



GİRESUN  
ÜNİVERSİTESİ



# FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GİRESUN ARI YETİŞTİRİCİLİĞİNDE ANTİBİYOTİK  
DİRENÇLİLİĞİ VE BALLARDAKİ ANTİBİYOTİK  
KALINTI DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI

**Biyoloji Anabilim Dalı**  
**Yüksek Lisans Tezi**  
**Tahsin DEMİR**  
**20142102011**

**2019**

GİRESUN

**T.C.  
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GİRESUN ARI YETİŞTİRİCİLİĞİNDE ANTİBİYOTİK  
DİRENÇLİLİĞİ VE BALLARDAKİ ANTİBİYOTİK  
KALINTI DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tahsin DEMİR**

**Enstitü Anabilim Dalı : Biyoloji**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Cengiz MUTLU**

**Haziran 2019**

T.C.  
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GİRESUN ARI YETİŞTİRİCİLİĞİNDE ANTİBİYOTİK  
DİRENÇLİLİĞİ VE BALLARDAKİ ANTİBİYOTİK  
KALINTI DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tahsin DEMİR

Enstitü Anabilim Dalı

:

Biyoloji

Bu tez 28/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr.  
Tamer AKKAN  
Jüri Başkanı

  
Doç. Dr.  
Cengiz MUTLU  
Üye

  
Dr. Öğr. Üyesi  
Okan YAZICIOĞLU  
Üye

Doç. Dr.  
Bahadır KOZ  
Enstitü Müdürü

## **BEYAN**

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Tahsin DEMİR

28/06/2019

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında değerli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, eğitimim süresince desteğini ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Cengiz MUTLU'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan, hiçbir yardımı esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Tamer AKKAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca proje çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen Feyzullah KONAK, Gökhan AKDENİZ, Fazıl GÜNEY, Ümit KAYABOYNU, Mehmet YILMAZ, Ayhan AKSOY ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her konuda desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan tüm aile fertlerim ve eşim ağrı DEMİR'e teşekkür ederim.

Bu alışma Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığı (Proje No: FEN-BAP-C-200515-08) ve Arıcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından maddi olarak desteklenmiştir, teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER .....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	V
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ÖZET.....	VII
SUMMARY .....	VIII
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
1.1. Arıcılık ve Gelişimi.....	2
1.2. Arıcılık Faaliyeti Ürünleri.....	3
1.3. Bal ve Yapısı .....	4
1.4. Arıcılıkta ve Arı Ürünlerinde Kimyasalların Kullanımı .....	7
1.4.1. Çevresel faktörler .....	8
1.4.1.1. Ağır metaller .....	8
1.4.1.2. Hastalık yapıcı mikroorganizmalar .....	9
1.4.1.3. Genetiği değiştirilmiş bitkiler .....	9
1.4.1.4. Diğer bulaşanlar .....	9
1.4.1.5. Pestisitler .....	10
1.4.2. Yanlış uygulanan arıcılık faaliyetleri sonucu oluşan kalıntı .....	11
1.4.2.1. Akarisitler.....	11
1.4.2.2. Baldaki organik asit kalıntısı.....	11
1.4.2.3. Antibiyotik Kalıntısı.....	12
BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	13
BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.1. Bal ve Arı Örneklerinin Toplanması.....	16
3.2. Analiz Aşamaları.....	17
3.2.1. Antibiyotik kalıntı düzeyi tespiti için uygulanan protokoller .....	18

3.2.1.1. Antimikrobiyal dizi I ultra kit protokolü.....	18
3.2.1.2. Antimikrobiyal dizi II kit protokolü.....	22
3.2.1.3. Antimikrobiyal dizi IV kit protokolü .....	26
3.3. Arılardan Bakteri İzolasyonu .....	29
3.4. Bakterilerin Antibiyotik Direnç Testleri .....	30
3.5. Çoklu Antibiyotik Dirençlilik Düzeylerinin Belirlenmesi.....	30
<b>BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>31</b>
4.1. Antibiyotik Kalıntı Analizleri .....	31
4.2. İzolatlardaki Antibiyotik Direnç Düzeyi.....	34
4.3. İzolatların Çoklu Antibiyotik Direnç İndeksi .....	36
<b>BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>37</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>42</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>47</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

µl	: mikrolitre
ppb	: Milyarda bir kısım
ppm	: Milyonda bir kısım
CEFT	: Seftiofur
ÇAD	: Çoklu Antibiyotik Direnci
DAPS	: Dapson
GDO	: Genetiği Değiştirilmiş Organizma
SCP	: Sülfaklorpidazin
SD	: Sülfadoksin
SDM	: Sülfadimetoksin
SM	: Sülfamerazin
SMM	: Sülfamonometoksin
SMT	: Sülfametazin/Sülfamidin
SMX	: Sülfametoksazol
SP	: Sülfapiridin
SQ	: Sülfakinoksalin
SS	: Sülfizoksazol
ST	: Sülfatiazol
STR	: Streptomisin
SZ	: Sülfadiazin
TAF	: Tiamfenikol
TMP	: Trimetoprim
TYL	: Tilosin



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. Giresun il haritası (Url-2).....	16
Şekil 3.2. Randox cihazı.....	17
Şekil 4.1. İzolatların antibiyotik direnç yüzdeleri .....	34
Şekil 4.2. İzolatların antibiyotik direnç testleri.....	35



## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Analiz edilen antibiyotikler .....	18
Tablo 3.2. Antibiyogram testlerinde kullanılan antibiyotikler.....	30
Tablo 4.1. Antibiyotik kalıntı düzeyleri (ppb).....	33
Tablo 4.2. İzolatların antibiyotik direnç sayıları .....	36
Tablo 5.1. Bal için çeşitli ülkelerin belirlediği maksimum kalıntı limitleri (ppb) (Zhang ve ark., 2019).....	37

# GİRESUN ARI YETİŞTİRİCİLİĞİNDE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİ VE BALLARDAKİ ANTİBİYOTİK KALINTI DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı Giresun il sınırları dâhilinde gerçekleştirilen arıcılık faaliyetlerinden elde edilen bal numunelerindeki mevcut antibiyotik kalıntı düzeyi ve bu balların üretimini gerçekleştiren arılardan izole edilen bakterilerin antibiyotik direnç düzeylerinin belirlenmesidir.

Bu amaç için 2015 yılı Haziran ve Eylül ayları arasında Giresun ilinin arıcılık faaliyetlerinin gerçekleştirildiği ilçelerinden steril şartlar altında 22 farklı arıcıdan 3'er adet bal ve arı örnekleri alınmıştır. Bal numunelerinin 21 farklı antibiyotiğe karşı kalıntı düzeyleri, arıcılık faaliyetlerinde kullanılan arılardan izole edilen bakterilerin ise 8 farklı antibiyotiğe karşı direnç düzeyleri araştırılmıştır.

Bal numunelerinde tespit edilen en yüksek antibiyotik kalıntı düzeyleri ppb düzeyinde; SMT: >380, SP: 153,55, TCN: 68, SM: 41,42, SMM: 21,38, QNL: 13,49, DAPS: 8,79, SDM: 8,13, SS: 5,8, STR: 5,38, SX: 4,88, SQ: 4,32, SMP: 3,72, SMX: 3,69, ST: 3,67, SD: 3,18, SCP: 1,94, TMP: 1,55 ve CEFT: 0,43'dir. Ayrıca numunelerde TAF ve TYL tespit edilememiştir. Arılardan izole edilen bakterilerin ortalama antibiyotik direnç düzeyleri % ifadeyle sırasıyla; AMP: 74,6, NA: 30,5, KZ: 54,2, CXM: 23,7, CTX: 22, TE: 5,1 ve E: 10,2 olarak tespit edilmiştir. Test edilen tüm izolatların AK'ye karşı hassas olduğu kayıt edilmiştir. İlaveten, izolatlardaki çoklu antibiyotik direnç değeri (ÇAD) oranı %36'dır.

Sonuç olarak; Giresun il sınırları dâhilinde gerçekleştirilen arıcılık faaliyetlerinden üretilen bal numunelerindeki antibiyotik kalıntı düzeylerinin yüksek miktarda olduğu, bu balları üreten arılardan izole edilen bakterilerin de yüksek düzeyde antibiyotik dirençliliği taşıdığı söylenebilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Bal, Antibiyotik, Kalıntı, Dirençlilik, Giresun

# THE INVESTIGATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN GIRESUN BEEKEEPING AND ANTIBIOTIC RESIDUE LEVELS IN HONEYS

## SUMMARY

The aim of this study was to determine the level of antibiotic residues in honey samples obtained from beekeeping activities in Giresun province and to determine the antibiotic resistance levels of bacteria isolated from bees producing these honeys.

For this purpose, 3 repetitive honey and bee samples from 22 different beekeepers were taken under sterile conditions between June and September 2015. The residual levels of honey samples against 21 different antibiotics and the resistance levels of bacteria isolated from bees used in beekeeping activities to 8 different antibiotics were investigated.

The highest antibiotic residues detected in honey samples were found at ppb level; SMT: >380, SP: 153,55, TCN: 68, SM: 41,42, SMM: 21,38, QNL: 13,49, DAPS: 8,79, SDM: 8,13, SS: 5,8, STR: 5,38, SX: 4, 88, SQ: 4,32, SMP: 3,72, SMX: 3,69, ST: 3,67, SD: 3,18, SCP: 1,94, TMP: 1,55 and CEFT were determined as 0,43. In addition, TAF and TYL were not detected in the samples. The average antibiotic resistance levels of the bacteria isolated from bees were expressed as %; AMP: 74,6, NA: 30,5, KZ: 54,2, CXM: 23,7, CTX: 22, TE: 5,1 and E: 10,2. All isolates tested were found to be sensitive to AK. In addition, the rate of multiple antibiotic resistance (MAR) in the isolates was 36%.

As a result; it can be said that the antibiotic residue levels in the honey samples produced during the beekeeping activities carried out in Giresun are high and the bacteria isolated from the bees producing these honeys have a high level of antibiotic resistance.

**Keywords:** Honey, Antibiotic, Residue, Resistance, Giresun

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

İnsanoğlunun enfeksiyon kaynağı olarak bakterileri hedef aldığı günden itibaren “antibiyotikler” insan-bakteri savaşının en önemli silahı olmuştur. İlerleyen yıllarda nüfus sayısındaki kontrolsüz artışa ilaveten besin kaynağı temininde güçlük çekme hem bitkisel hem de hayvansal üretimin birim alanda daha fazla verim parolasına sahip olmayı ön planda tutmuştur. Dolayısıyla yetiştiricilik faaliyetlerinde bakteriyel kökenli hastalıkları yok etmek amacıyla da antibiyotik kullanımı yaygın hale gelmiştir. Doğal ortamda kontrolsüz bir şekilde akılcı olmayan yöntemle de antibiyotiklerin kullanımı bakterilerdeki antibiyotik direncinin yayılmasının en önemli nedenleri arasındadır. Çünkü antibiyotik kullanımındaki en önemli üç unsur olan uygun doz, uygun süre ve uygulama şekli göz ardı edilmektedir. Haliyle bakteriler bu savaştan sadece galip çıkmakla yetinmeyip sahip oldukları dirençliliklerini diğer bakterilere de yaymaktadır. Bir bütün olarak ele alındığında yaşam alanlarında sınır tanımayan bakterilerin doğal ortamda bile antibiyotiklere karşı direnç kazanmaları bunların sucul ortam, klinik ortam ve tarımsal faaliyet alanı gözetmeksizin çapraz kontaminasyona neden olmasını sağlamaktadır ve besin yolu ya da diğer bulaşma ile insan ve diğer canlıların sağlığını tehdit eder hale gelmesini sağlamaktadır.

İnsanların en önemli besin kaynaklarından biri olan “bal” arıcılık faaliyetinin bir ürünü olarak piyasaya sunulmaktadır. Yine nüfus sayısındaki kontrolsüz artışın sonucu olarak gıda kaynaklarındaki azalış, insanları kısıtlı zaman ve mekânlarda daha fazla ürün elde etme yollarına itmektir. Arıcılık faaliyetlerinde de işini şansa bırakmak istemeyen yetiştiriciler olası bakteriyel enfeksiyon riskine karşı, veteriner hekim denetiminden uzak, kontrolsüz ve gelişigüzel şekilde “hasta olabilir” varsayımı ile antibiyotik kullanımını yasak olmasına rağmen tercih etmektedir. Arıcılık faaliyetlerinde kullanılan antibiyotikler, sadece balda kalıntı yapmamakla birlikte arıların bakteriyel florasını bozmakta ve mevcut haliyle o antibiyotiğe hassas olan bakteri türlerinin zamanla dirençli hale gelmesine hatta bu dirençliliğin yayılmasına

bile neden olabilecek hale gelmektedir. Kısa vadede karlı çıktığını düşünen faaliyet sahibi kişiler aslında ileride telafisi mümkün olmayan zarara yol açtıklarını görememektedir. Bu sebeplere ilaveten yaşayan tüm canlıların en önemli organ işlevi gören yapılarından biri olan mikrobiyomları bozulmakta ve organizmanın tamamında biyolojik aksaklıklara sebep vermektedir. Dolayısıyla yetiştiricilik ya da çoğaltım amaçlı olsun antibiyotik kullanımının mutlak suretle uzman kişiler tarafından önerildiği şekilde gerçekleştirilmesinin aslında insani bir vazife olduğu bilincinin yaygınlaştırılması gerekmektedir.

### **1.1. Arıcılık ve Gelişimi**

Mısır'da ilk defa başlayan arıcılık faaliyetleri esasen Mezopotamya, Anadolu ve Avrupa'da gelişim göstermiştir. Özellikle göçlerin yoğun olarak yaşandığı 17. yy'da yeni ülkelere taşınarak bugün hemen hemen kutup bölgeleri hariç tüm yerleşelerde bu tür faaliyetlerin yapıldığı ifade edilmektedir (Fıratlı ve ark., 2000). Arıcılık faaliyetleri diğer yetiştiricilik faaliyetlerine kıyasla; daha az sermaye ve düşük girdiler taşıması ve zor topografik koşullarda bile gerçekleştirilebilmesi nedeniyle insanlar tarafından geçim kaynağı olarak tercih edilmektedir (Bölüktepe ve Yılmaz, 2008).

Ülkemizdeki mevcut durum değerlendirildiğinde tüm dünyada olduğu gibi insan besin kaynaklarının en önemli çeşitlerinden biri olan bal; arıcılık faaliyetlerinin ürünü olup, sağlık açısından en çok tercih edilenlerden biridir ve bu özelliği sayesinde sürekli ön planda yer almaktadır (Tong ve ark., 1975; Anonim, 2012). Türkiye'nin bulunduğu coğrafyadaki iklim koşulları, bitki florası ve biyolojik çeşitliliği arıcılık faaliyetlerinin bu denli yüksek olmasının nedeni olarak gösterilebilmektedir.

Anadolu topraklarında arıcılık faaliyetlerinin varoluşu ve yayılışı Dünya genelinden çok daha eski zamanlara dayanmaktadır (Fıratlı ve ark., 2000). Türkiye'nin bitki örtüsü coğrafik konumu denize olan yükseklik farklılıklarından doğan flora çeşitliliği mevsimsel değişkenlikler arıcılık faaliyetleri bakımından ülkemizin avantajlı halde bulunmasını sağlamaktadır. Dünya genelinde bulunan ballı bitkilerin %75 kadarı

ülkemizde de vardır. Bundan dolayı arıcılık ülkemizde sürekli ve hızlı bir gelişim göstermekte olup tarımsal üretim olarak önemli bir yere sahiptir (Sıralı, 1996).

Arıcılık yapabilmek için herhangi bir toprağa ihtiyaç olmaması çiftçinin arıcılığa yönelmesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca bal ve diğer arı ürünlerine olan talep çiftçinin hızlı şekilde para kazanmasına olanak sağlamaktadır. Bu olanaklar kırsal kesimde bulunan çiftçilerimize maddi açıdan büyük katkılar sağlamaktadır. Arıcılık üzerine geliştirilen teknikler ile arıcılığın gelişmesinin yanı sıra kovan üretimi, balmumu üretimi, arıcılık malzemeleri üretimi ve ilaç kullanımı gibi alanlarda da üretime katkı sağlamaktadır. Bu durum diğer sanayi ürünlerine karşı arz talep ilişkisini artırmaktadır (Sıralı, 2010).

## **1.2. Arıcılık Faaliyeti Ürünleri**

Arılar yaşamsal faaliyetlerimiz boyunca sağlıklı beslenmemiz ve sağlığımızı korumak açısından çok önemli besin kaynaklarını sağlamaktadırlar. Bunlar; arı sütü, arı zehri, propolis, polen ve bal olarak belirtilebilir. Ayrıca bitkilerin üremesine ve çoğalmasına tozlaşmaya yardımcı olarak doğrudan katkı sağlamaktadırlar. Bu olay doğanın dengesi açısından da son derece önemlidir (Talu, 2004). Dünyadaki gıda maddelerinin %90'ı 82 bitki türünden elde edilir. Bu bitki türlerinden 63'ü (%77) arı tarafından tozlaşmaya gereksinim duymaktadır (Özbek, 2003). Özellikle 39 bitki türü için arı tozlaşması mutlaka gereklidir. İnsan gıdasının 1/3'ü doğrudan veya dolaylı olarak arı tozlaşmasına ihtiyaç duyan bitkilerden oluşur (Güler, 2006).

Bilinirliği en yüksek olan arı ürünü %99,4 ile baldır. Daha sonra sırasıyla %61,6 ile polen, %52,8 ile arı sütü ve %46,4 ile bal mumu gelmektedir. Buna karşın arı zehri %16,3, propolis ise %8,9 oranı ile daha az tanınmaktadır (Bölüktepe ve Yılmaz, 2008). En çok bilinen ve üretilen arı ürünü bal olmasına rağmen diğer arı ürünleri de en az bal kadar önemli ve araştırılması gereken ürünlerdir. Önemli bir arı ürünü olan propolis; antibakteriyel, antifungal, antiviral, antienflamatuar, antioksidan,

antitümoral ve sitostatik aktivite gibi birçok biyolojik özellikleri ile ön plana çıkmaktadır (Albayrak ve Albayrak, 2008).

Elde edildiği ortam itibariyle, doğal çevre ile sürekli iç içe bulunan bal çevresel kirleticiler karşı hassas durumdadır. Bu kirleticileri sıralayacak olursak; ksenobiyotikler, aflatoksin, pestisit ve antibiyotiklerdir (Jan ve Cerne, 1993; Haarmann, 2000; Erbilir ve Erdoğan, 2005; Lusby ve ark., 2005). İnsanların en önemli gıda kaynakları arasında yer alması ve bu tür çevresel kirleticileri karşı hassas durumda yer alması arıcılık faaliyetleri sonucunda elde edilen ürünlerin kontaminantlara karşı sürekli izlenmesini zorunlu kılmaktadır. Bu kirlenmenin öncü kaynakları; sanayi devrimi, insan nüfusundaki kontrolsüz artış ve kontrolsüz kentleşmedir. Uluslararası mevzuatlarla koruma altına alınan arıcılık faaliyeti ürünleri, ülkemizde de ulusal mevzuat hükümleri çerçevesinde kontrol altında tutulmaktadır. Özellikle, Avrupa Birliğinin almış olduğu komisyon kararına (37/2010) benzer şekilde ülkemiz sınırları içerisinde de bal arılarının sağaltım amaçlı antibakteriyel ilaç kullanımına izin verilmemektedir (Uludağ, 2008).

### **1.3. Bal ve Yapısı**

Arıcılık faaliyetlerinin en çok tercih edilen ürünü olan bal; çok çeşitli bileşenlerin bir araya gelmesiyle oluşan bir gıda kaynağıdır. Balın yaklaşık olarak 200 kadar bileşeni bünyesinde barındırdığı ifade edilmektedir (White, 1979).

Başlıca bileşenlerinden olan su; hasat zamanına göre değişkenlik göstermekle birlikte bu oran ortalama %17-18 civarındadır. Yine diğer bir önemli bileşen olan karbonhidratlar; balda yaklaşık olarak %80 oranında şeker formunda yer almaktadır. Balın yapısında yaklaşık olarak 15 farklı şeker grupları bulunmakla beraber bunların çoğunluğunu fruktoz ile glukoz oluşturmaktadır. Balın yapısında bulunan şekerler baldaki kuru ağırlığın %95-99 oranını oluşturmaktadırlar. Basit şekerlerden olan fruktoz ve glukoz şekeri ise bu oranın %85 ini oluşturmaktadır (Doner, 2003). Bu şekerlerin dışında maltoz, izomaltoz, furanoz, erloz, kojibioz, melezitöz ve kestöz gibi şekerlerde az miktarda da olsa balın yapısında



bulunan şekerlerdir (Weston ve Brocklebank, 2000). Balların orjinine göre içerisindeki şeker oranları farklılık gösterebilir (Bogdanov ve ark., 1996). Ayrıca fruktoz glukoz oranı balın kristallenme sürecine etki eden faktörlerdendir (Abu-Tarboush ve ark., 1993; Rodrigez ve ark., 2004).

Proteinler; arının bal aldığı nektara, coğrafik konuma, bitki örtüsüne bağlı olarak değişmekle birlikte balda 15-17 farklı aminoasit bulunmaktadır. Bu aminoasitlerden balın yapısında en fazla bulunanı prolin dir. Prolin balın içeriğinde en belirgin aminoasittir. Nektarı bala çevirirken arılar tarafından bala aminoasitlerden prolin katılmaktadır. Balda bulunan prolin miktarı aynı zamanda balın protein miktarını da vermektedir. Sebebi ise baldaki aminoasitlerin %50-85'ini prolin oluşturmaktadır (Bogdanov, 2002; Hermosin ve ark., 2003). Balın çeşidine bağlı olarak prolin miktarları da değişkenlik gösterir (Meda ve ark., 2005). Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre çiçek ballarında prolin miktarı en az 300 mg/kg olmalıdır (Anonim, 2012). Daha sonra prolini sırasıyla lizin ve glutamik asit izlemektedir. Ayrıca histidin, arjinin, treonin, serin, glisin, valin, metionin, lösin, fenilalanin ve alanin de balın yapısında bulunan aminoasitlerdir.

Yine diğer bir bileşen olan özellikle enzimler; balın kalite göstergelerinden biri olarak kabul edilmekle birlikte diastaz ve invertaz enzimleri balın içerisinde en fazla bulunan ve bitkinin nektarıyla ve aynı zamanda arının midesinden bala geçen enzimler olarak bilinmektedir. Özellikle diastaz; bal içeriğinde bulunan doğal bir enzim olup, üründeki bulunma oranını arının nektar aldığı coğrafik konum ve flora etkilemekte olup, hasat edilen balın depolanma şartlarına, balın tazelik sürecine, ısı işlem uygulanması veya uygulanmaması durumuna göre farklılık göstermektedir (Estevinho ve ark., 2010). Diastaz sayısı baldaki önemli kalite kriterlerinden bir tanesidir. Bal kristalize olduğunda çözmek için ısı işlem uygulanır. Depolama veya perakende satış aşamalarındaki kontrolsüz uygulanan ısı işlemler baldaki diastaz sayısını düşürürken hidroksimetil furfural miktarını da artırmaktadır. Isı işlem sonucu balda oluşan katile kayıpları diastaz ve hidroksimetil furfural analizleri ile ölçülebilmektedir (Tosi ve ark., 2008). Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre çiçek ballarında diastaz sayısı en az 8 olmalıdır (Anonim, 2012).

Mineraller bakımından bal; oldukça zengin bir yapıya sahip olup bu minerallerin koyu ballarda, kestane ballarında ve salğı ballarında daha fazla olduğu gözlenmiştir. (Bogdanov, 1999). Balın kendine özel kokusunu veren organik asitler bununla birlikte balın yapısının asidik olmasını da sağlarlar. Baldaki pH değeri 3,4 ve 6,1 arasında değişmektedir (Mato ve ark., 2006). Diğer önemli bir bileşen olan vitaminler; arıcılık faaliyetinin yapıldığı alanda arıların topladığı polenlerin kaynağı olan bitkilerin çeşitliliğine göre balın içerisinde çeşit olarak değişmekle birlikte B, C, E ve K vitaminleri balda bulunan başlıca vitaminlerdendir. Özellikle 2 yaşından sonra insanoğunun hayatının her evresinde tercih edilen bir ürün olması nedeniyle bal, kalitatif ve kantitatif göstergeler ile kalite yönünden sürekli denetim altında olmalıdır. Tüketici olarak birçok değişkenle gözlemlenen bu durumun ileri teknoloji, bilgi ve tecrübe gerektirdiği unutulmamalıdır.

Renk olarak irdelendiğinde bal; açık sarı tonlarından başlayıp kırmızının koyu tonlarına kadar hatta siyaha yakın tonlarda dahi olabilir. Bunun sebebi olarak; içeriğindeki polen farklılıkları, mineral madde, fenolik bileşiklerin içeriği ve flora gösterilebilir. Ayrıca bitkilerin yapısında bulunan karoten, klorofil, ksantofil gibi renk veren yapılar da balın rengini etkileyebilmektedir (Doner, 2003). Yine balın rengi içeriğini oluşturan bazı maddelerin farklı dalga boylarındaki ışınları absorbe etmesine bağlı olarak da değişkenlik gösterebilir (Anonim, 2011). Bal rengini ölçmede çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Renk göz önünde bulundurularak balın uluslararası derecelendirmesinde yedi sınıf kullanılmaktadır. Bunlar su beyazı, ekstra beyaz, beyaz, ekstra açık amber, açık amber, amber ve koyu amberdir (Doner, 2003).

Diğer bir karakteristik özellik olan balın nem miktarı; kalite korunması, kristal yapısı ve yoğunluk gibi değerleri etkilemektedir. Balın olgunlaşma göstergelerinden biri olan nem arıların toplamış olduğu nektarda ilk safhada yüksek orandadır. Nem oranı düşürülmemiş bal fermantasyona uğrar ve ekşime yaparak balın bozulmasına ve hatta kullanım dışı kalmasına sebep olur. Nektarın arı tarafından olgunlaştırılmasından sonra kalan nem miktarı, balın petekteki doğal nem içeriğini verir. Nem miktarı, olgunlaşma sırasındaki çevresel koşullar, nektarın orijinal nem içeriği ve bal arısı kolonisinin gücü gibi birçok faktöre bağlıdır. Arılar, topladıkları nektar içeriğindeki fazla nemi kanat

çırpma yöntemiyle bir miktar uçurur ve balı olması gereken nem miktarına ulaştırır. Olgunlaşmış bir balda normalde nem içeriği %18,6'nın altındadır (Doner, 2003). Balın petekten süzülmesinin ardından nem içeriğinde, depolama koşullarına bağlı olarak değişiklik olabilmektedir. Yüksek nem içeriği balın fermente olmasına, raf ömrünün azalmasına sebep olduğu gibi, henüz petekte olgunlaşmadan alındığını da gösterebilmektedir. Düşük nem içeriği ise glikozun kristalleşmesine ve balda granül yapı oluşmasına neden olmaktadır. Nem miktarı kaliteyi doğrudan etkileyen bir faktördür. Bu yüzden Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre çiçek ballarında nem oranı en fazla %20 olabilir (Anonim, 2012).

Günümüzde balın kristalize olması, tüketicilerin çoğunda arıya şeker yedirilerek elde edilmiş bal olduğu düşüncesini oluşturmaktadır. Hâlbuki balın kristalize olması bal için gayet doğal bir durumdur. Balda kristallenme olayı balın cinsine göre değişiklik gösterebilir. Örneğin; çiçek balları kısa sürelerde kristalize olabilirken, kestane ve çam ballarında bu süreç çok daha uzundur. Aynı zamanda balın kristalize olmasını balın içerdiği su miktarı, balda bulunan polen gibi katı partiküllerin miktarı, balda bulunan şekerlerden olan fruktoz/glukoz miktarlarının birbirine oranı gibi durumlar da kristallenme sürecini etkilemektedir.

#### **1.4. Arıcılıkta ve Arı Ürünlerinde Kimyasalların Kullanımı**

Arıcılıkta kimyasal ilaçların kullanımlarının olumlu etkisi olduğu gibi kontrolsüz, düzensiz ve yasaklı ilaçların kullanılması ise arıcılık sektörünü ve tüketici sağlığını çok büyük oranda tehdit etmektedir. Bu tehditlerin başında arı ve arı ürünlerinde hastalıklara karşı mücadelede amaçlı, kontrolsüz ve bilinçsiz bir şekilde birçoğu yasaklı olmasına rağmen kullanılan naftalin, pestisit ve antibiyotikler gelmektedir. Türk Gıda Kodeksi 2005/49 sayılı Bal Tebliğinde "Bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı (*Apis mellifera*) tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal ürüne bal denir (Anonim, 2012). Tanımından da anlaşılacağı üzere balın içeriğinde herhangi bir katkı maddesi ve kalıntı bulunmamalıdır. Tebliğde de belirtildiği gibi gıda katkı maddelerinden, balın

doğalında olmayan organik veya inorganik her şeyden arı olması istenmektedir. Balda kalıntı sorunu yoğun bir şekilde kendini hissettirmektedir. Ballardaki kalıntının sebebi; çevresel kaynaklı olabileceği gibi arı hastalıklarının tedavisi amacıyla kovana uygulanan ilaçlar da olabilir. Başlıca Kalıntı Bulaşma Kaynakları; Çevresel Faktörler ve Yanlış Uygulanan Arıcılık Faaliyetleri Sonucu Oluşan Kalıntı olarak sınıflandırabiliriz.

#### **1.4.1. Çevresel faktörler**

Çevresel Faktörler tarımsal kaynaklı olmayanlar (ağır metaller, hastalık yapıcı mikroorganizmalar, genetiği değiştirilmiş bitkiler ve diğer bulaşanlar) ve tarımsal kaynaklı olanlar (pestisit) olmak üzere olmak üzere kategorize edilmektedir.

##### **1.4.1.1. Ağır metaller**

Bal arıları günlük yaşamsal faaliyetlerini sürdürmek amacıyla doğada dolaşırken çok çeşitli yüzeylere temas ederler. Bu yüzeyler kimi zaman asfalt, kimi zaman tarım ilacına maruz kalmış meyve çiçekleri bazen de kirli su ve hava olabilmektedir. Buralardan bulaşan kirlilikler arı ile beraber kovana ve arı ürünlerine de bulaşmaktadır. Bu durumlarda ağır metaller ballara kolaylıkla bulaşmış olurlar. Bu elementler kadmiyum, demir, bakır, manganez, magnezyum, alüminyum, baryum, kalsiyum, nikel ve kükürt şeklinde sıralanabilir (Tong ve ark., 1975; Erbilir ve Erdoğan, 2005).

Gıda yoluyla yüksek miktarda kadmiyum alınması, zehirlenmelere neden olarak, dolaşım ve iskelet sisteminin bozulmasına yol açar. Fazla miktardaki kurşun, insanlarda, hipertansiyon, duyma zorluğu, anemi, böbrek hastalığı ve zekâ kaybına neden olur. Günlük alınabilecek çinko ve bakır miktarların aşılması durumunda, karaciğerde leke oluşumu sinir sistemi bozukluğu, böbrek fonksiyonlarında zayıflama ve ölüme neden olmaktadır. Gıdalarla alınması gereken nikel miktarının aşılması durumunda insanlarda zehirlenme olayları gözlenir.

Arının bırakılacağı bölgeler rastgele seçilmemelidir. Asfalt, sanayi ve endüstriyel bölgelerden, kirli su kaynaklarından ve ilaçlama sahalarından uzak bölgelerde konaklatılmalıdır. Ayrıca arıcıların kullandığı bala ve arıya temas eden bütün malzemeler kalıntı bırakmayacak malzemeler olmalıdır.

#### **1.4.1.2. Hastalık yapıcı mikroorganizmalar**

Balda nem oranının düşük seviyelerde olması mikroorganizmalar için uygun ortam oluşturmaz. Buna rağmen yapılan araştırmalar, minimum düzeyde ve kısa bir sürede olsa bazı mikroorganizmaların yaşayabildiklerini ortaya koymuştur. *Clostridium botulinum* sporları balın içerisinde yaşayabilmelerine rağmen toksin oluşturamazlar. Bu bakteriler erişkin insanlar için tehlike oluşturmazken süt çocuklarının bağırsaklarında etkili olarak sinir felcine neden olabilecek toksinler üretebilirler. Bu riski ortadan kaldırmak için ilk 6 ay bebeklere kesinlikle bal verilmemelidir. Fakat daha da sağlıklıları bu sürenin 2 yaşına kadar olmasıdır. *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* vb. gibi patojen bakteriler ve *Candida albicans* üzerinde yapılan çalışma sonucunda, patojen bakteriden 12'sinin bal ile inhibe edildiği, ancak *Candida albicans*'ın inhibe edilemediği kaydedilmiştir (Lusby ve ark., 2005).

#### **1.4.1.3. Genetiği değiştirilmiş bitkiler**

Genetiği Değiştirilmiş Bitkiler (GDO) özellikle de mısır ve kolza arılar ve arıcılar için problemlere yol açmaktadır. ABD'de GDO'lu ürünler kabul görürken AB ülkelerinde ihtiyatla karşılanmaktadır. Özellikle polen GDO'lu ürünler yönünden risk altındadır.

#### **1.4.1.4. Diğer bulaşanlar**

Bu tür bulaşlara örnek olarak radyoaktif izotoplar ve organik kirleticiler verilebilir. Radyoaktif bulaşın diğer tüm gıda kaynakları gibi arılar ve arı ürünleri için de bir problem olduğu bilinmektedir (Al-Waili ve ark., 2012). Diğer organik kimyasallar arasında ise PCB (poliklorlu bifeniller) sayılabilir. Bu bileşik günümüzde halen

çevrede bulunabilir ve gıdalara bulaşabilir. Özellikle balmumunda yüksek oranda bulunmuştur. Baldaki oranı ise güvenilir seviyelerdedir (Jan ve Cerne, 1993).

#### **1.4.1.5. Pestisitler**

Tarım ürünlerini hasattan önce ve hasattan sonra koruma altına almak ve bakteri, virüs, haşere gibi zararlılardan korumak amacıyla tarım alanlarında pestisitler kullanılmaktadır. Kullanılan bu pestisitlerin olumlu yönleri olduğu kadar olumsuz yönleri de vardır. Toprakta yeraltı sularına sızarak, buharlaşıp atmosfere karışarak ve yine rüzgâr ve suyuyla uygulama sahasının dışına da bulaş sağlayabilirler. Pestisit; kontamine sahalardan da arılara ve arı ürünlerine kolayca bulaşabilmektedir. Bu şekilde insan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Özellikle polen pestisitler açısından bala göre daha risklidir.

Yağ dokularında birikmek suretiyle kanser yapıcı, karaciğer yıpratıcı, böbrek fonksiyonlarını bozucu etkiler gösterirler. Bir kısmı ise vücutta birikmediği halde sinir hücrelerinde yaptığı tahribat sonucu unutkanlık, düşüncede yavaşlama, sinir kas koordinasyonlarında bozukluk ve öğrenme güçlüğüne neden olur. Kalıntılar, toprakta bulunan ve verimlilik için önemli olan mikroorganizmaların kısmen veya tamamen yok olmasına sebep olur. Bu durum ekosistemin bozulmasına ve türler arasındaki dengenin kaybolmasına neden olur.

Tarım alanlarında kimyasal kullanımı en son çözüm olarak akla gelmeli, mümkünse biyolojik mücadeleye önem verilmelidir. Eğer kimyasal kullanımı zorunlu ise arılar için en az zarara sahip ilaçlar tercih edilmeli, ilaçlama alanları sınırlı tutulmalı, ilaçlama yapılırken özenle ve sadece gerekli bölgelere yapılmalıdır. Etrafta bulunan su kaynaklarının ilaçtan etkilenmemesine dikkat edilmelidir. İlaçlama yapmadan önce çevre arıcılarına haber verilmeli, ilaçlama saati arıların kovanlara döndüğü zaman olarak belirlenmelidir. Ayrıca uygulama gerekli dozlarda ve belirtilen şekilde yapılmalıdır (Seğmenoğlu ve Baydan, 2012).

#### **1.4.2. Yanlış uygulanan arıcılık faaliyetleri sonucu oluşan kalıntı**

Arı hastalıklarıyla mücadele için bilinçsizce ve kulaktan dolma bilgilerle kullanılan birçok ilacın, arıya faydanın yanında zararda verdiği, arı ve ürünlerinde kalıntıya sebep oldukları bilinmektedir.

##### **1.4.2.1. Akarisitler**

Acari alt sınıfına ait zararlıların kontrolünü sağlayan pestisitler olup, fitofag akarların mücadelesinde büyük kolaylık sağlamıştır. Varroaya karşı kullanılan ilaçlardır. Akarisitler arı ve arı ürünlerinde ciddi bulaşmalara sebep olurlar. Yağda çözülebilenleri balmumunda birikmelere sebep olup, küçük miktarlarda da olsa bala bulaşabilirler. Toksik olmayan varroasitler: Organik arıcılıkta da kullanılabilir. Uçucudurlar. Yağda ve suda çözünenler olarak 2 gruba ayrılabilir. Yağda çözünenler balmumunda birikirken suda çözünenler daha çok balda birikim yapar. Yapılan araştırmalar akarisit bulaşmasının sırasıyla yavrulu çerçeve, ballı çerçeve ve bal olduğunu göstermiştir. Yine aynı şartlarda yapılan denemelerde en çok kalıntıyı sırasıyla bromopropilat, kumafos ve fluvalinatın bıraktığı saptanmıştır. Yine piyasada satılan ticari temel petekler üzerinde yapılan bir çalışmada, bromopropilat, kumafos ve fluvalinatın var olduğu saptanmıştır (Fernandez ve Lozano, 1993; Url-1).

##### **1.4.2.2. Baldaki organik asit kalıntısı**

Timol genelde balmumunda özellikle de yavrulu çerçevelerde birikmektedir. Balda ulaştığı miktar limit değerleri aşmamaktadır. Fakat bütün bal sezonu boyunca kullanılırsa limit değerleri aşabilir ve balın tadında istenmeyen değişikliklere yol açabilir. Baldaki formik asit kalıntısı asidin doğal yapısı nedeniyle çok fazla sorun yaratmaz. Eğer formik asit uygulaması baharda yapılır ve yaz sezonunda da balda formik asit miktarı artarsa balın tadını olumsuz etkileyebilir. Oksalik asit uygulamasından sonra balda herhangi bir kalıntıya rastlanmamıştır (Bogdanov, 2006).

### 1.4.2.3. Antibiyotik Kalıntısı

Arıcılıkta antibiyotik kullanımı 2006 yılından beri yasaklanmıştır. Arıcılıkta antibiyotik kullanımıyla oluşan rezidüer nihai tüketici olan insanlarda akut ve kronik toksisitenin yanı sıra bakterilerde direnç gelişimine de katkıda bulunabilmektedir (Özkan ve ark., 2015). Geçmişte arı hastalıklarında kullanılan antibiyotikler arı ve arı ürünlerinde kalıntıya sebebiyet oluşturduğu için günümüzde yasaklanmıştır. Buna rağmen bazı arıcılar halen kullanmakta ve bulaşa neden olmaktadır.

Bu nedenle bu çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesi'nin önemli arıcılık faaliyeti merkezlerinden biri olan Giresun il sınırları dâhilinde üretilen ballardaki mevcut antibiyotik kalıntı düzeyleri ve bu balları üreten arıların flora elemanı olan bakterilerdeki antibiyotik direnç düzeylerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.



## BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Reybroeck (2003), Belçika marketlerinde yerel olarak üretilen ballarda streptomisin, tetrasiklin, sülfonamid, beta laktam ve kloramfenikol gibi antibiyotiklerin varlığını araştırmış ve arıcılık faaliyetlerinde kabul görmeyen düzeylerde antibiyotiklerin kullanıldığı yargısını ortaya koymuştur.

Sheridan ve ark. (2008), bal numunelerinde 14 sülfonamid türevi antibiyotik ve kloramfenikol analizi için bir yöntem geliştirmiş ve 25 ülkeden 116 örnek analiz ederek %38'inin en az bir antimikrobiyal ajan içerdiğini rapor etmişlerdir.

Uludağ (2008), Ege Bölgesi'nde toplanan bal örneklerinin sülfonamid grubu antibiyotik kalıntıları bakımından araştırıldığını bildirmiş ve bu amaçla, bölge illerinden toplanan 103 adet bal örneklerinde çeşitli antibiyotiklerin varlığını tespit etmiştir.

Gunes ve ark. (2008), Güney Marmara Bölgesindeki 50 bal numunesinde LC-ESI-MS yöntemiyle eritromisin varlığını araştırmışlar ve sonuç olarak 4 numunede kalıntıya rastlanıldığını rapor etmişlerdir.

Mujić ve ark. (2011), Bosna Hersek'in kuzeybatısındaki Una-Sana Kantonu Bölgesinde 18 farklı bölgede üretilen bal numunelerinin 46'sında antibiyotik kalıntısının tespit edildiğini ifade etmişlerdir.

Galarini ve ark. (2013), İtalya'da yapılan bir çalışmada farklı ülkelerden (İtalya, Macaristan, Arjantin) toplanan 50 bal numunesinde kinolin, nitroimidazol ve sülfonamid grubu antibiyotikleri LC-MS/MS yöntemiyle analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda İtalya numunelerinde sülfatiazol, üç ülkeden gelen numunelerde ise

sülfadimetoksin tespit edilmiş ancak kalıntı düzeylerinin toplum sağlığı açısından risk oluşturmayacak düzeyde olduğu ifade edilmiştir.

Zai ve ark. (2013), Pakistan'da yapılan bir çalışmada 100 adet bal numunesi markalı ve markasız olarak iki gruba ayrılarak tetrasiklin, streptomisin, gentamisin ve penisilin grubu antibiyotikleri aramışlardır. Markalı balların %12,5'inde, markasız balların ise %19,96'sında antibiyotiğe rastlandığı belirtilmiştir.

Mahmoudi ve ark. (2014), İran'ın Qazvin Eyaletinden rastgele toplanan 135 bal numunesinde ELISA yöntemiyle enrofloksasin, penisilin ve kloramfenikol gibi antibiyotiklere rastlanıldığını rapor etmişlerdir.

Özkan ve ark. (2015), Ardahan ilinde 2015 yılında yapılan bir çalışmada 180 adet bal numunesinde sülfonamid ve streptomisin grubu antibiyotikleri ELISA yöntemiyle araştırmışlar ve numunelerde streptomisin ve sülfonamid grubu antibiyotiklerin varlığını tespit etmişlerdir.

Gačić ve ark. (2015), Hırvatistan'da yaptıkları bir çalışmada pazardan toplanan 74 adet çeşitli bal örneklerinin hiçbirinde antibiyotik kalıntısı bulunmadığını tespit etmişlerdir. Ancak araştırmacılar bir sonraki aşamada, test edilen bal örneklerinin her birine belli miktarlarda antibiyotik ilave ederek balda kalma sürelerini araştırma yoluna gitmişlerdir. Sonuç olarak; incelenen tüm bal örneklerinde kloramfenikol ve sülfathiazolün yarı ömrünün 6 aydan daha uzun olduğunu kanıtlamışlardır.

Kutlu ve ark. (2017), Bitlis ili Hizan ilçesinde 20 farklı bölgedeki arılıklardan alınan bal numunelerinde tetrasiklin ve sülfonamid grubu antibiyotik kalıntılarına bakıldığını ve çalışılan örneklerin hiç birinde antibiyotik kalıntısına rastlanmadığını bildirmişlerdir.

Saygılı (2017), Kırklareli ili civarında arıcılık faaliyeti yapan 27 üreticiden toplanan petek örneklerindeki antibiyotik kalıntı düzeylerini LC-MS/MS yöntemiyle analiz

etmiş ve sonuç olarak streptomisin, tetrasiklin ve kloramfenikolün tespit edilmediğini rapor etmiştir.

Louppis ve ark. (2017), Kıbrıs ve Yunanistan kökenli ballarda sülfonamidler, tetrasiklinler, amfenikoller ve florokinolonlar gibi dört farklı antibiyotik sınıfını içeren antibiyotiklerin kalıntı düzeylerini araştırmış ve sonuç olarak bunların arasında üç bal örneğinde oksolonik asit, sülfatiazol ve sülfadimetoksinin tespit edildiğini kayıt etmişlerdir.

Korkmaz ve ark. (2017), ülkemiz sınırları dâhilinde gerçekleştirilen diğer bir çalışmada Doğu Akdeniz'de endemik olarak üretilen bir bal türü olan çam balındaki antibiyotik kalıntı düzeylerini araştırmışlardır. Araştırmacılar bu amaç için Ege Bölgesi'nden 59 adet doğal çam balı numunesi toplamış ve bu örneklerdeki sülfonamid ve tetrasiklin grubu antibiyotiklerinin varlığını tespit etmişlerdir.

Dluhořová ve ark. (2018), Çek Cumhuriyeti'nde marketlerde satılan ve farklı coğrafik kökene sahip 50 bal numunesinde UPLC-MS/MS aracılığı ile antibiyotik kalıntısını araştırmışlar ve sonuç olarak bazı örneklerde sülfametoksazol ve sülfadiazin kalıntısına rastlanıldığını belirtmişlerdir.

Mehdi ve ark. (2018), Cezayir'in kuzey bölgelerinden toplanan 23 farklı bal örneğini incelenmiş ve çok azında kloramfenikole rastlanıldığını rapor etmişlerdir.

## BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1. Bal ve Arı Örneklerinin Toplanması

2015 yılı Haziran-Eylül döneminde Giresun ili ve ilçelerindeki yayları kapsayan ve arıcılık faaliyetlerinin gerçekleştirildiği bölgelerden steril şartlar altında 22 farklı arıcıdan 3 paralel ve ayrı kovanlardan olmak üzere 100 gr bal ve 10-20 adet arı numunesi alınmıştır (Şekil 3.1). Alınan numuneler etiketlenip aynı gün içerisinde laboratuvarlara ulaştırılmış ve analiz yapılana kadar -20 °C bekletilmiştir.



Şekil 3. 1. Giresun il haritası (Url-2)

### 3.2. Analiz Aşamaları

Ordu, Arıcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Laboratuvarlarında bal numunelerinde sülfonamid, tetrasiklin ve streptomisin grubu antibiyotiklerin analizleri Randox cihazı ve ona ait kitler ile aşağıdaki prosedürler izlenerek yapılmıştır. Bal numunelerindeki kalıntı düzeyi test edilen antibiyotikler Tablo 3.1'deki gibidir.



Şekil 3. 2. Randox cihazı

Tablo 3. 1. Analiz edilen antibiyotikler

Kısaltma İsmi	Antibiyotik	Kısaltma İsmi	Antibiyotik
SZ	Sülfadiazin	SCP	Sülfaklorpridazin
SDM	Sülfadimetoksin	DAPS	Dapson
SQ	Sülfakinoksalin	SD	Sülfadoksin
SMT	Sülfametazin/ sülfamidin	TMP	Trimetoprim
SMX	Sülfametoksazol	CEFT	Seftiofur
ST	Sülfatiazol	TAF	Tiamfenikol
SS	Sülfizoksazol	STR	Streptomisin
SP	Sülfapiridin	TYL	Tilosin
SM	Sülfamerazin	TCN	Tetrasiklin
SMM	Sülfamonometoksin	QNL	Kinolonlar
SMP	Sülfametoksipiridazin		

### 3.2.1. Antibiyotik kalıntı düzeyi tespiti için uygulanan protokoller

#### 3.2.1.1. Antimikrobiyal dizi I ultra kit protokolü

##### I. Aşama (Örneklerin hazırlanması)

Kit kullanılmadan önce reaktiflerin oda sıcaklığına ulaşması sağlanmıştır.

**Kalibratörlerin hazırlanması:** Bu kitte kalibratörler kullanıma hazır olarak gelmektedir. Son kullanım tarihine kadar +2/+8 °C’de saklanmalıdır.

**Kontrolün hazırlanması:** Bu kitte kontrol kullanıma hazır olarak gelmektedir. Son kullanım tarihine kadar +2/+8 °C’de saklanmalıdır.

**Yıkama solüsyonunun (Wash Buffer) hazırlanması:** 32 ml yıkama solüsyonu + 968 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

### **Örneğin hazırlanması:**

- a. 1 gr. bal numunesi tartılmıştır.
- b. Üzerine 37 °C'ye ısıtılmış yıkama solüsyonundan 9 ml ilave edilmiştir.
- c. Bal numunesi çözününceye kadar roll karıştırıcı ile 10 dakika karıştırılmıştır.
- d. Üzerine 10 ml daha yıkama solüsyonundan ilave edilmiştir ve kısaca vortex ile karıştırılmıştır. Örneğimiz biyoçipe uygulamak için hazır hale gelmiştir.

Dilüsyon Faktörü (DF) : 20

### **II. Aşama (İnkübasyon ve Konjügasyon)**

Kullanılacak kuyu/kuyular özel alüminyum ambalajlarından çıkartılmıştır. Her üçlü sıranın bir kuyucuğunun arka kısmına cam kalemiyle yukarı ok (↑) işareti çizilmiştir. Kullanılmayacak olan 3'lü kuyucuklar taşıyıcıdan alınarak özel ambalajına silika boncuklarıyla birlikte ağzı kapatılarak yerleştirilmiştir.

- a. Kullanılacak biyoçiplerin ID kısımları cam kalemiyle doldurulmuştur (Örnek; AM I Kalibratör, AM I Sample, vs.)
- b. Her kuyucuğa 200 µl tahlil seyreltici (Dil Asy) ilave edilmiştir. (Kalibratör Biyoçipi için de bu solüsyondan ilave edilir.)
- c. 50 µl örnek/kalibratör/kontrol, kuyucuklara sırayla ilave edilmiştir.
- d. Kuyu/Kuyular taşıma aparatına takılmış ve inkübatöre yerleştirilmiştir.
- e. Kuyu/Kuyular 30 dakika 25 °C, 370 rpm'de inkübe edilmiştir.
- f. İnkübasyonun sonlanmasına 5 dakika kala konjugat hazırlanmıştır.

### **Konjugatın hazırlanması ve saklanması**

Bu kitte konjugat kullanıma hazır olarak gelmektedir. Liyofilize olmadığı için önceden sulandırılmasına gerek yoktur. Kuyu/Kuyular uygulamadan önce kitte bulunan Diluent Konjugatı (Seyreltici Konjugat) ile yeterli miktarda sulandırılmıştır. Sulandırma miktarları aşağıdaki gibidir.

1. Kuyu/Kuyular için: 10 µl Konsantre Konjugat + 490 µl Seyreltici Konjugat
2. Kuyu/Kuyular için: 20 µl Konsantre Konjugat + 980 µl Seyreltici Konjugat
3. Kuyu/Kuyular için: 30 µl Konsantre Konjugat + 1470 µl Seyreltici Konjugat
4. Kuyu/Kuyular için: 40 µl Konsantre Konjugat + 1960 µl Seyreltici Konjugat
5. Kuyu/Kuyular için: 50 µl Konsantre Konjugat + 2450 µl Seyreltici Konjugat
6. Kuyu/Kuyular için: 60 µl Konsantre Konjugat + 2940 µl Seyreltici Konjugat

**g.** Hazırlanan konjugattan her kuyucuğa 50 µl ilave edilmiştir.

**h.** Kuyu/Kuyular 1 saat 25 °C, 370 rpm'de inkübe edilmiştir.

### **III. Aşama (Yıkama ve Okuma)**

**a.** Kuyu/Kuyular inkübatörden taşıma aparatı ile birlikte alınarak lavaboda hızlıca ters çevrilerek içerisindeki sıvı boşaltılmış ve yıkama işlemlerine geçilmiştir. Toplamda 6 kez yıkama yapılmıştır. Bu yıkamalardan 2'si hızlı yıkama 4'ü inkübasyonlu yıkamalardır.



### **Yıkama aşamaları:**

Kuyucuklar  $\frac{3}{4}$  oranında yıkama solüsyonu ile doldurulur. Taşıma aparatının her köşesine 5'er saniye vurularak (tapping) boşaltılır (1.Yıkama).

Önceki işlem tekrar edilir (2.Yıkama).

Kuyucuklar  $\frac{3}{4}$  oranında yıkama solüsyonu ile doldurulur. Taşıma aparatının her köşesine 5'er saniye vurulur ve kronometre 2 dakikaya ayarlanarak başlatılır. 2 dakikalık inkübasyonun bitimine 20 saniye kala tekrar taşıma aparatının her köşesine 5'er saniye vurulur ve boşaltılır (3.Yıkama).

Önceki işlem 3 kez daha tekrar edilir.

İşlemler sonunda kuyucuklar yıkama solüsyonuyla yarı dolum yapılarak okuma öncesi karanlık bir ortama koyulmuş ve kemilüminisans ışıma solüsyonu (LUM+PX) hazırlanmıştır.

### **3 LUM+PX solüsyonunun hazırlanması (1:1)**

1 nolu kuyucuk için: 250 µl LUM+PX,

2 nolu kuyucuk için: 250 µl LUM+PX,

3 nolu kuyucuk için: 250 µl LUM+PX,

Kayıp (Ölü) Hacim: 250 µl LUM+PX,

Toplam (Her 3'lü sıra için) : 1 ml LUM+PX (500 µl LUM+ 500 µl PX) hazırlanır.

**b.** Yarı dolu kuyu/kuyular taşıma aparatından çıkartılarak içi boşaltılmış ve kağıt havluya sarılarak kuyucuklarda sıvı kalmayacak şekilde kurutulmuştur.

**c.** Kurutma işleminden sonra herbir kuyucuğa 250 µl LUM+PX karışımından ilave edilmiştir. Son kuyucuğa ışıma solüsyonu ilave edildiği anda kronometre başlatılarak karanlık bir ortamda 2 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitimine 15 saniye kala taslağı önceden hazırlanmış olan cihaza kuyulara yerleştirilmiş ve okuma işlemi başlatılmıştır. 2,5 dakika sonunda okuma işlemi tamamlanmış ve kuyular cihazdan alınarak sonuçlar yorumlanmıştır.

### 3.2.1.2. Antimikrobiyal dizi II kit protokolü

#### I. Aşama (Örneklerin Hazırlanması)

Kit kullanılmadan önce reaktiflerin oda sıcaklığına ulaşması sağlanmıştır.

**Kalibratörlerin hazırlanması:** Bu kitte kalibratörler liyofilize (toz) haldedir. 1 ml Sulandırma Tamponu (Reconstitution Buffer) ile sulandırılarak 30 dakika çözünmesi sağlanmıştır. Sulandırıldıktan sonra kalibratörler +2/+8 °C'de 8 saat stabil kalmaktadır. Bu süre sonunda stabiliteleri düşmektedir.

**Kontrolün hazırlanması:** Bu kitte kontrol liyofilize olarak gelmektedir. 1 ml Buf Rec (Reconstitution Buffer) ile sulandırılarak 30 dakika çözünmesi sağlanmıştır. Son kullanım tarihine kadar +2/+8 °C'de saklanmıştır.

**Yıkama solüsyonunun (Wash Buffer) hazırlanması:** 32 ml yıkama solüsyonu +968 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu buffer +2/+8 °C'de 1 ay saklanabilir. Kullanım sıklığına bağlı olarak bu buffer 16 ml yıkama solüsyonu + 484 ml distile su 8 ml yıkama solüsyonu + 242 ml distile su ile hazırlanmıştır.

#### Örneğin hazırlanması:

- a. 1 gr. bal numunesi tartılmıştır.
- b. Üzerine 37 °C'ye ısıtılmış yıkama solüsyonundan 9 ml ilave edilmiştir.
- c. Bal numunesi çözününceye kadar roll karıştırıcı ile 10 dakika karıştırılmıştır.
- d. Üzerine 10 ml daha yıkama solüsyonundan ilave edilmiş ve kısaca vortex ile karıştırılmıştır.

Örneğimiz biyoçipe uygulamak için hazır hale getirilmiştir.

Dilüsyon Faktörü (DF) : 20

## II. Aşama (İnkübasyon ve Konjügasyon)

Kullanılacak kuyu/kuyular özel alüminyum ambalajlarından çıkartılmıştır. Her üçlü sıranın bir kuyucuğunun arka kısmına cam kalemiyle yukarı ok (↑) işareti çizilmiştir. Kullanılmayacak olan 3'lü kuyucuklar taşıyıcıdan alınarak özel ambalajına silika boncuklarıyla birlikte ağızı kapatılarak yerleştirilmiştir.

**a.** Kullanılacak biyoçiplerin ID kısımları cam kalemiyle doldurulmuştur. (Örnek; AM II Kalibratör, AM II Sample, vs.)

**b.** Her kuyucuğa 100 µl tahlil seyreltici (Dil Asy) ilave edilmiştir. (Kalibratör Biyoçipi içinde)

**c.** 100 µl örnek/kalibratör/kontrol, kuyucuklara sırayla ilave edilmiştir.

**d.** Kuyu/Kuyular taşıma aparatına takılmış ve inkübatöre yerleştirilmiştir.

**e.** Kuyu/Kuyular 30 dakika 25 °C, 370 rpm'de inkübe edilmiştir.

**f.** İnkübasyonun sonlanmasına 5 dakika kala konjugat hazırlanmıştır.

### Konjugatın hazırlanması ve saklanması

Bu kitte konjugat 10X konsantrasyonunda liyofilize olarak gelmektedir. Son kullanım tarihine kadar +2/+8 °C'de liyofilize olarak saklanabilir 30 dakikalık ilk inkübasyon başladığında kit içerisinde bulunan AM II Seyreltici Konjugat Solüsyonundan 1 ml alınarak liyofilize şişeye aktarılmış ve tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Sulandırılan konjugat +2/+8 °C'de 24 saat -20 °C'de 3 hafta ışıktan uzakta saklanmalıdır. İlk inkübasyonun bitimine 5 dakika kala kuyu/kuyulara yetecek miktarda tekrar AM II Seyreltici Konjugat Solüsyonu ile yeterli miktarda sulandırılmıştır. Sulandırma miktarları aşağıdaki gibidir.

1. Kuyu için: 100 µl Konsantre Konjugat + 900 µl Seyreltici Konjugat

2. Kuyu için: 200 µl Konsantre Konjugat + 1800 µl Seyreltici Konjugat

3. Kuyu için: 300 µl Konsantre Konjugat + 2700 µl Seyreltici Konjugat

4. Kuyu için: 400 µl Konsantre Konjugat + 3600 µl Seyreltici Konjugat

5. Kuyu için: 500 µl Konsantre Konjugat + 4500 µl Seyreltici Konjugat

6. Kuyu için: 600 µl Konsantre Konjugat + 5400 µl Seyreltici Konjugat

**g.** Hazırlanan konjugattan her kuyucuğa 100 µl ilave edilmiştir.

**h.** Kuyu/Kuyular 1 saat 25 °C, 370 rpm de inkübe edilmiştir.

### **III. Aşama (Yıkama ve Okuma)**

- a.** Kuyu/Kuyular inkübatörden taşıma aparatı ile birlikte alınarak lavaboda hızlıca ters çevrilerek içerisindeki sıvı boşaltılmış ve yıkama işlemlerine geçilmiştir. Toplamda 6 kez yıkama yapılmıştır. Bu yıkamalardan 2'si hızlı yıkama 4'ü inkübasyonlu yıkamalardır.

#### **Yıkama aşamaları:**

Kuyucuklar  $\frac{3}{4}$  oranında yıkama solüsyonu ile doldurulur. Taşıma aparatının her köşesine 5'er saniye vurularak (tapping) boşaltılır (1.Yıkama).

Önceki işlem tekrar edilir (2.Yıkama).

Kuyucuklar  $\frac{3}{4}$  oranında yıkama solüsyonu ile doldurulur. Taşıma aparatının her köşesine 5'er saniye vurulur ve kronometre 2 dakikaya ayarlanarak başlatılır. 2 dakikalık inkübasyon sonunda tekrar taşıma aparatının her köşesine 5'er saniye vurulur ve boşaltılır (3.Yıkama).

Önceki işlem 3 kez daha tekrar edilmiştir.

İşlemler sonunda kuyucuklar yıkama solüsyonuyla yarı dolum yapılarak okuma öncesi karanlık bir ortama koyulmuş ve kemilüminisans ışımaya solüsyonu (LUM+PX) hazırlanmıştır.

### **LUM+PX solüsyonunun hazırlanması (1:1)**

1 nolu kuyucuk için: 250 µl LUM+PX

2 nolu kuyucuk için: 250 µl LUM+PX

3 nolu kuyucuk için: 250 µl LUM+PX

Kayıp (Ölü) Hacim: 250 µl LUM+PX

Toplam (Her 3'lü sıra için) : 1 ml LUM+PX (500 µl LUM+ 500 µl PX)

**b.** Yarı dolu Kuyu/Kuyular taşıma aparatından çıkartılarak içi boşaltılmış ve kağıt havluya sarılarak kuyucuklarda sıvı kalmayacak şekilde kurutulmuştur.

**c.** Kurutma işleminden sonra her bir kuyucuğa 250 µl LUM+PX karışımından ilave edilmiştir. Son kuyucuğa ışımaya solüsyonu ilave edildiği anda kronometre başlatılarak karanlık bir ortamda 2 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitimine 15 saniye kala taslağı önceden hazırlanmış olan cihaza kuyulara yerleştirilmiş ve okuma işlemi başlatılmıştır. 2,5 dakika sonunda okuma işlemi tamamlanmış ve kuyular cihazdan alınarak sonuçlar yorumlanmıştır.

### 3.2.1.3. Antimikrobiyal dizi IV kit protokolü

#### I. Aşama (Örneklerin hazırlanması)

Kit kullanılmadan önce reaktiflerin oda sıcaklığına ulaşması sağlanmıştır.

**Kalibratörlerin hazırlanması:** Bu kitte kalibratörler 100X liyofilize (toz) haldedir. 1 ml Yıkama solüsyonu ile sulandırılarak 30 dakika çözünmesi sağlanmıştır. Sulandırıldıktan sonra kalibratörler +2/+8 °C 8 saat -20 °C’de 1 hafta stabil kalmaktadır. Bu süreler sonunda stabiliteyi düşmektedir.

**Kontrolün hazırlanması:** Bu kitte kontrol liyofilize (toz) haldedir. 1 ml Yıkama solüsyonu ile sulandırılarak 30 dakika çözünmesi sağlanmıştır. Sulandırıldıktan sonra kontrol +2/+8 °C’de 8 saat -20 °C’de 1 hafta stabil kalmaktadır. Bu süreler sonunda stabilitesi düşmektedir.

**Yıkama solüsyonunun (Wash Buffer) hazırlanması:** 32 ml yıkama solüsyonu + 968 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu buffer +2/+8 °C’de 1 ay saklanabilir. Kullanım sıklığına bağlı olarak bu buffer 16 ml yıkama solüsyonu + 484 ml distile su 8 ml yıkama solüsyonu + 242 ml distile su ile hazırlanabilir.

**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponunun hazırlanması:** 6,8 gr (±0,02) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılarak 1L’lik balon jöjeye aktarılmıştır. Üzerine ~200 ml distile su ilave edilmiştir. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> kimyasalı çözüldükten sonra hacmi distile su ile 1L’ye tamamlanmıştır.

#### Örneğin hazırlanması:

- a. 1 gr. bal numunesi tartılmıştır.
- b. Üzerine 9 ml 40mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8,0) ilave edilmiştir.
- c. Üzerine 10 ml daha yıkama solüsyonundan ilave edilmiş ve 1 dakika vortex ile karıştırılmıştır. Örneğimiz biyoçipe uygulamak için hazır hale getirilmiştir.

Dilüsyon faktörü (DF) : 20

## II. Aşama (İnkübasyon ve Konjügasyon)

Kullanılacak kuyukuyular özel alüminyum ambalajlarından çıkartılmıştır. Her üçlü sıranın bir kuyucuğunun arka kısmına cam kalemiyle yukarı ok (↑) işareti çizilmiştir. Kullanılmayacak olan 3'lü kuyucuklar taşıyıcıdan alınarak özel ambalajına silika boncuklarıyla birlikte ağızı kapatılarak yerleştirilir.

**a.** Kullanılacak kuyu/kuyular ID kısımları cam kalemiyle doldurulmuştur. (Örnek; AM IV Kalibratör, AM IV Sample, vs.)

**b.** Her kuyucuğa 100 µl tahlil seyreltici (Dil Asy) ilave edilmiştir. (Kalibratör Biyoçipi içinde)

**c.** 100 µl örnek/kalibratör/kontrol, kuyucuklara sırayla ilave edilmiştir.

**d.** Kuyu/Kuyular taşıma aparatına takılmış ve inkübatöre yerleştirilmiştir.

**e.** Kuyu/Kuyular 30 dakika 25 °C, 370 rpm'de inkübe edilmiştir.

**f.** İnkübasyonun sonlanmasına 5 dakika kala konjugat hazırlanmıştır.

### Konjugatın hazırlanması ve saklanması

Bu kitte konjugat 100X konsantrasyonunda liyofilize olarak gelmektedir. Son kullanım tarihine kadar +2/+8 °C'de liyofilize olarak saklanabilir 30 dakikalık ilk inkübasyon başladığında Yıkama Solüsyonundan 1 ml alınarak liyofilize şişeye aktarılmış ve tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Sulandırılan konjugat +2/+8 °C'de 48 saat, -20 °C'de 2 hafta ışıktan uzakta saklanmalıdır. İlk inkübasyonun bitimine 5 dakika kala kuyu/kuyulara yetecek miktarda tekrar Yıkama Solüsyonu ile yeterli miktarda sulandırılmıştır. Sulandırma miktarları aşağıdaki gibidir.

1. Kuyu için: 10 µl Konsantre Konjugat + 990 µl Yıkama Solüsyonu
2. Kuyu için: 20 µl Konsantre Konjugat + 1980 µl Yıkama Solüsyonu
3. Kuyu için: 30 µl Konsantre Konjugat + 2970 µl Yıkama Solüsyonu
4. Kuyu için: 40 µl Konsantre Konjugat + 3960 µl Yıkama Solüsyonu

5. Kuyu için: 50 µl Konsantre Konjugat + 4950 µl Yıkama Solüsyonu

6. Kuyu için: 60 µl Konsantre Konjugat + 5940 µl Yıkama Solüsyonu

**g.** Hazırlanan konjugattan her kuyucuğa 100 µl ilave edilmiştir.

**h.** Kuyu/Kuyular 1 saat 25 °C, 370 rpm de inkübe edilmiştir.

### **III. Aşama (Yıkama ve Okuma)**

**a.** Kuyu/Kuyular inkübatörden taşıma aparatı ile birlikte alınarak lavaboda hızlıca ters çevrilerek içerisindeki sıvı boşaltılmış ve yıkama işlemlerine geçilmiştir. Toplamda 6 kez yıkama yapılmıştır. Bu yıkamalardan 2'si hızlı yıkama 4'ü inkübasyonlu yıkamalardır.

#### **Yıkama aşamaları:**

Kuyucuklar  $\frac{3}{4}$  oranında yıkama solüsyonu ile doldurulur. Taşıma aparatının her köşesine 5'er saniye vurularak (tapping) boşaltılır (1.Yıkama).

Önceki işlem tekrar edilir (2.Yıkama).

Kuyucuklar  $\frac{3}{4}$  oranında yıkama solüsyonu ile doldurulur. Taşıma aparatının her köşesine 5'er saniye vurulur ve kronometre 2 dakikaya ayarlanarak başlatılır. 2 dakikalık inkübasyon sonunda tekrar taşıma aparatının her köşesine 5'er saniye vurulur ve boşaltılır (3.Yıkama).

Önceki işlem 3 kez daha tekrar edilmiştir.

İşlemler sonunda kuyucuklar yıkama solüsyonuyla yarı dolmuş yapılarak okuma öncesi karanlık bir ortama koyulmuş ve kemilüminisans ışımaya solüsyonu (LUM+PX) hazırlanmıştır.



### **LUM+PX solüsyonunun hazırlanması (1:1)**

1 nolu kuyucuk için: 250 µl LUM+PX

2 nolu kuyucuk için: 250 µl LUM+PX

3 nolu kuyucuk için: 250 µl LUM+PX

Kayıp (Ölü) Hacim: 250 µl LUM+PX

Toplam (Her 3'lü sıra için) : 1 ml LUM+PX (500 µl LUM+ 500 µl PX)

**b.** Yarı dolu kuyu/kuyular taşıma aparatından çıkartılarak içi boşaltılmış ve kağıt havluya sarılarak kuyucuklarda sıvı kalmayacak şekilde kurutulmuştur.

**c.** Kurutma işleminden sonra herbir kuyucuğa 250 µl LUM+PX karışımından ilave edilmiştir. Son kuyucuğa ışma solüsyonu ilave edildiği anda kronometre başlatılarak karanlık bir ortamda 2 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitimine 15 saniye kala taslağı önceden hazırlanmış olan cihaza kuyulara yerleştirilmiş ve okuma işlemi başlatılmıştır. 2-2,5 dakika sonunda okuma işlemi tamamlanmış ve biyoçip cihazdan alınarak sonuçlar yorumlanmıştır.

### **3.3. Arılardan Bakteri İzolasyonu**

Arıcılık faaliyeti yapan üreticilerden bal örneklerinin temin edildiği her kovandan alınan arılardan, 1 gr gelecek şekilde steril şartlar altında iç muhteviyat alınmış, homojenize edilmiş ve seri sulandırma ile PCA ve MacConkey Agar (Merck) üzerine ekim yapılarak 24-72 saat 35 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresini takiben bakteri kolonilerinden rastgele seçilerek Nutrient Agar'da (Merck) stok kültürleri yapılmıştır.

### 3.4. Bakterilerin Antibiyotik Direnç Testleri

Antibiyotik hassasiyet testleri agar difüzyon testi uygulanarak yapılmıştır (Bauer ve ark., 1966). Bu testlerde kullanılan antibiyotikler Tablo 3.2'deki gibidir. Antibiyotik disklerinin etkisini doğrulamak için referans bakteri olarak NCCLS'nin (1997) önerdiği *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Antibiyogram testlerinde kullanılan antibiyotikler

Antibiyotik Kodu, Derişimi	Antibiyotik Adı	Grubu
AK, 30 µg	Amikasin	Aminoglikozit
AM, 10 µg	Amfisilin	Aminopenisilin
CZ, 30 µg	Sefazolin	Sefalosporin 1
CXM, 30 µg	Sefuroksim	Sefalosporin 2
CTX, 30 µg	Sefotaksim	Sefalosporin 3
NA, 30 µg	Nalidiksik Asit	Kinolin
TE, 30 µg	Tetrasiklin	Tetrasiklin
E, 15 µg	Eritromisin	Makrolid

### 3.5. Çoklu Antibiyotik Dirençlilik Düzeylerinin Belirlenmesi

ÇAD indeks değeri her bir izolat için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Eğer izolat insan ya da hayvan kaynaklı antibiyotiklere yoğun miktarda maruz kalmış ise, o zaman 0,2 den daha yüksek bir ÇAD indeks değeri ortaya çıkmaktadır. Eğer antibiyotik çok nadir kullanılmışsa ya da hiç kullanılmamışsa ÇAD indeks değeri 0,2 den küçük ya da 0,2 ye eşit olarak kabul edilmektedir (Krumperman, 1985).

## BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Antibiyotik Kalıntı Analizleri

Giresun il sınırları içerisinde toplanan bal numunelerindeki antibiyotik kalıntı değerleri değişimi Sülfadiazin (SZ): 0-4,88 ppb, Sülfadimetoksin (SDM): 0-8,13 ppb, Sülfakinoksalin (SQ): 0-4,32 ppb, Sülfametazin/sülfamidin (SMT): 0->380 ppb, Sülfametoksazol (SMX): 0-3,69 ppb, Sülfatiazol (ST): 0-3,67 ppb, Sülfizoksazol (SS): 0-5,80 ppb, Sülfapiridin (SP): 0-153,55 ppb, Sülfamerazin (SM): 0-41,42 ppb, Sülfamonometoksin (SMM): 0-21,38 ppb, Sülfametoksipiridazin (SMP): 0-3,72 ppb, Sülfaklorpidazin (SCP): 0-1,94 ppb, Dapson (DAPS): 0-8,79 ppb, Sülfadoksin (SD): 0-3,18 ppb, Trimetoprim (TMP): 0-1,55 ppb, Seftiofur (CEFT): 0-0,43 ppb, Tiamfenikol (TAF): 0 ppb, Streptomisin (STR): 0-5,38 ppb, Tilosin(TYL): 0 ppb, Tetrasiklin (TCN): 0,79->68 ppb ve Kinolonlar (QNL): 0-13,49 ppb olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

İstasyon olarak değerlendirme yapıldığında Sülfadiazin (SZ) kalıntı miktarı bakımından; Bulancak: 0-4,88 ppb, Tirebolu: 4 ppb, Espiye: 0 ppb, Keşap: 0-4,23 ppb, Merkez: 0 ppb, Sülfadimetoksin (SDM) bakımından; Bulancak: 0,39-8,13 ppb, Tirebolu: 0,97 ppb, Espiye: 0-0,90 ppb, Keşap: 0-7,22 ppb, Merkez: 0,38 ppb, Sülfakinoksalin (SQ) bakımından; Bulancak: 0-3,60 ppb, Tirebolu: 0,24 ppb, Espiye: 0-0,15 ppb, Keşap: 0-4,32 ppb, Merkez: 0 ppb, Sülfametazin/sülfamidin (SMT) bakımından; Bulancak: 0-25,67 ppb, Tirebolu: >380 ppb, Espiye: 0-10,03 ppb, Keşap: 0-376,7 ppb, Merkez: 0,52 ppb, Sülfametoksazol (SMX) bakımından; Bulancak: 0-3,69 ppb, Tirebolu: 0,08 ppb, Espiye: 0-0,8 ppb, Keşap: 0-3,42 ppb, Merkez: 0 ppb, Sülfatiazol (ST) bakımından; Bulancak: 0-3,67 ppb, Tirebolu: 0,86 ppb, Espiye: 0-0,75 ppb, Keşap: 0-2,99 ppb, Merkez: 0,58 ppb, Sülfizoksazol (SS) bakımından; Bulancak: 0-5,10 ppb, Tirebolu: 0 ppb, Espiye: 0-1,12 ppb, Keşap: 0-5,80 ppb, Merkez: 1,04 ppb, Sülfapiridin (SP) bakımından; Bulancak: 0,09-11,42 ppb, Tirebolu:

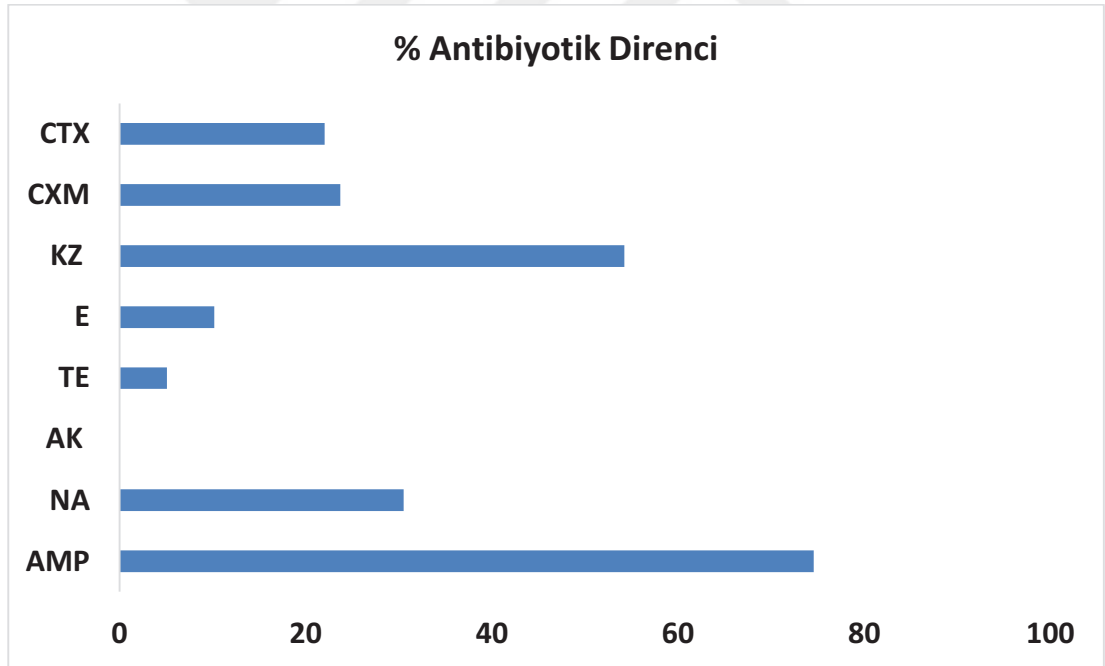
153,55 ppb, Espiye: 0,02-0,64 ppb, Keşap: 0-11,35 ppb, Merkez: 0,56 ppb, Sülfamerazin (SM) bakımından; Bulancak: 0,07-2,65 ppb, Tirebolu: 41,42 ppb, Espiye: 0,13-0,36 ppb, Keşap: 0-2,87 ppb, Merkez: 0,23 ppb, Sülfamonometoksin (SMM) bakımından; Bulancak: 0,76-21,38 ppb, Tirebolu: 10,70 ppb, Espiye: 0,23-1,94 ppb, Keşap: 0-20,08 ppb, Merkez: 0 ppb, Sülfametokspiridazin (SMP) bakımından; Bulancak: 0-3,72 ppb, Tirebolu: 3,02 ppb, Espiye: 0-0,27 ppb, Keşap: 0-3,00 ppb, Merkez: 0,05 ppb, Sülfaklorpidazin (SCP); Bulancak: 0-0,89 ppb, Tirebolu: 0 ppb, Espiye: 0-0,10 ppb, Keşap: 0-1,94 ppb, Merkez: 0,26 ppb, Dapson (DAPS) bakımından; Bulancak: 0-0,92 ppb, Tirebolu: 8,79 ppb, Espiye: 0-0,97 ppb, Keşap: 0-0,83 ppb, Merkez: 0,83 ppb, Sülfadoksin (SD) bakımından; Bulancak: 0-2,08 ppb, Tirebolu: 0 ppb, Espiye: 0-0,19 ppb, Keşap: 0-3,18 ppb, Merkez: 0,05 ppb, Trimetoprim (TMP) bakımından; Bulancak: 0,03-1,49 ppb, Tirebolu: 0,13 ppb, Espiye: 0-0,88 ppb, Keşap: 0-1,55 ppb, Merkez: 0,73 ppb, Seftiofur (CEFT) bakımından; Bulancak: 0-0,43 ppb, Tirebolu: 0,36 ppb, Espiye: 0-0,16 ppb, Keşap: 0-1,11 ppb, Merkez: 0,10 ppb, Tiamfenikol (TAF) bakımından; Bulancak: 0 ppb, Tirebolu: 0 ppb, Espiye: 0 ppb, Keşap: 0 ppb, Merkez: 0 ppb, Streptomisin (STR) bakımından; Bulancak: 0-5,38 ppb, Tirebolu: 0 ppb, Espiye: 0-1,24 ppb, Keşap: 0-5,36 ppb, Merkez: 0 ppb, Tilosin (TYL) bakımından; Bulancak: 0 ppb, Tirebolu: 0 ppb, Espiye: 0 ppb, Keşap: 0 ppb, Merkez: 0 ppb, Tetrasiklin (TCN) bakımından; Bulancak: 2,94->68 ppb, Tirebolu: >68 ppb, Espiye: 0,79-3,21 ppb, Keşap: 1,96-13,62 ppb, Merkez: 3,85 ppb, Kinolonlar (QNL) bakımından; Bulancak: 0,79-10,60 ppb, Tirebolu: 2,61 ppb, Espiye: 0,40-5,35 ppb, Keşap: 0-13,49 ppb, Merkez: 1,34 ppb, olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4. 1. Antibiyotik kalıntı düzeyleri (ppb)

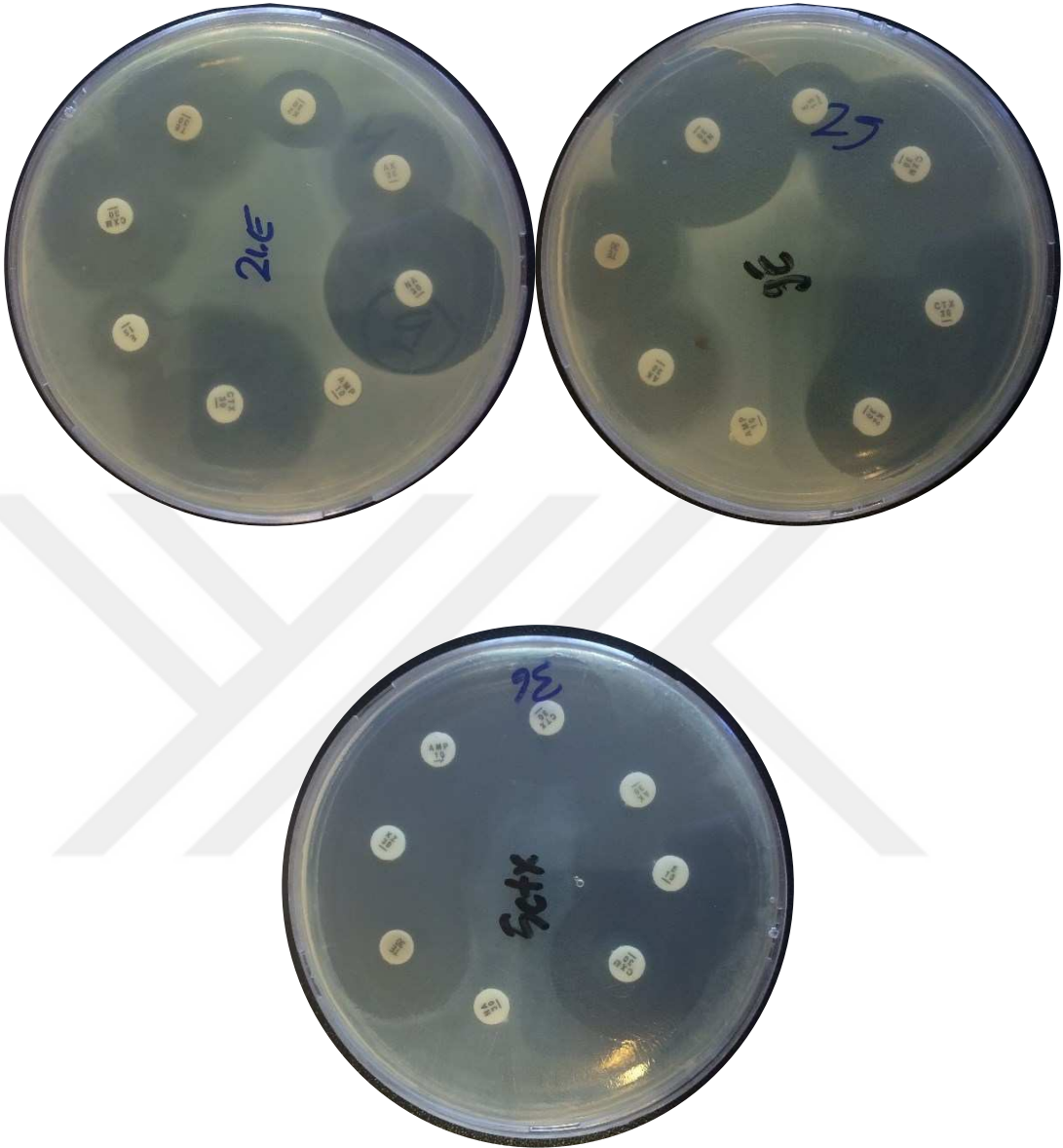
Örnekleme Alanı	Antibiyotikler																					
	SZ	SDM	SQ	SMT	SMX	ST	SS	SP	SM	SMM	SMP	SCP	DAPS	SD	TMP	CEFT	TAF	STR	TYL	TCN	QNL	
Bulancaak-1	0	0,71	0	2,54	0	0	0	0,53	0,07	1,05	0,35	0	0	0	0,03	0	0	0	0	0	>68	0,79
Bulancaak-2	0	1,57	0	25,67	0	0	0	0,67	0,18	2,15	0	0	0	0	0,23	0	0	0,01	0	0	3,42	1,22
Bulancaak-3	0	0,39	0,01	11,52	0	0	0	0,09	0,17	0,76	0	0	0	0	0,09	0	0	0	0	0	21,23	3,33
Bulancaak-4	0,15	1,39	0,36	24,08	0	1,03	1,60	1,34	0,44	1,47	0,38	0,89	0,92	0,17	0,49	0	0	5,38	0	0	12,51	4,28
Bulancaak-5	4,88	8,13	2,68	0	1,94	3,67	4,41	11,42	2,65	21,38	3,72	0,50	0,76	1,13	1,29	0,15	0	0	0	0	4,21	3,20
Bulancaak-6	3,75	6,27	2,46	0	3,01	3,55	5,10	9,10	2,49	16,03	1,69	0,004	0,58	1,67	1,49	0	0	0	0	0	2,94	2,09
Bulancaak-7	3,37	6,30	3,17	4,33	3,39	3,05	4,18	10,36	2,23	18,73	2,45	0,47	0,54	1,73	0,99	0,43	0	0	0	0	>68	10,60
Bulancaak-8	3,25	5,69	3,60	10,45	3,69	3,26	4,73	9,08	2,46	18,47	3,13	0,45	0,42	2,08	0,75	0,10	0	0	0	0	4,09	9,60
Merkez	0	0,38	0	0,52	0	0,58	1,04	0,56	0,23	0	0,05	0,26	0,83	0,05	0,73	0,10	0	0	0	0	3,85	1,34
Keşap-1	0	0	0	54,10	0	0	0	0	0,33	0,22	0	0	0	0	0,04	0	0	5,36	0	0	4,94	2,93
Keşap-2	0	0,13	0,05	7,04	0,63	0	0	0,17	0,64	1,35	0,15	0	0	0	0,04	0	0	0	0	0	1,96	0
Keşap-3	0	0	0,07	376,7	0	1,02	1,06	2,25	0,93	0,49	0	0,48	0,83	0	0,29	0	0	0	0	0	6,61	2,88
Keşap-4	3,19	6,94	2,74	0	2,28	2,95	2,07	6,91	1,96	8,88	1,24	0	0,51	0,91	1,55	0,08	0	0	0	0	4,16	7,89
Keşap-5	3,49	7,22	4,32	0	3,28	1,19	3,13	11,35	2,76	20,08	3	1,94	0,62	3,18	1,34	0,08	0	0	0	0	4,52	13,49
Keşap-6	0	0	0	0,43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,28	0	0	4,33	6,35
Keşap-7	0	0	0	98,94	0,38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	0	0	0	0	3,32	0,86
Keşap-8	4,23	6,40	1,45	0	3,42	2,55	5,80	7,59	1,81	14,40	1,90	0,24	0,42	1,17	1,14	0	0	0	0	0	13,62	1,33
Keşap-9	2,76	7,25	2,92	0,47	3,26	2,99	4,72	8,51	2,87	15,25	2,82	0,61	0,67	3,08	0,72	0,07	0	0,26	0	0	4,65	5,28
Espiye-1	0	0	0,11	10,03	0,08	0	0	0,28	0,36	1,94	0	0	0	0	0	0,16	0	1,24	0	0	3,21	1,20
Espiye-2	0	0	0	0	0	0	0	0,02	0,13	0,23	0	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0	0,79	5,35
Espiye-3	0	0,90	0,15	0,48	0	0,75	1,12	0,64	0,26	0,32	0,27	0,10	0,97	0,19	0,88	0	0	0	0	0	2,20	0,40
Tirebolu	4	0,97	0,24	>380	0,89	0,86	0	153,55	41,42	10,70	3,02	0	8,79	0	0,13	0,36	0	0	0	0	>68	2,61

## 4.2. İzolatlardaki Antibiyotik Direnç Düzeyi

Bal numunelerinin alındığı kovandaki arı kolonisinden rastgele ve steril şartlar altında alınan arı örneklerinden izole edilen toplam 59 izolatin antibiyotik direnç düzeyi Şekil 4.1'deki gibidir. Antibiyotik direnç düzey oranları sırasıyla; AMP %74,6, KZ: %54,2, NA: %30,5, CXM: %23,7, CTX: %22, E: %10,2 ve TE: %5,1 olarak saptanmıştır. Ayrıca çalışma süresince elde edilen tüm izolatlardan AK'ye karşı hassas olduğu kayıt edilmiştir.



Şekil 4.1. İzolatların antibiyotik direnç yüzdeleri



Şekil 4.2. İzolatların antibiyotik direnç testleri

### 4.3. İzolatların Çoklu Antibiyotik Direnç İndeksi

İzolatların Çoklu Antibiyotik Direnç İndeksi analizine göre %36'sının referans değeri aştığı tespit edilmiştir. Ayrıca, çalışma boyunca elde edilen 59 izolatın en az 1 antibiyotiğe karşı direnç taşıdığı kayıt edilmiştir. Test edilen antibiyotik sayısına göre direnç gösteren izolat sayıları Tablo 4.2'deki gibidir.

Tablo 4.2. İzolatların antibiyotik direnç sayıları

	Antibiyotik Sayısı								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Dirençli İzolat Sayısı	-	23	18	6	7	5	-	-	-



## BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tarih boyunca sağlıklı yaşam için son derece önem arz eden besin kaynaklarından biri olan balda; ülkemizdeki yasal düzenlemeler incelendiğinde Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği (Anonim, 2017) hükümleri uyarınca sadece amitraz ve kumafos için en yüksek kalıntı limitleri belirlemiş ancak herhangi bir antibiyotik için kalıntı seviyesi miktarı ifade edilmemiştir. Balda çeşitli ülkelerde referans olarak kullanılan maksimum kalıntı limitleri Tablo 5.1’de gösterilmiştir.

Tablo 5. 1. Bal için çeşitli ülkelerin belirlediği maksimum kalıntı limitleri (ppb) (Zhang ve ark., 2019)

Antibiyotikler	Avrupa Birliği <sup>a</sup>	Çin	ABD	İsviçre	Belçika	Fransa	Türkiye
Sülfonamidler	50	50	-	50	20	-	d
Nitrofuranlar	1 <sup>b</sup>	-	-	-	1 <sup>c</sup>	-	d
Enrofloksasin	-	d	d	-	5	-	d
Tetrasiklinler	20	50	-	20	20	10	d
Kloramfenikol	0.3	e	d	-	0.1	-	d
Eritromisin	20	e	-	-	20	-	d
Furazolidon	d	e	d	-	-	-	d
Streptomisin	40	-	-	20	20	10	d
Streptomisin	20	-	-	-	60	15	d
Fumagilin	-	-	-	-	25	-	d
Lincomisin	-	-	-	-	20	-	d

-, İlgili bilgi mevcut değildi.

a İzleme için önerilen konsantrasyon.

b Kanatlı eti ve Su Ürünleri Ürünleri için geçerli, bal için uygulanabilir değer

c Komisyon Kararına (2002/657/EC) göre belirlenen asgari limit düzeyi

d Yasaklı

e Tespit Edilmedi

Ardahan ili dâhilinde toplanan 180 adet bal numunesinin %37,77’inde streptomisin, %94’ünde ise sülfonamid kalıntısına rastlanıldığı rapor edilmiştir (Özkan ve ark., 2015). Ayrıca çalışmada en yüksek değerler sırasıyla 5,57 ile 2,79 ppm olarak kayıt edilmiştir.

Muğla ilinden topladıkları bal numunelerindeki sülfametazin düzeyinin tespit edilen örneklerdeki değişimi 9,2-1501 ng/g, sülfametoksazolun tespit edilen örneklerdeki değişim aralığı 9,94-22,56 ng/g olarak rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmada İzmir ili dâhilinde toplanan bal numunelerinde sülfamerazin düzeyinin tespit edilen örneklerdeki değişimi 9,43-28,5 ng/g, sülfametazin düzeyinin tespit edilen örneklerdeki değişimi 8,3-60 ng/g olarak tespit edilmiştir. Manisa ili menşeli bal numunelerinde 14,30 ng/g düzeyinde sülfametoksazol kalıntısı, Kütahya ilindeki numunelerde ise bu kalıntı 20 ng/g olarak rapor edilmiştir. Yine Kütahya ilinde sülfametazin düzeyinin tespit edilen örneklerdeki değişimi 100-9901 ng/g olarak kayıtlara geçmiştir. Aydın ilinden toplanan bal örneklerinde sadece 1 numunede sülfamerazin 16,7 ng/g, Denizli'den toplanan bal örneklerinde de yine 1 örnekte sülfametazin 49,12 ng/g olarak analiz edilmiştir (Uludağ, 2008).

Ülkemiz coğrafyasının yaygın arıcılık faaliyetinin yapıldığı 6 bölgesinde doğrudan üreticilerin peteklerinden süzölmüş olarak toplanan bal numunelerinin 1714'sinde sülfametazin, 1425'inde tetrasiklin ve 91'inde streptomisin varlığı tespit edilmiştir. Oran olarak değerlendirildiğinde tüm numunelerin %37,77'sinde streptomisin ve %52,22'sinde ise sülfonamid kalıntısının rapor edildiği söylenebilmektedir (Sunay, 2006).

Küresel boyutta irdelendiğinde; İngiltere'de, ithalat yolu ile tedarik edilen toplam 105 adet bal numunesinin 2'sindeki sülfonamid kalıntı düzeyi 44-11000 ng/ml (Url-3), Fransa'da yapılan bir çalışmada 148 adet bal numunesinin 19'undaki sülfonamid kalıntı düzeyi 10-6127 ng/ml (Martel ve Zeggane, 2003), Belçika'da gerçekleştirilen çalışmada ise yerel programla üretilen toplam 72 adet bal numunesinin 3'ünde, ithal yol ile temin edilen 98 adet bal numunesinin 31'inde sülfonamid kalıntısına rastlanıldığı rapor edilmiştir (Reybroeck, 2003). Mevcut durum altında Giresun ili dâhilinde toplanan örneklerdeki sülfonamid kalıntı düzeyi değişiminin 0,43->380 ppb aralığında olması dünya ve ülke genelinde olduğu gibi Giresun ili dahilindeki arıcılık faaliyetlerinde de yasadışı olarak sülfonamidlerin kullanıldığı bilgisini doğrulamaktadır.

Ege Bölgesi'ndeki doğal çam ballarından toplanan 59 örneğin 35'inde tetrasiklin grubu antibiyotikler 6-42 ppb aralığında, 31'inde sülfametazin 3-32 ppb aralığında, 28'inde ise yine sülfametazin hassasiyet limiti altında (<1 ppb) rapor edilmiştir. Tüm numunelerin %59,3'ünde sülfametazin, %52,5'inde ise tetrasiklin grubu antibiyotik kalıntısı tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada en yüksek değerler tetrasiklin ve sülfametazin olmak üzere sırasıyla 42-38 ile 32-26 ppb olarak kayıt edilmiştir (Korkmaz ve ark., 2017).

Marmara bölgesindeki arı üreticilerinden topladıkları 50 bal örneği üzerinde yaptıkları çalışmada, oksetetrasiklin ve sülfonamid antibiyotik gruplarına ait örnekleri LC-MS/MS ile analiz etmiş ve antibiyotik kalıntısına rastlamamışlardır (Güneş ve ark., 2009). Yine LC-MS/MS'le gerçekleştirilen bir başka çalışmada analiz edilen 536 adet bal numunesinin %23'ünde sülfonamid türevi antibiyotik kalıntısı tespit edilmiştir (Erdoğan ve ark., 2011).

2003-2006 yıllarında Ege Üniversitesi İlaç Araştırma Laboratuvarı'nda 403 balda yapılan sülfonamidler yönünden yapılan kalıntı analizlerinde, sülfonamid kalıntısına sebep olan bileşiklerin dağılımı sırasıyla; % 65, 25, 4, 2, 2, 1, 1 oranında sülfametazin, sülfametizol, sülfametoksipirazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametoksazol, süfadiyazin yönünden pozitif numunelere rastlanması (Üzümcü, 2007), Ege bölgesindeki bu çalışmada sülfametazinin %68 oranında bulunmasıyla benzerlik göstermektedir. Bu oran, aynı zamanda Ege bölgesi arı yetiştiricilerinin yaygın sülfametazin kullanımı eğiliminin göstergesidir.

İtalya'da farklı flora ve jeocoğrafik bölge orjinli piyasa ballarından 74 adet numune toplanmış ve 27 antibiyotiğin kalıntı düzeyleri irdelenerek sadece %12'sinde iz seviyede sülfonamid kalıntısı tespit edilmiştir (Gačić ve ark., 2015). Yine İtalya'da farklı botanik ve coğrafi kökenlerden türevlenmiş 66 adet bal numunesi 6 antibiyotik sınıfına ait antibiyotiklerin kalıntı düzeyi irdelenen bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada test edilen numunelerin 42'sinin 2017 yılında, 24'ünün ise aynı bölgede 2016 yılında üretilen ballardan oluştuğu belirtilmiştir. Araştırmacılar 2017 yılında üretilen ballardan; 38 bal örneğinde tilosin (TYL), 36 bal örneğinde tetrasiklin (TCN),

27 bal örneğinde kinolon (QNL), 21 bal örneğinde tiamfenikol (TAF), 19 bal örneğinde sefalosporin (CEFT) ve son olarak sadece bir bal örneğinde streptomisin (STR) türevi antibiyotik tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. 2016 yılında üretilen ballarda ise 24 numunenin sadece 2'sinde kinolon kalıntısının cihazın belirleyebileceği sınırlardan biraz daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (Barrasso ve ark., 2018). Sonuçlar, bazı durumlarda, yasalar aracılıkla antibiyotik kullanımını açıkça yasaklamasına rağmen, İtalya gibi Avrupa topluluğuna ait bir ülkede antibiyotik kullanıldığını göstermektedir.

Baggio ve ark. (2009), 2001-2007 yılları arasında 5303 bal numunesinden yapmış oldukları çalışma sonucunda; İtalyan pazarında balda en yaygın kullanılan maddeleri sülfonamid, ardından tetrasiklin, streptomisin, tilosin ve kloramfenikol olduğunu vurgulamıştır. Çalışmada yer alan tüm numunelerin %6,3'ünde antibiyotik kalıntısı tespit edilmiş iken, yerel ballarda bu oranın %1,7 olduğu vurgulanmıştır. 2001-2007 yılları arasında ithal edilen balların %12,7'sinde streptomisin, %10,3'ünde sülfonamidler, %3,1'inde tetrasiklinler, %4,3'sinde tilosin ve %0,9'unda kloramfenikol, İtalya marketlerindeki balların %10,6'sında sülfonamidler, %5,2'sinde tilosin, %4,2'sinde tetrasiklinler, %2,8'inde streptomisin ve %1,8'inde kloramfenikol, 2001-2004 yılları arasında yerel üretilen balların ise %5,7'sinde tilosin, %3,8'inde sülfonamidler ve %0,3'ünde tetrasiklinlerin pozitif sonuç vererek kalıntı gösterdikleri rapor edilmiştir. Bununla birlikte, sonuçlar son birkaç yılda kovanlara uygulanan antibiyotiklerde de bir değişiklik olduğunu göstermiştir. Analizler sonucunda, sülfonamidler ve özellikle de tetrasiklinler gibi geleneksel antibiyotiklerin uygulanmasının yanı sıra, analiz edilen aktif maddeler arasında streptomisin ve tilosin gibi daha yeni antibakteriyel maddelerde de bir artışın kaydedildiği dikkat çekmiştir.

On yıllardır, Amerikalı arıcılar, larva patojenlerinin kontrolü için rutin olarak oksitetrasiklin ile kolonileri tedavi ettiklerini ve buna bağlı olarak Maryland arılarından fonksiyonel bir metagenomik bakteri taraması sonucunda yüksek oranda tetrasiklin/oksitetrasiklin direnci tespit ettiklerini rapor etmişlerdir (Tian ve ark., 2012). Antibiyotik kullanımı, kalıntı sorununa sebep olmanın yanı sıra, arıların bağışıklık sistemini zayıflatmakta ve hastalık yapıcı bakterilerin antibiyotiklere direnç

kazanmasına sebep olmaktadır. Dünya Kanser Ajansı'nda Grup III'de yer alan bazı sülfonamidlerin fare ve sıçanlarda özellikle tiroid bezinde büyüme ve tümör sıklığında artış yarattığı ifade edilmiştir (Kaya ve ark., 2002; Url-4). Bunlarla ilintili olarak Giresun il sınırları içerisinde toplanmış olduğumuz bal numunelerinin bulunduğu kovanlardaki arılardan izole edilen bakterilerin mevcut antibiyotik direnç düzeyleri irdelendiğinde sadece 1 antibiyotik hariç diğer test edilen tüm antibiyotiklere farklı oranlarda direnç taşıdığı ve tüm izolatların %36'sının ÇAD referans değeri aştığının tespit edilmesi literatür bulgusu ile uygunluk göstermektedir. Mevcut durum Giresun il sınırları dâhilinde gerçekleştirilen arıcılık faaliyetlerinde kontrolsüz ve yasal olmayan şekilde antibiyotik kullanımı olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilmektedir. Ayrıca, arıcılık faaliyetinde yer alan arıların flora elemanı bakterilerdeki yüksek antibiyotik direnci; antibiyotik kullanımının uzun yıllardır aktif olarak uygulandığının diğer bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Sonuç olarak, insanların en önemli gıda kaynakları arasında yer alan ve sağlıklı yaşam için temel besin öğeleri arasında gösterilen balın, antibiyotik kalıntısı içermesi hem ekolojik denge hem de insan sağlığı açısından istenmeyen bir durumdur. Kısa vadede ürünlerdeki verimi arttırmak, hastalıklarla mücadele etmek gibi amaçlarla yasadışı olarak kullanılan antibiyotiklerin uzun vadede daha büyük zararlara yol açtığı bilinmesi gerekmektedir. Aksi halde, arıların florasında doğal olarak yer alan bakterilerdeki artan antibiyotik direnci ileriki aşamalarda yayılım göstererek tedavi edilemeyecek hastalıkların yayılmasına da kaynak oluşturabilecek potansiyeldedir. Sağlık açısından bu durum istenilmediği gibi ekonomik açıdan da kayıpların büyük olacağı aşikârdır. Bu nedenle Giresun ili dâhil olmak üzere ülkemiz genelinde ticari ve/veya amatör olarak arıcılık faaliyeti yapan herkesin bilinçlendirilmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abu-Tarboush, H., Al-Kahtani, H., El-Sarrange, M. 1993. Floral type identification and quality evaluation of some honey types. *Food Chemistry*, 46,13-17.
- Albayrak, S., Albayrak, S. 2008. Propolis: doğal antimikrobiyal madde. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 37(3):201– 215.
- Al-Waili, N., Salom, K., Al-Ghamdi, A., Ansari, M. J. 2012. Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. *TheScientificWorldJournal*, 930849.
- Anonim, 2011. Pfund Scale, [https://www.sizes.com/units/pfund\\_scale.htm](https://www.sizes.com/units/pfund_scale.htm). Erişim Tarihi 20.06.2019.
- Anonim, 2017. Türk Gıda Kodeksi hayvansal gıdalarda bulunabilecek farmakolojik aktif maddelerin sınıflandırılması ve maksimum kalıntı limitleri yönetmeliği, Resmi Gazete, Sayı 30000.
- Anonim. 2012. Türk Gıda Kodeksi bal tebliği-2012/58. Resmi Gazete, Sayısı: 28366.
- Baggio, A., Gallina, A., Benetti, C., Muttinelli, F. 2009. Residues of antibacterial drugs in honey on Italian market. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2:52-58.
- Barrasso, R., Bonerba, E., Savarino, A., Ceci, E., Bozzo, G., Tantillo, G. 2018. Simultaneous quantitative detection of six families of antibiotics in honey using a biochip multi-array technology. *Veterinary Sciences*, 6(1):1.
- Bauer, A.W., Kirby, W.W., Sherris, J.C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standard single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45,493-496.
- Bogdanov, S. 1999. Honey quality and international regulatory standards: review by the international honeycommission. *Bee World*, 80(2):61-69.
- Bogdanov, S., 2002. Harmonised Methods of the International Honey Commission. 62.
- Bogdanov, S., 2006. Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37(1):1-8.
- Bogdanov, S., Vit, P., Kilchenmann, V. 1996. Sugar profiles and conductivity of stingless bee honeys from Venezuela. *Apidologie*, 27,445-450.
- Bölüktepe, F.E., Yılmaz, S. 2008. Arı ürünlerinin bilinirliği ve satın alma sıklığı. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 8,53-62.
- Dluhořová, S., Borkovcová, I., Kaniová, L., Vorlová, L. 2018. Sulfonamide residues: honey quality in the Czech Market. *Journal of Food Quality*, 1-7.
- Doner, 2003. Honey. In: L. Trugo, P. Finglas, B. Caballero (Editors), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Elsevier, pp. 3125-3130, Amsterdam.

- Erbilir, F., Erdoğan, Ö. 2005. Determination of heavy metals in honey in Kahramanmaraş city, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 109,181-187.
- Erdoğan, A.T., Coşkun, Y., Güven, S.İ. 2011. Determination of sulphonamide antibiotics residues in honey presented for consumption. *The Journal of Bornova Veterinary Science*, 33,37-44.
- Estevinho, M.L., Rodrigues, P., Moreira, L.L., Dias, L.G., Gomes, S. 2010. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48,544-548.
- Fernandez, M., Lozano, J. 1993. Gas chromatographic- mass spectrometric method for the simultaneous determination of amitraz, bromopropylate, coumpos, cymiazole and fulvalinate residue in honey. *Analyst*, 118(12):1519-1522.
- Fıratlı, Ç., Genç F., Karacaoğlu M., Gençer, H.V. 2000. Türkiye Ziraat Mühendisliği 5. Teknik Kongresi, Ankara, 811-826.
- Gaćić, M., Bilandžić, N., Šipušić, Đ.I., Petrović, M., Kos, B., Vahčić, N., Šušković, J. 2015. Degradation of antibiotic residues in honey. *Food Technology and Biotechnology*, 53(2):154-162.
- Galarini, R., Moretti, S., Giusepponi, D., Rossi, R., Saluti, G. 2013. Multiclass determination of antibiotics in honey. 6th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis November, 5-8.
- Gunes, N., Cibik, R., Gunes, M.E., Aydin, L. 2008. Erythromycin residue in honey from the Southern Marmara region of Turkey. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 25(11): 1313–1317.
- Güler, A. 2006. Bal arısı. OMÜ Ziraat Fakültesi Ders Kitabı. No:55, Samsun.
- Güneş, M.E., Güneş, E., Cibik, R. 2009. Oxytetracycline and sulphonamide residues analysis of honey samples from Southern Marmara Region in Turkey. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15,163-167.
- Haarmann, T.K. 2000. Honey bees as indicators of radionuclide contamination: A truly useful biomonitor. In: *Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals*, eds. J. Devillers and M. H. Pham-Delègue, Taylor & Francis, London and New York, 132–150.
- Hermosin, I., Chicon, R.M., Cabezudo, M.D. 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83,263-268.
- Jan, J., Cerne, K. 1993. Distribution of some organochlorine compounds (PCB, CBz, and DDE) in beeswax and honey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 51,640-646.
- Kaya, S., Pirinççi, İ., Ünsal, İ.A., Karaer, Z., Traş, B., Bilgili, A., Akar, F., Doğan, A. 2002. Veteriner hekimliğinde farmakoloji 2. Cilt, 3. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara.

- Korkmaz, S.D., Kuplulu, O., Cil, G.I., Akyuz, E. 2017. Detection of sulfonamide and tetracycline antibiotic residues in Turkish pine honey. *International Journal of Food Properties*, 20(1):50-55.
- Krumperman, P.H. 1985. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 46,165-170.
- Kutlu, M.A., Gül, A., Özdemir, F.A., Kiliç, Ö. 2017. Bitlis ili hizan ilçesinde üretilen ballarda antibiyotik kalıntılarının belirlenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 4(4):523-527.
- Louppis, A.P., Kontominas, M.G., Papastephanou, C. 2017. Determination of antibiotic residues in honey by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 10(10):3385-3397.
- Lusby, P.E., Coombes, A.L., Wilkinson, J.M. 2005. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Archives of Medical Research*, 36,464-467.
- Mahmoudi, R., Norian, R., Pajohi-Alamoti, M. 2014. Antibiotic residues in iranian honey by elisa. *International Journal of Food Properties*, 17(10):2367-2373.
- Martel, A.C., Zeggane, S. 2003. HPLC Determination of sülfathiazole in french honeys. *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26(6):953-961.
- Mato, I., Huidobro, J., Simal-Lozano, J., Sancho, M.T. 2006. Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54,1541-1550.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fason honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91,571-577.
- Mehdi, Y., Mutlaq, A., Al-Balas, Q., Azzi, E., Bouadjela, L., Taïbi, N., Bachari, K. 2018. Physicochemical characterization and determination of chloramphenicol residues and heavy metals in Algerian honeys. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(33):33322-33333.
- Mujić, I., Alibabić, V., Jokić, S., Galijašević, E., Jukić, D., Šekulja, D., Bajramović, M. 2011. Determination of pesticides, heavy metals, radioactive substances, and antibiotic residues in honey. *Polish Journal of Environmental Studies*, 20(3):719-724.
- NCCLS, 1997. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Standards M2-A6. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 6th edn., NCCLS.
- Özbek, H. 2003. Türkiye’de arılar ve tozlaşma sorunu Uludağ Arıcılık, 3,41-44.
- Özkan, O., Eşsiz, D., Yazici, K., Erdağ, D. 2015. Ardahan ilinde üretilen ballarda antibiyotik kalıntı düzeylerinin araştırılması. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 10(2):88-92.



- Reybroeck, W. 2003. Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian Market. *Apiacta*, 38,23-30.
- Rodriguez, G.O., Sulbaran, B., Ferrer, A., Rodriguez, B. 2004. Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*, 84,499-502.
- Saygılı, M. 2017. Kırklareli ilinde arıcılık faaliyeti yapan üreticilerden toplanan peteklerde antibiyotik ve pestisit kalıntısı aranması. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Seğmenoğlu, M., Baydan, E. 2012. Ballarda rastlanabilen ilaç kalıntıları ve bulaşanlar. *AVKAE Dergisi*, 2,24-28.
- Sheridan, R., Policastro, B., Thomas, S., Rice, D. 2008. Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10):3509-3516.
- Sıralı, R. 2010. Arıcılığın Türkiye için önemi. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 2,3-4.
- Sıralı, R., 1996. Arıcılığın Türkiye ekonomisine katkısı. *Teknik Arıcılık*, 54,13-15. Ankara.
- Sunay, A.E. 2006. Balda orijin tespiti. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Talu, Ş. 2004. Arıcılık sektör profili. İstanbul Ticaret Odası, Bilgi ve Doküman Yönetimi Şubesi.
- Tian, B., Fadhil, N.H., Powell, J.E., Kwong, W.K. Moran, N.A. 2012. Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees, *mbio.asm.org*, 3(6):1-7.
- Tong, S., Morse, R., Bache, C., Lisk, D. 1975. Elemental analysis of honey as an indicator of pollution. *Archives Environ Health J*, 30,329-332.
- Tosi, E., Martinet, R., Ortega, M., Lucero, H., Re, E. 2008. Honey diastase activity modified by heating. *Food Chemistry*, 106,883-887.
- Uludağ, R. 2008. Ege bölgesinde tüketime sunulan ballarda sülfonamid kalıntılarının araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Üzümcü, İ. 2007. Ulusal kalıntı izleme programı ve yasal zemini, Antibiyotik Kullanımı Stratejileri ve Kalıntıları Sempozyumu, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- Weston, R.J., Brocklebank, L.K., Lu, Y. 2000. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some new zealand honeys. *Food Chemistry*, 70,427-435.
- White, J.W., 1979. Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in Honey. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 62,509.
- Zai, I.U.M., Rehman, K., Hussain, A. 2013. Detection and quantification of antibiotics residues in honey samples by chromatographic techniques. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 14(5):683-687.

Zhang, Y., Li, X.Q., Li, H.M., Zhang, Q.H., Gao, Y., Li, X.J. 2019. Antibiotic residues in honey: a review on analytical methods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Trends in Analytical Chemistry, 110,344-356.

Url-1 <http://www.aribalpolen.com/ari-urunlerinde-kalinti-sorunu> Erişim Tarihi 20.06.2019

Url-2 <https://www.turkiye-rehberi.net/giresun-haritasi.asp> Erişim Tarihi 20.06.2019

Url-3 [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/243614/9780108507656.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/243614/9780108507656.pdf). Erişim Tarihi 20.06.2019

Url-4 <https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/15001-sulphonamides-review-final-report.pdf>. Erişim Tarihi 20.06.2019



## ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Bulancak'ta doğdu. İlk ve ortaokulu Ordu Akyazı Çamsan İlköğretim Okulu'nda, liseyi Erzincan Tarım Meslek Lisesi, Laborant Bölümü'nde tamamladı. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Bölümü'nden mezun oldu. Aynı zamanda 2007 yılının Eylül ayında Ordu Arıcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde laborant olarak çalışmaya başladı. 2011 yılında girdiği Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2014 yılında mezun oldu. Evli olup, 2014 yılı Eylül ayında girdiği Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Programında öğrenim görmeye ve Ordu Arıcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde Biyolog olarak çalışmaya devam etmektedir.