

## ***Nosema Ceranae* ile Doğal Enfekte Balarısı Kolonilerinde Noseba®'nin Etkinliğinin Araştırılması**

**Levent AYDIN<sup>1</sup>, Mehmet ÖZÜİÇLİ<sup>1</sup>, Ahmet Onur GİRİŞGİN<sup>1</sup>,  
Yiğit ALTAV<sup>2</sup>, Betül SAYGIN<sup>1</sup>, Nurgül ÇİMENLİKAYA<sup>1</sup>,  
Suna Aslı ZENGİN<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bursa-Türkiye

<sup>2</sup> Arion İlaç Ar&Ge Merkezi, Tuzla - İstanbul

<sup>3</sup> Bavet İlaç San. ve Tic. A.Ş., Tuzla -İstanbul

Received 2019-07-18 Accepted 2020-02-15

### **Özet**

Bu çalışmada, Arion İlaç Ar-Ge Merkezi ve Bavet İlaç San. ve Tic. A.Ş. tarafından geliştirilen, *Origanum minutiflorum* ve *Laurus nobilis* e-sansiyel yağ karışımı ile vitamin bileşiklerinin (Noseba®), Nosemosis ile doğal enfekte balarısı kolonilerinde etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bursa yöresi İkizce köyünde Mayıs 2019'da 10'ar çerçevesi kolonilerden sindirim yönteminde pozitiflik/negatiflik kontrolü için kovan başı en dış çerçeveden 30'ar arı muayene edilip, pozitif çıkan kolonilerden Neubauer lamına alınarak ışık mikroskopunda 40x10 büyütmede sayılıp Shimanuki-Knox formülü ile arı başına düşen spor sayısı tespit edilmiştir. Pozitif kovanlar spor sayıları dikkate alınarak 7'şerli 4 gruba ayrılmış, toplam 28 kovan çalışmada kullanılmıştır. Üç ayrı deneme grubunda 1 lt 1:1'lik şeker şurubuna sırasıyla 20, 40 ve 80 cc Noseba® karıştırılmış, Nosema-pozitif bir adet kontrol grubu ise deneme sonuna kadar tedavi edilmeden bırakılmıştır. Nosema sayımını takiben 2 gün üst üste 0,5 lt Noseba® karışımları tedavi gruplarındaki kolonilere oral yolla verilmiştir. Tedavi sonrası +1, +5, +10 ve +15. günlerde tekrar spor sayımı yapılmış, kontrol grubu ile istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırası ile 1. tedavi grubu %34,2; 2. tedavi grubu %67,2 ve 3. tedavi grubu % 99,9 etkili bulunmuş, kontrol grubu çalışma sonunda 3. tedavi grubu (80 cc) ile tedavi edilmiş ve %99,9'luk etkinlik saptanmıştır. Çalışma süresince Noseba®dan kaynaklı hiçbir yan etki ve koloni kaybı görülmemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Balarısı, *Nosema ceranae*, Noseba, Etkinlik

### **Abstract**

In this study, we aimed to determine the effectiveness of Noseba® which is developed by Arion Drug Research Center and Bavet Drug Corporation which containing *Origanum minutiflorum* and *Laurus nobilis* essential oil mixture with vitamin, in honeybee colonies naturally infected with Nosemosis. In May 2019, 25 individual bees were examined from the outer frame of the hive, for the control of positivity and negativity from the colonies with ten frames in the İkizce village of Bursa region. The number of spores per bee was determined with Shimanuki-Knox formula by using Neubauer slide from the positive colonies and counted at 40 × magnification under the light microscope. Positive hives were divided into four groups considering the number of spores, each group consisted of 7 hives and a total of 28 hives were used in the study.

In three treatment groups, Noseba® solution was added into one litre of 1:1 sugar syrup with amounts of 20, 40 and 80 cc, respectively. One positive control group was remained untreated until the end of the experiment. 0.5 lt of Noseba® mixture were given orally to the colonies in the treatment groups for two consecutive days following the Nosema count. +1, +5, +10 and +15 days after treatment were re-counted and compared with the control group statistically. As a result, when compared with the control group, the first treatment group was 34.2%, the second treatment group was 67.2% and the third treatment group was found 99.9% effective, respectively. The control group was treated with the mixture as were used in the third treatment group (80 cc) at the end of the study and 99.9% efficacy was determined. No side effects and colonyloss were observed from Noseba® during the study.

**Keywords:** Honeybee, *Nosema ceranae*, Noseba, Efficiency

\* Corresponding author: : Mehmet ÖZÜİÇLİ, Tel No: 05543341870; E-mail: mehmetozuicli@uludag.edu.tr



## Giriş

Arılarda hastalığa neden olan etkenler; mantarlar (*Nosema apis*, *N. ceranae*, Ascospherosis ve Aspergillois), amip (*Malpighamoeba mellifica*), gregarinler, flagellatlar (*Leptomonasapis*, *Crithidiamellifica*), helmint nematodlar (*Mermis albicans*, *Parachordodes tolosanus*, *Agamomermis sp.*, *Neoaplectana carpocapsae*), bakteriler, virüsler ve artropodlardan (insekta ve akar sınıflarında) yaklaşık 119 etken bulunmaktadır.<sup>1,2</sup> Son yıllarda ortaya çıkan CCD-Koloni Çökme Bozukluğunun ana sebepleri bal arılarında gözlemlenen Varroosis, Nosemosis, Trachea akarı vb. gibi arı zararlılarıdır.<sup>1</sup> *N. apis* ve *N. ceranae* ergin bal arılarında (*Apis mellifera*) Nosemosis'e neden olur ve bu etkenler ergin arılarının sindirim sistemine yerleşir. Nosemosis en yaygın arı hastalıklarından birisidir ve dünya çapında önemli arı kayıplarına neden olur.<sup>3,4</sup> Bu hastalık direkt olarak; sindirim sistemi bozukluklarına, arıların ortalama ömrünün kısalmasına, koloni sayısının azalmasına neden olur. İndirekt olarak; bal üretiminin ve polen toplamanın azalmasına ve kolonide önemli kış kayıplarına neden olur.<sup>5,6</sup> Nosemosis; bakteriyel, viral ve protozoal hastalıklarla birlikte görülebilir. Bu durum arı kolonisi sağlığını, arı ürünleri ve üretimini olumsuz yönde etkiler. Her canlıda olduğu gibi bal arılarında da birtakım hastalık etkenleri gözlemlenmekte, koloni sağlığı ve devamlılığını olumsuz yönde etkilemektedir.<sup>5,7</sup> CCD'ye (Colony Collapse Disorder) birçok faktör neden olabilir.<sup>8</sup> Bu faktörlerden en önemlilerinden biri de Nosema cinsinde yer alan *N. apis* ve *N. ceranae* etkenleridir.<sup>9,10</sup>

Yapılan çalışmalarda Nosemosis Bursa yöresinde<sup>11,12</sup> % 26, Kars yöresinde<sup>13</sup> %15,74, Elazığ yöresinde<sup>14</sup> %8,7, Muğla bölgesinde<sup>15</sup> %100, Bingöl yöresinde<sup>2</sup> %26,16, Trakya bölgesinde<sup>16</sup> %6,5, Hatay yöresinde<sup>17</sup> ise %10 oranında bildirilmiştir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda fumagillin içeren preparatlar kullanılmasına karşın *N. ceranae* enfeksiyonlarına karşı etkinlikleri %70'leri aşmamıştır. Aynı zamanda Varroosis enfestasyonları ile birlikte miks seyreden Nosemosis olgularında Varroa ilaçlarının yeterince görev yapmadığı da bildirilmekte, bu nedenle öncelikle Nosemosis'in kontrol altına alınması gerekmektedir.<sup>18</sup> Bu çalışmada doğal bir ürün olan ve kalıntı problemi olmayan, Arion İlaç Ar-Ge Merkezi ve Bavet İlaç San. ve Tic. A.Ş. tarafından geliştirilen bitkisel esansiyel yağ karışımı ile vitamin bileşiklerinin Nosemosis ile doğal enfekte balarısı kolonilerinde etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metod

Bu çalışmada ergin arı örnekleri Bursa (İkizce köyü) yöresinden toplanmıştır. Nosemosis varlığının tespiti için en dış çerçeveden kovan başı 30'ar adet arı örnekleri alınmıştır. Laboratuvara getirilen canlı arı örnekleri hareketsiz kalmaları için derin dondurucuda bir gün bekletilmiştir. Bir gün sonra, hareketsiz kalan arılar digestion yöntemiyle Nosema varlığı yönünden incelenmiştir.

Digestion yönteminde pozitiflik/negatiflik kontrolü için kovan başı 10'ar arı muayene edilerek 10 arının abdomeni bisturi yardımı ile kesilmiştir. Abdomenleri bir havana alınarak her abdomen için 1 ml olmak üzere 10 ml distile su ilave edilmiştir. Uygun bir bağıt yardımı ile iyice ezilip, solüsyon homojen hale getirilerek lam-lamel arasına pipetle bir damla alınarak 40x10 büyütmede ışık mikroskopunda (Nikon Eclipse E100) Nosema sporları yönünden muayene edilmiştir. Pozitif bulunan örneklerden her koloni için 20'şer arı numunesi yukarıda anlatılan digestion yöntemiyle hazırlanıp solüsyonlarından birer damla Neubauer lamına alınıp, ışık mikroskopunda 40x10 büyütmede beş büyük ve her biri 16 adet küçük kare içeren sayım alanındaki Nosema sporları sayılmıştır. Arı başına toplam spor sayısı (N) şu formülle bulunmuştur:<sup>19,20</sup>  $N = S \times 4 \times 10^6 / 80$ . Etkenin tüm Bursa yöresinde *N. ceranae* olduğu, PCR ile daha önce saptanmıştır.<sup>21</sup> Bu çalışma da aynı sabit arılıkta yapılmış ve dışarıdan yeni bir koloni girişi olmamıştır. Yapılan ilk Nosema spor sayımları sıfırıncı gün sayımları olarak kaydedilmiştir. Pozitif koloniler spor sayıları dikkate alınarak yedişerli dört grup oluşturulmuştur. Toplam 28 kovan çalışmada kullanılmıştır. Noseba ticari ürünü *Origanum minutiflorum* ve *Laurus nobilis* bitkilerinin esansiyel (uçucu) yağlarından ve vitamin karışımından oluşmaktadır. Birinci grup tedavisiz kontrol, 2. grup 20 cc Noseba+1 litre şeker şurubu, 3. grup 40 cc Noseba+1 litre şeker şurubu ve 4. grup 80 cc Noseba+1 litre şeker şurubu ile hazırlanarak, sayımı takiben iki gün üst üste 0,5 lt tedavi gruplarındaki kovanlara oral yolla verilmiştir. Tedavi sonrası +1, +5, +10 ve +15. günlerde tekrar sayım yapılmış ve kontrol grubu ile yüzde azalma istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Saha denemeleri 10.04.2019-25.04.2019 tarihleri arasında yapılmıştır

## Bulgular

Çalışmada kullanılan 28 pozitif kovanda tedavi öncesi ortalama arı başına Nosema spor sayısı 17,8 milyon gibi yüksek bir oranda bulunmuştur. Kontrol grubu ve tedavi uygulanan 3 grubun elde edilen sonuçları tabloda verilmiştir.

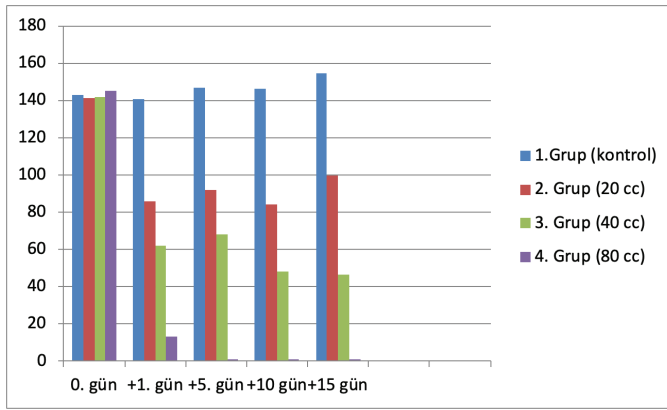
Tablo 1: Nosemosis ile doğal enfekte bal arısı kolonilerine Noseba'nın Etkisi

*Protokol no	**TEDAVİ ÖNCESİ VE SONRASI ARI BAŞINA SPOR SAYISI				
	0. gün	+1. gün	+5. gün	+10. gün	+15. gün
1. Grup (kontrol)	143	140,7	147	146	154,6
2. Grup (20 cc)	141,2	86	92	84	99,9
3. Grup (40 cc)	142	62	68	48	46,6
4. Grup (80 cc)	145	13,4	1	1	1

\*Her grup 7 pozitif (10 çerçevesi) koloniden oluşmaktadır

\*\* Toplam x 10 6 her koloni için spor sayısı

Grafik 1: \*\*Tedavi Öncesi ve Sonrası Arı Başına Spor Sayısı



\*Her grup 7 pozitif (10 çerçevesi) koloniden oluşmaktadır.

\*\* Toplam x 106 her koloni için spor sayısı.

Tedaviyi takiben 2.grup kovanlarda spor sayılarında dalgalanma olmuş, 15. günde %34,2 etkinlik sağlanmıştır. 15 gün sonunda iki kovan tamamen menfi olmuş, 3.grupta ise kolonilerde 5. günden itibaren spor sayısında büyük düşüş göstermesine rağmen 15. günde etkinliğin %67,2'lerde olduğu saptanmıştır. Bu grupta bir kovan menfi olmasına karşın üç kovanda spor sayıları tedavi öncesine göre % 5'lere inmiştir. Dördüncü grupta tedavi sonrası 1. günde etkinlik %93,1'e ulaşmış, 5. günden itibaren sadece bir kolonide toplam 7 spor görülmüş, 15. Günde sadece bir kovanda iki adet spor tespit edilmiştir. Dördüncü tedavi grubu % 99,9 etkili bulunmuştur. Tedavi sonrası 30 günde tüm koloniler tekrar kontrol edilmiş, tedavi gruplarında spor sayıları korunmasına karşın kontrol grubu kolonileri aşırı zayıflayarak 4-5 çerçevesi duruma geçmiştir. Bu nedenle 250 cc x 2 defa (Noseba 80cc+1litre şurup) hesabı ile şuruplanarak 15 gün içinde eski durumlarına gelmiş ve 4.gruptaki etkinlik aynı şekilde tespit edilmiştir. Tedaviden kaynaklanan anormal derecede arı ölümleri gözlemlenmemiştir. ve koloni kaybına rastlanmamıştır.

## Tartışma ve Sonuç

Nosemosis son yıllarda tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın bir şekilde görülmektedir. Özellikle Nose-

ma ceranae N. apis'e göre daha patojen, hızla kolonilerin sönmesine yol açan bir türdür ve arıların için ciddi tehdit oluşturmaktadır.<sup>8,9,21</sup> Fumagillin etken maddesinin N. ceranae enfeksiyonlarında etkinliğinin sınırlı kalması ve/veya Avrupa Birliği ülkelerinde sınırlandırılması-yasaklanması ile esansiyel yağ, vitamin ve mineral karışımlarının arı hastalık etkenlerine karşı kullanımı artmıştır.<sup>22</sup> Yapılan çalışmalarda N. ceranae'nın fumagilline karşı direnç geliştirmeye başladığı, bir antibiyotik türevi olması, bazı durumlarda fumagillinin spor üremesini baskılayamadığı ve değişken etki gösterdiğinden dolayı fumagillinin üretimi durdurulmuştur.<sup>23,24</sup> Günümüzde Nosemosis tedavisinde bitkisel kökenli ilaçlar veya yem katkı maddeleri kullanılmaktadır. Bitkisel etken maddelerden daha çok timol, sarımsak özü, nane özü, şalgam özünün ticari veya elde hazırlanan preparatları kullanılabilir. Özellikle timol, bağırsaklarda patojen mikroorganizmaların gelişimini engelleyici etkisi, balda kalıntı bırakmaması ve arıya zarar vermemesinden dolayı daha fazla tercih edilmektedir.<sup>25,26</sup> Bu maddelere ilave olarak organik asitlerden okzalik asit<sup>27</sup> ve kabuklu deniz hayvanlarında bulunan kitosan da<sup>28</sup> spor miktarını belirgin olarak düşürmektedir. Son yıllarda Nosemosisli kolonilerde Fumagillin ile yapılan uygulamalarda Bursa yöresinde tedaviye net cevap alınamaması, Ütük ve ark. (2016)'ın belirttiği gibi arılarda N. ceranae'nın bulunduğu kanısını uyandırmaktadır.

Bu karışımların balda kalıntı bırakmaması da tedavide tercih sebebi olmalarına neden olmuştur. Ancak ülkemizde bugüne kadar hazırlanan bu tür içerikler ticarileşmesine karşın ciddi bilimsel verilere dayanmamaktadır. Genelde etkinlik testleri ile ilgili bilimsel veriler eksiktir.<sup>22</sup>

Bitkisel ekstreler, esansiyel yağlar ve organik asitlerle Nosemosis üzerine yapılan çalışmalarda, LD50 ve LD değerleri, ürünler kimyasal değil bitkisel tabanlı olduğu için yapılmamıştır.<sup>25,27</sup> Buna bağlı olarak Noseba üzerinde de LD50 ve LD çalışmaları yapılmamıştır.

Noseba'nın kullanıldığı tedavi gruplarında tarlacı arıların kovana giriş-çıkış sıklığının arttığı, tedaviye başlanmadan önce kovan önünde gözlemlenen zayıflamış arıların gözlemlenmediği, tedavi edilmeyen pozitif kontrol gruplarında; tarlacı arıların giderek zayıfladığı, kovan önünde uçamayan arıların toplandığı, Nosemosis belirtisi olarak arıların kanat açıklıklarının arttığı, kovana giriş-çıkışların azaldığı, hastalığa bağlı olarak kovadaki çerçeve sayısının giderek azaldığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada ilk kez yeni bir ürün olan Noseba, kontrollü olarak Nosemosis ile doğal enfekte arı kolonilerine şeker

şurubu ile uygulanmış, %99,9 etkinlik tespit edilmiştir. Tedaviden kaynaklanan herhangi bir yan etki veya koloni kaybı görülmemiş, aksine koloniler hızla güçlenmiş ve ballık ilave edilmiştir. Ancak Nosema ile kontamine kolonilerde sporların bal ve petekte bir yıla yakın canlı kaldığı dikkate alınmalı<sup>18</sup>, bu ballı peteklerin değiştirilmesi gerekliliğinden yola çıkarak Noseba karışımının uygun dozajlarda kullanılması ile arı bakım ve beslenmesinin doğru yapılmasıyla Nosema enfeksiyonunun ciddi bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir.

## Kaynaklar

- Giray T, Çakmak İ, Aydın L, et al. Preliminary Survey Results On 2006-2007 "Colony Losses in Turkey. Uludağ Bee J. 2007; 7: 102-108.
- Aydın L. The status of honeybee parasites and predators in Turkey and againts control methods. International 2. Muğla Beekeeping and Pine Honey Congress. October 5-8, 2010; Muğla-Turkey.
- Forsgren E, Fries I. Comparative virulence of Nosema ceranae and Nosema apis in individual European honeybees. Vet Parasitol. 2010; 170(3-4): 212-217.
- Fries I. Nosema ceranae in European honeybees (Apis mellifera). J Inverteb Pathol. 2010; 103: 73-79.
- Higes M, Martin-Hernandez R, Botias C, et al. How natural infection by Nosema ceranae causes honey bee colony collapse. Environ Microbiol. 2008; 10(10): 2659-69.
- Neumann P, Carreck NL. Honey bee colony losses. J Apic Res. 2010; 49(1): 1-6.
- Chen YP, Evans JD, Murphy C, et al. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of Nosema ceranae, microsporidian parasite isolated from the European honey bee, Apis mellifera. J Eukar Microbiol. 2009; 56(2): 142-147.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, et al. A metagenic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science. 2007; 318(5848): 283-287.
- Paxton R. Does infection by Nosema ceranae cause Colony Collapse Disorder in honeybees Apis mellifera? J Apic Res. 2010; 49: 80-84.
- Chaimanee V, Warrit N, Chantaannkul P. Infections of Nosema ceranae in four different honey bee species. J Inverteb Pathol. 2010; 105(2): 201-210.
- Aydın L, Güleğen E, Çetinbaş H. Bursa yöresi bal arılarında Nosema apis'in (Zander, 1909) yaygınlığı. Bültendif. 2001; 17: 6-8.
- Aydın L, Çakmak İ, Güleğen E, et al. Honey bee Nosema disease in the Republic of Turkey. J Apic Res. 2005; 44 (4): 196-197.
- Topçu B, Arslan MÖ. The prevalence of Nosemosis in honeybee in the province of Kars. Uludağ Bee J. 2004; 4: 164-170.
- Şimşek H. Elazığ yöresi bal arılarında bazı parazit ve mantar hastalıklarının araştırılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2005; 52: 123-126.
- Şimşek D. Muğla ili bal arılarının (Apis mellifera L.) mikrobiyal ve paraziter hastalıklar yönünden incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2007.
- Doğaroğlu M, Sıralı R. Survey results on honeybee pests and disease in Thracian Region of Turkey. Uludağ Bee J. 2005; 5: 71-78.
- Muz MN, Girişgin AO, Muz D, et al. Molecular detection of Nosema ceranae and Nosema apis in colony collapsed apiaries of Turkey. J Apic Res. 2010; 49(4): 342-344.
- Girişgin AO. Nosemosis. In: Doğanay A, Aydın L, eds. Bal Arısı Yetiştiriciliği, Ürünleri, Hastalıkları. Dora Yayıncılık. Bursa-Türkiye, 2017: 381-389.
- Gurgulova K, Valchovski R, Petrov P, et al. Distribution of Nosema apis and Nosema ceranae in Bulgaria. Diagnostic in honey bees. From sampling to data analyses. Beedoc-Cost Action. 2010; Ghent University, Belgium.
- Shimunaki H, Knox DA. Laboratory diagnosis of honey bee diseases. US. Department of Agriculture, Technical Bulletin, 1990.
- Ütük AE, Pişkin FÇ, Girişgin AO, et al. Microscopic and molecular detection of Nosemosis in Turkey. Apidologie. 2016; 47, (2): 267-271.
- Girişgin AO, Özüçü M, Aydın L. Situation of Nosema disease of honey bees and its treatment studies in Turkey. International 5. Muğla Beekeeping and Pine Honey Congress. November 1-5, 2016; Muğla - Turkey.
- Williams GR, Shutler D, Little CM, et al. The microsporidian Nosema ceranae, the antibiotic Fumagillin-B, and western honey bee (Apis mellifera) colony strength. Apidologie. 2011; 42(1): 15-22.
- Huang WF, Solter LF, Yau PM, et al. Nosema ceranae escapes fumagillin control in honey bees. PLoS Pathog. 2013; 9(3): e1003185.
- Costa C, Lodesani M, Maistrello L. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of Nosema ceranae and on the longevity of honey bees (Apis mellifera L.) in laboratory conditions. Apidologie. 2009; 41 (2010): 141-150.
- Wiese N, Fischer J, Heidler J, et al. The terpenes of leaves, pollen, and nectar of thyme (Thymus vulgaris) inhibit growth of bee disease-associated microbes. Sci Rep. 2018; 8: 14634.
- Nanetti A, Rodriguez-Garcia C, Meana A, et al. Effect

of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection. *Res Vet Sci.* 2015; 102: 167-172.

28. Saltykova E, Gaifullina LR, Kaskinova MD, et al. Effect of chitosan on development of *Nosema apis* Microsporidia in honey bees. *Microbiology.* 2018; 87(5): 738-743.

Makalede "Noseba" olarak belirtilen ticari isim firma tarafından "BEESEBA" olarak deęiřtirilmiřtir.