the producer, the storage time was not extended. This value may decrease when the storage time increases.

Honey is naturally acidic, and its pH value often varies between 3.2 and 4.5. The acidity of honey is basically caused by its gluconolacton and gluconic acid content (White 1975). Honey has an acidic pH and this property prevents most types of bacteria to develop in its environment, particularly that of pathogens of animal origin, as these bacteria require an optimum pH level of 7.2 to 7.4 (Molan 1992). The pH values of honey are dependent upon the level of the various acids they contain, along with their mineral contents (calcium, sodium, potassium, and other ash compounds). Honeys with rich mineral salt content usually have higher pH values (Lawless et al. 1996).

Various studies performed in Turkey report the average pH levels for honey as the following: Gul (2008) as 3.34 for the honey samples obtained from Eastern Anatolian region, Yilmaz (2000) as 3.8, Ilgin (2010) as 2.95 on average, Guler (2005) as 4.96 on average, Sahinler and Gul (2004) as 6.36 and 5.6 for highland and sunflower plant honey samples, respectively, Gundogan (2009) as "between 4.29 and 4.89" for Muğla pine honey, Haroun (2006) as 3.38 for sunflower plant honey, Duman Aydın et al. (2008) as "between 2.21 and 3.54", Erdogan et al. (2005) as "between 3.90 and 4.35", Kurt and Yaman Karadeniz (1982) as 4.32 on average, Akyuz et al. (1995) as 4.11 on average, Batu et al. (2013) as 4.1 on average, and Kaplan (2014) as "between 3.58 and 6.45".

In the present study, the highest pH value for the honey samples obtained from Bingol province was determined from the Bingol-Solhan sample as 2.91, while the lowest value was determined from the Bingol - Kigi sample as 2.68. The average pH value for all regions was determined as 2.81. Turkish Food Codex (TFC 2012) specifies no standard pH value for the honey. The findings in our study in terms of pH levels were lower compared to the findings of other studies performed on Eastern Anatolian region honeys, like the pH findings of Gul (2008) with 3.34, of Ilgin (2010) with 3.95, and of Erdogan et al (2005) with 3.90 and 4.35. While the distance between the study areas of these studies is small, the difference found can still be attributed to differences in environmental conditions, and the genetic properties of the bees that produced the honey.

High values of moisture content in honey can result in crystallization, and facilitates bacterial deterioration, leading to reduced shelf life (Tosi et al. 2002; Rodriguez et al. 2004). The moisture content of honey should stay below 20%, or the honey becomes susceptible to fermentation from osmophilic yeasts (Krell 1996; Belitz et al. 1999).

Various studies have been performed all around Turkey to investigate the moisture content of honey specimens of different regions, and the results reported by the researchers are as follows: Akdeniz et al. (2013) as an average of 17.60%, Derebasi et al. (2014) as 16.66%, Ilgin (2010) as 19.65%, Unal and Kuplulu (2006) as an average of 15.62%, Bozkurt and Aydoğan (1986) as an average of 14.88%, Tolon (1999) as 17.05%, Akyuz et al. (1995) as 17.8%, Sahinler and Gul (2004) as 15.23% and 18.1% for highland and sunflower plant honeys, respectively, Erdogan et al. (2005) as "between 15.35% and 20.50%", Akyuz (1996) as 16.82% and 17.61% for domestic and Iran origin honeys, respectively, Aydogan et al. (1990) as 15.84%, Yilmaz (1994) as 16.0%, Gul (2008) as 17.92%, Duman Aydın et al. (2008) as "between 13.2% and 19.2%", Haroun (2006) as 16.49%, and Kutlu and Bengu (2015) as 15.35%.

In the present study, the highest moisture content amongst the inspected honey specimens obtained from the province of Bingol was determined from the Bingol - Solhan sample with 16.2%, while the lowest was determined from the Bingol - Yayladere sample with 14.8%. The average of all region samples in terms of moisture content was determined to be 15.43%. The Turkish Food Codex (TFC 2012)

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

specifies the moisture content standard for honey should not exceed 20%. Accordingly, all samples obtained from the province of Bingöl are within this standards.

As a result of the moisture analysis of the honey, it is seen that there is a small difference between the lowest (Yayladere) and the highest (Solhan) values even though only one sample was obtained from each region. This may be indicative that the honey was harvested at the optimum maturation period.

All 7 samples evaluated in this study were found to have properties that are within standards in terms of invert sugar, sucrose, and moisture content parameters.

It is believed that the amylase activity of honey is related to the temperature and maturation level of honey (White et al. 1964). A study has tested storage of different honey samples in temperatures varying between -20°C and 60°C, and the amylase enzyme was found to have reduced activity in higher temperatures (White et al. 1962). Amylase is an important enzyme within the honey that makes its digestion easier and it is secreted from the salivary glands of the bees. This enzyme is destroyed from thermal processing or if the storage period is long, and therefore can be used as an indicator for the freshness of honey (Kahraman and Kupullu 2011). Amylase destroys polysaccharides and is added to the honey by the bees during its storage period within the honeycomb. Its ratio within the honey can, therefore, change during the in-hive period. Any thermal process applied to the honey before it is being presented to the market lowers its diastase count (Artık and Poyrazoglu 2007). The term “diastase count” is used in honey, instead of “diastase (amylase) activity”. This “diastase count” refers to the polysaccharide weight (in terms of grams) of 1 gram of honey that can be destroyed within 1 hour at 40°C (Sahinler et al. 2001). According to the Turkish Food Codex Rescript of Honey (2012/58), the “diastase count” of honey should at least be 8. Babacan and Rand (2007) have characterized the amylase enzyme of honey and have measured the enzymatic activity as 0.0134 units mL⁻¹.

The highest enzymatic activity found in the present study as a result of the α -amylase activity measurements was found in the Bingöl - Kigi sample with 0.0120 units mL⁻¹, while the lowest was determined from the Bingöl-Adaklı sample of 0.0043 units mL⁻¹. No standard has been specified for the

amylase enzyme activity in the Turkish Food Codex Rescript of Honey (TFC 2012; 2012/58).

Amylase enzyme activity results differ between regions. Low activities can be caused by problems that occur during the supply and transportation of honey. However, the lack of a standard for amylase enzyme activity and the inadequacy of studies make it difficult for us to explain the difference observed in our study.

CONCLUSION

Unemployment causes a continuous wave of migration from eastern regions to the west of Turkey. The eastern regions have a rich variety of plant fauna, which is mostly due to different factors such as, climate, geographical variations and sunlight. The winters of the region are harsh, but the spring and summer months are quite warm due to the excessive amounts of sunlight available. The resulting rich plant fauna represents a great opportunity for beekeeping. Considering the fact that beekeeping is a business that requires relatively lower investment and no closed area, it also represents a great economic opportunity for the rural regions.

As a result of our analysis, it has been observed that all parameters measured are in compliance with TFC standards. These results are promising in terms of promoting regional beekeeping. However, it is still not sufficient. Microscopic and other analysis of honey obtained from the regions should be performed regularly. In this way, compliance with the standards can be tested and maintained. For this reason, it is important to increase the number of studies and financial support for these studies.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Bingöl University Coordination Unit of Scientific Research Projects, with project no: BAP-223-88-2011. This study was produced as a part of Yılmaz ATEŞ's master thesis.

REFERENCES

- Akdeniz, G., Sahin, S., Yilmaz, O., Karatas, U., Karmaz, E., Kabakcı, D., Yasar, N. (2013). Comparison of Microscopic Structure and Biochemical Properties of Blackthorn (*Paliurus spina-christi* Miller) and Sunflower

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- (*Helianthus annuus* L.) Honey. *Aricilik Arastirma Dergisi*. 5(9): 22-25.
- Akyuz, M. 1996. Investigation of physical, chemical and sensory properties of local and Iranian honeys offered for consumption in Van. Van Yuzuncu Yil University Health Sciences Institute (Master Thesis), Van.
- Akyuz, N., Bakirci, I., Ayar, A., Tuncturk, Y. 1995. A research on some physical and chemical properties of honey sold in the Van market and their conformity to the relevant standard. *Gida*. 20(5): 321-326.
- Alqarni, AS., Owayss, AA., Mahmoud, AA. 2014. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society*. 18: 618-25.
- Anonymous, 2002. Honey Standard. Turkish Standardization Institute TS 3036/March 2002, Ankara, s.23
- Anonymous, 2020. <http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf> (Date of access: 03 March 2020).
- Armon, PJ. 1980. The use of honey in the treatment of infected wounds. *Tropical Doctor*. 10:91.
- Artik, N., Poyrazoglu, E. 2007. Honey and Honey Analysis, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Department of Publications. Ankara-Turkey.
- Aydogan, A., Ozalp, E., Bozkurt, M. 1990. Research on the chemical structures of our local honey. *Turk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 48: 55-84.
- Babacan, S., Rand, AG. 2007. Characterization of honey amylase. *Journal of Food Science*. 72(1): C050-5.
- Batu, A., Küçük, E., Çimen, M. 2013. Determination of physicochemical and biochemical values of flower honeys in Eastern Anatolia and Eastern Black Sea regions. *Gida Teknolojileri Elektronik Dergisi*. 8(1): 52-62.
- Belitz, HD., Grosch, W., Schieberle, P. 1999. Food Chemistry, 2nd Edition, Springer-Verlag; p. 821- 828, Berlin Heidelberg.
- Bilgen Çınar, S. 2010. Analytical properties of Turkish pine honey. Ankara University Institute of Science (Master Thesis), Ankara.
- Bozkurt, M., Aydogan, A. 1986. Research on the chemical composition of honeys from different regions of Turkey. *THT-Biyoloji Dergisi*. 43(1): 1-22.
- Derebasi, E., Bulut, G., Col, M., Guney, F., Yasar, N., Erturk, O. 2014. Physicochemical and Residue Analysis of Honey from Black Sea Region of Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*. 23(1): 10-7.
- Duman Aydin, B., Sezer, C., Bilge Oral, N. 2008. Investigation of quality qualities of strained honey for sale in Kars. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 14(1): 89-94.
- Erdogan, Y., Dodologlu, A., Zengin, H. 2005. Effect of different environmental conditions on honey quality. *ataturk universitesi ziraat fakultesi dergisi*. 36(2): 157-62.
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., Seijo, MC. 2014. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*. 149: 84-90.
- Gul, A. 2008. Investigation with regard to food safety, the structural features of some honey produced in Turkey. Mustafa Kemal University Institute of Science (Master Thesis), Hatay.
- Guler, Z. 2005. Chemical and sensory properties of honey produced in the Eastern Black Sea Region. *Gida*. 30(6): 379-84.
- Gundogan, M. 2009. Chemical analysis of pine honey in Mugla region. Mugla University Institute of Science (Master Thesis), Mugla.
- Haroun, MI. 2006. Determination of phenolic and flavonoid profiles of some floral and honeydew honeys produced in Turkey. Ankara University Institute of Science (Master Thesis), Ankara.
- Kahraman, D., Kuplulu, O. 2011. Determination of HMF and diastasis activity in filtered honey. 4. National Veterinary Food Hygiene Congress, Antalya, October 13-16.
- Kaplan, HB. 2014. Aegean region chemical properties of honey. Pamukkale University Institute of Science (Master Thesis), Denizli.
- Krell, R. 1996. Value-Added Products from Beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124 Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Kurt, A., Yaman Karadeniz, R. 1982. A research on strained honey consumed in Erzurum city center. *Gida*. 7(3): 115-20.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Kutlu, M., Bengu, AS. 2015. Determination of quality criteria of honey produced in Gaziantep. *Türk Doga ve Fen Dergisi*. 4(1): 48-53.
- Lawless, HT., Horne, J., Giasi, P. 1996. Astringency of organic acids is related to pH. *Chemical Senses*. 21(4): 397-403.
- Mis. I. 2010. Biochemical investigation of honey produced in Van and its region. Van Yuzuncu Yil University Health Sciences Institute (Master Thesis), Van.
- Molan, PC. 1992. The antibacterial activity of honey 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World*. 73(2): 59-76.
- Padilla, F., Puerta, F., Flores, JM., Bustos, M. 1992. Bees, Apiculture and the new World. *Archivos de Zootecnia*. 41(extra): 563-67.
- Paradkar, MM., Irudayaraj, J. 2001. Discrimination and classification of beet and cane inverts in honey by FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*. 76: 231-39.
- Sahinler, N., Gul, A. 2004. Biochemical analysis of highland and sunflower honeys. 4. National Animal Science Science Congress, Isparta, September 1-3.
- Sahinler, N., Sahinler, S., Gul, A. 2001. Composition and biochemical analysis of honeys of Hatay region. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 6: 93-108.
- Sunay, AE. 2006. Origin Detection in Honey. Istanbul Technical University Institute of Science (Master Thesis), Istanbul.
- TFC, 2012. Turkish Food Codex Honey Communique (Communique No: 2012/58) 27 July 2012 history and 28366 numbered Official newspaper. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/07/20120727-12.htm>; (Date of access: 09 March 2020).
- Tolon, B. 1999. A Research on the Biochemical Properties of Pine Honeys in Mugla and its Districts, Ege University Institute of Science (Master Thesis), Izmir.
- Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, OS., Tastemur, B., Sagdic, O., et al. 2013. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*. 46: 124-31.
- Unal, C., Kuplulu, O. 2006. Chemical quality of strained honey consumed in Ankara. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 53: 1-4.
- White, JW. 1975. Composition of Honey. (Crane, E. Ed.) William Heinemann Ltd. London-England. pp.157-206
- White JR, JW., Kushnir, I., Subers, MH. 1964. Effect of storage and processing temperatures on honey quality. *Food Technology*. 18(4): 153-56.
- White, JW., Riethof, ML., Subers, MH., Kushnir, I. 1962. Composition of American Honeys. Tech Bull 1261, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Washington DC-USA.
- Yilmaz, H. 1994. Investigation of the chemical components of honey in the eastern and southeastern regions. Ataturk University Institute of Science (Master Thesis), Erzurum.
- Yilmaz, H. 2000. Composition of honeys collected from eastern and south eastern Anatolia and effect of storage on HMF content and diastase activity. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 25(5): 347-49.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

ANADOLU'NUN FARKLI İLLERİNDEN TOPLANAN PROPOLİS ÖRNEKLERİNİN KİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Chemical Characterization of Propolis Samples Collected from Different Provinces of Anatolia

Şaban KESKİN¹, Levent YATANASLAN², Semiramis KARLIDAĞ^{3*}

¹Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Bilecik, TÜRKİYE. ORCID NO: 0000-0002-0287-4268, E-posta: saban.keskin@bilecik.edu.tr

²Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Gebze, TÜRKİYE. ORCID NO: 0000-0002-7605-7877, E-posta: leventyatanaslan@gmail.com

³Malatya Turgut Özal Üniversitesi Akçadağ Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Malatya, TÜRKİYE. ORCID NO: 0000-0002-9637-2479, *Yazışma yazarı/Corresponding author: E-posta: semiramis.karlidag@ozal.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 03.04.2020

Kabul Tarihi / Accepted 29.04.2020

DOI: 10.31467/uluaricilik.714317

ÖZ

Propolis; bal arılarının bitkilerin farklı kısımlarından topladıkları reçineleri işleyerek kovanlarında depoladıkları viskoz yapışkan reçinems bir maddedir. Bu reçinems madde arıcılar tarafından farklı tekniklerle hasat edilerek ham propolis olarak endüstriye arz edilmektedir. Endüstrinin içeriği bilinen, belirli standartlarda propolis ürünleri üretebilmeleri adına bölgelerin propolislerinin balsam, toplam fenolik madde, kimyasal kompozisyon gibi kalite parametreleri açısından ortaya koyulması gerekmektedir. Bu çalışmada Marmara bölgesi ve civarındaki bazı illerden elde edilen propolis örnekleri analiz edilerek belirli özellikleri aydınlatıldı. %70'lik etanol ile hazırlanan propolis ekstraktları analize tabi tutuldu. Etanolde çözünen kısım olarak tanımlanan balsam miktarı gravimetrik olarak tayin edildi. Toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine göre belirlendi. Ekstraktların kimyasal kompozisyonu Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) metoduyla aydınlatıldı. Analiz edilen örneklerin balsam oranlarının %35 ile %72 arasında değiştiği tespit edildi. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarının 28 ile 80 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/ mL aralığında olduğu belirlendi. GC-MS ile yapılan içerik analizinde, propolis ekstraktlarının uçucu bileşenler, fenolik asitler/flavonoidler, terpenik bileşikler, serbest yağ asitleri ve esterleri ve organik asitleri ihtiva ettiği görüldü. Örneklerin kimyasal bileşiminin kavak tipi propolis ile yüksek benzerlik gösterdiği görülmekle birlikte farklı bitkisel kaynaklardan bileşenleri de içerdikleri tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Balsam, Antioksidan aktivite, Kimyasal kompozisyon

ABSTRACT

Propolis is a viscous sticky resin-like substance that honey bees' process and store in their hives. Honey bees collect the resins from different parts of the certain plants. This resinous substance is harvested by beekeepers with different techniques and is supplied to the industry as raw propolis. In order to produce propolis products in a standardized way, it is necessary to establish the quality parameters of regional propolis such as balsam, total phenolic amount and chemical composition. In this study, propolis samples were obtained from some cities around Marmara region. Propolis extracts prepared with 70% ethanol were analyzed. The amount of balsam described as the ethanol soluble fraction was determined gravimetrically. The amount of total phenolic substance was determined

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

according to the folin-ciocalteu method. The chemical composition of the extracts was elucidated by using the Gas Chromatography- Mass spectrometry (GC-MS) method. The balsam ratios of the analyzed samples were found to vary between 35% and 72%. It was determined that the amount of total phenolic substances was between 28 and 80 mg of gallic acid equivalent (GAE)/ mL. From the content analysis using with GC-MS, it was found that propolis extracts contained the volatiles, phenolic acids/flavonoids, terpenic compounds, free fatty acids or esters and organic acids. Although the chemical composition of the samples appears to be of high similarity to the poplar type, it consists of different plant sources as well.

Keywords: Propolis, Balsam, Antioxidant activity, Chemical composition

EXTENDED ABSTRACT

Background: Propolis is a viscous, sticky, resin-like, substance that honey bees process and store in their hives. Honey bees collect the resins from different parts of the certain plants and add some pollen and bees wax while processing it. This is why the chemical composition of propolis, as with the other bee products, are highly dependent upon the flora in of the region. This resinous substance is harvested by beekeepers with different techniques and is supplied to industry as raw propolis. In order to produce standard products from processing propolis, it is necessary to establish the quality parameters of regional propolis such as balsam content, the total phenolic amount and the overall chemical composition. Identifying the phytochemicals in the propolis samples may result in an opportunity to produce certain chemicals from propolis as well.

Aim: The main aim of the present study is to characterize the chemical composition of propolis samples obtained from beekeepers in Marmara region. Possible botanical sources of the resins collected by bees is discussed as well.

Methods: In this study, propolis samples were obtained from cities located in or around the Marmara region of Turkey. Propolis extracts were prepared using 70% ethanol and a standard maceration technique from this the extracts were analyzed. The amount of balsam described as the ethanol soluble fraction was determined gravimetrically. The amount of total phenolic content was determined according to the folin-ciocalteu method. Antioxidant activity of the extract was tested by using ferric reducing activity (FRAP) test. The chemical composition of the extracts was elucidated by using the GC-MS method.

Results: The balsam ratios of the analyzed samples were found to vary between 35% and 72%. It was

determined that the amount of total phenolic substances was between 28 and 80 mg GAE_/mL. In the content analysis using GC-MS, it was found that propolis extracts contained volatiles, phenolic acids or flavonoids, terpenic compounds, free fatty acids or esters and organic acids. Glycerol, sorbitol, palmitic acid, benzoic acid, ferulic acid, caffeic acid, cinnamic acid derivatives, chrysin, galangin, pinostrobin, mannose, glucose, anthraquinone derivatives, lactone derivatives, succinic acid, malic acid and L-proline were detected in nearly all samples. Pimaric and isopimaric acid, dehydroabietic acid, tyrosol and aloeemodin were detected only in some propolis samples.

Conclusion: Although the chemical composition of the samples appears to be highly similar to the poplar type, it is obvious that different plant sources such as pine and olive trees might be in the resin as well. Dehydroabietic acid, pimaric and isopimaric acid, are carboxylic acid of pine tree resins and Tyrosol comes from olive tree. Our findings correspond well with the flora that are found in the area where the propolis samples were obtained.

GİRİŞ

Arıcılık, bitkilerde polinasyonu sağlamak ve özellikle koloniye dayalı bal, balmumu, propolis, polen, arı sütü, arı zehri, ana arı, oğul ve paket arı gibi çeşitli ürünlerin üretimini kapsayan bir tarım koludur (Genç ve Dodoloğlu 2002). Propolis, çam, meşe, huş, okaliptüs, kavak, kestane vb. ağaçlar ve bazı otsu bitkilerin tomurcuk, yaprak ve benzeri kısımlarından arılar tarafından toplanan ve mumla karıştırılarak kovan içerisinde birçok amaca yönelik olarak kullanılan ve rengi koyu sarıdan kahverengiye kadar değişen bir balsamdır (Ghisalberti 1979, Krell 1998). Arılar bitkilerden topladıkları bu balsamı bir kısım polen ve salgıladıkları enzimler ile karıştırarak kovanlarında depolamaktadırlar (Bayram v.d. 2018).

Propolis antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antikanser ve immün sistemi uyarıcı aktiviteleri nedeniyle son zamanlarda dikkat çekmektedir. Propolis çok çeşitli bir bileşime sahiptir ve fenolik asitler, flavonoidler, terpenler gibi potansiyel olarak biyoaktif bileşikler içerir (Bayram v.d. 2018, Omar v.d. 2019). Genel olarak propolis %45-55 reçine, %25-35 balmumu ve yağ asitleri, %10 esansiyel yağlar (uçucular), %5 polen ve %5 mineral maddelerden meydana gelmiştir (Krell 1996, İsmail v.d. 2018).

Propolis kimyasal bileşimi kaynağına bağlı olarak farklılık göstermektedir (Kamatou v.d. 2019) ve dünya genelinde ham propoliste 300 civarında farklı bileşik tespit edilmiştir (Huang v.d. 2014, Graikou v.d. 2016, Mehmetoğlu v.d. 2017, Keskin v.d. 2019). Herhangi bir bölgede üretilen propolis bitki kaynaklarının bilinmesi o bölge propolisinin kimyasal standardizasyonunun oluşturulması açısından önem taşımaktadır (Schmidt ve Buchmann 1992, Graikou v.d. 2016). Bankova (2005), propolis standardizasyonu ile ilgili bir makalesinde propolislerin botanik orijinlerine göre isimlendirilmesinin standardizasyonda bir yaklaşım olabileceğini ifade etmektedir. Bu yaklaşıma göre propolis bitanik orijini ile içeriğindeki biyoaktif bileşen sınıfları arasında bir ilişki kurulabileceği ifade edilmektedir (Bankova 2005).

Bu çalışma ile Marmara bölgesinin farklı illerinden (Bilecik, Bursa, Balıkesir, Çanakkale, İstanbul ve Sakarya) ve İzmir'den toplanan propolis örneklerinin kimyasal kompozisyonları aydınlatıldı. Benzer biyoaktif bileşenleri ortaya koyularak bölge propolislerinin bitanik orijinleri ile kimyasal bileşimleri arasındaki ilişki tartışıldı. Böylece bölge propolisleri ile standardı belli ürünlerin üretilmesine katkı sunulmak amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kimyasallar ve Propolis Örnekleri

Çalışmada kullanılan etanol, metanol, folin reaktifi, gallik asit, bis-(trimethylsilyl)-trifluoro-acetamide (BSTFA), piridin Sigma Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir. Tuzak ile toplanmış olan propolis örnekleri Bilecik, Bursa, Balıkesir, Çanakkale, İstanbul, Sakarya ile İzmir illerinde faaliyet gösteren arıcılardan 2019 yılı sonbaharında temin edilmiştir. Her ilden 5'er örnek alınmıştır. Örnekler homojen olarak karıştırılmış ve analizler tek örnek üzerinden yapılmıştır.

Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması

Propolis ekstraksiyonu klasik maserasyon tekniği ile gerçekleştirildi. Derin dondurucudan (-18°C) çıkarılan örnekler bir blender yardımı ile öğütülerek toz hale getirildi. Ekstraksiyonda 1:10 (g/v) oranı kullanıldı. Beş g öğütülmüş propolis örneği üzerine 50 mL %70'lik etanol karışımı ilave edildi. Yirmi dört saat 200 rpm sabit hızda manyetik karıştırıcı ile karıştırılan örnekler Whatman no 1 süzgeç kâğıdından süzüldü. Süzüntü etanol ekstraktı olarak etiketlendi.

Balsam Oranının Belirlenmesi

%70'lik etanolde çözünen kısım olarak ifade edilen balsam oranı Keskin ve Kolaylı (2019)'nın belirttiği yönteme göre yapıldı. Sabit tartıma getirilmiş bir balona 5 mL etanol ekstraktı ilave edildi, çözücü evaporatör ile uzaklaştırıldı ve balon tekrar tartıldı. Dolu ve boş tartımlar arasındaki farktan örneklerin balsam oranı % olarak hesaplandı.

Toplam Fenolik Madde Miktarı

Hazırlanan ekstraktların toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu metoduna göre tayin edildi (Singleton v.d. 1999). Gallik asit standardına göre hazırlanan standart grafiğinden örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg GAE/mL cinsinden hesaplandı.

Antioksidan Aktivite Tayini

Örneklerin antioksidan aktiviteleri Fe³⁺ indirgeme metoduyla belirlendi. Demir indirgeme kapasitesi olarak bilinen FRAP metodunun esası, antioksidan bileşenler tarafından Fe(TPTZ)³⁺ kompleksindeki Fe³⁺ iyonlarının asidik ortamda mavi renkli Fe(TPTZ)²⁺ kompleksine indirgenmesidir. Oluşan mavi renkli kompleksin absorbanşı 593 nm'de saf su referansına karşı kaydedildi. Sonuçlar standart bir antioksidan olan Trolox eşdeğeri cinsinden hesaplandı.

GC-MS ile Kimyasal Bileşen Analizi

GC-MS analizi için her bir örnekten 5 mg kurutulmuş ekstrakt bir reaksiyon şişesine (vial) ayrı ayrı ilave edildi. Üzerine 50 µL susuz piridin ve 75 µL BSTFA pipetlendi. 80°C'de 20 dak türevleme reaksiyonunun tamamlanması sağlandı. GC-MS analizi, 30 m uzunluğunda, 0,25 mm i.d. ve 0,25 µm film kalınlığına sahip DB-17HT kılcal sütunu ile donatılmış bir Hewlett-Packard 5972 kütle spektrometre sistemine bağlı olan 5890 seri II Plus bir Hewlett-Packard gaz kromatografi cihazı ile yapıldı. Fırın sıcaklığı,

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

5°C/dak hızında 75 ila 325°C arasında programlandı ve 15 dakika 325°C'de tutuldu. Hareketli faz olarak 0,8 mL/dak akış hızında helyum gazı kullanıldı. Ayrılma oranı 1:50, enjektör sıcaklığı 300°C ve iyonlaşma voltajı 70 eV'ye ayarlandı (Bankova v.d. 2016).

İstatistiksel Hesaplamalar

Elde edilen deneysel verilerin istatistiksel hesaplamaları (ortalama değer, standart sapma ve korelasyon değerleri) Microsoft excel programı kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Balsam Oranının Belirlenmesi

Örneklerin balsam değerlerinin %35 ile %72 arasında değiştiği belirlendi (Tablo 1).

Toplam Fenolik Madde Miktarı

Bu çalışmada örneklerin toplam fenolik madde miktarının 28 mg GAE/mL ile 80 mg GAE/mL arasında değiştiği tespit edildi (Tablo 1).

Antioksidan Aktivite Tayini

Propolis örneklerinin antioksidan aktiviteleri FRAP metoduna göre belirlendi ve sonuçlar Tablo 1'de verildi. Örneklerin antioksidan değerlerinin 53 ile 155 µmol FeSO₄.7H₂O/mL aralığında değişen antioksidan kapasiteye sahip oldukları belirlendi.

GC-MS ile Kimyasal Bileşen Analizi

Propolis örneklerin kimyasal bileşimi GC-MS metodu ile aydınlatıldı. Tespit edilen bileşenler Tablo 2'de verildi. Marmara bölgesinin farklı illerinden elde edilen propolis örneklerinin uçucu bileşenler, alkoller, fenolik asitler/flavonoidler, yağ asitleri ve esterleri, şekerler, aminoasitler, organik asitler ve kinon türevi bileşenlerce zengin olduğu belirlendi. Örneklerin hemen hemen hepsinde gliserol ve sorbitol, palmitik asit, benzoik asit, ferulik asit, kafeik asit, hidrosinnamik asit, krisin, galangin, pinostrobin, mannoz, glikoz, antrakınon türevleri, lakton türevleri, süksinik asit, malik asit ve L-polin tespit edildi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite arasındaki korelasyon katsayısı 0,98 olarak hesaplandı. Bu katsayı toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite arasında oldukça iyi bir ilişki (korelasyon) olduğunu göstermektedir.

TARTIŞMA

Etanolde çözünen kısım olarak ifade edilen balsam ham propolis için önemli bir kalite parametresidir. Propolis standardizasyonu ile ilgili yapılmış olan bir çalışmada ülkemizin farklı bölgelerinden elde edilen propolis örneklerinin balsam oranlarının %23,6 ile %71,1 arasında değiştiği bildirilmiştir (Keskin ve Kolaylı 2018). Popova v.d. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada kavak tip propolislerin %40 ile %60 arasında balsam içerdiği bildirilmektedir. Propolis, bitkilerin farklı kısımlarından toplanan reçinelerden orijin alan bir arı ürünüdür. Bitkisel reçineler ise fenolik reçineler ve terpenik reçineler olarak iki gruba ayrılmıştır (Langenheim 2003). Bu yönü ile propolisin orijin aldığı reçine kaynağının tipine bağlı olarak farklı oranlarda balsam içeriğine sahip olabileceği söylenebilir. Çalışmamızda elde edilen bulgular bu durumu desteklemektedir. Özellikle İstanbul, Balıkesir ve Çanakkale örneklerinin düşük balsam değerine sahip olmaları bu bölgelerin bitki örtüsünün ağırlıklı olarak çam ağaçları ile kaplı olması ile ilişkilendirilebilir.

Propolis ekstraktları için diğer önemli bir parametre de toplam fenolik madde miktarıdır. Keskin ve Kolaylı (2018) Anadolu propolislerinin toplam fenolik madde miktarının ham propolis için 16,13-178,34 mg GAE/g arasında değiştiğini bildirmiştir. Ozdal v.d. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada Anadolu'nun farklı bölgelerinden elde edilen propolislerin toplam fenolik madde miktarının 2748 mg GAE/100 g ile 19969 mg GAE/100 g arasında değiştiği bildirilmiştir. Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak propolis etanol ekstraktının (EEP) toplam fenol içeriğini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, EEP'de fenolün toplam konsantrasyonu %19,44, flavonoller ve flavonoller %2,616 ve flavanonoller %16,176 olarak tespit edilmiştir (Agarwal v.d. 2013). Çalışmamızda elde edilen bulgular literatürle uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Elde edilen bulgular, yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahip olan örneklerin aynı zamanda yüksek antioksidan aktiviteye de sahip olduklarını göstermiştir. Benzer sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarda da bildirilmektedir (Keskin ve Kolaylı 2018).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Tablo 1: Hazırlanan propolis ekstraktlarının balsam, toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite değerleri
Table 1: Balsam amount, total phenolic content and antioxidant activity of the propolis extracts

Örnek Samples	Balsam Miktarı (%) Balsam Value (%)	Toplam Fenolik Madde Total Phenolic Content mg GAE/mL	Antioksidan Aktivite Antioxidant Activity $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/mL}$
İzmir	66.2±0.14	74.21±0.18	136.74 ±1.86
Balıkesir	48.5±0.12	36.24±0.08	61.26 ±1.14
Bursa	46.3±0.21	56.64±0.12	108.64 ±1.48
Bilecik	72.8±0.24	80.24±0.14	155.28 ±2.28
Sakarya	59.4±0.15	68.26±0.09	114.12 ±1.33
İstanbul	35.6±0.11	45.36±0.15	83.18 ±0.89
Çanakkale	55.2±0.14	28.48±0.17	53.42 ±0.67

Propolisin bileşimi bitkiye, bölgeye, mevsime, koloniye, propolis toplama tekniklerine bağlı olarak değişmesi nedeniyle, her propolisin rengi, kokusu, tıbbi karakterleri ve kimyasal kompozisyonları farklılık göstermektedir (Oruç v.d. 2017, Karlıdağ ve Genç 2019). Çeşitli ülkeler kendi propolis standartlarını oluşturmak için çalışmalarına devam etmektedirler. Örneğin, Romanya, propolisin kompozisyonu ve biyolojik aktivitesini belirlemek için kalite kriteri çalışmalarına odaklanmıştır (Mărghitaş v.d. 2013). Farklı coğrafik orijinlerden elde edilen 114 kavak tipi propolis örneğinde üç ana biyoaktif madde grubunu (fenolikler, flavonlar/flavonoller, flavanonlar/dihidroflavonoller) ölçmek için valide edilmiş spektrofotometrik prosedürler kullanılmıştır.

Tek tek bileşenler yerine aktif bileşik gruplarının konsantrasyonlarının ölçülmesinin, propolis için kalite standartlarının geliştirilmesinde uygun bir yaklaşım olduğu ifade edilmiştir (Popova v.d. 2007). Roman propolisinin kimyasal bileşimini analiz etmek amacıyla yapılan bir çalışmada (Mărghitaş v.d. 2013) propolis örneklerinin yüksek miktarlarda fenolik asitleri ve farklı flavonoidleri (flavonlar/flavonoller, flavanonlar/dihidroflavonoller, oroterfenoller) içerdiği tespit edilmiştir. Ham propolisin kompozisyonu arılar tarafından kullanılan bitki kaynağına göre değişmektedir. Kavak tipi ham propolisine ait biyoaktif bileşenlerin karakterize edildiği bir çalışmada (Popova v.d. 2007), %21 toplam fenolik madde, %4 toplam flavon/flavonol, %4 toplam flavanonlar/dihidroflavonolların varlığı bildirilmiştir.

Ülkemizde de farklı bölgelerin propolisleri ile ilgili yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Bayram v.d. (2018) tarafından Hakkâri'nin dört farklı ilçesinden (Merkez, Yüksekova, Şemdinli ve Çukurca) toplanan

64 propolis örneğinin etanol ekstraktları, gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) ile analiz edilmiştir. Şemdinli örneklerinde flavonoidler genel olarak yüksek konsantrasyonda bulunmuştur. Çalışılan 64 propolis örneğinin 28 tanesinde 27 kumarin tespit edilmiştir. Suberosin dışındaki kumarinlerin, Türk kökenli herhangi bir propolis örneğinde daha önce hiç rapor edilmediği ifade edilmiştir. Yüksekova'ya ait propolis örneklerinin diğer ilçelerin örneklerine göre kumarin içeriği açısından daha zengin olduğu, Yüksekova propolisleri arasında ise Akocak (%41,99) ve Akçalı (%30,86) örneklerinin kumarinlerce en zengin örnekler olduğu bildirilmiştir. Hakkâri'nin propolis örnekleri kumarin ve furokumarinler dâhil flavonoidler açısından zengin bir kimyasal içerik sergilediği de vurgulanmıştır. Marmara bölgesi propolislerinin fenolik/flavonoid içeriğinin yükseklik ve mevsime göre değişiminin araştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada bölge propolislerinin ferulik asit, kafeik asit, gallik asit gibi fenolik asitler ve pinosebrin, galangin, rutin, apigenin gibi flavonoidlerce zengin olduğu bildirilmiştir (Sorucu ve Oruç, 2019). Literatürdeki bu çalışmada propolis örnekleri LC-MS-MS tekniği ile sadece fenolik asit ve flavonoid içeriği açısından değerlendirilmiş olduğundan bölge propolislerinin içerdiği diğer bileşenler ile ilgili bir bulguya rastlanılamamıştır. Çalışmamızın bulguları literatürdeki bu çalışma ile fenolik bileşenler yönü ile uyum içerisindedir. Ancak bu çalışma ile bölge propolislerinde bulunabilen uçucu bileşenler, amino asitler, organik asitler, şekerler, alkoller, yağ asitleri ve esterleri, antrakınonlar ve lakton türevleri gibi diğer bileşik sınıflarının varlığı da ortaya koyulmuştur (Tablo 2).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Tablo 2: Propolis ekstraktlarının GC-MS ile tespit edilen bileşenler

Table 2: Chemical composition of propolis extracts detected by GC-MS

Compounds	TIC % İzmir	Balıkesir	Bursa	Bilecik	Sakarya	İstanbul	Çanakkale
Linalool		1,1215		0,4568			
Terpineol		0,8563		0,2154			
B-Selenin				0,1245	2,1592		
Linalool Oksid			0,4836		0,1317		
Timol				1,4582			
Tetrakosanoik Asit						0,6833	0,3945
Fenil Asetaldehit			0,0571				
Benzil Alkol			0,0932	0,0845			
Gliserol	0,6482	0,8756	1,2294	0,7854	0,2217	0,7782	0,5478
Sorbitol	0,4617		0,0258	0,3256	0,321		0,265
Dehidrokakalohastin-14-Ol							3,045
2-Dodekanol			0,1124				
Palmitik Asit	0,243	0,4256		0,5621	0,2485	0,3782	0,7131
Oleik Asit							1,7392
Linoleik Asit		0,3254		0,2965			0,3539
Stearik Asit	0,1599					0,1076	0,4394
Oktadekanoik Asit		0,6574				0,8797	
Etil Palmitat		0,3541	0,2206	0,4125			
Etil Oleat		0,2456	0,9088				0,1897
Etil Laurat		0,1124					
Etil Linoleat			0,178	0,2145			
Etil Stearat			0,1126				
Tirosol		1,1542					
Benzoik Asit	0,0954	1,2985	0,9704	1,2642		0,2359	0,5721
Ferulik Asit	0,2314	1,2548	1,5645	3,2451	0,3023	1,1516	0,5887
Isoferulik Asit							0,2951
Kafeik Asit	0,588	2,8956	1,4153	3,1542	0,4908	1,7088	2,0379
Hidrosinnamik Asit		0,0654	0,0637	0,0542	0,0285	0,0277	
Sinnamil Sinamat		0,8695		0,8546			
3-Metil-3-Butenil Isoferulat	0,1438	0,1856	0,0426	0,2145	0,1321	0,0699	
3-Metil-2-Butenil Isoferulat	0,2678		0,3735	0,5784	0,3058	0,2182	0,6265
Sinnamik Asit		0,3568	0,4248	0,6875	0,0744		0,4072
P-Kumarik Asit			1,057	1,1245		1,0862	0,3024
3,4 Dimetoksi Sinnamik Asit				0,8745		0,2666	0,8579
Pinobanskin Isobutanoat				0,6124			0,5115
Krisin	0,8546	0,7586	1,1236	1,1452	0,9845	0,8456	0,8964
Galangin	2,4624	1,8625	2,8453	3,0215	2,1542	2,8541	2,4632
Pinostrobin	1,5214	1,8524	2,4568	2,8654	1,2145	1,7456	1,7458
Vanillik Asit	0,4677	0,3256			0,2488		
Glukoz	0,8619	0,4586					
Furuktoz	0,471	0,2154				0,027	
Sorboz		1,2546	2,4264		0,9136	2,7941	
Ksiloz		0,7452		0,4521		0,4015	1,5345
Mannoz	1,8192	1,6523	1,0255		1,435	0,0478	1,625
Galaktoz	0,0876			1,1245			1,7652
L-Ramnoz	1,0776		0,0385		0,3962		
Alloz	0,0662				0,5955		
Myo-Inositol	0,1907			0,0865	0,0606	0,0924	
Dehidroabietik Asit	0,2985		0,7247		0,117		3,7157
Isopimarik Asit							1,9251
Pimarik Asit							0,3206
Kinon Türevleri							
Aloe Emodin		4,6512					6,6682
1,6-Dihidroksi-2-Metil Antrakinon	2,2011		3,396		1,8362		
1,6-Dihidroksi-3-Metil Antrakinon		3,6548		1,1452		2,7871	
5,7 Dimetoksi-2,2 Dimetil Kromen		2,1546					4,5527
1,3,8-Trihidroksi-6-Metil Antrakinon			4,2198				
1,8-Dihidroksi-3-(Hidroksimetil) Antrakinon					2,429	5,2489	
Glukonik Asit Gama Lakton	0,0998	0,0846		0,0752	0,02		
Mannoonik Asit Gama Lakton	0,0455		0,2948			0,4859	
L-Prolin	0,0484	0,0321		0,0574	0,0173	0,0216	
L-Alanin							
Malik Asit	1,2505	0,2415	0,0463	0,0321	0,2492	0,3811	0,1545
Suksinik Asit	0,2296	0,3568	0,0606	0,3254	0,1051	0,5529	
1h-Indol-3-Asetik Asit	4,0136		0,4603		1,3722		
5-Hidroksindol-3-Propionik Asit			0,2348			0,4406	
Sitroflex A					0,0826		
Δ9-Tetrahidrokannabinol Asit	0,0459						0,3564
Tiazepin Türevleri		6,6542					

SONUÇ

Yapılan bu çalışma ile Marmara bölgesine ait farklı iller ile İzmir ilinden elde edilen propolis örneklerinin balsam, toplam fenolik madde miktarları, antioksidan aktiviteleri ve kimyasal kompozisyonları tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular bölge propolislerinin kavak tipi (poplar type) propolis ile benzer kimyasal bileşenlere sahip olmakla birlikte farklı kaynaklardan gelen bileşenler içerdiklerini de göstermiştir. Özellikle Balıkesir, Bursa ve Çanakkale örneklerinde tespit edilen pimarik asit, dehidroabiyetik asit, tirosol gibi bazı bileşenlerin kavak ağaçlarının yanında çam ve zeytin ağaçlarının da bal arılarının reçine kaynağı olarak ziyaret edildiğini düşündürmektedir. Propolis örneklerinin elde edildiği bu illerin bitki örtüsü bu düşüncüyü desteklemektedir. Nitekim Sorucu (2015), Marmara bölgesi propolisleri ile ilgili yaptığı çalışmada, bölgede propolis kaynağı olarak sırasıyla söğüt, meşe, kavak, çam, ıhlamur, ceviz ve kestane en sık rastlanan ağaçlar olarak belirlendiğini bildirmektedir. Bölge propolislerinin toplam fenolik madde miktarları ile antioksidan kapasiteleri arasında doğrusal bir ilişki bulunduğu da tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Agarwal, G., Vemanaadhy, GG., Mehta, DS. 2013. Evaluation of Chemical Composition and Efficacy of Chinese Propolis Extract on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An *In Vitro* Study <http://www.contemplindent.org> July 16: 256-261, IP: 164.100.31.82.
- Bankova, V., 2005. Chemical Diversity of Propolis and The Problem of Standardization *Journal of Ethnopharmacology* 100: 114–117.
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., José Conti, B., Silva Cunha, IB., Danert, C. 2016. Standard Methods for *Apis mellifera* Propolis Research *Journal of Apicultural Research* 58(2): 1-49.
- Bayram, NE. Sorkun, K., Öz, GC., Salih, B., Topçu, G. 2018. Chemical Characterization of 64 Propolis Samples from Hakkari *Turkey Rec. Nat. Prod.* 12(6): 569-581.
- Genç, F., Dodoloğlu, A. 2002. Arıcılığın Temel Esasları *Atatürk Üniv. Zir. Fak., Ders Yayınları* No: 166, *Erzurum*. 338 s.
- Ghisalberti, EL. 1979. Propolis: A review *Bee World* 60(2): 59-84.
- Graikou, K., Popova, M., Gortzi, O., Bankova, V., Chinou, I. 2016. Characterization and Biological Evaluation of Selected Mediterranean Propolis Samples. Is it a New Type? *LWT - Food Science and Technology* 65: 261-267.
- Huang, S., Zhang, CP., Wang, K., Li, GQ., Hu, FL. 2014. Recent Advances in The Chemical Composition of Propolis *Molecules* 19(12): 19610-19632.
- Ismail, TNNT., Sulaiman, SA., Ponnuraj, KT., Man, CN., Hassan, NB. 2018. Chemical Constituents of Malaysian *Apis mellifera* Propolis *Sains Malaysiana* 47(1): 117–122, <http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2018-4701-14>.
- Kamatou, G., Sandasi, M., Tankeu, S., Vuuren, S.V., Viljoen, A. 2019. Headspace Analysis and Characterisation of South African Propolis Volatile Compounds Using GCxGC – ToF – *MS Revista Brasileira de Farmacognosia* 29: 351–357.
- Karlıdağ, S., Genç, F. 2019. Farklı Yöntemler Kullanılarak Üretilen Propolis Örneklerinde Biyolojik Olarak Aktif Bileşenlerin Belirlenmesi *U. Arı D. - U. Bee J.* 19(1): 34-42 ., Doi: 10.31467/Uluaricilik.568297.
- Keskin, M., Keskin, Ş., Mayda, N., Özkök, A. 2019. Determination of Biochemical Profile of Bilecik Propolis *Hacettepe J. Biol. & Chem.* 47(4): 403-409.
- Keskin, M., Kolaylı S. 2018. Standardization of Propolis, is it Possible? *U. Arı D. - U. Bee J.* 18(2): 101-110.
- Keskin, M., Kolaylı, S. 2019. Ticari Propolis Ekstraktlarının Kalite Parametreleri Açısından Karşılaştırılması *U. Arı D. - U. Bee J.* 19(1): 43-49.
- Krell, R. 1996. Value-added Products from Beekeeping: Food & Agriculture Org. <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.htm>.
- Krell, R. 1998. Beeswax & Propolis (For Pleasure and Profit) *International Bee Research Association, 18 North Road, Cardiff CFI 3DY, UK.* 30 p.
- Langenheim, JH. 2003. Plant Resins Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany *Timber Press, Inc. Oregon 97204, U.S.A.* ISBN 0-88192-574-8.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Mărghitaş, LA., Dezmirean, DS., Bobiş, O. 2013. Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine, 1-9 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/159392>, ID159392.
- Mehmetoğlu, S., Tarakçı, Z., Demirkol, M., Çakıcı, N., Güney, F. 2017. Gıda Katkı Maddesi Olarak Propolis *Arcılık Araştırma Dergisi* 9 (1): 32-39.
- Omar, B., Badia, D. Abdelhakim, B., Yousif, L., Nadia, SS., Jamal, A. 2019. Phenolic Content, Antibacterial and Antioxidant Activities of Moroccan propolis *Bentham Science Publishers* 15 (6): 696-705.
- Oruç, HH., Sorucu, A., Ünal, HH., Aydın, L. 2017. Mevsim ve Rakımın Propolisteki Biyolojik Olarak Aktif Belirli Fenolik Bileşiklerin Düzeylerine Etkisi ve Propolisin Kısmi Standardizasyonu *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 64: 13-20.
- Ozdağ, T., Ceylan, FD., Eroglu, N., Kaplan, M., Olgun, EO., Capanoglu, E. 2019. Investigation of Antioxidant Capacity, Bioaccessibility and LC-MS/MS Phenolic Profile of Turkish Propolis *Food Research International* 122: 528-536.
- Popova, M., Bankova, VS., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcuzzan, GL., Sabatini, AG. 2007. Chemical Characteristics of Poplar Type Propolis of Different Geographic Origin *Apidologie* 38: 306-311, DOI: 10.1051/apido:2007013.
- Popova, M., Giannopoulou, E., Skalicka-Woźniak, K., Graikou, K., Widelski, J., Bankova, V., Kalofonos, H., Sivolapenko, G., Gawel-Beben, K., Antosiewicz, B., Chinou, I. 2017. Characterization and Biological Evaluation of Propolis from Poland *Molecules* 22: 1159.
- Schmidt, JO., Buchmann, SL. 1992. Other Products of The Hive, The Hive and Honey Bee *Dadant and Sons Hamilton Illinois*.p 928-977.
- Singleton, VL., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, RM. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Sorucu, A. 2015. Marmara Bölgesindeki Propolislerde Biyolojik Etkisi Olan Fenolik Madde ve Miktarlarının Mevsim ve Rakım Farkına Bağlı Olarak Belirlenmesi *Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 118 s. Tez No:426562.
- Sorucu, A., Oruç, HH. 2019. Determination of Biologically Active Phenolic Compounds in Propolis By LC-MS/MS According to Seasons and Altitudes *Journal of Food Measurement and Characterization*. 13(3): 2461-2469.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

THE EFFECTS OF MEDICAL AND AROMATIC PLANT EXTRACTS ON SOME PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HONEYBEE (*APIS MELLIFERA* L.) COLONIES

Tıbbi ve Aromatik Bitki Ekstraktlarının Balarısı (*Apis mellifera* L.) Kolonilerinin Bazı Fizyolojik Özellikleri Üzerine Etkisi

Yaşar ERDOĞAN^{1*}, M. Murat CENGİZ²

¹Bayburt University, Demirözü Vocational High School, Department of Veterinary Medicine, Bayburt, TURKEY, ORCID NO.: 0000-0001-6154-7008, Yazışma yazarı / Corresponding author: E-posta: yasarerdogan@hotmail.com

²Atatürk University, Erzurum Vocational High school department of Horse Training, Erzurum, TURKEY, ORCID NO.: 0000-0002-9844-4229; E-posta: mcengiz@atauni.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 15.04.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 29.05.2020

DOI: 10.31467/uluaricilik.720548

ABSTRACT

In this study, the effects of extracts obtained from medicinal and aromatic plants added to syrups used to feeding honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies on some physiological characteristics of colonies were investigated. The experiment was carried out on 6 groups of 5 colonies. These groups are syrup (S), syrup + *Urtica dioica* (SU), Syrup + *Melissa officinalis* (SM), Syrup + *Hypericum perforatum* (SH), Syrup + *Achillea millefolium* (SA) and syrup + *Thymus serpyllum* (ST). As a result of the research, the sealed brood area data were determined as 3013.24±1939.26, 3107.00±2060.42, 3270.81±2194.80, 3091.20±1962.69, 3273.90±2095.49 and 3613.06±2348.27 cm² in S, SU, SM, SH, SA, ST groups, respectively. When we compare the honey yields of the experimental groups, according to group S, SU increased by 18.48%, SM 43.10%, SH 16.04%, SA 27.35% and ST 53.86%. Therefore, syrup + medicinal and aromatic plant extract mixture given to honey bee colonies may have a positive effect on colony development and honey yield.

Key words: Honeybees, feeding, plant extract, honey yield

Öz

Bu çalışmada, bal arısı (*Apis mellifera* L.) kolonilerinin beslenmesinde kullanılan şuruplara eklenen tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen ekstraktların, kolonilerin bazı fizyolojik özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Denemede 5'er koloniden oluşan 6 grup bulunmaktadır (şurup (S), şurup + *Urtica dioica* (SU), Şurup + *Melissa officinalis* (SM), Şurup + *Hypericum perforatum* (SH), Şurup + *Achillea millefolium* (SA) ve şurup + *Thymus serpyllum* (ST). Araştırma sonucunda, kapalı kuluçka alanı S, SU, SM, SH, SA, ST gruplarında sırasıyla, 3013,24±1939,26, 3107,00±2060,42, 3270,81±2194,80, 3091,20±1962,69, 3273,90±2095,49 ve 3613,06±2348,27 cm² olarak tespit edilmiştir. Ayrıca ek beslenmenin arı kolonilerinin bal verimi açısından S grubuna göre, SU %18,48, SM %43,10, SH %16,04, SA % 27,35 ve ST % 53,86 oranında artış göstermiştir. Balarısı kolonilerine verilen şurup + tıbbi ve aromatik bitki ekstraktı karışımının koloni gelişimi ve bal verimi üzerinde etkili olabildiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bal arıları, besleme, bitki özütü, bal verimi

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Giriş: Bal arıları yeryüzündeki en önemli canlılardan birisidir. Üretmiş oldukları bal, polen, propolis, arı sütü, arı zehri gibi ürünlerle bir kısım insanlara fayda sağlamakta iken, polinasyonla doğaya yapmış olduğu katkıları sayesinde tüm insanoğluna hizmet etmektedir. Bal arıları hayatîyetlerini devam ettirebilmeleri için karbohidratlara, proteinlere, yağlara, mineral maddelere, vitaminlere ve suya ihtiyaç duyarlar. Bal arıları bu ihtiyaçlarını doğada nektar, polen ve sudan karşılarlar. Erken ilkbahar ve geç sonbahar dönemlerinde bu besin maddeleri yeterli seviyede bulunmadığında ek beslemeler yapılarak koloninin yaşama ve gelişmesi için gerekli olan ihtiyaçları karşılanabilir. Ek yemleme ya sade şeker şurubu veya şeker şurubuna değişik vitamin ve mineral preparatları karıştırılarak yapılmaktadır. Son zamanlarda organik tarımın yaygınlaşmasıyla birlikte preparatların yerine tıbbi özellikleri bilinen değişik bitkiler ya doğrudan veya ekstraktları çıkartılarak katılmaya başlanmıştır. Bu çalışma, kolonilerin üretim etkinliklerini artırabileceği düşüncesiyle arı beslemesinde şuruba katılan tıbbi ve aromatik bitki ekstraktlarının bal arılarının fizyolojik özellikleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, bir yaşlı Kafkas melezi ana arıya sahip olan 30 adet koloni kullanılmıştır. Arı kolonileri Standart Langstroth tipi ahşap arı kovanlarına yerleştirilmiştir. Arı kolonileri her grupta 5'er koloni olacak şekilde 6 gruba ayrılmıştır. Doğadan toplanıp kurutulmuş ve toz haline getirilmiş bitkiler (*Urtica dioica*, *Melissa officinalis*, *Hypericum perforatum*, *Achillea millefolium*, *Thymus serpyllum*) ekstraksiyonda kullanılmıştır. İki litrelik beher içerisine 250 g bitki tozu konulmuş üzerine 650 ml kaynar çift damıtılmış su ilave edilmiş ve 5 saat demlenmeye bırakılmıştır. Daha sonra 0,45 µm'lik whatman filtresinden geçirilmiştir. Şerbet 1/1 oranında hazırlanmış, 1000 ml şerbete 30 ml ekstrakt katılarak denemede kullanılmıştır. Yemlemeye 15.04.2019 tarihinde başlanıp günlük olarak kovan başına 500 ml verilerek 25.05.2019 tarihinde bitirilmiştir. Birinci gruba sadece şeker şurubu, diğerlerine ise şurup+ekstrakt karışımı verilmiştir. Bu uygulamaların, arı kolonilerinin nektar akış dönemi ağırlık kazancı, arı çerçevesi sayısı, kapalı kuluçka alanı ve bal verimi gibi bazı fizyolojik özellikler üzerine etkisi araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışma sonucunda en yüksek kuluçka alanı ortalaması $3613,06 \pm 2348,27 \text{ cm}^2$ ile ST grubunda, en düşük ortalama ise $3013,24 \pm 1939,215 \text{ cm}^2$ ile S grubunda da tespit edilmiştir (Tablo 1). Yavrulu alan miktarı bakımından S ye göre en fazla yüzdelik artışı %19,90 ile ST, en düşük ise %3,11 ile SU göstermiştir. Yemlerin kuluçka alanı gelişimi üzerine olan etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ($p < .05$). En yüksek ergin arı gelişimi ST grubundan ($15,72 \pm 6,89$ adet/koloni) elde edilmiştir (Tablo 1). Yemlerin, arılı çerçeve sayıları bakımından etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ($p < .05$). Kovan dışı hizmet yapan işçi arı sayısının artması kovana taşınan nektar miktarını da artırmıştır. ST grubunda ($52,26 \pm 6,17 \text{ kg/koloni}$) yer alan arı kolonileri S grubundan ($28,54 \pm 5,03 \text{ kg/koloni}$) %83,11'lik bir artış sağlamıştır. Yemlerin nektar akım dönemi ağırlık artışı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < .05$). Bu çalışma sonunda, S grubundaki kolonilerin bal verim ortalaması $16,45 \pm 1,55 \text{ kg/koloni}$ iken, en yüksek verimin elde edildiği ST grubunda $25,31 \pm 3,14 \text{ kg/koloni}$ elde edilmiştir (Tablo 2). Deneme sonucunda S grubuna göre, SU %18,48, SM %43,10, SH %16,04, SA %27,35, ST %53,86'lık bir artış sağlamıştır. Şeker şurubu ile şeker şurubu+ekstrakt karışımı yemlemenin deneme gruplarının bal verimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ($p < .05$).

Sonuç: Erken ilkbahar döneminde yapılan şerbet yemlemesinde şerbete katılan tıbbi ve aromatik bitki ekstraktları arı kolonilerinin tüm fizyolojik özellikleri üzerinde olumlu etki göstermiştir.

INTRODUCTION

Honeybees are one of the most important creatures on earth. Honeybees supply some people with the products they produce, such as honey, pollen, propolis, royal jelly, and bee venom, but their most important role is their contributions to nature by pollination. Honeybees need carbohydrates, proteins, fats, mineral substances, vitamins, and water to survive. Honeybees gather these needs in nature from nectar, pollen and water.

Pollen is required for tissue and organ development of both larvae and young adult bees (Herbert 1992; Imdorf et al. 1998). In the early spring and late autumn periods, when these nutrients are not enough, additional feedings can be made and the needs of the colony required for survival and

development can be met. Thus, honeybee colonies develop faster and enter the nectar flow period much stronger. As a result, honeybee colonies spend the season more efficiently. In addition, supplementary feeding in the autumn helps honeybee colonies to enter the winter more strongly and to reaching spring without losing too many bees. Supplementary feeding is of great importance for honeybees. While the honeybee colonies can meet their needs by gathering from the nature during the production season, regular supplementary feeding should be done in the early spring period, when the source is not enough in nature. Supplementary feeding is done with pure sugar syrup or by mixing different vitamins and minerals into the sugar syrup. With the widespread of organic farming, medicinal and aromatic plant extracts have been added to the syrups instead of chemical drugs.

Medicinal and aromatic plants are generally used in beekeeping due to the antibacterial, antifungal, antioxidant, antiviral effects on the honeybees on the digestive system. (Dıġrak et al. 1999; Keleş et al. 2001; Soycan and Açıkgöz 2005). It has been reported that medicinal aromatic plants increase the performance and durability of poultry (Adıyaman and Ayhan 2010). This study was carried out to determine the effects of medicinal and aromatic plant extracts on the physiological properties of honeybees.

MATERIAL AND METHOD

The research was done at the beekeeping application station of Bayburt University Demirözü Vocational High School in 2019.

Honeybee colonies (30 colonies) with a one-year-old Caucasian hybrid queen bee, were equalized in terms of sealed brood area, number of frames covered with bee and food stock. Honeybee colonies were placed in Standard Langstroth type wooden beehives. These colonies had a total of eight frames, 5 of which had a sealed brood area. There were five honeybee colonies in each group. These groups are 1) Sugar syrup (S), 2) Sugar syrup + *Urtica dioica* extract (SU), 3) Sugar syrup + *Melissa officinalis* extract (SM), 4) Sugar syrup + *Hypericum perforatum* extract (SH), 5) Sugar syrup + *Achillea millefolium* extract (SA), 6) Sugar syrup + *Thymus serpyllum* extract (ST).

Plants collected from nature to obtain plant extracts were dried in the air circulating drying cabinets at

40°C for 40 hours (Türküsay and Onogur 1998). The dried plants were ground very finely. The ground plants were used to obtain the extract. 250 g of ground plant powder was placed in a two-liter beaker, and 650 ml of boiling double distilled water was added and left to brewed for 5 hours then filtered through a 0.45 µm whatman filter (Gunasegaran et al. 2011). The sugar syrup used in the study was prepared at a ratio of 1:1 (1 part sugar 1 part water). Of the extracts obtained, 30 ml was added to 1000 ml of sugar syrup and 500 ml was given daily to each colony in the trial groups from the formed solution. Colonies in the control group were given 500 ml of pure sugar syrup daily (Fresnaye and Lensky 1961; Dodoloğlu 2000). Feeding of the colonies started on 15.04.2019 and finished on 25.05.2019.

In this study, some physiological properties of honeybee colonies fed with different medicinal and aromatic plant extracts such as nectar flow period weight gain, number of bee frames, which covered with bees, size of sealed brood area and honey production were investigated.

Number of Frames Covered with Bees

All colonies were equalized in terms of the number of frames covered with bee at the beginning of the experiment. The number of frames covered with bees was counted at 30-day intervals until September 5, when the honey harvest was made. The values obtained were recorded as the development of adult bees of the experimental groups (Cengiz and Erdoğan 2017).

Sealed Brood Area

The sealed brood area of the trial colonies was measured at 30-day intervals from the start of the experiment. The data obtained were calculated in cm² using the PUCHTA method. (Fresnaye and Lensky 1961).

Nectar Flow Period Weight Gain

All colonies in the experiment were weighed at the beginning of the nectar flow period and before harvest. The difference was recorded as the weight gain of the colonies in the nectar flow period (Genç 1994; Cengiz et al. 2019).

Honey Yield

At the end of the experiment (September 5), honey was harvested. The harvest was made only from honey supers. The number of the hive was written on each frame that was taken during the harvest.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

After the frames were weighed and filtered, the empty frames were weighed again, and the difference was recorded as the honey yield of honeybee colonies (Genç and Aksoy 1993; Dodoloğlu 2000; Carbonari et al. 2016; Cengiz and Dülger 2018).

All data were analyzed using ANOVA (IBM SPSS 22 statistical software: IBM SPSS Statistics, Armonk, NY). Models used to measure repeated ANOVA (MANOVA) and simple ANOVA. In all analyses, the significance level was taken as $p < .05$. Duncan's post hoc test was used to compare averages.

RESULTS

The amount of sealed brood area from April, when the experiment started, increased continuously until

July, and decreased in August. As a result of the study, the highest sealed brood area was determined at $3613.06 \pm 2348.27 \text{ cm}^2$, in the ST group, and the lowest average was $3013.24 \pm 1939.215 \text{ cm}^2$ in S group (Table 1). In terms of the amount of sealed brood area and compared to the control group the highest and the lowest rates of increase were in the ST group (19.90%) and in the SU group (3.11%), respectively. The effect of feeding with sugar syrup + extract mix on sealed brood area development was found to be statistically significant ($p < .05$). In terms of sealed brood area, S group, SU group and SH group were in group a, SM group and SA group were in group b, and ST group was in group c. In July, the highest and the lowest sealed brood areas value were measured in the ST group (6980.34 cm^2) and in the SA group (4622.04 cm^2), respectively (Figure 1).

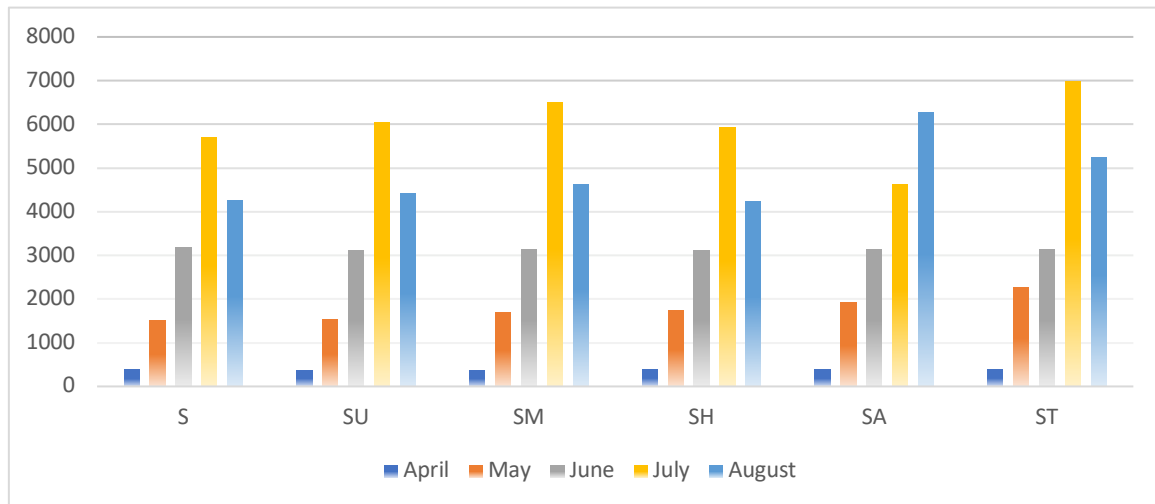


Figure 1. Sealed brood area development of experimental groups fed by syrup + medicinal and aromatic plant extracts by months.

Table 1. The effect of syrup + medical and aromatic plant extract on colony performance parameters of honeybees.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Application groups		Development of brood area (sealed brood/cm ²)	Development of honeybee colonies (frames/colony)
S	Mean	3013.24+1939.26 ^a	12.24+5.06 ^a
	P Value	.00	.00
	SEM	387.84	1.01
SU	Mean	3107.00+2060.42 ^a	13.84+6.26 ^{bc}
	P Value	.00	.00
	SEM	412.74	1.25
SM	Mean	3270.81+2194.80 ^b	14.68+7.02 ^d
	P Value	.00	.00
	SEM	438.96	1.40
SH	Mean	3091.20+1962.69 ^a	13.12+5.69 ^b
	P Value	.00	.00
	SEM	392.54	1.14
SA	Mean	3273.90+2095.49 ^b	14.52+5.63 ^{cd}
	P Value	.00	.00
	SEM	419.09	1.38
ST	Mean	3613.06+2348.27 ^c	15.72+6.89 ^e
	P Value	.00	.00
	SEM	469.65	1.60
Measuring periods			
April	Mean	380.39+24.71 ^a	5.00+0 ^a
	P Value	.00	.00
	SEM	4.40	.00
May	Mean	1530.36+172.14 ^b	9.77+0.81 ^b
	P Value	.00	.00
	SEM	54.24	.15
June	Mean	3187.15+79.51 ^c	13.77+0.82 ^c
	P Value	.00	.00
	SEM	413.40	.15
July	Mean	5700.73+319.05 ^e	18.83+1.96 ^d
	P Value	.00	.00
	SEM	81.77	.42
August	Mean	4267.55+386.18 ^d	22.73+2.34 ^e
	P Value	.00	.00
	SEM	88.56	.53

SEM: standard error of mean.

^{a,b,c,d,e} $p < .05$.

Adult bee development, which has increased continuously since the beginning of the experiment, reached the highest level towards the end of the nectar flow period. The highest adult bee development was obtained in the ST group (15.72±6.89 frame/colony) as in the development of sealed brood area (Table 1). The average value obtained in the ST group related to adult bee development was 28.43% higher than the S group (Table 1). The average values obtained from other groups were all higher than the S group. The effect of feeds consisting of sugar syrup + extract mixture on the number of frames covered with bees was statistically significant ($p < .05$). In August, the highest number of frames covered with bees was

measured in the ST group (26.8 frame/colony) and the lowest value in the S group (18.8 frame/colony) (Figure 2). The values we obtained in terms of the number of frames covered with bees were higher than previous studies (Kumova 2000; Yeninar et al. 2015; Bekret et al. 2015; Dodoloğlu and Emsen 2007).

The weight gain during the nectar flow period in ST group increased by 83.11% compared to S group. The effect of sugar syrup + extracts mixture feed on nectar flow period weight gain was statistically significant ($p < .05$). These values that we obtained were lower than the value obtained by Dodoloğlu et al. (2004), but higher than the results obtained by Taha (2014) (Table 2).

Table 2. The effect of syrup+medical and aromatic plan extract colony performance parameters of honeybees.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Application groups		Weight gain of the application groups (kg/colony)	Honey yield (kg/colony)
S	Mean	28.54±5.03 ^a	16.45±1.55 ^a
	P Value	.00	.00
	SEM	2.27	.69
SU	Mean	39.24±2.59 ^b	19.49±1.21 ^{ab}
	P Value	.00	.00
	SEM	1.16	.54
SM	Mean	47.14±4.44 ^c	23.54±2.86 ^{cd}
	P Value	.00	.00
	SEM	1.98	1.28
SH	Mean	33.60±3.94 ^{ab}	19.09±2.74 ^{ab}
	P Value	.00	.00
	SEM	1.76	1.22
SA	Mean	37.68±5.60 ^b	20.95±1.94 ^{bc}
	P Value	.00	.00
	SEM	2.50	.87
ST	Mean	52.26±6.17 ^c	25.31±3.14 ^d
	P Value	.00	.00
	SEM	2.76	1.40

SEM: standard error of mean.

a,b,c,d $p < .05$.

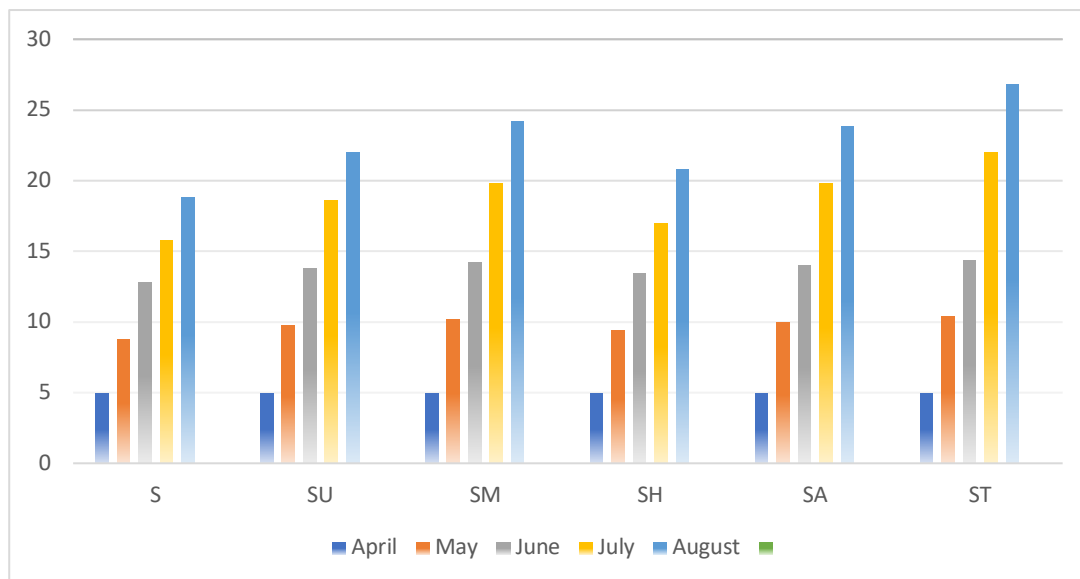


Figure 2. The development of the number of frames covered with bee of the experimental groups fed with syrup + medicinal and aromatic plant extracts by months.

At the end of this study, the honey yield average of the colonies in the S group was the lowest 16.45±1.55 kg/colony, while the ST group presented the highest average among groups 25.31±3.14 kg/colony was obtained in the ST group where the highest yield was obtained (Table 2). In terms of honey yield, the SU group increased by 18.48%, the

SM group by 43.10%, the SH group by 16.04%, the SA group by 27.35%, the ST group by 53.86% compared to the S group. The effect of sugar syrup+extract mixture feed on honey yield was statistically significant ($p < .05$).

DISCUSSION

The brood area is one of the important measurements in determining colony development (Genç et al. 1999). The larger the brood area, the greater is the number of worker bees to work for the colony in the future. Our results regarding the sealed brood area are lower than the values obtained by Kumova et al. (1993), but it was higher according to the data obtained by Akyol and Kaftanoğlu 2001; Karacaoğlu et al. 2003; Arslan et al. 2004.

Adult bee development has increased steadily from the beginning to the end of the experiment. It reached the highest level in September. The values we obtained in terms of the number of frames covered with bees were higher than previous studies (Kumova 2000; Yeninar et al. 2015; Bekret et al. 2015; Dodoloğlu and Emsen 2007).

The increase in the number forager workers also increases the amount of nectar carried to the hive. In this study, the highest nectar flow period weight gain mean was recorded in ST group (Table 2).

The number of worker bees in the honeybee colony, the race of the honeybee, the age of the queen bee, the health of the honeybee colony, the density of the beehive in the region, the nectar flow time, the climate and weather conditions are factors affecting honey production. We obtained different values from the experimental groups related to honey yield. These values were higher than Chaudhary (2001) and lower than Wineman et al. (2003) and Akyol and Kaftanoğlu (2001).

The supplemental additional feeding is very important to honeybee colonies in autumn and spring, especially in regions with long and cold winters. Supplementary feeding eliminates the food shortage of the bee colony and encourages the colony to raise offspring. In our study, medicinal plant extracts added to syrup in the early spring period showed a positive effect on bee colonies. All of the medicinal and aromatic plants we selected were beneficial to honeybee colonies. In particular, *Thymus serpyllum* and *Achillea millefolium* had been very effective.

REFERENCES

- Adıyaman, E., Ayhan, V. (2010). Use of Aromatic Plants in Broiler Nutrition. *Hayvansal Üretim* 51(1): 57-63.
- Akyol, E., Kaftanoğlu, O. (2001). Colony characteristics and the performance of caucasian (*Apis mellifera caucasica*) and Muğla (*Apis mellifera anatoliaca*) bees and their reciprocal crosses. *J Apicult Res.* 40:11–15.
- Arslan, S., Güler, A., Cam, HM. (2004). Determination of the wintering ability and comb honey yield of the different honeybee (*Apis mellifera* L.) genotypes in Tokat region. *Agri J Gop Univ.* 21:85–90.
- Bekret, A., Çankaya, S., Silici, S. (2015). The Effects of Mixture of Plant Extracts and Oils are added to Syrup on Honey Bee Colony Development and Honey Yield. *Turkish Journal of Agriculture Food Science and Technology*, 3(6): 365-370, 2015 DOI: 10.24925/turjaf.v3i6.365-370.282
- Carbonari, V., Malaspina, O., Junior, VVA., Polatto, LP. (2016). Variation in honey yield per hive of Africanized bees depending on the introducing time of young queens. *Cienc Rural.* 46:895–900. DOI: 10.1590/0103-8478cr20151126
- Cengiz, E., Genç, F., Cengiz, MM. (2019). Bal Arılarında (*Apis Mellifera* L.) İki Analı Koloni Yönetiminin Koloni Performansı ve Varroa (*Varroa Destructor Anderson & Trueman*) Bulaşıklık Düzeyine Etkisi. *U.Bee J.*, 19(1): 1-11, DOI: 10.31467/uluaricilik.568092
- Cengiz, MM., Dülger, C. (2018). Gezgin ve Sabit Arıcılık İşletmelerinde Kontrollü Şartlarda Yetiştirilen Ana Arılarla Oluşturulan Balarısı (*Apis mellifera* L.) Kolonilerinin Bazı Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13(1): 19-27, DOI: 10.17094/ataunivbd.309110
- Cengiz, MM., Erdoğan, Y. (2017). Comparison of wintering ability and colony performances of different honeybee (*Apis mellifera* L.) genotypes in Eastern Anatolian/Turkey conditions. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 23(6): 865-870, DOI: 10.9775/kvfd.2017.17667
- Chaudhary, OP. (2001). Honey processing, agmarking and processing. In: Yadav PR, editor. Recent advances in apiculture. Hisar: CCS Haryana Agricultural University.
- Diğrak, M., Alma, MH., İlçim, A., Sen, S. (1999). Antibacterial and antifungal effects of various commercial plant extracts. *Pharmaceutical Biology*, 37(3): 216-220. DOI: 10.1076/phbi.37.3.216.6307

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Dodoloğlu, A. (2000). Kafkas ve Anadolu bal arısı (*Apis mellifera* L.) ırkları ile karşılıklı melezlerini morfolojik, fizyolojik ve davranış özellikleri (Doktora tezi) Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Bölümü, Erzurum.
- Dodoloğlu, A., Dulger, C., Genc, F. (2004). Colony condition and bee behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.) housed in wooden or polystyrene hives and fed "bee cake" or syrup. *J. Apic. Res.* 43:3–8. DOI:10.1080/00218839.2004.11101100
- Dodoloğlu, A., Emsen, B. (2007). Effect of Supplementary Feeding on Honey Bee Colony. *J. Appl. Anim. Res.* 32(2): 199-200. DOI: 10.1080/09712119.2007.9706878
- Fresnaye, J., Lensky, Y. (1961). Methods "Appreciation des Surfaces de vain Dans les colonies Abeilles". *Ann Abeille.* 4:369–376.
- Genç, F. (1994). Honey bee (*Apis Mellifera* L.) colonies of different types of honeycomb use in weight gain, infant breeding and honeycomb processing effect. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 25:210–222.
- Genç, F., Aksoy, A. (1993). Some of the correlations between the colony development and honey production on the honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Apiacta.* 28:33–41.
- Genç, F., Dulger, C., Kutluca, S., Dodoloğlu, A. (1999). Comparison of behavior features Caucasian, Middle Anatolia and Erzurum honeybee (*Apis mellifera* L.) genotypes in Erzurum Conditions. *Turk J Vet Anim Sci.* 23:651-656.
- Gunasegaran, T., Rathinam, X., Kasi, M., Sathasivam, K., Sreenivasan, S., Subramaniam, S. (2011). Isolation and identification of Salmonella from curry samples and its sensitivity to commercial antibiotics and aqueous extracts of *Camelia sinensis* (L.) and *Trachyspermum ammi* (L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 266-269. DOI: 10.1016/S2221-1691(11)60040-3.
- Herbert, EW. (1992). Honey bee nutrition. In: J. Graham (ed.) the Hive and the Honey Bee, Dadant & Sons. Hamilton, Illinois, p 197-234.
- Imdorf, A., Rickli, M., Kilchenmann, V., Bogdanov, S., Wille, H. (1998). Nitrogen and mineral constituents of honeybee worker brood during pollen shortage. *Apidologie.*, 29:315-325. DOI: 10.1051/apido: 19980402
- Karacaoglu, M., Gencer, HV., Koc, AU. (2003). Effects of supplemental feeding on brood production and honey yield of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies in the Aegean Region. *J. Anim Prod.*, 44:47–54
- Keleş, O., Ak, S., Bakırel, T., Alpınar, K. (2001). Screening of Some Turkish Plants for Antibacterial Activity. *Turk J Vet Anim Sci.*; 25: 559-565.
- Kumova, U. (2000). Feeding Effect on Colony Development and Honey Production of Honeybee (*Apis mellifera* L.) Colonies. *J Anim Prod.*, 41: 55-64.
- Kumova, U., Kaftanoğlu, O., Yeninar, H. (1993). Çukurova Bölgesinde Bal Arısı (*Apis mellifera* L.) Kolonilerinin Ek Yemlerle Beslenmesinin Koloni Gelişimi Üzerine Etkileri. *Ç.Ü.Z.F. Dergisi.* 8, (1):153-166.
- Soycan, Ö., Açıkgöz, S. (2005). Antioxidant effects of aromatic plants on animal products. *J Anim Prod.*; 46: 50-55.
- Taha, AA. (2014). Effect of hive type on strength and activity rate of honeybee colonies (*Apis Mellifera* L.) in Egypt. *J Plant Prot Path.* Mansoura Univ. 5:773–784.
- Türküsay, H., Onoğur, E., (1998). Studies on Antifungal Effects of Some Plant Extracts In Vitro. *Turk. J. Agric. Forest.*, 22, 267-271
- Wineman, E., Lensky, Y., Mahrer, Y. (2003). Solar heating of honeybee colonies (*Apis mellifera* L.) during the subtropical winter and its impact on hive temperature, worker population and honey production. *Amer. Bee J.*, 143:565–570.
- Yeninar, H., Akyol H., Yörük, A. (2015). Effects of Additive Feeding with Pollen and Water on Some Characteristics of Honeybee Colonies and Pine Honey Productio. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 3(12): 948-951. DOI:10.24925/turjaf.v3i12.948-951.576

DERLEME / REVIEW

BAL ARILARINDA GASTROİNTESTİNAL BAKTERİYEEL FLORA

Gastrointestinal Bacterial Flora in Honey Bees

Şeyma SUYABATMAZ¹, Arif BOZDEVECİ², Şengül ALPAY KARAOĞLU^{3*}

¹Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Zihni Derin Yerleşkesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Rize, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0001-8597-3650, E-posta: seyma_suyabatmaz18@erdogan.edu.tr

²Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Zihni Derin Yerleşkesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Rize, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0002-0729-9143, E-Posta: arif.bozdeveci@yandex.com

³Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Zihni Derin Yerleşkesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Rize, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0003-1047-8350, E-mail: sengul.karaoglu@erdogan.edu.tr, Yazışma yazarı / Corresponding author: sengul.karaoglu@erdogan.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 02.04.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 06.05.2020

DOI: 10.31467/uluaricilik.701170

ÖZ

Bal arılarının (*Apis mellifera*) gastrointestinal sisteminde, mikroflora veya mikrobiyota olarak adlandırılan, çeşitli mikrobiyal tehditlere karşı korunmada, bazı metabolik faaliyetlerinde ve arı mahsullerinin üretiminde rol oynayan, arı bağışıklık sisteminde güçlü etki mekanizmalarına sahip, özgün bir mikroorganizma koleksiyonu bulunur. Özellikle yetişkin bal arıları çok zengin bir mikrofloraya sahiptirler. Arı sağlığının korunmasında en önemli ve dikkat çekici faktör, sahip oldukları bu mikrofloradır.

Bal arıları (*Apis mellifera*) insanlar gibi toplu halde yaşar ve kovanda yaşamın devamlılığını sağlamak için iş birliği içinde çalışır. Üretken kolonilerde mikrobiyotadaki çeşitlilik artışı, arının gelişimsel yaşından beslenmesine, kovanın bulunduğu coğrafi konumdan iklim değişikliğine kadar çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu bakteriyeel topluluk kompozisyonundaki çeşitlilik azlığının da arının mevcut üretkenliğini olumsuz yönde etkileyebileceği belirtilmektedir. Bu derleme, arı yaşamı için büyük önem arz eden bağırsak temel mikroflorasının çeşitliliğini, edinim yollarını, arının gastrointestinal sistemindeki özel kolonizasyonunu ve bal arısı için fayda mekanizmalarını açıklamaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Apis mellifera*, Gastrointestinal sistem, Mikrobiyota

ABSTRACT

In the gastrointestinal tract of honey bees (*Apis mellifera*), there is a unique collection of microorganisms, called microflora or microbiota, which have various metabolic activities in the bee crops, which can protect against various microbial threats, and is linked to powerful mechanisms of action in the bee immune system. The adult honey bees especially have a rich microflora. Their microbiome is considered to be one of the most important and remarkable factors in maintaining bee health.

Like humans, honey bees (*Apis mellifera*) are social creatures and work cooperatively to ensure the continuity of life in the hive. In productive colonies, the increasing diversity of microbiota depends on various factors, from the developmental age of the bee to its feeding, from the geographical location of the hive to the local climate. The lack of diversity of the bacterial community may negatively affect the productivity of the bee hive. This review describes the diversity of the honey bee intestinal core microflora, which are of great importance for bee life, the ways in which they acquire the bacteria, how they colonize in the gastrointestinal tract of bee and their associated beneficial mechanisms for honey bee survival.

Keywords: *Apis mellifera*, Gastrointestinal tract, Microbiota

EXTENDED ABSTRACT

Goal: The role of the intestinal microbiome in animal health has become increasingly apparent. Although the structure of the gut microbiome of *Apis mellifera* is well known, the dynamic change in different stages of development is not known very well. Traditional and molecular methods, especially bacterial 16S rRNA gene region analysis and metagenome studies are used to determine the diversity of gut microbiota. Bees newly hatched from larvae and eggs are almost sterile, but microbial vaccination begins soon after social interactions, therefore microbial colonization of the bee gut begins within an average of four days after the brood emerges, and is then shaped by its diet and habitat. It is known that a healthy gut microbiome plays an active role in bee metabolism, immune function, growth and development, as well as protection from pathogens. Therefore, microbiological and molecular investigation of the bee microbiome will yield important information relevant to bee health.

Discussion: Colony Collapse Disorder (CCD), which is characterized by the disappearance of thousands of bees rapidly from beehives from multiple known and unknown factors such as climate change, intensive use of pesticides, antibiotics abuse, and presence of pathogens are thought to cause microflora degradation in honey bees. All these factors affect the feeding and other behaviors of honey bees. The gastrointestinal tract of the bee is in the form of a specialized tube that extends from mouth to anus, each chamber has a separate environment that supports specific microorganisms, and each chamber contains several commensal or beneficial bacterial communities. Nearly three-quarters of this community consists of *Lactobacillus*, one *Snodgrassella*, *Gilliamella*, *Bifidobacterium* and very few other bacteria genera. The honey bee gut microbiota has a close relationship with the host and provides several advantages, such as promoting the host's food digestion, essential nutrients, degradation of toxic components, pathogen defense and regulation of host development, behaviour, and immunity.

Conclusion: The role of the gut microbiome is becoming increasingly apparent in animal health. In this regard, little is known about the dynamic change of the bacterial community in different stages of development, although it is well known that the digestive tract and especially the gut flora structure in the bee, varies considerably according to age

development, environmental factors, diet, and chemicals used for various purposes. Although the honey bee microbiota contains nuclear species, other factors such as the intestinal flora health, beekeeper's feeding style, interactions with other social classes, and environmental negativities cause the flora in the bee intestine to be negatively affected and cause significant changes in hive productivity. Therefore, we point out that it is beneficial to know how the community of bee microbial flora changes in association with other factors in order to protect bee health, increase beekeeping efficiency, and prevent economic losses.

GİRİŞ

Bal arıları, binlerce işçi arıdan, tek bir kraliçe arıdan ve sadece çiftleşmede rol alan ve belirli dönemlerde bulunan az sayıdaki erkek arıdan oluşan kolonilerde yaşayan sosyal böceklerdir (Kwong v.d. 2016). Hayvanlar alemi, Eklembacaklılar şubesi, Antenliler alt şubesi, Böcekler sınıfı, Zar Kanatlılar takımı, Arılar familyası ve *Apis mellifera* Linea türü şeklinde sınıflandırılan bal arıları, doğada asırlardır önemli roller oynamış, dünyada tarım ve ticarete büyük öneme sahip; en önemli tozlaştırıcılardır (Bonilla-Rosso ve Engel 2018). Günümüzde arılar, sağlık ve üretkenliklerini etkileyen bir dizi biyotik ve abiyotik faktörlere (patojenler, böcek ilaçları, iklim değişikliği, habitat kaybı, mikroflora bozunumu vb.) maruz kalmaktadır. Bu nedenle çeşitli ortamlarla temas halinde olup çeşitli bakteriyel flora kazanımları olmaktadır (Alberoni v.d. 2016, Porrini v.d. 2016).

Koloniye güçlü ve işlevsel tutmak için koloninin içinde ve dışında yapılması gereken bir görev hiyerarşisi vardır. Yetişkin bal arısı, larva aşamasında genetik içeriğine ve yiyeceğine bağlı olarak bir kraliçe, işçi veya erkek arı (drone) olabilir. Kraliçe arı yaklaşık 15-16 gün, işçi arılar 20-21 gün ve erkek arıların tamamen gelişmesi 22-24 gün sürer. İşçi bal arısı, yumurta döneminden itibaren larva haline gelmesine ve daha sonra erişkin işçi arısına dönüşmesine kadar bir dizi yaşamsal aşama geçirmektedir. Genelleştirilmiş bir yaklaşımda, her bir işçi arı larva besleyiciliği, kovan savunması, kraliçe arı bakımı, kovan havalandırılması ve dezenfeksiyonu gibi görevleri yerine getirmektedir (Rangberg v.d. 2012).

Genç arılar (özellikle bakıcı arılar), protein ve lipid bakımından zengin, işlenmiş polen (arı ekmeği) ile beslenir ve yavru bakımına katılırlar (Rokop v.d. 2015). Larva başlangıçta steril olabilir, ancak işçi arı

besleme yapan arıların ve bakıcı arıların sağladığı polenleri ve arı sütünü yedikleri için, pupa devresinden önce besinler aracılığıyla kendi mikrofloralarını oluştururlar (Lee ve Kime 1984). Kültüre dayalı yapılan bazı eski araştırmalarda, pupalıktan çıkan arıların sindirim sistemlerinin oluştuğu ilk erişkinlik dönemlerinde gastrointestinal mikroflora bakterileri içermedikleri gösterilmiştir (Gilliam 1971). Bağırsak mikrobiyota gelişimi çevreden etkilenir ve özellikle gelişim sırasında değişime oldukça duyarlıdır.

Çalışmalar, arı gastrointestinal mikrobiyomunun metabolizmada, bağışıklık fonksiyonunda, büyümede ve gelişmede, patojenlere karşı korunmada aktif bir rol oynadığını göstermektedir. Son yıllarda, antibiyotiğe dirençli bakterilerden parazitik akarlar (örneğin *Varroa destructor*) kadar çeşitli patojenler ve çevresel stres faktörleri arı sağlığını tehdit etmektedir. Bu durum, bal arıları için patojen olan bakteriler üzerinde yapılan araştırmaların yanı sıra, mikrofloranın arı sağlığı üzerindeki rolü ve bu simbiyotların genel işleyişi hakkında araştırmalar yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır (Bendel 2002, Bonilla-Rosso 2018).

MİKROBİYAL FLORA, KOLONİZASYONU VE EDİNİMİ

Mikrobiyota

Canlılarda vücut içinde (sindirim kanalı) ya da dışında (deri florası) birlik içinde (simbiyot) 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.

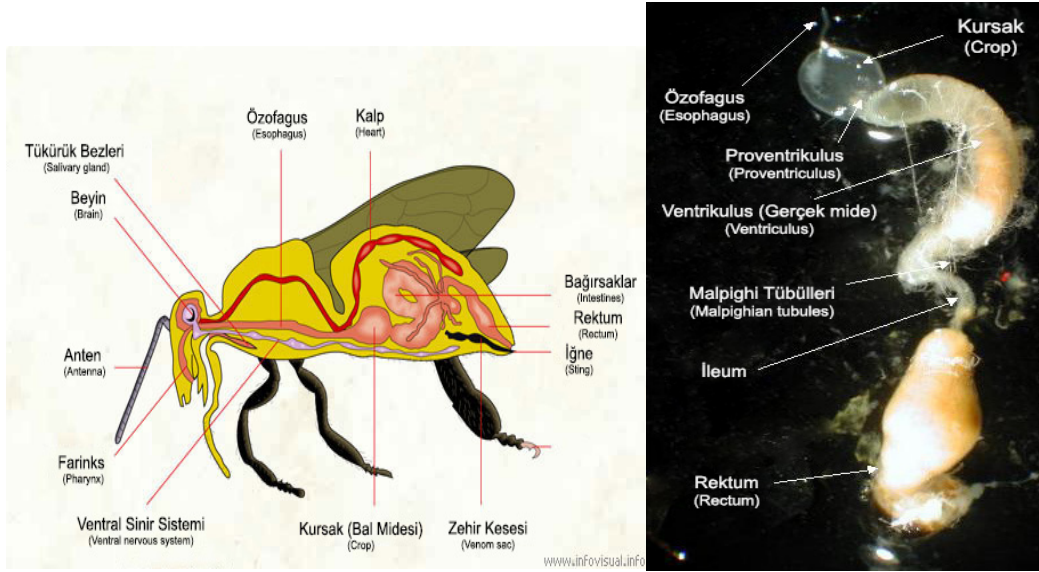
Tüm canlılarda kalıcı ve geçici olmak üzere iki tip mikrobiyota popülasyonu bulunmaktadır. Kalıcı mikrobiyota canlının vücudunda aşırı olumsuz bir durum oluşmadıkça hayat boyu bulunan mikrobiyal topluluk iken, geçici mikrobiyota ise saatler veya aylar süresince organizmada bulunan, değişim gösteren mikrobiyal topluluktur. Kalıcı mikroflorada mikroorganizmalar belirli alanlarda sürekli olarak bulunurlar. Geçici (transient) mikroflora ise çevreden

bulaşma ile gelişir ve sürekli değişim gösterir. Geçici floranın fırsatçılık durumuna bağlı olarak hastalık yapma (patojenik) veya yapmama (nonpatojen) potansiyelleri vardır. Hastalık yapma potansiyeli; normal konağın savunma sisteminin çökmesinde, normal mikrofloranın hasarında ve olmaması gereken vücut bölgelerinde bulunması halinde ortaya çıkmaktadır (Sammataro ve Yoder 2012).

Mikroorganizmaların Gastrointestinal Sistemde Yerleşimleri

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 simbiyotları 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 (Şekil1). 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).

Bal arısı mikrobiyotasındaki temel (çekirdek) türlerin varlığı oldukça tutarlı olsa da bağırsak segmentlerinde, sosyal sınıflarda, kovanlarda önemli varyasyonlar görülmektedir (Martinson v.d. 2011, 2012, Moran v.d. 2012, Corby-Harris v.d. 2014, Powell v.d. 2014, Ludvigsen v.d. 2015, Yun v.d. 2018). Bal arılarının farklı spesifik mikroorganizmaları barındıran gastrointestinal bölmeleri temel bağırsak mikrobiyotasını oluşturan bakterilerin özel kolonizasyonu ile oluşur (Raymann ve Moran 2018). Bakterilerin büyük çoğunluğunun bal arısı arka bağırsağında yaşadığı (Martinson v.d. 2012) ve arka bağırsak mikrobiyotasının, bal midesi ve orta bağırsağa göre geçici/değişken mikrobiyotaya sahip olduğu da belirtilmektedir (Corby-Harris v.d. 2014, Ludvigsen v.d. 2015). Larvalardaki bakteriyel sekansları incelemek için moleküler yöntemleri kullanan daha yakın tarihli çalışmalarda, mikroflorada bazı çekirdek (temel) dışı türlerin varlığı da bildirilmiştir (Mohr ve Tebbe 2006, Ahn v.d. 2012, Martinson v.d. 2012, Vojvodic v.d. 2013).

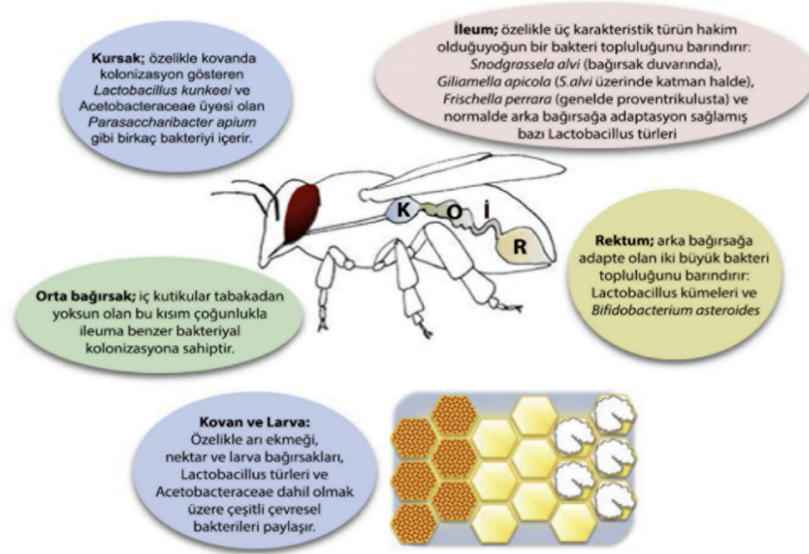


Şekil1. Erişkin bal arısı gastrointestinal sistemi (Zachary Huang, Department of Entomology, Michigan State University, URL-1, URL-2)

Figure1. Adult honey bee gastrointestinal tract

Anatomik olarak bal midesi (kursak), bal arısının sosyal/beslenme ara yüzüdür. Bal midesi; şişirilebilir balon benzeri yapıya sahiptir ve ön bağırsağın özelleşmiş bir parçasıdır. Bal midesinin ana işlevi, sıvı gıdaların (su, nektar ve tatlı su) kovana taşınması ve vücutta depolanmasıdır (Blatt ve Roces 2002). Arılar çiçekte, polene ve nektara erişmek için ön ayaklarını ve dillerini kullanırlar, daha sonra polen kesesinde polenleri toplarlar. Arılar kovana geri döndükten sonra, bal midesi içeriklerini bir petek hücresinde depolamak üzere veya diğer arılarla trofallaksis yoluyla paylaşmak için ağızdan geri çıkarıp kullanılmaktadırlar. Bu süre içerisinde bal midesinde bekleyen nektar, hem duvar epitelinde yer alan akuaporinler sayesinde lümeninden bal midesine suyun alınımı ile işlenir, hem de dışarıdan bal midesine bulaştırılmış olan çeşitli mikroorganizmalara maruz kalır. Bal midesi mikrobiyotası mevsimseldir; sahip olduğu kalıcı mikrobiyal ortam, işçi arının gerçekleştirdiği göreve, nektar kaynağına ve miktarına bağlıdır (Tajabadi v.d. 2011, Corby-Harris v.d. 2014). Bal midesi mikroaerobik (düşük oksijenli) bir ortama ve optimum 35°C sıcaklığa sahip olması nedeniyle, özellikle bal arısına özgü laktik asit bakterilerinin

gelişmesi için uygun bir nişi temsil etmektedir (Jones v.d. 2004, Olofsson ve Vásquez 2008, Killer v.d. 2014). Bu mikroorganizmalar, depolanan ürünlerin korunmasının yanı sıra, fermentasyon ve sindirimde de aktif rol oynamaktadırlar (Anderson v.d. 2014). Bal midesinin veya polen kesesinin, özellikle *Lactobacillus kunkeei* 'yi bol miktarda içerdiği, %1,7'sinin diğer çevresel bakteriler olan *Lactobacillus* türleri ve *Acetobacteraceae* (Alpha 2.2) familyası üyeleri ve %1,3 'ünün *Bifidobacterium* olarak tespit edildiği, ayrıca yapılan çalışmalarda bal midesinde, bağırsakta, kovanda, nektarda, seyreltilmiş balda ve arı ekmeğinde yüksek osmotolerant (yüksek şeker varlığında üreyebilen) ve aside dirençli çeşitli taksonların varlığı bildirilmektedir (Olofsson ve Vásquez 2008, Endo ve Salminen 2013, Anderson v.d. 2014). Ventrikülüs olarak da adlandırılan orta bağırsak, polen ve nektar için birincil sindirim alanıdır ve gerçek mide olarak bilinmektedir. Orta bağırsak, karnın etrafında sarılmış şekilde bulunur; aslında arı vücudunun yaklaşık iki katı uzunluğundadır. Orta bağırsakta mikroorganizmaların kolonizasyonu ileum ile aynıdır (Crailsheim 1988, Davis 2004, URL-3).



Şekil2. Bal arısı mikrobiyotasının ana bileşenleri ve arı bağırsağındaki veya kovandaki yerleri (Moran 2015)

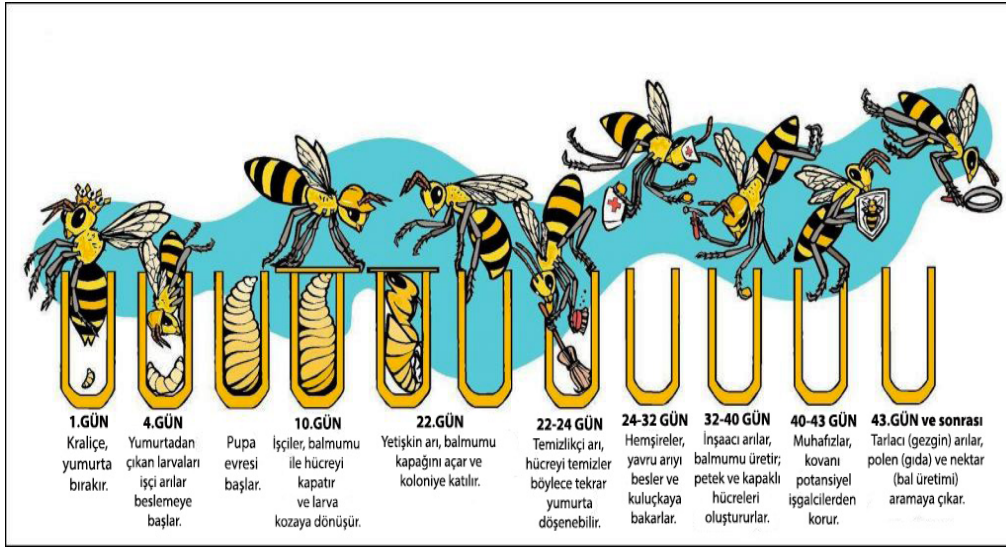
Figure2. The main components of the honeybee microbiota and their location in the intestine or hive

Arka bağırsak; metabolik ürünlerin geri kazanıldığı ve fazla suyun vücuda geri emildiği ince bağırsak (ileum) ve rektumdan oluşmaktadır. Omurgalıların böbrekleri gibi işlev gören malpigi tüpleri de arka bağırsağın bazal ucuna bağlıdır ve karın boşluğunda serbestçe yüzer. Rektum gerektiğinde şişerek, büyük miktarda atık madde tutabilir. Arılar yuvalarını temiz tutarlar ve kovanın dışında bir boşaltım uçuşu yapana kadar atıklarını rektumda muhafaza ederler. Uzun ve soğuk kışları olan iklimlerde, arılar bu görevi gerçekleştirmek için haftalarca hatta aylarca bekleyebilirler (Davis 2004, URL-3). Bu durumun mikroorganizmalar için eşsiz bir üreme ortamı yarattığı ve rektum pH değerini özellikle asidik bakteriler için optimal duruma getirdiği düşünülmektedir. Erişkin işçi bal arısı, sindirim sisteminde kabaca 10^8 - 10^9 kob (koloni oluşturan birim) bakteri hücrelerine sahiptir ve bu topluluk işçi kovandan ayrılmadan önce, dört gün içerisinde kurulur. Bu bakterilerin büyük çoğunluğu *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* üyelerinden oluşmaktadır ve yaklaşık %95'i arka bağırsağa yerleşmiştir (Martinson v.d. 2012, Powell v.d. 2014) *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri muhtemelen karbonhidrat katabolizmasında ve dolayısıyla konakçılarının beslenmesinde merkezi bir işlev görmektedir (Lee v.d. 2014). İnce bağırsakta (ileum)

baskın olan bakteriler ise *Gilliamella apicola*, *Snodgrassella alvi*, *Frischella perrara* olarak bildirilmektedir ve bu mikroflora üyelerinin özellikle fekal-oral yolla bulaştığı belirtilmektedir (Powell v.d. 2014).

Mikrobiyal Flora Edinimi

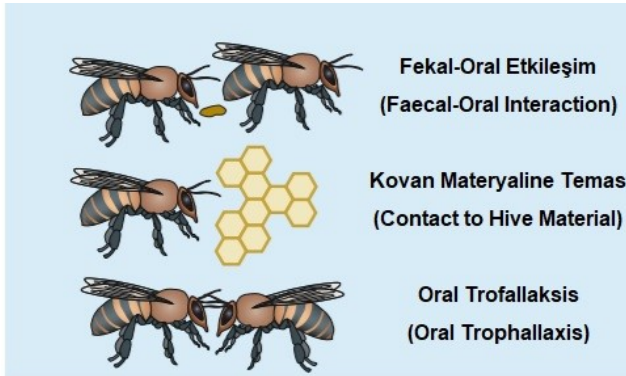
Larva ve yumurtadan yeni çıkan işçi arılar (Şekil3), neredeyse steril yani hiç bakteri kolonizasyonu göstermezken, mikrobiyal aşılama ve bağırsakta kolonileşme, polen tüketiminin bir sonucu olarak, yavru arı yumurtadan çıktıktan sonraki ortalama dört gün içinde gerçekleşir ve kolonideki kıdemli arılarla sosyal etkileşimler sırasında devam eder (Gilliam 1997, Martinson v.d. 2012, Raghavan v.d. 2013, Powell v.d. 2014). Nicelendirildiğinde, larvalardaki bakteri sayısı yok denecek kadar azdır (Martinson v.d. 2012) ve esas olarak çevresel *Acetobacteraceae* (Alpha2.2) familyası üyelerinden ve *Lactobacillus* türlerinden (Vojvodic v.d. 2013) oluşmaktadır. Bu gruplar nektar ve polende de bulunduğundan, larvalardaki mikrobiyota varlığı, farklı kaynaklardan gelen suşların filogenetik analizleri ile belirtildiği gibi gıda yoluyla bulaşan bakterilerdir (Anderson v.d. 2013).



Şekil3. Bal arısı yaşam döngüsü (URL-4)

Figure3. Life cycle of honey bee

Gastrointestinal mikrobiyota, koloni üyeleri tarafından oral-fekal, oral trofallaksis, depolanmış polen veya arı ekmeği tüketimi, kovan içindeki yaşlı arılarla etkileşim ve erişkin dönemde petek gözleri ile temas yoluyla kazanılır ve paylaşılır (Şekil 4) (Martinson v.d. 2012, Powell v.d. 2014, Kwong ve Moran 2016).



Şekil4. Erişkin arılarda bakteriyel aşılama yolları (Kwong ve Moran 2016)

Figure4. Bacterial vaccination routes in adult bees

Powell ve ark. (2014) gerçekleştirdikleri çalışmada; kovadaki çerçeve, malzeme ve diğer işçi arılar ile temas etmeyen ve izole şekilde yetiştirilen denek bireylerin, 4 ila 6 gün boyunca stabil bir etkileşime tabi tutulan ve doğal kovan koşullarında bulunan

arıların aksine, 8 gün sonra bile önemli bir gastrointestinal flora geliştiremedikleri sonucuna varmışlardır.

Arı kolonileri yıl boyunca çeşitli tarımsal ekosistemlere ve kovanın mikrobiyal dengesini etkileyebilecek çok sayıda çevresel değişkene maruz kalmaktadır. Arı mikrobiyotası; mevsimsel ve coğrafi değişimler gibi faktörlere (Mrazek v.d. 2008, Mattila v.d. 2012), döllenmiş yumurtadan, erişkin döneme ulaşıncaya dek izlenen gelişim evrelerine (Mohr ve Tebbe 2006, Yoshiyama ve Kimura 2009, Martinson v.d. 2012), bal arısının yaşına, beslenmesine ve sosyal yaşam tarzına bağlıdır (Ludvigsen 2013, Corby-Harris v.d. 2014, Linjordet 2016). Aynı kovan içindeki işçi arıların çoğunun benzer mikrobiyotaya sahip olması gerektiği ve bu durumun taksonomide farklılıkları tetiklediği bildirilmektedir (Martinson v.d. 2011, 2012, Moran v.d. 2012). Bazı araştırmalar, işçi arılar yaşlandıkça ve yiyecek arama sürecine geçtiklerinde, mikrobiyota bileşimlerinin hafifçe farklı türlere kaydığını göstermektedir. Mikrobiyotada bulunan kalıcı mikroorganizmaların, özellikle *Snodgrassella alvi* ve *Gilliamella apicola*, sayılarının da mevsimsel olarak artış şeklinde kayabildiği ve bu durumun muhtemelen beslenme diyetindeki değişikliklerin etkisini yansıttığı bildirilmektedir (Raymann ve Moran 2018).

Tablo1. Bal arıları ile ilişkili başlıca bakteri türleri (Martinson v.d. 2011, Kwong ve Moran 2013, Moran 2015, URL-5)**Table1.** Bacterial species associated with honey bees

Bakteri Şubesi (Phylum)	Taksonomi/ Türler (Species)	Başlıca Bulunan Yer (Location)	Arı Türü (Bee Species)
<u>Alphaproteobacteria</u>	<u>Rhizobiales</u>	Erişkin Bağırsağı; değişken kolonizasyon	<i>Apis mellifera</i>
	<u>Bartonellaceae</u>		
	<i>Bartonella apis</i>	(Adult intestine; variable colonization)	
	<u>Rhodospirillales</u>	Erişkin Bal Midesi, Larva Bağırsağı, Kovan	<i>Apis</i> ve <i>Bombus</i> türlerinde
	<u>Acetobacteriaceae</u>		
	<i>Bombella apis</i>	(Adult Crop, Larval Intestine and Hive)	
	<i>Gluconobacter</i> sp.		(<i>Apis</i> and <i>Bombus</i> species)
	<i>Commensalibacter</i> sp.		
	<i>Parasaccharibacter apium</i>	Larva Bağırsağı, Bazı Erişkin Arka Bağırsağı, Erişkin Bal Midesi, Bal ve Kovan	<i>Apis</i> ve <i>Bombus</i> türlerinde
		(Larval Intestine, Some Adults Hindgut, Adult Crop, Honey and Hive)	(<i>Apis</i> and <i>Bombus</i> species)
<u>Betaproteobacteria</u>	<u>Neisseriales</u>	Erişkin Arka Bağırsağı/İleum Duvarında	<i>Apis</i> ve <i>Bombus</i> türlerinde
	<u>Neisseriaceae</u>		
	<i>Snodgrassella alvi</i>	(Adult Hindgut/Ileum wall)	(<i>Apis</i> and <i>Bombus</i> species)
<u>Actinobacteria</u>	<u>Bifidobacteriales</u>	Erişkin Arka Bağırsağı/Rektum	<i>Apis</i> ve <i>Bombus</i> türlerinde
	<i>Bifidobacterium asteroides</i>		
	<i>B. actinocoloniiforme</i>	(Adult Hindgut/Rectum)	(<i>Apis</i> and <i>Bombus</i> species)
	<i>B. bohemicum</i>		
<u>Firmicutes (4-5)</u>	<u>Lactobacillales</u>	Erişkin Arka Bağırsağında / Rektumda	<i>Apis</i> ve <i>Bombus</i> türlerinde
	<i>Lactobacillus mellis</i>		
	<i>L. mellifer</i>	(Adult Hindgut/Rectum)	(<i>Apis</i> and <i>Bombus</i> species)

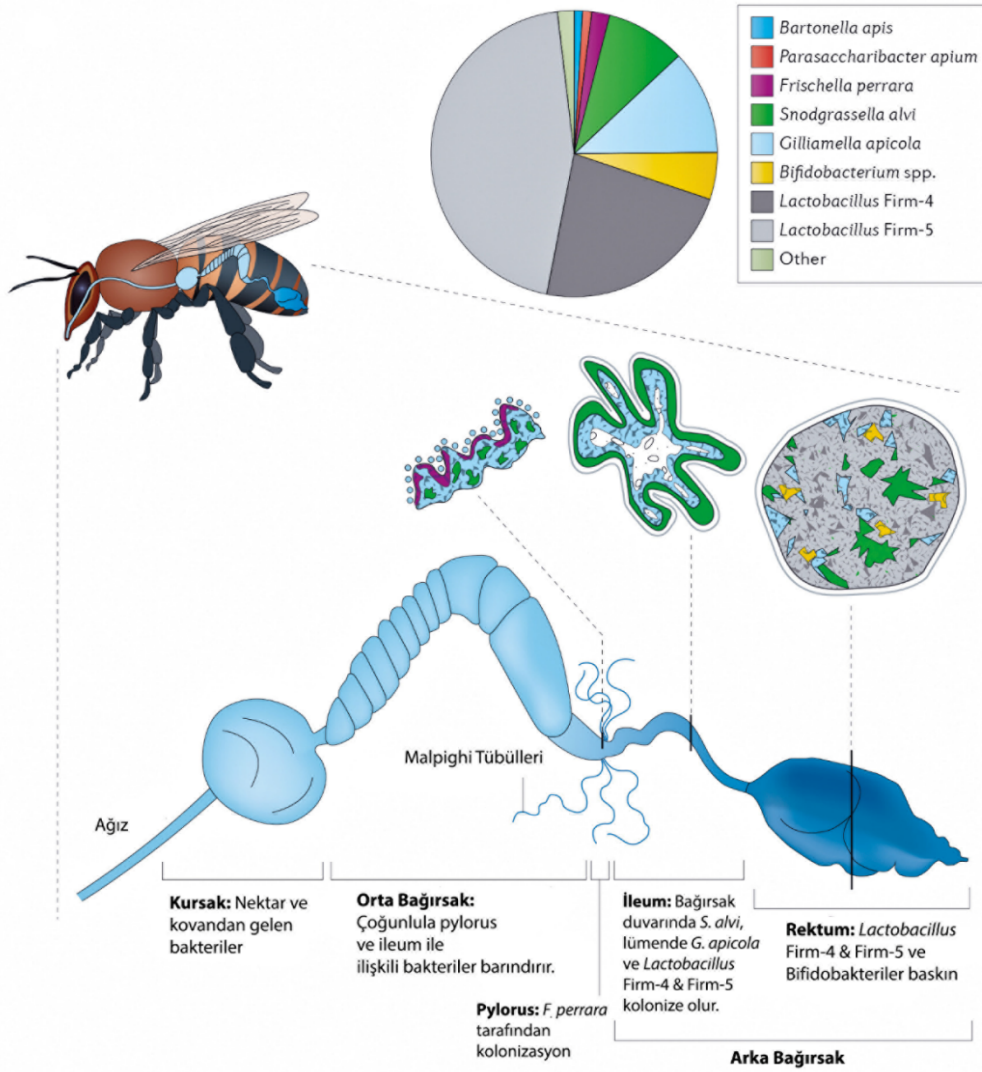
DERLEME / REVIEW

<i>L. apinorum</i>	Erişkin Arka Bağırsağı (Ileum ve Rektum)	<i>Apis</i> ve <i>Bombus</i> türlerinde
<i>L. melliventris</i>		
<i>L. kimbladii</i>	(Adult Hindgut-Ileum and rectum)	(<i>Apis</i> and <i>Bombus</i> species)
<i>L. kullabergensis</i>		
<i>L. helsingborgensis</i>		
<i>L. kunkeei</i> (Fructophilic)	Larva Bağırsağı, Erişkin Kursak, Nektar, Bal, Kovan (Erişkin Arka Bağırsağında bulunmaz)	<i>Apis</i> ve <i>Bombus</i> türlerinde
	(Larval Intestine, Adult Crop, Nectar, Honey, Hive (not found in the adults hindgut))	(<i>Apis</i> and <i>Bombus</i> species)
<u>Gammaproteobacteria</u>	<u>Orbales</u>	
	<u>Orbaceae</u>	
<i>Gilliamella apicola</i>	Erişkin Orta Bağırsak, Arka Bağırsak (Ileum Lümeninde)	<i>Apis</i> ve <i>Bombus</i> türleri
	(Adult Midgut, Hindgut- Ileum lumen)	(<i>Apis</i> and <i>Bombus</i> species)
<i>Frischella perrara</i>	Erişkin Arka Bağırsak-Proventrikulus ve Ileum	<i>Apis mellifera</i>
	(Adult Hindgut-Proventriculus & Ileum)	

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). Moleküler çalışmalar (16S rRNA geni) ile elde edilen verilere göre, arı bağırsağı mikrobiyotasının ~%95'ini oluşturan bakterilerin Tablo1'de verildiği gibi arının çeşitli vücut bölgelerinden, kovandan ve arı ürünlerinden karakterize edilebildikleri bildirilmektedir (Jeyaparakash v.d. 2003, Martinson v.d. 2011, Moran v.d. 2012, Kwong ve Moran 2016).

Temel Mikrobiyota ve Diğer Bağırsak Mikroorganizmaları

Arıların gastrointestinal sistemi; *Gilliamella apicola*, *Snodgrassella alvi*, *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, *Lactobacillus Firm-4*, *Firm-5* ve *Bifidobacterium asteroides* üyelerinden oluşan büyük bir mikrobiyotadan oluşur (Şekil5). Bu bakteri türleri bal arısı bağırsağının temel (çekirdek) mikrobiyotasını oluşturmaktadır (Rokop v.d. 2015, Kwong ve Moran 2016, Yun v.d. 2018).



Şekil5. Arı mikrobiyotasının kolonizasyonu (Kwong ve Moran 2016)

Figure5. Colonization of bee microbiota

Bal arısı sindirim sisteminin, kültüre dayanan çalışmalarda, mikroaerofilik (atmosferik oksijen seviyeleri altında) veya anaerobik mikroorganizmalara sahip oldukları bildirilmiştir. Son zamanlarda, metagenomik numunelerin ve kültürlenmiş izolatların potansiyel metabolizması ve fonksiyonları genetik yöntemler kullanılarak ortaya konmuştur. *A. mellifera* işçi arıların çoğunda, bağırsak mikrobiyotasının %95 'inden fazlasının yaklaşık sekiz bakteri türünden oluştuğu belirlenmiştir (Ahn v.d. 2012, Sabree v.d. 2012).

Erişkin işçi bal arısı (*Apis mellifera*) bağırsakları dokuz temel bakteri türünü (veya filotipleri) barındırır ve yerleşimi büyük ölçüde arka bağırsak ile sınırlıdır. Bu türlerin beşi; *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, iki tür *Lactobacillus* ve bir tür *Bifidobacterium*'dur. Bunlar her yerde bulunabilir ve esasen dünyadaki her erişkin işçi arıda yerleşim gösterdikleri bildirilmektedir. Bu türler temel bağırsak mikrobiyomu olarak kabul edilebilir. Diğer üyeler ise *Bartonella apis*, *Apibacter adventoris*, *Frischella perrara* türleri ve *Acetobacteraceae* familyası üyeleri

DERLEME / REVIEW

olarak bilinmektedir (Raymann ve Moran 2018).

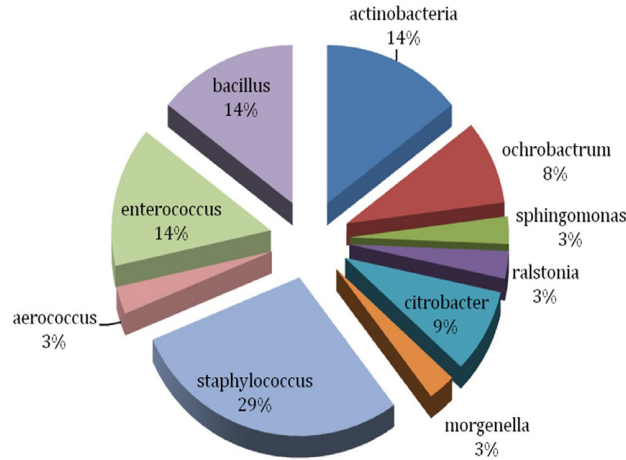
Her bir temel bakteri türü, sindirim sistemi içinde karakteristik bir dağılım gösterir. Üç ana proteobakteriyel tür olan *G. apicola*, *F. perrara* ve *S. alvi*, ileumda baskındır ve malpigi tüplerinden itibaren ileum duvarı boyunca devam eden yoğun bir biyofilm tabakası oluşturur. *Snodgrassella alvi* doğrudan bağırsağı kaplayan kütikül üzerinde sürekli bir tabaka oluşturmaktadır. *Gilliamella apicola* bağırsak epitelinin lümenine karşı en üst katmanında kolonize olur. *Frischella 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, *Lactobacillus Firm 4*, *Firm 5* ve *Bifidobacterium asteroides*, arka bağırsağın rektum bölgesinde en fazla miktarda bulunmaktadır. *Lactobacillus Firm-5*, lümen içinde küçük kümeler halinde kolonize olmaktadır (Moran 2015, Raymann ve Moran 2018).

Arılarla ilişkili mikroflora ilk olarak kültürel teknikler kullanılarak araştırılmıştır (Gilliam ve Valentine 1976, Gilliam ve Morton 1978). Çeşitli çalışmalarda, Gram değişken pleomorfik bakteriler, *Bacillus türleri* ve bazı Enterobacteriaceae familyası üyeleri ile birlikte küf ve mayalar; polen, nektar, arılar, bal, balmumu ve arı sütünde saptanmıştır (Snowdon ve Cliver 1996, Gilliam 1997). Küfler, özellikle de *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsleri, işçi bal arılarının sindirim kanalında yaygın olarak bulunmuştur (Gilliam ve Perst 1972, Gilliam v.d. 1974, 1997). Bağırsak mayalarına en sık, hastalıklı, besin eksikliği olan diyetlerle veya antibiyotiklerle beslenen ya da pestisitlere maruz kalan kolonilerden gelen işçi arılarda rastlanılmış; maya varlığı bal arılarındaki stres koşullarının bir göstergesi olarak ortaya konmuştur. Yumurtalar, prepupalar, pupalar ve yeni doğan işçi arıların genellikle mikroorganizma taşımadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, bazı larvaların, beslenme esnasında, erişkin arılar, polen ve petek gözleri ile ilişkili mikroorganizmaları edindiği bildirilmiştir. Erişkin işçi ve kraliçe arılarında en yaygın bağırsak mikroorganizmaları Gram değişken pleomorfik bakteriler olarak bildirilmiştir. Ayrıca bu bakteriler farklı tür bal arısı larvalarından, arı dışkılarından, polenlerden, arı ekmeğinden de izole edilmiştir. Bu bakteriler Gram boyamada aşırı

değişkenlik gösterir ve hem basil hem kok morfolojisine sahiptir. Ayrıca kraliçe arıların bağırsaklarında *Torulopsis magnoliae*, *T. glabrata*, *Candida parapsilosis* ve *Hansenula anomola* gibi mayaların ve *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi Gram-negatif basillerin bulunduğu ve nadiren bu bakterilerin arı ekmeği ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. İşçi arılarının gastrointestinal sisteminde *Penicillium* ve *Aspergillus* cinslerine ait küfler bulunmuştur. Yaygın olarak tanımlanan türler arasında *Penicillium frequentans*, *P. cyclopium*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Cladosporium cladosporioides* ve *Alternaria tenuissima* bildirilmektedir. Yapılan çalışmada, işçi arılarda küf kolonizasyonunun sonbahar ve kış aylarında daha yaygın olduğu sonucuna varılmıştır (Gilliam 1997).

Bazı bal arısı bağırsaklarında düşük miktarda da olsa başka bakteri türleri bulunmaktadır. Bunlar arasında hem Avrupa hem de Amerikan bal arısı işçilerinden ve bazı bombus arılarından alınan örneklerde çok az (<%1) miktarda Bacteroidetes familyasının (Babendreier v.d. 2007, Sabree v.d. 2012) spesifik bir kümesi bulunabilmektedir. Ek olarak, yaygın böcek patojenleri ile ilişkili çeşitli Enterobacteriaceae familyası üyelerinin genellikle düşük sayılarda (<%0,1) bulunduğu ve nadiren bireysel olarak bazı arılarda daha yüksek oranlara ulaştığı belirtilmektedir (Moran v.d. 2012, Sabree v.d. 2012).

Anjum ve ark. (2017), 45 işçi arının bağırsak içeriğinden toplam 150 aerobik ve fakültatif anaerobik bakteriyi, biyokimyasal testler ve 16S rDNA dizilimi ve biyoinformatik yöntemler kullanılarak tanımlamışlar ve Firmicutes (%60), Proteobacteria (%26), Actinobacteria (%14) adlı üç büyük bakteri şubesi olarak sınıflandırmışlardır (Şekil6). Çalışmada Enterobacteriaceae ve Micrococcineae familya üyeleri ile *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Ochrobactrum*, *Sphingomonas*, *Ralstonia*, *Corynebacterium* cinsleri izole edilmiştir. Bu bakterilerin birçoğunun asitli ortamlara ve fermente şekerlere toleranslı olduğu, bu nedenle sağlıklı bir mikrobiyotanın içeriği olarak kabul edilebileceği bildirilmektedir.



Şekil6. Bal arısından izole edilen bazı aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerin biyokimyasal testler ve 16S rDNA dizilimi ile sınıflandırılması (Anjum v.d. 2017)

Figure6. Classification of some aerobic and facultative anaerobic bacteria isolated from honey bee by biochemical analysis and 16S rDNA sequence

Hem *Gilliamella apicola* hem de *Snodgrassella alvi*, bağırsak simbiyotları olup, işlevsel yetenekleri azaltılmış nispeten küçük genomlara sahiptir. *G. apicola*, eksik kükürt asimilasyonu ve trikarboksilik asit (TCA) yollarından dolayı bazı bileşikler sentezleyemez. Ayrıca, pirimidin öncüsü bazı maddeleri sentezleyen enzimlerden yoksundur. *S. alvi* ise şekeri karbon kaynağı olarak kullanamaz ve bunun yerine şeker metabolizmasının alt üniteleri olan sitrat, malat, a-ketoglutarat ve laktat gibi karboksilatları kullanabilmektedir. Bunlar doğrudan TCA döngüsünde kullanılabilir veya laktat durumunda laktat dehidrojenaz yoluyla pirüvata dönüştürülebilir. *S. alvi*, NADH dehidrojenaz ve sitokrom bo ve bd oksidazlara sahip zorunlu bir aerobdur, ancak süksinil-CoA ve süksinatın karşılıklı dönüşümünü katalize eden TCA döngüsü enzimi süksinil-CoA sentetazdan yoksundur. *G. apicola* ve *S. alvi* arı bağırsağında metabolik ortaklar olarak bazı açılardan birbirlerini tamamlayan mikroflora üyeleri olarak belirtilir (Kwong v.d. 2014). *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri de muhtemelen karbonhidrat katabolizmasında ve dolayısıyla konakçılarının beslenmesinde ortak merkezi bir işlev görmektedirler (Lee v.d. 2014).

Lamei (2018) *Apis mellifera* üzerinde yaptığı laktik asit bakterileri izolasyonu çalışmasında 7 farklı laktobasil türünü (*Lactobacillus apinorum*, *L. mellifer*, *L. apis*, *L. helsingborgensis*, *L. melliventris*, *L. kimbladii* ve *L. kullabergensis*) ve iki farklı bifidobakter türünü (*Bifidobacterium asteroides* ve *B.*

coryneforme) bildirmiştir. Bal arılarında laktik asit bakterilerinin yaygın kolonizasyon bölgesi bal midesi (kursak) olarak bilinmekle birlikte, orta (ventrikulus) ve arka bağırsaktan da çoğunlukla *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Enterococcus* cinsine ait bakterilerin izole edilebildiği gözlenmiştir (Tajabadi v.d. 2011, Corby-Harris v.d. 2014, Killer v.d. 2014, Hroncova v.d. 2015).

Mathialagan v.d. (2018), bal arılarıyla ilişkili doğal olarak oluşan probiyotik laktik asit bakterilerinin (LAB) çeşitliliğini araştırmak için farklı bal arısı ırklarında (*Apis mellifera*, *A. cerena indica*, *A. florea*, *A. dorsata* ve *Tetragonula iridipennis*) bal midesini incelemiştir. Sonuçlar analiz edilen örneklerdeki zengin LAB çeşitliliğini göstermiş; 6 cinsine ait toplam 42 izolat elde edilmiştir. İzole edilen suşların toplam mikrofloradaki yüzdeleri sırasıyla; *Enterococcus* (%23,8), *Micrococcus* (%18,8), *Streptococcus* (%13,8), *Pediococcus* (%13,8), *Lactobacillus* (%13,8), *Lactococcus* ve *Leuconostoc* (%10,0) şeklinde belirlenmiştir.

Mikrobiyotanın Yararları

Bağırsak mikroorganizmaları, metabolizma ve genel sağlık için önemli işlevler sunar. Sindirilemeyen karbonhidratları immünomodülasyona ayırma işlevi bulunan mikrobiyota, birçok konak organizma için gereklidir (Hall v.d. 2017). Bal arısı bağırsak mikrobiyotasının konakçı üzerinde belirgin etkileri vardır. Laboratuvar çalışmalarında, zengin bir bağırsak mikrobiyotasına sahip konaklarda ağırlık

DERLEME / REVIEW

artışı ve hormon sinyallerinin teşvik edildiği ve konakçının bağışıklık sistemini uyardığı belirtilmiştir (Kesnerova v.d. 2017)

Yapılan çalışmalarla, arılarda yetersiz beslenmenin normal bağırsak mikroflorasını bozduğu, daha yüksek mortalite ve hastalık duyarlılığına neden olduğu gösterilmiştir. Mikrofloranın (disbiyozun) bozulmasının işçi arı gelişimi için birçok olumsuz sonucu vardır: Erken yaşlarda bu tür bir bozulma, vitellogenin dahil olmak üzere önemli gelişimsel genlerin ekspresyonunu etkilemektedir. Bu durum bal arısı mikrobiyotasının immün sistemini uarması nedeniyle bağışıklığın etkilenmesine yol açmaktadır. Buna karşılık, bal arısının doğuştan gelen bağışıklık fonksiyonunun, hücresel stres tepkilerinin uyarılmasıyla tehlikeye sokulduğu gösterilmiştir (Raymann ve Moran 2018).

Bağırsak mikroflorası için bir başka potansiyel rol, parazitlere ve patojenlere karşı korumadır. Bal arıları veya bombus arılarıyla ilişkili bazı mikrofloral bakteri türleri antimikrobiyal özelliklere sahiptir, bu da potansiyel patojenlerin inhibisyonu olasılığını düşündürmektedir (Forsgren v.d. 2010, Vásquez v.d. 2012, Raghavan v.d. 2013). Yeni yapılan bir çalışmada *L. kunkei* 'nin arı sağlığı için antifungal etkili olduğu belirlenmiştir (Janashia v.d. 2018).

Laktik asit bakterileri (LAB), diğer hayvanlarda olduğu gibi bal arılarının da gastrointestinal mikrobiyotasının baskın üyeleri olan probiyotik mikroorganizmalardır (Rada v.d. 1997, Evans ve Lopez 2004, Killer v.d. 2010, Crotti v.d. 2012). LAB türlerinin probiyotik etkisinin, bal arılarının bağışıklığını artırdığı, patojenlerin etkisine karşı hayatta kalmalarına yardımcı olduğu, koloninin polen ve nektardan yararlanmalarını artırdığı (fermentasyon, sindirim ve emilim) ve balın antimikrobiyal özelliklerine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (Evans ve Lopez 2004, Forsgren v.d. 2010, Linjordet 2016). Özellikle Bacillales ve Actinobacteria sınıfının üyeleri ile *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakteriler, bal arıları ve insanlar da dahil olmak üzere birçok canlıda yararlı bağırsak simbiyotları olarak bilinir. Bal arılarında, bu bakterilerin nektar işleme, karbonhidrat metabolizması, immünomodülasyon ve patojen girişinin önlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Anderson v.d. 2011).

Bal arısı bağırsak mikrobiyotasındaki diğer değişimler, arıların beslenmesini, bağışıklığını ve genel sağlığını etkileyebilmektedir. Örneğin, Enterobacteriaceae familyasının birçok üyesi, şeker

fermantasyonu ve azot metabolizmasında rol alan fakültatif anaeroblardır ve bu nedenle bu taksonların nispi bolluğundaki değişiklikler bal arısı metabolizmasını bozabilir. Bal arısı mikroflorasında temel mikroflora bakterileri olarak tanımlanan türlerin dışında *Serratia*, *Edwardsiella*, *Acetobacter*, *Mannheimia*, *Gluconobacter*, *Bartonella* ve *Klebsiella* cinsine ait bakteriler de saptanmıştır. Bu bakterilerin bal arısının sağlığı için önemi henüz tam olarak bilinmemektedir. *Bartonella*, bu bağlamda bilinen bir fırsatçı patojendir ve antagonistik etki gösterdiği bildirilmektedir (Anderson v.d. 2011, Engel v.d. 2012).

Serratia marcescens ve *Hafnia alvi* gibi arı mikroflorasında düzensiz olarak bulunan bazı türler, böcek patojenleri ile yakından ilişkilidir. Bu bakteriler, bağırsak mikroflorasının bozulması durumunda baskın olabilecek fırsatçı patojenleri temsil edebilirler (Sabree v.d. 2012, Powell v.d. 2014). Örneğin, insan bağırsaklarındaki bazı *Escherichia coli* suşları, kolorektal kanser ve tümörlerin bir nedeni olarak ortaya çıkan kolibaktin adı verilen bir maddenin üretimi için hibrid nonribozomal peptid-poliketid sentaz yolunu kodlayan büyük bir lokus (~ 50 kilobaz) içerir. İlginç bir şekilde, bal arısında ileum ile sınırlı olan *Frischella perrara*, hücre kültürlerinde kolibaktine benzer sitotoksik etkilere sahip bir madde üreten yakın homolog bir lokusu kodlamaktadır. Bal arılarında *F. perrara* ve kolibaktinin rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, çoğu işçi arı bağırsaklarında bulunmasına rağmen, *F. perrara*'nın konakçıları için olumsuz sonuçları olabileceği düşünülmektedir (Engel v.d. 2015).

Escherichia coli hayvanların ve insanların bağırsak sistemlerinin normal florasında bulunan zararsız bir bakteridir, ancak hastalık nedeni olabilen patojen türleri de bulunmaktadır. İnsan bağırsak florasının normal bir üyesi olarak bulunan *E. coli* suşları ile konak organizma arasında uyumlu bir ilişki olduğundan hastalık yapmaz. Ancak, aynı canlıda başka bir organa veya başka bir konakçının bağırsağına geçmesi durumunda hastalık sebebi olabilir. Bu durumun, birçok canlının bağırsağında olduğu gibi arı barsak florası için de geçerli olduğu düşünülmektedir.

Bağırsak mikroflorası, konakçının bağışıklık sistemini düzenleyerek konakçı sağlığını büyük ölçüde etkileyebilir. Bununla birlikte, birçok önemli böcek için, bağırsak mikrobiyotası ile bağışıklık fonksiyonu arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır. Kwong ve ark. (2017) yaptıkları

çalışmada mikrobiyota varlığında arıların bağırsak dokusunda antimikrobiyal peptit (AMP) bileşikler olan apidaekin ve himenoptaesin peptitlerinin gen ekspresyonunun yüksek olduğu, ayrıca hem bağırsak lümeni hem de hemolenfin içinde; normal bağırsak mikrobiyotasını barındıran arılarda bağırsak mikrobiyotası bulunmayan arılardan daha yüksek apidaekin konsantrasyonlarını içerdikleri bildirmişlerdir. Dong ve ark. (2020) arı temel mikrobiyotasındaki önemli artışın, Peptostreptococcaceae, Bacteroidales takımları ile *Acinetobacter*, *Cyanobacteria*, *Bacteroides* ve *Escherichia-Shigella* gibi fırsatçı patojen cinslerin varlığında önemli bir azalmaya sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Arı temel mikrobiyotasının sosyal temas yoluyla önemli ölçüde kolonize olduğu bilinmektedir. Bağırsakta göreceli olarak *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* artışının işçi arılarda 4 günden sonra stabil olduğu belirlenmiştir. Bu bakterilerin, arılar için gerekli olan birçok besin ve enerji bileşenlerinin üretiminde rol alan bir dizi karbonhidrat metabolizmasına sahip olduğu ve nektar işlenmesine katıldığı öne sürülmektedir (Engel v.d. 2012, Butler v.d. 2013). Arı barsak mikroflorası, arının çevresel koşullarla ve de kendi popülasyonu ile olan sosyal etkileşimlerinden etkilenir; bu etkileşim mikroorganizmaların popülasyondaki diğer bireyler arasında yayılımını kolaylaştırır. Farklı çevre koşulları ve bakterisit etkili kimyasallar yüzünden normal mikrobiyotasından yoksun bırakılan arıların, kilo alımının ve metabolizmalarının olumsuz etkilendiği (Zheng v.d. 2017), patojenlere duyarlılıklarının (Koch ve Schmid-Hempel 2011) ve mortalitenin arttığı (Raymann v.d. 2017) gösterilmiştir.

SONUÇ

Son araştırmalarda, yetişkin bal arıları ve bombus arılarının, nispeten basit ve benzersiz bir bağırsak mikroflorasına sahip oldukları gösterilmiştir. Bal arısı bağırsak mikrobiyotası, memelilerinkiyle bazı benzerliklere sahiptir; çoğunlukla sosyal temas ile oluşmaktadır, büyük ölçüde konakçılarının bağırsaklarıyla sınırlıdır, diyet karbonhidratlarının metabolize edilmesine yardımcı olur ve patojenlere karşı koruma sağlamaktadır. Bununla birlikte, bal arılarında bağırsak mikroflorasının kompozisyonu dengesiz diyet (yetersiz beslenme), stres, yaşlanma, çeşitli antibiyotiklere ve pestisitlere maruz kalma, iklimsel ve coğrafi değişimler gibi birçok faktörden de

etkilenmektedir.

Erişkin bağırsaklarındaki karakteristik bağırsak bakterileri, pupa evresinden çıktıktan sonraki ilk birkaç gün boyunca temas edilen kudemli arılar ve peteklerden bulaşma yoluyla edinilmektedir. Bu aşılama sayesinde özel antimikrobiyal etkinlikleriyle bulundukları ortamı koruma ve konak immun sistemini olumlu yönde uyarma yetenekleri olan mikrobiyal flora belirli bölgelere yerleşmiş olur. Bal arıları (*Apis mellifera*), özellikle bahçe bitkilerinin birincil tozlayıcılarıdır. Son birkaç yılda, bal arıları ve kolonilerinde önemli bir düşüş rapor edilmektedir. Pek çok faktör bu varsayılan düşüşe sebep olabilir. Patojen mikroorganizmalar ve insektisitler dikkat çeken yaygın faktörler olmakla birlikte, dolaylı olarak peşistitler ve çeşitli kimyasalların etkileri de temel bağırsak mikroflorasının bozulmasına ve bal arısı sağlığının olumsuz etkilenmesine zemin hazırlamaktadır. Arı yaşamı için büyük önem arz eden mikrofloranın en önemli temel üyelerinin merak edilen tüm etki mekanizmaları henüz bilinmemektedir. Bu alanda daha fazla çalışma yapılması gerek evrensel gerekse bölgesel etkenlerin belirlenmesi ve arı popülasyonlarının korunması önemle gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahn, JH, Hong, IP, Bok, J, Kim, BY, Song, J, Weon, HY 2012. Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honeybees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. Journal of Microbiology, 50, s., 735–745. [PubMed: 23124740]
- Alberoni, D, Gaggia, F, Baffoni, L, Gioia, DD 2016. Beneficial microorganisms for honeybees: Problems and progresses. Applied Microbiology and Biotechnology, 100, 22. DOI: 10.1007/s00253-016-7870-4.
- Anderson, KE, Carroll, MJ, Sheehan, T, Mott, BM, Maes, P, Corby-Harris, V 2014. Hivestored pollen of honeybees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. Molecular Ecology, 23, 5904–5917. [PubMed: 25319366].
- Anderson, KE, Sheehan, T, Eckholm, B, Mott, B, DeGrandi-Hoffman, G 2011. An emerging paradigm of colony health: Microbial balance of the honeybee and hive (*Apis mellifera*). Insectes Sociaux, 58, 431–444. doi: 10.1007/s00040-011-0194-6

DERLEME / REVIEW

- Anderson, KE, Sheehan, TH, Mott, BM, Maes, P, Snyder, L, Schwan, MR, Walton, A, Jones, BM, Corby-Harris, V 2013. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: Bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 8e83125. [PubMed: 24358254]
- Anjum, SI, Shah, AH, Aurongzeb, M, Kori, J, Azim MK, Ansari, MJ, 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.
- Babendreier, D, Joller, D, Romeis, J, Bigler, F, Widmer, F 2007. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiol Ecol*, 59(3), 600–10. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00249.x.
- Bendel, JL 2002. Characterization of the normal flora of honeybee hives in Central Wisconsin. University of Wisconsin-La Crosse, Journal of Undergraduate Research, Volume V (2002), *Biology and Microbiology*, 437–441. (URL: <https://www.uwlax.edu/urc/jur-online/2002/>)
- Blatt, J, 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, 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.
- Butler, È, Alsterfjord, M, Olofsson, TC, Karlsson, C, Malmström, J, Vásquez, A 2013. Proteins of novel lactic acid bacteria from *Apis mellifera mellifera*: An insight into the production of known extra-cellular proteins during microbial stress. *BMC Microbiology*, 13, 235.
- Corby-Harris, V, Maes, P, Anderson, KE 2014. The bacterial communities associated with honeybee (*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.
- Crotti, E, Balloi, A, Hamdi, C, Sansonno, L, Marzorati, M, Gonella, E, Favia, G, Cherif, A, Bandi, C, Alma, A, Daffonchio, D 2012. Microbial symbionts: A resource for the management of insect-related problems. *Microbial Biotechnology*, 5(3), 307–17. DOI:10.1111/j.1751-7915.2011.00312.x.
- Davis, FC 2004. Inside and outside influences. In: David FC (editor), *The Honey Bee Inside Out*, Bee Craft Limited, Warwickshire, s., 145–157.
- Dong, Z-Xiang, Li, H-Yuan, Chen, Y-Fei, Wang, F., Deng, X-Yu, Lin, L-Bing, Zhang, Q-Lin, Li, J-Lian, Guo, J. 2020. Colonization Of The Gut Microbiota Of Honey Bee (*Apis mellifera*) Workers At Different Developmental Stages. *Microbiological Research*, 321, 1–12. DOI: 10.1016/j.micres.2019.126370
- Endo, A, Salminen, S 2013. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 36, 444–448. [PubMed: 23845309]
- Engel, P, Bartlett, KD, Moran, NA 2015. The bacterium *Frischella perrara* causes scab formation in the gut of its honeybee host. *Article in mBio*, 6, 3. DOI: 10.1128/mBio.00193-15.
- Engel, P, Martinson, VG, Moran, NA 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 109, 11002–11007.
- Evans, J, Lopez, D 2004. Bacterial probiotics induce an immune response in the honeybee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 97, 752–756.
- Forsgren, E, Olofsson, T, Vásquez, A, Fries, I 2010. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honeybee larvae. *Apidologie*, 41, 99–108.
- Gilliam, M 1971. Microbial sterility of the intestinal content of the immature honeybee, *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 honeybees. *FEMS Microbiology Letters*, 155, 1–10. DOI: 10.1111/j.1574-

- 6968.1997.tb12678.x.
- Gilliam, M, Morton, LH 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, Prest, DB 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, DB, Morton, HL 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, Valentine, DK 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.
- 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.
- Hroncova, Z, Havlik, J, Killer, J, Doskocil, I, Tyl, J, Kamler, M, Titera, D, Hakl, J, Bunesova, V, 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.
- Janashia, I, Choiset, Y, Jozefiak, D, Déniel, F, Coton, E, Moosavi-Movahedi, AA, Haertlé, T 2018. Beneficial protective role of endogenous lactic acid bacteria against mycotic contamination of honeybee beebread. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10, 638–646. DOI: 10.1007/s12602-017-9379-2.
- Jeyaprakash, A, Hoy, MA, Allsopp, MH 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. DOI: 10.1016/j.jip.2003.08.007.
- Jones, JC, Myerscough, MR, Graham, S 2004. Honeybee nest thermoregulation: Diversity promotes stability. *Science*, 16, 402–404.
- Kešnerová, L, Mars, RAT, Ellegaard, KM, Troilo, M, Sauer, U, Engel, P 2017. Disentangling Metabolic Functions Of Bacteria In The Honey Bee Gut. *PLOS Biology*, 15(12), e2003467. DOI:10.1371/journal.pbio.2003467.
- Killer, J, Dubna, S, Sedlacek, I, Svec P 2014. *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 152–157. DOI: 10.1099/ijs.0.053033-0.
- Killer, J, Kopec, J, Mrazek, J, Rada, V, Dubna, S, Marounek, M 2010. Bifidobacteria in the digestive tract of bumblebees. *Anaerobe*, 16, (2), 165–170. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2009.07.007.
- Koch, H, Schmid-Hempel, P 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 108, 19288–19292.
- Kwong WK, Mancenido, AL, Moran, NA 2017. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honeybees. *Royal Society Open Science*, 4, 170003. DOI: 10.1098/rsos.170003.
- Kwong, WK., Moran, NA 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nature reviews microbiology*, 14, 374–84. DOI:10.1038/nrmicro.2016.43.
- Kwong, WK, Engel, P, Koch, H, Moran, NA 2014. Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 11509–11514. [PubMed: 25053814]
- Kwong, WK, Moran, NA 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, 2008–2018. DOI:

DERLEME / REVIEW

10.1099/ijcs.0.044875-0.

- Lamei, S 2018. The Effect of Honeybee-Specific Lactic Acid Bacteria on American Foulbrood Disease of Honeybees. Doktora Tezi. Swedish University of Agricultural Sciences and Lund University, Uppsala, Lund, İsveç, 59 s, 14–21.
- Lee, CY, Kime, RW 1984. The use of honey for clarifying apple juice. *Journal of Apicultural Research & Bee World*, 23, 45–49.
- Lee, FJ, Rusch, DB, Stewart, FJ, Mattila, HR, Newton, ILG 2014. Saccharide breakdown and fermentation by the honeybee gut microbiome. *Environmental Microbiology*, 17(3), 796–815. DOI: 10.1111/1462-2920.12526.
- Linjordet, SM 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.
- 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.
- Ludvigsen, J, Rangberg, A, Avershina, E, Sekelja, M, Kreibich, C, Amdam, G, Rudi, K 2015. Shifts in the midgut/pyloric microbiota composition within a honeybee apiary throughout a season. *Microbes and Environments*, 30, 235–244.
- Martinson, VG, Danforth, BN, Minckley, RL, Rueppell, O, Tingek, S, Moran, NA 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, VG, Moy, J, 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, YSJT, David, PMM, Senthilkumar, M, Srinivasan, MR, 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.
- Mattila, HR, Rios, D, Walker-Sperling, VE, Roeselers, G, Newton, ILG 2012. Characterization of the active microbiotas associated with honeybees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. *PloS One*, 7, e32962. DOI: 10.1371/journal.pone.0032962.
- Mohr, KI, Tebbe, CC 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
- Moran, NA 2015. Genomics of the honeybee microbiome. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 22–28. DOI: 10.1016/j.cois.2015.04.003.
- Moran, NA, Hansen, AK, Powell, JE, Sabree, ZL 2012. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS ONE*. 7, e36393. [PubMed: 22558460]
- Mrazek, J, Strosova, L, Fliegerova, K, Kott, T, Kopečný, J 2008. Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiologica (Praha)*, 53, 229–233. DOI: 10.1007/s12223-008-0032-z.
- Olofsson, TC, 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]
- Porrini, C, Mutinelli, F, Bortolotti, L, Granato, A, Laurenson, L, Roberts, K, Gallina, A, Silvester, N, Medrzycki, P, Renzi, T, Sgolastra, F, Lodesani, M 2016. The status of honey bee health in Italy: Results from the Nationwide Bee Monitoring Network. *PLoS ONE* 11(5):e0155411.doi:10.1371/journal.pone.0155411.
- Powell, JE, Martinson, VG, Urban-Mead, K, Moran, NA 2014. Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 7378–7387.
- Rada, V, Machova, M, Huk, J, Marounek, M, Duskova, D 1997. Microflora in the

- honeybee digestive tract: Counts, characteristics and sensitivity to veterinary drugs. *Apidologie*, 28, 357–365.
- Raghavan, KT, Jacob, AA, Chandran, H 2013. Honeybee gut flora as a source of LAB (Lactic Acid Bacteria) with probiotic capabilities. *The Journal of Food Technology*, 105, 126-134.
- Rangberg, A, Diep, DB, Rudi, K, Amdam, GV 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.
- Raymann, K, Moran, AN 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
- Raymann, K, Shaffer, Z, Moran, NA 2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biology*, 15, e2001861.
- Rokop, ZP, Horton, MA, Newton, ILG 2015. Interactions between cooccurring lactic acid bacteria in honey bee hives. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 7261–7270. DOI:10.1128/AEM.01259-15.
- Sabree, ZL, Hansen, AK, Moran, NA 2012. Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honeybees. *PLoS ONE*, 7, e41250. [PubMed: 22829932]
- Sammataro, D, Yoder, AJ 2012. Honey bee colony health: Challenges and sustainable solutions. CRC Press Taylor and Francis Group, LLC, International Standard Book Number- 13: 978-1-4398-7941-2, Ozkirim, A., s., 13–14.
- Snowdon, JA, Cliver, DO 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, 31(1-3), 1–26. DOI:10.1016/0168-1605(96)00970-1
- Tajabadi, N, Mardan, M, Manap, MYA., Shuhaimi, M, Meimandipour, A, Nateghi, L 2011. Detection and identification of *Lactobacillus* Bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee *Apis dorsata*. *Apidologie*, Springer Verlag, 42 (5), 642–649. DOI: 10.1007/s13592-011-0069-x
- URL-1, 2020. <https://bee-health.extension.org/abdomen-of-the-honey-bee/> (18 Şubat 2020)
- URL-2, 2020. <https://infovisual.info/en/biology-animal/internal-anatomy-of-a-bee> (18 Şubat 2020)
- URL-3, 2020. <https://www.uaex.edu/farm-ranch/special-programs/beekeeping/about-honey-bees.aspx/> (18 Şubat 2020).
- URL-4, 2020. <https://dickinsoncountyconservationboard.com/2017/05/17/see-the-larva-inside-the-indoor-bee-hive/> (18 Şubat 2020).
- URL-5, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> (18 Şubat 2020)
- Vasquez, A, Forsgren, E, Fries, I, Paxton, RJ, Flaberg, E, Szekely, L, Olofsson, TC 2012. Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE*, 7(3), [e33188]. DOI: 10.1371/journal.pone.0033188.
- Vojvodic, S, Rehan, SM, Anderson, KE 2013. Microbial gut diversity of Africanized and European honeybee larval instars. *PLoS ONE*, 8:e72106. [PubMed: 23991051]
- Yoshiyama, M, 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: 91–96. DOI: 10.1016/j.jip.2009.07.005.
- Yun, JH, Jung, MJ, Kim, PS, Bae, JW 2018. Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honeybee. *Scientific Reports*, 8 (1). DOI: 10.1038/s41598-018-19860-7.
- Zheng, H, Powell, JE, Steele, MI, Dietrich, C, Moran, NA 2017. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 114:4775–4780.