

YENİ BİR TEKNİK: BAL ARISI KOVANLARINDA NANO-GÜMÜŞ KAPLAMANIN BAZI MİKROORGANİZMALARA KARŞI ETKİNLİĞİ

A New Technic: Efficacy of Nano-Silver Coating of Honey Bee Hives Against Some Microorganisms

(Extended Abstract in English can be found at the end of this article)

M. Ertan GÜNEŞ¹, A. Ebru BORUM², Cüneyt ÖZAKIN³, A. Onur GİRİŞGİN⁴, Levent AYDIN⁴

¹U.Ü.Teknik Bilimler MYO, U.Ü.Arıcılık Geliştirme-Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bursa

²U.Ü.Keles MYO, U.Ü.Arıcılık Geliştirme-Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bursa

³U.Ü. Tıp Fakültesi, U.Ü.Arıcılık Geliştirme-Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bursa

⁴U.Ü.Veteriner Fakültesi, U.Ü.Arıcılık Geliştirme-Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bursa

E-posta: egunes@uludag.edu.tr

Anahtar Kelimeler: Nano Gümüş, Etkinlik, Mikroorganizma, Kovan, Bal arısı

Key words: Nano Silver, Efficacy, Microorganism, Hive, Honeybee.

ÖZET

Bu çalışmada 100 ppm nano-gümüş solüsyonun laboratuvar koşullarında (*in vitro*) *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* üzerindeki antibakteriyel ve antifungal etkinliği belirlenmiş ve 100 ppm gümüş solüsyonunun mikroorganizmaları 2-10 dakikalık süreler içinde inhibe ettiği saptanmıştır.

Kovan çalışmasında (*in vivo*) ise yavru çürüklüğü açısından önemli görülen *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium jeikum* ve kireç hastalığı etkeni *Ascospaera apis* gibi mikroorganizmalar ile kontamine edilmiş, normal kovanlar ile iç yüzeyi tamamen (10 nanogram-50ppm) nano gümüş ile kaplanmış (emprenye) kovanlarda enfeksiyon kaynağı mikroorganizmaların üremeleri takip edilmiştir. *In vivo* çalışmada çevre, toprak ve su kökenli adi yavru çürüklüğü etkenleri tekli, ikili ve çoklu verilerek gümüşlü ve normal kovanlarda etkinlikleri belirlenmiştir.

Tekli ve çoklu kontaminasyonlar sonucu nano-gümüş kaplı kovanlarda verilen mikroorganizmaların hiçbiri ürememiş, yapılan aylık kontrollerde ise kovanlarda arıların sayısının azalmadığı, hastalık belirtilerinin oluşmadığı ve yavru sayısının azalmadığı tespit edilmiştir. Bazı nano-gümüş kaplı kovanlarda, 5.gün sekonder bakteri üremeleri olmasına rağmen 1, 2 ve 3.ay kontrollerinde hiçbir sekonder mikroorganizma saptanmamıştır.

Normal kovanlarda ise verilen bakterilerin ve çok sayıda sekonder bakterinin ürediği tespit edilmiştir. Ayrıca kontrol kovanlarında arıların sayısının azalması, hastalık belirtilerinin oluşması, peteklerde bulmaca manzarası, koku ve adi yavru çürüklüğü belirtileri tespit edilmiştir. 1, 2, ve 3. ay kontrollerinde de aynı ya da farklı sekonder etkenler izole edilmiştir.

Gümüşlü kovanlardan ve kontrol kovanlarından hasat edilen bal ve peteklerde gümüş kalıntı düzeyinin katkı kalıntı açısından normal sınırlarda olduğu saptanmış ve insan sağlığı yönünden herhangi bir risk taşımadığı saptanmıştır.

GİRİŞ

Mikroorganizmalar yaşam alanlarımızın hemen her yerinde, havada, toprakta ve suda bulunmakta kimi zaman insan ve hayvan sağlığını tehdit etmektedir. İnsan ve hayvan sağlığını korumak ve enfeksiyonların kaynağı mikroorganizmaların yol açtığı hastalıklardan kurtulmak amacıyla yapay veya doğal birçok antibiyotik kullanılmıştır. Antibiyotiklerin keşfinden binlerce yıl önce altın, bakır ve gümüşün mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etkisi olduğu bilinmektedir (Kim ve ark., 1998; Berger ve ark., 1996; Wesley, 2009).

Gümüş iyonlarının öldürücü etkinliği son yıllarda yapılan araştırmalarla açıklığa kavuşturulmuştur. Bu çalışmalarda gümüş iyonlarının proteinlerin-SH gruplarıyla bağ yaptığı belirlenmiştir. Gümüşün proteinler üzerindeki bu etkisi nedeniyle, hücre DNA'sı, hücre sitoplazması, hücre duvarı proteinleriyle reaksiyona girerek antibakteriyel, antifungal ve antiviral etki gösterdiği bildirilmiştir (Bragg ve Rannie, 1974; Richards ve ark., 1984; Thurmman ve Gerba, 1989; Russel ve Hugo, 1994; Wells ve ark., 1995; Feng ve ark., 2000; Matsumara ve ark., 2003; Batarseh, 2004).

Son yıllarda nano teknoloji kullanılarak gümüş iyonlarının milimetrenin 100'de 1 boyutlarına kadar küçültülerek daha az miktardaki gümüş ile daha geniş bir yüzey alanı kaplanarak gümüşün antibakteriyel etkinliğinden birçok alanda yararlanılmaktadır. Bakterilerin gümüşe direnç geliştirememesi, dikkatli kullanımında toksisitesinin olmaması, alerjik özellik taşıması ve diğer maddelere göre son ürün haline getirilmesinin daha ucuz olması nedeniyle tekstil, elektronik, tıp, seramik, cam, ambalaj ve boya ürünlerinin üretimi sırasında yüzeyde oluşturulan antibakteriyel bariyer etkinlikten yararlanılmaktadır (Üreyen ve ark., 2008; Kawashita ve ark., 2000; Dolaş ve ark., 2011; Sürengil ve Kılınç, 2011).

Bu çalışmada 100 ppm nano-gümüş solüsyonunun laboratuvar koşullarında *E.coli*, *S.aureus*, *S.typhimurium*, *E.faecalis*, *B.cereus*, *C.albicans* ve *A.niger* üzerindeki antibakteriyel ve antifungal etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır; *in vivo* çalışmada ise yavru çürüklüğü açısından önemli görülen seçilmiş mikroorganizmalar ile enfekte edilmiş normal kovanlar ile iç yüzeyi tamamen 10 nanometre-50 ppm nano gümüş ile kaplanmış (emprenye) kovanlarda enfeksiyon kaynağı mikroorganizmaların üremeleri takip edilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

In vitro Çalışma

Escherichia coli (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella typhimurium* (CCM 5445), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus cereus* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Aspergillus niger* (Klinik suş) 37°C 'de sıvı Thioglycollate besiyerinde 24 saat zenginleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm test mikroorganizmalarının taze besiyerlerinden 0,5 McFarland Standart yoğunluğunda bulanıklık hazırlanmıştır. Daha sonra 0,5 McFarland Standart yoğunluğundan steril distile su kullanılarak 10⁶ ya kadar dilüsyonlar yapılmış ve bu dilüsyonlardan kanlı agar besiyerine pasajlar yapılarak 37°C'de inkübe edilmiştir. Test edilen her mikroorganizma başlangıç sayısının 10⁶ Kob/mL düzeyinde olduğu saptanmıştır. Her bir mikroorganizmanın 10⁶lık dilüsyonunun 1 ml'si 3500 dev/dk 20 dakika santrifüje edilerek santrifüjleme sonunda üstteki sıvı kısım pipetlenerek atılmıştır. Altta kalan çökelti 100 ppm nano-gümüş solüsyonu ile muamele edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan *E.coli*, *S.aureus*, *S.typhimurium*, *E. faecalis*, *B. cereus* ve *C. albicans* üzerine 100 ppm gümüş solüsyonu eklenmesini takip eden 2, 5, 10, 30 ve 60. dakikalarda numune alınarak kanlı ağara ekim yapılmıştır. Plaklar 37°C 'de 24 saat inkübe edilerek inkübasyon sonu üreme görülen plaklar değerlendirilmiştir (Bragg ve Rannie, 1974; Feng ve ark., 2000; Spacciapoli, 2001; Sondi ve Salopek-Sondi, 2004; Ki-Young ve ark., 2007).

Saha Kovan Denemeleri

Bu çalışmada 12 adet tam polen çekmeceli nano-gümüş kovan ile 12 adet kontrol kovanı kullanılmıştır. Nano-gümüş 10 nanometre çapında ve 50 ppm olarak kovanların tüm iç yüzeyine ve çerçevelere kaplanmıştır. Kontrol olarak Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ndeki aynı özellikteki ve güçteki kovanlar kullanılmıştır.

In vivo çalışmada çevre, toprak ve su kaynaklı olarak en sık rastlanan adi yavru çürüklüğü etkenlerinin kovanlara tekli, ikili ve çoklu verilerek gümüşlü kovanlarda *in vivo* etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla daha önce yapılan yavru çürüklüğü çalışmalarında en sık rastlanan bakteriler *E. faecalis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *C. jeikum* ve kireç hastalığının etkeni *A. apis* kullanılmıştır.

Çalışmada *Paenibacillus larvae* ile deneysel olarak yapılan bir araştırma referans alınarak larvalar *P.larvae* gıda ve haemosellerine percutan olarak infekte edilmiştir. Çalışmamızda ise bu bakterinin yayılması çok hızlı olduğu, tehlikeli ve ülkemiz yasalarına göre Amerikan Yavru Çürüklüğü İHBARI MECBURI HASTALIK olduğu için bu çalışmada daha önceki çalışmalarımızın ışığında yaygın olarak kovanlarda rastlanan adi yavru çürüklüğü etkenleri ile kireç hastalığı etkeni mantar kullanılmıştır. Etkenlerin kontaminasyonunda besleme yöntemi tercih edilmemiştir. Kapalı yavru gözleri ve petekler, püskürtme yolu ile infekte edilmiştir (Gregorc ve Bowen, 1998).

Çalışmada bakteriler 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$) standardına ayarlanmış, seçilen kovanların yavrulu gözlerine bakteriler püskürtme yöntemi ile verilmiştir. Kovanlar mikroorganizmalar ile kontamine edilmeden önce ve mikroorganizmalar ile kontamine edildikten sonra kapalı yavru gözlerinden steril svaplar yardımı ile 1, 3, ve 5. günler ile 1, 2, ve 3. aylarda bakteriyolojik numuneler alınmıştır.

Aynı çerçeve sayısına sahip (yavrulu çerçeve sayısı) 2 adet nano-gümüş kaplı kovan ile 2 adet kontrol kovani ilk olarak *E. faecalis* ile kontamine edilmiştir (Protokol 1).

İkinci kontaminasyonda, 2 adet nano-gümüş kaplı kovan ile 2 adet kontrol kovana *E.faecalis* ve *E.coli* birlikte verilmiştir (Protokol 2).

Üçüncü kontaminasyonda, *E. faecalis* ve *B. subtilis*, 2 adet nano-gümüş kaplı kovan ile 2 adet kontrol kovana verilmiştir (Protokol 3).

Dördüncü kontaminasyon, 2 adet nano-gümüş kaplı kovan ile 2 adet kontrol kovana *E.faecalis*, *B.subtilis* ve *C. jeikum* birlikte verilmiştir (Protokol 4).

Beşinci kontaminasyonda, 1 adet nano-gümüş kaplı kovan ile 1 adet kontrol kovana *A. apis* verilmiştir (Protokol 5).

Altıncı kontaminasyonda, 1 adet nano-gümüş kaplı kovan ile 1 adet kontrol kovana *E. faecalis* ve *A. apis* verilmiştir (Protokol 6).

Yedinci kontaminasyonda, 2 adet nano-gümüş kaplı kovan ile 2 adet kontrol kovana *E. faecalis*, *B. subtilis* ve *A. apis* verilmiştir (Protokol 7).

BULGULAR

Çalışmanın birinci aşamasında 100 ppm gümüş solüsyonu ile yapılan *in vitro* denemelere ait bulgular Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1-Nano-gümüş Laboratuar (*In vitro*) Çalışması

	0. dakika kob/mL	Mikroorganizmalarda sayıca azalma değerleri (kob/mL)				
		2.dk	5. dk	10 dk.	30. dk.	60. dk.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10^6	$1,2 \times 10^4$	$5,0 \times 10^2$	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10^6	$4,0 \times 10^2$	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 5445	10^6	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	10^6	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 6633	10^6	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	10^6	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok
<i>Aspergillus niger</i> Klinik suş	10^6	$3,2 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	Üreme yok	Üreme yok

E. faecalis, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *C. albicans* üzerine 100 ppm gümüş solüsyonunun 2. dakika içinde etkili olduğu saptanmış ve besiyerlerinde üreme tespit edilmemiştir. *E. coli* de ise 10. dakikada üreme olmadığı tespit edilmiştir.

S. aureus 100 ppm gümüş solüsyonu ile muamele edildiğinde, 5. dakikadan sonra üreme olmadığı saptanmıştır. *A. niger*'in ilk 10 dakika içerisinde 10^3 seviyesinde canlı kaldığı ancak 30.dakikadan sonra tamamen etkinliğini kaybettiği saptanmıştır.

Tablo 2: Nano-gümüşlü kovanlarda primer ve sekonder olarak üreyen mikroorganizmalar

Protokol No	Nanogümüşlü Kovan sayısı	Verilen Test Mikroorganizması (0.5. McFarland)	Sekonder Bakteri Üremesi			
			5.gün	1.ay	2.ay	3.ay
1	1	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-
1	2	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-
2	1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus brevis</i>	-	-	-
2	2	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
3	1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-
3	2	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-
4	1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Corynebacterium jeikium</i>	<i>Corynebacterium renal grup</i>	-	-	-
4	2	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Corynebacterium jeikium</i>	<i>Staphylococcus cohnii</i> <i>spp. cohnii</i>	-	-	-
5	1	<i>Ascosphaera apis</i>	-	-	-	-
6	1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Ascosphaera apis</i>	<i>Bacillus brevis</i> <i>Aerococcus urinae</i>	<i>Bacillus brevis</i>	-	-
7	1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Ascosphaera apis</i>	<i>B. brevis</i> <i>Corynebacterium aquaticum</i>	-	-	-
7	2	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Ascosphaera apis</i>	<i>Bacillus brevis</i>	-	-	-

Saha Çalışması

Tablo 2'de görüldüğü gibi özellikle birden fazla etken ile kontaminasyonlarda 5. günde toprak, su, insan, hayvan ve çevre kökenli sekonder etkenler izole ve identifiye edilmiştir. Bu etkenlerin izole edilmesi normaldir. Çünkü koloni birden fazla mikroorganizma verilerek zayıflatılmıştır. Ancak 1, 2 ve 3. ay kontrollerinde verilen mikroorganizmalar da dâhil olmak üzere 5. günde hiçbir bakteri izole ve teşhis edilmemiştir. Ayrıca 5. gün izolasyonlarında bazı kovanlarda sekonder etkenler üremesine rağmen kovanlarda herhangi bir yavru çürüklüğü belirtisi, yavru azalması, arı azalması, koku vb. belirti görülmemiştir. Nano-gümüşlü kovanlarda ilk aşamada sekonder bakteriler üremesine rağmen zamanla bu kovanlarda koruyuculuğun sağlanarak sekonder etkenlerin üremediği saptanmıştır.

Normal kovanlarda ise verilen bakterilerden *B.subtilis* ve *E.coli* üremiştir. Diğer verilen mikroorganizmaların üremediği saptanmıştır. Ancak bu kovanlarda çok sayıda sekonder bakteri

(*B.pumilus*, *B.brevis*, *Lactobacillus* spp., *C.jeikeium*, *C.renal group*, *C.aquaticum*, *H.aluci* vb.) üremiştir. Bu mikroorganizmaların her bir kontrol kovanında süper infeksiyon şeklinde ürediği tespit edilmiştir. Ayrıca kontrol kovanlarında arıların sayısının azalması, hastalık belirtilerinin oluşması, peteklerde bulmaca manzarası, koku ve adi yavru çürüklüğü belirtileri tespit edilmiştir. Birinci, 2. ve 3. ay kontrollerinde de aynı ya da farklı sekonder etkenler izole edilmiştir.

Gümüşün ballarda kalıntı problemine neden olup olmadığı ile ilgili olarak TÜBİTAK MAM tarafından ICP-MS kantitatif element analizi yöntemi ile nano-gümüşlü ve kontrol kovanlarından elde edilen petek ve ballarda kalıntı düzeyi incelenmiştir. Sonuç olarak gümüşlü kovanlardan ve kontrol kovanlarından hasat edilen ballarda gümüş kalıntı düzeyinin normal sınırlarda ve birbirine paralel olduğu saptanmıştır. Normal kovanlarda aynı düzeyde gümüşün nedeni doğa kaynaklıdır.

Tablo 3: Normal kontrol kovanlarında üreyen mikroorganizmalar

Protokol No	Kontrol kovan sayısı	Test Mikroorganizması (0.5. McFarland)	Test Mikroorganizması ve Sekonder Bakteri Üremesi			
			5.gün	1.ay	2.ay	3.ay
1	1	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Corynebacterium aquaticum</i> <i>Bacillus pumilus</i>	<i>Corynebacterium aquaticum</i> <i>Bacillus pumilus</i>	<i>Corynebacterium aquaticum</i> <i>Hafnia aluci</i>	<i>Corynebacterium aquaticum</i> <i>Hafnia aluci</i>
1	1	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus brevis</i>	<i>Bacillus brevis</i>	<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Corynebacterium aquaticum</i>
2	1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Corynebacterium jeikum</i>	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus pumilus</i>
2	2	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Corynebacterium aquaticum</i> <i>Bacillus pumilus</i>	<i>Corynebacterium aquaticum</i> <i>Hafnia aluci</i>	<i>Bacillus brevis</i> <i>Corynebacterium aquaticum</i> <i>Aerococcus urinae</i>	<i>Bacillus brevis</i>
3	1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
3	2	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Corynebacterium aquaticum</i> <i>Bacillus pumilus</i>	<i>Corynebacterium genitalium</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
4	1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Corynebacterium jeikum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Corynebacterium renal grup</i>	<i>Corynebacterium renal grup</i>	<i>Corynebacterium renal grup</i>	<i>Corynebacterium renal grup</i>
4	2	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Corynebacterium jeikum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Corynebacterium renal grup</i>	<i>Staphylococcus cohnii</i> spp. <i>cohnii</i> <i>Corynebacterium renal grup</i>
5	1	<i>Ascospaera apis</i>	<i>Ascospaera apis</i>	<i>Ascospaera apis</i>	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus subtilis</i>
6	1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Ascospaera apis</i>	<i>Ascospaera apis</i>	<i>Bacillus brevis</i> <i>Corynebacterium aquaticum</i> <i>Aerococcus urinae</i>	<i>Bacillus brevis</i>	<i>Bacillus brevis</i> <i>Corynebacterium aquaticum</i> <i>Aerococcus urinae</i>
7	1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Ascospaera apis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus brevis</i> <i>Corynebacterium renal grup</i>	<i>Bacillus brevis</i>
7	2	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Ascospaera apis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Corynebacterium aquaticum</i> <i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan bir çalışmada Gram (-) bir mikroorganizma olan *E.coli* üzerinde gümüşün değişik konsantrasyonları *in vitro* olarak araştırılmıştır. Araştırmaya göre; 10 µg/cm³ konsantrasyondaki nano-gümüşün, 10⁵ CFU *E.coli* üzerine %70, 50–60 µg/cm³ konsantrasyonun ise %100 etkili olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada 20 µg/cm³ konsantrasyondaki nano-gümüşün, 10⁴ CFU *E.coli* üremesini tam olarak inhibe ettiği saptanmıştır. Çalışmada bakteri sayısı azaldıkça daha düşük konsantrasyonlarda nano-gümüşün etkili olduğu belirtilmiştir (Sondi ve Salopek-Sondi, 2004).

E. coli ve *S. aureus* üzerinde *in vitro* olarak yapılan diğer bir çalışmada standart suşlar üzerine 10 mg/mL AgNO₃ ilave edilmiş ve Transmissible elektron mikroskopunda (TEM) incelendiğinde etkenlerin

hücre duvarı ve sitoplazması üzerinde ciddi hasarlar olduğu gözlenmiştir (Feng ve ark., 2000).

Kim ve diğerleri (2007), tarafından yapılan bir çalışmada, 1 x10³ M gümüş nitratin *E.coli* ve mastitis etkeni olan bir mayaya karşı *S.aureus*ta daha etkili olduğu, *S.aureus*'a ise orta derece antibakteriyel etki gösterdiği saptanmış bunun da mikroorganizmaların hücre duvarlarının farklılığından kaynaklandığı ileri sürülmüştür.

Ki-Young ve diğ., (2007) tarafından yapılan bir çalışmada da değişik konsantrasyonlarda gümüş nano-partiküllerinin *B.subtilis* ve *E.coli* üzerinde etkinliği incelenmiş ve 70µg/mL konsantrasyondaki gümüş nano-partiküllerinin mikroorganizmalar üzerine etkili olduğu, *B. subtilis*'in ise gümüşe *E.coli*'den daha duyarlı olduğu belirlenmiştir.

In vitro yapılan başka bir araştırmada ise değişik konsantrasyonlarda ticari olarak kullanılan gümüş içeren dezenfektanların emdirildiği kumaşların 10^5 CFU *E.coli* ve *Proteus vulgaris*'i hemen *Enterobacter cloacae*, *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'yi ise 30 dakika ile 24 saat içinde inhibe ettiği saptanmıştır. Gram pozitif bakterileri ise en erken 24 saat sonra inhibe ettiği belirlenmiştir (Ip ve ark., 2006).

Periodontal bakteriler üzerine yapılan *in vitro* bir çalışmada bu bakterilere karşı gümüş nitrat, çinko klorit ve bakır kloritin etkinliği araştırılmıştır. Çinko klorit, bakteriler üzerine inhibitör aktivite gösterememiş, bakır klorit ise sadece *Porphyrromonas gingivalis* üzerine etkili olmuş, diğerlerinde etkili olamamıştır. Buna karşılık gümüş nitrat, *Porphyrromonas gingivalis*, *Prevotella denticola*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* üzerine oldukça güçlü antibakteriyel etki göstererek inhibe etmiştir. Bu bakterileri 0.5 mg/mL konsantrasyonda öldürmüş ya da canlılığını azaltmıştır. Buna karşılık ilginç olarak *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus*'u 25-50 mg/mL konsantrasyonda bile inaktive edememiş, sadece *Streptococcus mitis*'e oldukça zayıf bir aktivite göstermiştir (Spacciapoli ve ark., 2001).

Başka bir araştırmada koloidal gümüş nanopartiküllerinin 2 µg /mL konsantrasyonda bile birçok antibiyotiğe dirençli olan methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (*Staphylococcus epidermidis*), vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, ve ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae*'ye oldukça etkili olduğunu *in vitro* olarak saptanmıştır (Panaček ve ark., 2006).

Bu çalışmada *E.faecalis* ile kontamine edilen nano-gümüşlü kovanlarda üreme saptanmamıştır. Kontamine edilen normal kovanlarda ilk 24 saatten itibaren 5. güne kadar çok sayıda bakteri üremiştir. *E.faecalis* normal kovandaki arı kolonisinin direncini düşürerek çok sayıda bakteri üremesine neden olmuştur.

E.faecalis ve *E.coli*'nin birlikte verildiği nano-gümüşlü kovanların ikisinde de ilk 24-72 saat içinde herhangi bir üreme olmamıştır. Beşinci gün 1 kovanda 1 adet sekonder bakteri ürese de 1, 2 ve 3. ay kontrollerinde hiçbir üreme olmamıştır. Kontrol

kovanında ise 48. saatten itibaren *E.coli* ve çok sayıda sekonder etkenler üremiştir.

E. faecalis ve *B. subtilis*'in birlikte verildiği nano-gümüşlü kovanların ikisinde de ilk 24-72 saat içinde herhangi bir üreme olmamış, 1 kovanda üreyen 1 sekonder bakteri daha sonraki kontrollerde ürememiştir. Kontrol kovanında ise 48. saatten itibaren *B. subtilis* üremiştir.

A. apis verilen nano-gümüşlü kovanda herhangi bir üreme olmamış, kontrol kovanında ise 72. saatten itibaren primer mantar ve sekonder bakteri üremeleri olmuştur.

E. faecalis, *B. subtilis* ve *C. jeikum* ile kontamine edilen iki adet nano kovanda 24-72. saat üreme olmamıştır. Beşinci gün bazı sekonder etkenler ürese de 1, 2 ve 3. ay kontrollerinde hiçbir bakteri ürememiştir. Normal kovanlarda ise *B. subtilis* ile birlikte çok sayıda sekonder bakteri üremiştir.

E. faecalis ve *A. apis* verilen 1 adet nano-gümüşlü kovanda 5. gün ve 1. ay sonunda bazı sekonder bakteri üremesi olsa da, 2. ve 3.ay kontrollerinde üreme olmamış, normal kovanlarda ise *A. apis* ürememesine rağmen çok sayıda sekonder bakteri üremiştir. Mantar etkeni direnci düşürmüş, kendi ürememesine rağmen çok sayıda sekonder etken üremesine neden olmuştur.

E.faecalis, *B.subtilis* ve *A.apis* verilen nano-gümüşlü kovanlarda 5.gün sekonder bakteri üremesine rağmen daha sonraki kontrollerde üreme olmamış, normal kovanlarda ise *B.subtilis* ile çok sayıda sekonder bakteri üremiştir.

Buradan elde edilen sonuçlara göre insan ve arı sağlığı bakımından önemli bakterilerin nano-gümüşlü kovanlara verilmesi sonucu kovanlarda 1,5 gün ve 1-3 aylık kontrollerde primer etkenlerin hiçbir ürememiştir. Bazı nano-gümüşlü kovanda farklı bakteriler 3-5. günlerde üremiş olmasına rağmen kovanlarda herhangi bir yavru çürüklüğü belirtisi ve yavru azalması görülmemiştir. Daha sonra aylık olarak bu kovanlardan alınan numunelerde herhangi bir bakteri üremesine rastlanmamıştır. Nano-gümüşlü kovanlarda ilk aşamada sekonder bakteriler üremesine rağmen daha sonra sekonder etkenlerin üremediği saptanmıştır. Normal kontrol kovanlarında ise kontamine edilen bakteriler ve çok sayıda sekonder bakterilerin izole edilmesi, yavru sayısının azalması ve tipik yavru çürüklüğü belirtilerinin görülmesi önemlidir. Ayrıca günlük ve aylık yapılan kontrollerde de birbirinden farklı çok sayıda sekonder bakteri ve primer etkenler izole edilmiştir.

Nano-gümüş ile yapılan çalışmaların çoğunluğu *in vitro* olmasına rağmen, bu çalışmada hem *in vivo* hem de *in vitro* denemeler yapılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlarla, gelecekte arıcılıkta nano-gümüş ile kaplı kovanların kullanılmasıyla bakteri ve mantar hastalıklarına karşı belirli düzeyde bir korunma sağlanabileceği ortaya konmuştur. Çalışma sonunda analiz ettirilen petek ve bal örneklerinde gümüş seviyelerinin düşük olması, bu tip kovanlarla arıcılığın yapılmasının, hem arı sağlığı hem de insan sağlığı bakımından yararlı olacağını göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Batarseh, K.I. 2004. Anomaly and correlation of killing in the therapeutic properties of silver (I): chelation with glutamic and tartaric acids, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 546-548.
- Berger, T.J., Spadaro, J.A., Chansin, S.E., Becker, R.O. 1996. Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 9(2): 357-358.
- Bragg, P.D., Rannie, D.J. 1974. The effect of silver ions on the respiratory chain of *E. Coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 20: 883-889.
- Dolaş, E., Güllü, G., Menteşe, S. 2011. İç ortam hava kalitesinin iyileştirilmesinde gümüş iyonları içeren OVC malzemelerin antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi. X. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi, 13-16 Nisan 2011, İzmir.
- Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N., Kim, J.O. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4): 662-668.
- Gregorc, A., Bowen, I.D. 1998. Histopathological and histochemical and changes in honeybee larvae (*Apis mellifera L.*) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of american foulbrood disease, *Cell Biology International*, 22(2): 137-144.
- Ip, M., Lui, S.L., Poon, V.K.M., Lung, I., Burd, A. 2006. Antimicrobial activities of silver dressings: an *in vitro* comparison, *Journal of Medical Microbiology*, 55(1), 59-63.
- Kawashita, M., Tsuneyama, S., Miyaji, F., Kokubo, T., Kozuka, H., Yamamoto, K. 2000. Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel method, *Biomaterials*, 21(4): 393-398.
- Kim, T.N., Feng, Q.L., Kim, J.O., Wu, J., Wang, H., Chen, G.C., Cui, F.Z. 1998. Antimicrobial effects of metal ions (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}) in hydroxyapatite, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 9: 129-134.
- Kim, J.S., Eunye, K., Kyeong, N.Y., Sung, J.P., Hu, J.L., So, H.K., Young, K.P., Yong, H.P., Cheol-Yong, H., Yong-Kwon, K., Yoon, S.L., Dae, H.J., Myung, H.C. 2007. Experimental antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3: 95-101.
- Ki-Young, Y., Jeong, H.B., Jae-Hong, P., Jungho, H. 2007. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles, *Science of the Total Environment* 373: 572-575.
- Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S., Tsuchido, T. 2003. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7): 4278-4281.
- Panaček, A., Kvitek, L., Prucek R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V.K., Nevecna, T., Zboril, R. 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemical B*, 110: 16248-16253.
- Richards, R.M.E., Taylor, R.B., Xing, D.K.L. 1984. Effect of silver on whole cells and spheroplasts of a silver resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbios*, 39: 151 - 158.
- Russell, A.D., Hugo, W.B. 1994. Antimicrobial activity and action of silver, *Progress in Medicinal Chemistry*, 31: 351-371.
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria, *Journal of Colloid and Interface Science*, 275: 177-182.
- Spacciopoli, P., Buxton, D., Rothstein, D., Friden, P. 2001. Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens, *Journal of Periodontical Research*; 36: 108-113.
- Sürengil, G., Kılınç, B. 2011. Gıda-ambalaj sektöründe nanoteknolojik uygulamalar ve su ürünleri açısından önemi, *Journal of Fisheries Sciences*, 5(4): 317-325.

Thurmann, R.B., Gerba, C.P. 1989. The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses, *Critical Reviews in Environmental Control*, 18: 295-315.

Üreyen, M.E., Çavdar, A., Koparalı, S.A., Doğan, A. 2008. Yeni geliştirilen gümüş katkılı antimikrobiyal tekstil kimyasalı ve bu kimyasal ile işlem görmüş kumaşların antibakteriyel performansları. *The Journal of Textiles and Engineer*, 69: 25-31.

Wells, T.N.C., Scully, P., Paravicini, G., Proudfoot, A.E.I., Payton, M.A. 1995. Mechanism of irreversible inactivation of phosphomannose isomerases by silver ions and flomazine, *Biochemistry*, 34(24); 896 - 903.

Wesley, J.A. 2009. History of the medical use of silver, *Surgical Infections*, 10(3); 289-292.

EXTENDED ABSTRACT

GOAL

The germicide effect of silver ions has been explored with some researches. These ions are binds to -SH group of the proteins such as cell DNA, cell cytoplasm and cell wall. This reaction ends with antibacterial, antifungal and antiviral effects.

The aim of this study was to determine the antibacterial and antifungal effect of 100 ppm nano-silver solution on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* in laboratory conditions. Additionally, to detect the same effect in *in vivo* conditions, growth of infected foul brood microorganisms like *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium jeikum* and *Ascosphaera apis* was examined in nano-silver coated and uncoated hives.

MATERIALS AND METHODS

Experimental colonies were divided in to two homogeneous groups of twelve hives each. One group of hive's internal surface and frames were completely coated by 10 nano meter (50 ppm) nano silver ions and one group of hive was served as control.

In *in vitro* experiment, 100 ppm nano silver solution was tested on the bacteria of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* and fungi of *Candida albicans* and *Aspergillus niger* in test tubes. After the addition of nano silver solution, the sample was taken at the 2nd, 5th, 10th, 30th and 60th minutes which were inoculated on bloody agar. Growing plaques were evaluated after the end of incubation at 37°C for 24 hours.

In *in vivo* experiment, the effects of environmental, soil and water originated micro organisms like *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium jeikum* which cause common foul brood disease and the effect of the chalkbrood agent *Ascosphaera apis* were determined by applying them into the hives with single, double and triple ways via pulverization.

The inhibition of microorganisms by 100 ppm nano silver solution application was observed in duration of 2-10 min in *in vitro* experiment.

RESULTS AND CONCLUSION

Satisfactory results were achieved in *in vivo* experiments on nano-silver coated hives, like absence of the growth of contaminated microorganisms applied in single or multiple ways, no reduction of bee population at monthly checks, absence of the growth of secondary microorganisms and no development of disease symptoms. Thereupon, permanence of the protection of nano-silver coated hives against diseases was detected.

In uncoated hives, big amount of growth of applied bacteria and other secondary bacteria were detected beside reduction of bee population, developing of disease symptoms like crossword appearance of combs, typical smell and other signs of common foul brood were observed. The same or different genres of applied or secondary bacteria were isolated from uncoated hives at the month of first, second and third checks.

Usage of nano-silver coated hives in beekeeping can be effective to bacterial and fungal diseases. The silver residue levels harvested from combs and honey of silver coated or uncoated hives were in acceptable levels and have no risk for human health.