

Gemifloksasinin *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Erginlerinin Bazı Biyolojik Özelliklerine Etkisi ^[1]

Pınar HIZ ¹ Meltem ERDEM ² Ender BÜYÜKGÜZEL ³ Kemal BÜYÜKGÜZEL ⁴ ✍

^[1] Bu çalışma "Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir (Proje No: 2012-10-06-07)

¹ Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, TR-16120 Bursa - TÜRKİYE

² Bülent Ecevit Üniversitesi, Ahmet Erdoğan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, TR-67100 Zonguldak - TÜRKİYE

³ Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, TR-67100 Zonguldak - TÜRKİYE

⁴ Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, TR-67100 Zonguldak - TÜRKİYE

Article Code: KVFD-2016-15393 Received: 17.02.2016 Accepted: 06.04.2016 Published Online: 09.04.2016

Özet

Büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella* L. mikrobiyal enfeksiyonların ve klinik ilaçların çalışılmasında memeli modellerine alternatif bir model olarak bilindiği gibi insektisit etkinliği çalışmalarında da model böcek olarak yaygın kullanıma sahiptir. Bu böceğin larvaları yapay besin ortamında beslenerek fluorokinolon sınıfından bir antibiyotik olan gemifloksasinin böceğin eşey oranı, dişi ve erkek ömür uzunluğu, yumurta verimi, açılma oranı gibi ergin biyolojik özellikleri üzerine etkisi laboratuvar şartlarında incelendi. Böceğin birinci evre larvaları %0.001, 0.01, 0.1 ve 1.0 oranında gemifloksasin içeren yapay besinler ile ergin evreye kadar beslendi. Gemifloksasinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler erkek ve dişi eşey oranı ile erginlerin ömür uzunluğu üzerinde etkili olmadığı halde yumurta verimini önemli derecede düşürdüğü belirlendi. Artan besinsel gemifloksasin konsantrasyonları ile ters orantılı olarak yumurta verimi ve açılma oranı azaldı. Kontrol besini ile yetiştirilen dişiler günde 134.46 adet yumurta üretirken gemifloksasinin yüksek miktarlarında dişiler 26.75 ve 53.5 yumurta bıraktılar. Yumurtaların açılma oranı da gemifloksasinin %0.01'lik konsantrasyonundan itibaren önemli derecede azalmış olup, en yüksek konsantrasyon bu oranı %53.71'e düşürdü. Bu çalışma erginlerin biyolojik özelliklerinin gemifloksasin tarafından önemli derecede etkilendiğini ve bu etkilerin antibiyotiğin konsantrasyonlarına bağımlı değişimler olduğunu gösterdi.

Anahtar sözcükler: *Galleria mellonella*, Gemifloksasin, Yumurta verimi, Ömür uzunluğu

The Effect of Gemifloxacin on Some Biological Traits of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Adults

Abstract

Greater wax moth, *Galleria mellonella* L. is most commonly used as model insects for studying insecticidal efficiency of chemicals as well as it has been known as an alternative model to mammalian model for studying microbial infections and clinical drugs. The effects of a fluoroquinolone antibacterial agent, gemifloxacin, on sex ratio, male and female adult longevity, fecundity and hatchability of this insect were investigated by rearing the first instar larvae on artificial diets in the laboratory condition. The insect was reared from first-instar larvae to adult stage on an artificial diets containing gemifloxacin at 0.001, 0.01, 0.1 or 1.0%. Gemifloxacin did not affect male and female sex ratio and adult longevity while it significantly decreased egg number. Fecundity and hatchability were significantly and inversely decreased by increasing gemifloxacin concentrations. The females reared from control diet produced 134.46 per day, whereas high concentrations of gemifloxacin decreased the egg number to 26.75 and 53.5. Hatchability was also significantly decreased by 0.01% and above concentrations of gemifloxacin whereas, the highest concentration of antibiotic lowered the hatchability to 53.71%. This study indicated sublethal effects of gemifloxacin are likely to have a significant impact on adult biological traits and these effects show concentration-dependent variation in biological traits of the insect.

Keywords: *Galleria mellonella*, Gemifloxacin, Fecundity, Longevity

GİRİŞ

Memeli konak modellerin dışındaki omurgasız hayvanların, özellikle önemli bir grubunu oluşturan böceklerin, laboratuvar ortamında yapay besinler ile yetiştirilmesi ve

biyolojik model olarak kullanılması klinik amaçlı ilaç denemesi ve hastalık etkeni mikroorganizmaların etkinliğinin araştırılmasında son zamanlarda yaygınlaşmıştır. Bu uygulama tarımsal ürün zararlısı böcekler ile etkin ve çevreye duyarlı yeni kimyasal mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi



İletişim (Correspondence)



+90 372 2911757



buyukguzel@hotmail.com

için, laboratuvar şartlarında yetiştirilmesinin zor olduğu bu böceklerin yerine, diğer model böceklerin kullanılması kolaylığını da getirmiştir.

Böceklerin laboratuvar şartlarında yapay besinler ile yetiştirilmesi çalışmaları sırasında meydana gelebilecek mikrobiyal kontaminasyonların önlenmesi amacıyla geleneksel bazı inhibitörler kullanılmıştır ^[1]. Son zamanlarda bu amaçla antimikrobiyal kimyasallar olan yeni kuşak antibakteriyel, antifungal, antiviral ve hatta antiprotozoal antibiyotikler denenmiştir ^[2-4]. Bu antibiyotiklerin yüksek konsantrasyonlarda böceğin ergin evreye kadar yaşama, gelişmesi ile ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranına olumsuz etkileri belirlenmiştir ^[5-7]. Bu çalışmalardan da anlaşılacağı gibi omurgasız ökaryotik organizma olan böceklerin ergin biyolojik özelliklerine yeni kuşak sentetik bakteriyel DNA giraz inhibitörlerinin etkilerini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarında ise muhtemel kontaminasyonlara karşı önlem alınarak hem besin maddelerinin böcek tarafından etkin kullanılması hem de larvaların gelişiminde kontaminasyonların görülemeyen etkilerinin ortadan kaldırılması sağlanmıştır. Bu yaklaşım eski yıllarda besi hayvancılığında olduğu gibi tüm yararlı hayvanların beslenmesi açısından antibiyotiklerin çok düşük miktarlarda verimi artırmak amacıyla besinlere ilave edilmesi ile benzerdir. Et ve süt verimini artırmak amacıyla besi hayvancılığında kullanılan antibiyotiklerin etkilerine ^[8] benzer bir şekilde böcek beslenmesi amacıyla kullanılan antibiyotiklerin çok düşük konsantrasyonlarda böceklerin yaşama oranı ve gelişme süresi üzerinde olumlu etkiler yaptığı da belirlenmiştir ^[2,9]. Diğer taraftan bu antibiyotikler ipek böcekçiliği yetiştiriciliğinde kullanıldığında ipek proteini miktarı üzerinde olumlu etki yaptığı gibi ^[10] böceklerin vücut bileşimleri ve bazı fizyolojik özellikleri üzerinde de olumlu etkiler yaptığı gözlenmiştir ^[11].

Galleria mellonella L. larvaları bal arısı kovanlarında bal peteği, mum ve bal gibi kovan ürünleri ile beslenerek önemli ekonomik zarara neden olmaktadır ^[12]. Bu böceğin larvaları, kültürünün daha ucuz olması, laboratuvar şartlarında daha kolay sürdürülebilmesi, özel laboratuvar ekipmanlarına gerek duyulmaması ve diğer omurgasız modeller *Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila melanogaster*'in aksine 37°C de yaşamını sürdürebilmesi sebebiyle deney hayvanı modeli olarak kullanılmaktadır. Bu böceği laboratuvar ortamında yetiştirirken gerek besinlerdeki mikrobiyal kontaminasyonu önlemek gerekse biyolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve ekolojik araştırmalar için mikroorganizmadan arındırılmış böcekler yetiştirmek amacıyla bazı antibakteriyel antibiyotikler kullanılmıştır ^[13-15]. Diğer taraftan, *G. mellonella* larvaları yeni antimikrobiyal ilaçların etkinliği ile hastalık etkeni mikroorganizmaların (bakteriyel ve fungal) patojenitelerini belirlemede memeli model konaklara alternatif model olarak kullanılmaktadır ^[16,17].

Gemifloksasin fluorokinolon sınıfına dahil yeni kuşak bir antibiyotiktir. Bakterisit etkili olup insanların ve hayvan-

ların enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Gemifloksasin, bakterilerin DNA giraz (DNA giraz; topoizomeraz II) ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederek DNA replikasyonunu engeller ^[18]. Klinik amaçlı kullanılan antibiyotiklerin zararlı böceklerle yönelik insektisit olarak veya laboratuvar şartlarında böceklerin biyolojik özelliklerinin iyileştirilmesinde kullanılıp kullanılmayacağı henüz tartışma halindedir. Bu çalışma insan ve hayvanların enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan yeni kuşak antibakteriyel antibiyotiklerin böceklerin üzerindeki etkisinin incelemesi bakımından önemlidir.

Bu çalışmada *G. mellonella* larvalarını beslemek için kullanılan yapay besinlere ilave edilen, bakteriyel DNA giraz inhibitörü fluorokinolon grubu bir antibakteriyel antibiyotik olan gemifloksasinin böceğin eşey oranı, ömür uzunluğu, yumurta verimi ve açılma oranı gibi ergin biyolojik özelliklerine etkileri araştırıldı.

MATERYAL ve METOT

Böceklerin Yetiştirilmesi

Yumurtadan yeni çıkmış *G. mellonella* larvaları laboratuvar ortamında yapay besinde aseptik olmayan şartlarda beslenerek böcek kültürü oluşturuldu. Böceklerin yetiştirilmesi inkübatörde (Nüve, ES 500) 28±2°C ve %65±5 bağıl nemde yapıldı. Deneylerde yumurtadan yeni çıkmış birinci evre larvaları kullanıldı.

G. mellonella larvalarını laboratuvar şartlarında yetiştirmek için Bronskill ^[19] tarafından geliştirilen yapay besin kullanıldı. Besin, 420 g buğday kepeği, 150 ml süzme bal, 150 ml gliserin (Merck, Darmstadt, Germany), 20 g öğütülmüş koyu renkli eski petek ve 30 ml saf su içermektedir. Hazırlanan besin bir litrelik cam kavanozların (80x180 mm) yaklaşık 1/3'üne kadar dolduruldu. Kavanozun içine konulacak dişilerin yumurta bırakması ve yeni açılan larvaların beslenmesi için besinin üzerine küçük bir parça bal peteği bırakıldı. Bu kavanozların içine 10-15 adet diş bırakılarak ağızları tel kafes yerleştirilmiş kapak ile kapatıldı. Gelişimlerini tamamlayan olgunlaşan larvalar (7. evre) pup olmaları için diğer bir kavanoza aktarıldı. Bu kavanozun içine, larvaların pup olmaları için kuru ortam sağlamak üzere, katlanmış pelur kağıt parçaları bırakıldı ^[20]. Oluşan puplardan erginleşen bireylerin büyük bir çoğunluğu böcek kültürünün devamı, bazı erginler ise gemifloksasinin farklı konsantrasyonları ile ilgili beslenme çalışmaları için gerekli yumurtaların elde edilmesinde kullanıldı.

Beslenme Deneyleri

Deneylerde kullanılacak larvaların elde edilmesi için, 30 ml'lik geniş ağızlı, vida kapaklı plastik kapların (ORLAB, L190030, 35x55 mm) iç yüzeyine dişiler tarafından yumurta bırakılması sağlandı. Bırakılan yumurtalar 28±2°C ve %65±5 bağıl nemde bekletilerek açılması sağlandı. Bu yumurtalardan açılan *G. mellonella* larvaları beslenme deneylerinde

kullanıldı. Açılan larvalar, yumuşak uçlu bir fırça (No: 0, Goya Toray) ile tel kafes kapaklı cam kavanozların (60 x120mm) içindeki besine (yaklaşık 200 g) bırakıldı.

Gemifloksasin (gemifloksasin mesilat, %100, beyaz kristal toz, çalışmanın ilgili bölümlerinde gemifloksasin olarak verilecektir) antibiyotiği Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Maslak, İstanbul)'den temin edildi. Gemifloksasin mesilatın besine ilave edilmesi ile yürütülen beslenme deneylerinde denenen miktarların konsantrasyonu 100 gram besin başına gram antibiyotik (% a/a) olarak ifade edildi. Gemifloksasin, besinin hazırlanması sırasında doğrudan besine ilave edilerek homojenizasyonun sağlanması için besinler homojenizatörde 5 dk süre ile karıştırıldı. Gemifloksasinin %0.001, 0.01, 0.1 ve 1.0 olmak üzere 4 farklı konsantrasyonu denendi. Kontrol deneylerinde ise gemifloksasin içermeyen besin kullanıldı. Bu çalışmada denenecek gemifloksasin konsantrasyonları *G. mellonella* [14] ve bazı parazitoit böcek türleri [2] üzerinde antibiyotiklerin etkisinin araştırıldığı önceki çalışmalar temel alınarak belirlendi. Bu çalışmaların ışığında, denenecek konsantrasyonların aralığını belirlemek amacıyla ön beslenme deneyleri yapıldı. Böceklerin ergin evreye kadar gelişimini tamamlayabileceği konsantrasyon aralıkları belirlendi. Gemifloksasinin *G. mellonella* üzerindeki konsantrasyonları belirlenerek böceğin eşey oranı, erkek ve dişi ömür uzunluğu, dişilerin yumurta verimi, yumurtaların açılma oranı üzerine etkisi incelendi.

Eşey Oranı

Kontrol besini ve antibiyotiğin her konsantrasyonunu içeren besinlerin bulunduğu beslenme kaplarına (Cam kavanozlar, 60 x120 mm) 20 larva bırakıldı ve deneyler dörder defa tekrarlandı. Gelişimlerini tamamlayan olgun 7. evre larvaları alınarak pup olmak üzere 30 ml'lik plastik örnek kaplarına (ORLAB, L190030, 35x55 mm) her kapta bir larva olacak şekilde aktarıldı. Puplardan erginleşen bireylerin eşeyleri belirlenerek erkek ve dişi oranı hesaplandı. Denemede kullanılan erginlerin eşey ayrımı, erginlerinin vücut büyüklüğüne ve abdomenlerinin son segmentindeki genital yapıya göre yapıldı.

Ergin Ömür Uzunluğu

Gemifloksasinin erginlerin ömür uzunluğuna etkisini belirlemek için birinci evre larvaları gemifloksasinin miktarlarını içeren yapay besinler ile ergin evreye kadar beslendi. Her konsantrasyon için 10 adet ergin kullanıldı ve deneyler 4'er defa tekrarlandı. Erginleşen bireyler 30 ml'lik, geniş ağızlı, şeffaf, delikli kapaklı plastik kaplara (ORLAB, L190030, 35x55 mm) 1'er adet bırakıldı. *G. mellonella* erginleri besin almadığı (Charrière and Imdorf 1997) için deney süresince herhangi bir besin verilmedi. Bu erginler böcek kültürünün devam ettirildiği ortam şartlarında bekletildi. Erginler, her gün belirli saatte kontrol edilerek en son erginin ölümüne kadar her erginin yaşadığı süre belirlendi.

Yumurta Verimi ve Açılma Oranı

Yeni erginleşmiş ve döllenenmemiş bir günlük *G. mellonella* dişileri geniş ağızlı, delikli kapaklı, plastik kaplara (15 ml, ORLAB) her kapta 1 adet dişi olacak şekilde bırakıldı. Bırakılan yumurtalar siyah bir zemin üzerine konulan petri kutusu içinde sayıldı. Yapılan ön denemeler erginleşen dişilerin ilk 48-72 saat içinde yumurtalarını bıraktığını göstermiştir. Bu yüzden ilk 2-3 gün içinde bırakılan yumurtalar sayılarak açılması için stok kültürün devam ettirildiği ortam şartlarında bekletildi. Dişinin yumurta verimi, 1 günde dişi başına bırakılan yumurta sayısı ele alınarak değerlendirildi. Yumurtaların açılma oranı (fertilite) her gün açılan larvalar siyah bir zemin üzerinde sayılarak kaydedildi. Her bir deney için 10 adet dişi kullanıldı ve deneyler 4'er defa tekrarlandı.

Deneylerin tümü kısa bir günlük inceleme periyodu hariç sürekli olarak karanlıkta tutuldu. Besinin hazırlanması ve larvaların aşılması hariç beslenme deneylerinin tümü böceklerin yetiştirildiği şartlarda yürütüldü. Besinin hazırlanması, yumurtaların elde edilmesi, bu yumurtalardan çıkan larvaların besine konulması işlemleri tamamen aseptik olmayan şartlarda yapıldı [14].

İstatistiksel Analizler

Erginlerin ömür süresi, dişilerin yumurta verimi ve yumurtaların açılma oranı, ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü "Varyans Analizi" (ANOVA) [21], ortalamalar arasındaki farkın önemini saptamak için "LSD Testi" [21], eşey oranı ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde ise " χ^2 (Chi square) Testi" [22] kullanıldı. Ortalamalar (\pm S.H.) arasındaki farkın önemi 0.05 olasılık seviyesinde analiz edildi.

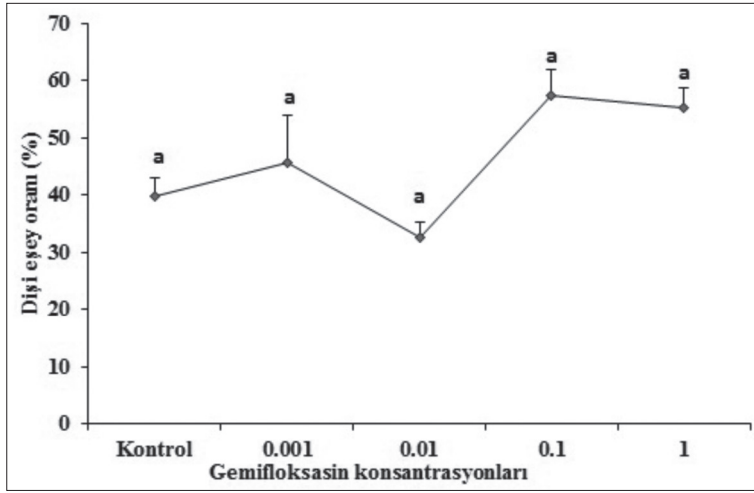
BULGULAR

Eşey Oranı

Kontrol besini ile beslenen başlangıçtaki larvaların %78.75'i erginleşti. Bu besin üzerinde beslenen larvalardan %60.11 erkek, %39.89 dişi ergin meydana geldi. Kontrol besini ile karşılaştırıldığında, gemifloksasinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler erkek ve dişi birey oranını etkilemedi. Ancak en yüksek gemifloksasin konsantrasyonunu içeren besin ile beslenen larvalardan kontrole göre düşük oranda erkek birey meydana gelirken dişi birey sayısında artış oldu (Şekil 1, Şekil 2). Gemifloksasinin %1.0'ini (en yüksek konsantrasyon) içeren besin erkek oranını %60.11'den %44.80'e düşürürken, dişi olma oranını ise %39.89'dan %55.20'ye artırdı.

Ömür Uzunluğu, Yumurta Verimi ve Açılma Oranı

Antibiyotiğin denenen en düşük miktarı, bu antibiyotiği içermeyen kontrol besinine göre erkek erginlerin ömür uzunluğunu ortalama 2.0 gün uzattığı halde istatistiksel bakımdan önemli bir etki oluşturmadı. Bu antibiyotiğin

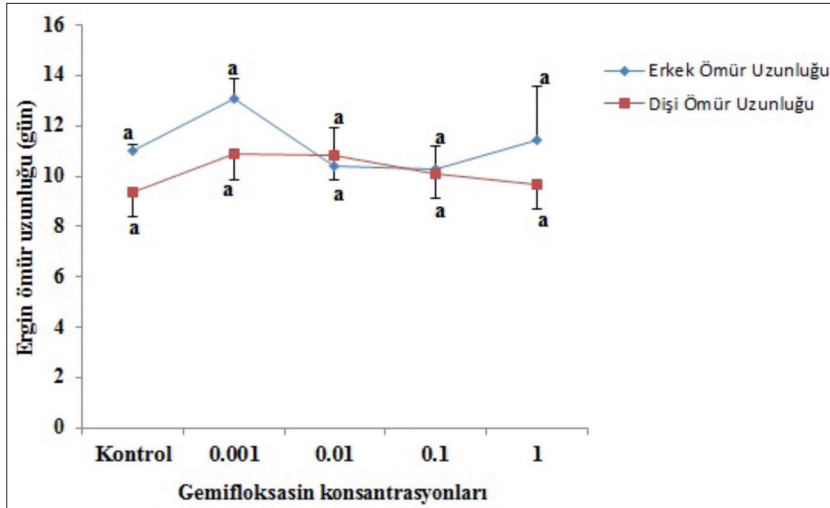
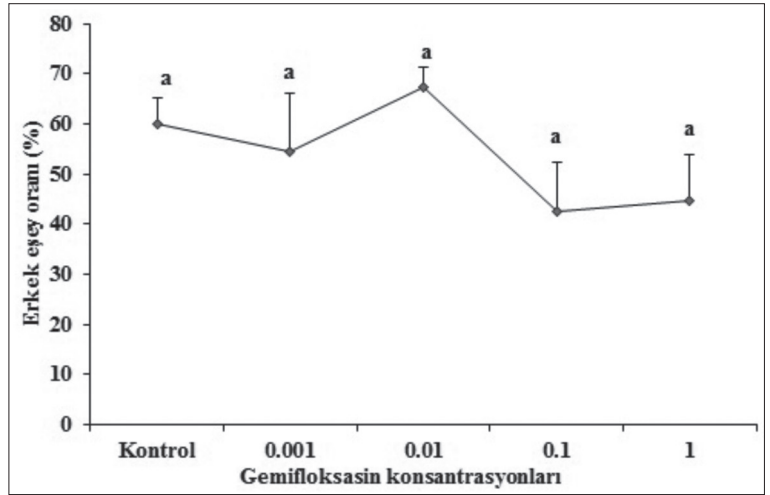


Şekil 1. Gemifloksasinin *G. mellonella*'nın dişi evey oranına etkisi. Veriler 4 tekrarın ortalaması (\pm S.H) olarak verilmiştir, her tekrarda 20 larva kullanıldı. Aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, $P>0.05$ (χ^2 testi)

Fig 1. The effects of gemifloxacin on female sex ratio of *G. mellonella*. Data are the average of 4 replicates (\pm S.E), with 20 larvae per replicate. Values followed by the same letter are significantly not different from each other ($P>0.05$) (χ^2 test)

Şekil 2. Gemifloksasinin *G. mellonella*'nın erkek evey oranına etkisi, 4 tekrarın ortalaması (\pm S.H), her bir tekrar için 20 larva kullanıldı. Aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, $P>0.05$ (χ^2 testi)

Fig 2. The effects of gemifloxacin on male sex ratio of *G. mellonella*. Data are the average of 4 replicates (\pm S.E), with 20 larvae per replicate. Values followed by the same letter are significantly not different from each other ($P>0.05$) (χ^2 test)



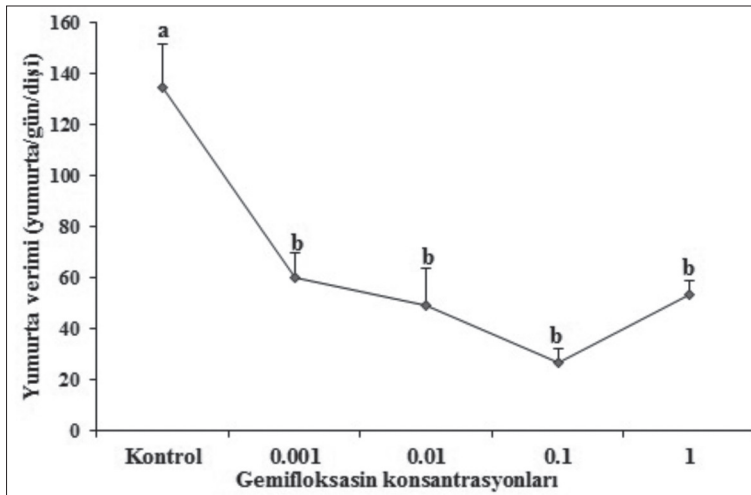
Şekil 3. Gemifloksasinin *G. mellonella* ergin ömür uzunluğuna etkisi, 4 tekrarın ortalaması (\pm S.H), her bir tekrar için her eşeyden 10 ergin kullanıldı. Aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, $P>0.05$ (LSD testi)

Fig 3. The effects of gemifloxacin on adult longevity of *G. mellonella*. Data are the average of 4 replicates (\pm S.E), with 10 adults per replicate. Values followed by the same letter are significantly not different from each other ($P>0.05$) (LSD test)

denenen en düşük miktarı benzer bir etkiyi dişi ömür uzunluğu üzerinde de gösterdi. Sonuçta gemifloksasinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler erkek ve dişi erginlerin ömür uzunluğu üzerinde önemli derecede etkili olmadığı görüldü (Şekil 3). Gemifloksasinin %0.001-0.1 oranında düşük konsantrasyonlarını içeren besinler

dişilerin ömür uzunluğunda kontrol grubuna göre yaklaşık 1'er gün uzamaya neden oldu, ancak bu etki istatistiksel olarak önemli olmadı.

Gemifloksasinin denenen konsantrasyonlarını içeren besinler ile beslenen larvalardan erginleşen dişilerin kontrol

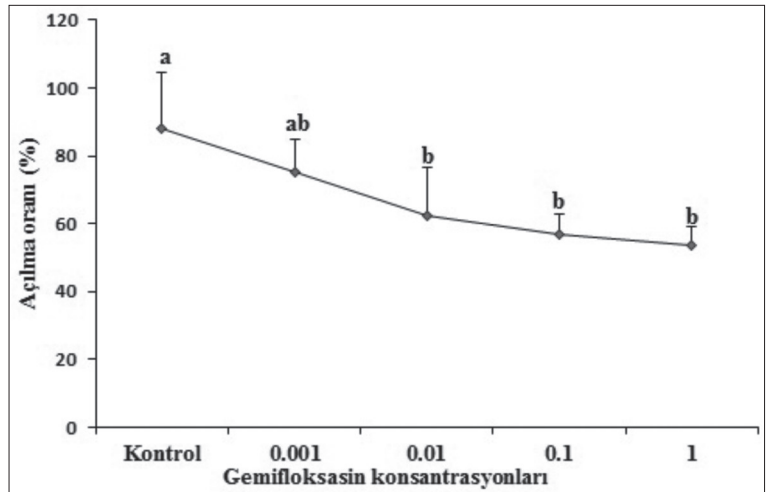


Şekil 4. Gemifloksasinin *G. mellonella* dişilerinin yumurta verimine etkisi, 4 tekrarın ortalaması (\pm S.H), her bir tekrar için 10 dişi kullanıldı. Aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, $P>0.05$ (LSD testi), (a-b) %0.001, 0.01, 0.1 ve 1.0'lik gemifloksasin konsantrasyonları kontrolden farklıdır ($P<0.05$)

Fig 4. The effects of gemifloxacin on fecundity of *G. mellonella*. Data are the average of 4 replicates (\pm S.E), with 10 female per replicate. Values followed by the different letter are significantly different from each other ($P>0.05$) (LSD Test). (a-b) 0.001, 0.01, 0.1 or 1.0% of gemifloxacin are different from control ($P<0.05$)

Şekil 5. Gemifloksasinin *G. mellonella* dişilerinin bıraktığı yumurtaların açılma oranına etkisi, 4 tekrarın ortalaması (\pm S.H), her bir tekrar için 10 dişi kullanıldı. Aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir, $P>0.05$ (LSD testi), (a-b) %0.01, 0.1 ve 1.0'lik gemifloksasin konsantrasyonları kontrolden farklıdır ($P<0.05$), (ab) %0.001'lik gemifloksasin konsantrasyonu kontrolden ve %0.01, 0.1, 1.0'lik gemifloksasin konsantrasyonlarından farklı değildir ($P>0.05$)

Fig 5. The effects of gemifloxacin on hatchability of *G. mellonella*. Data are the average of 4 replicates (\pm S.E), with 10 female per replicate. Values followed by the different letter are significantly different from each other ($P<0.05$) (LSD Test). (a-b) 0.01, 0.1 or 1.0% of gemifloxacin are different from control ($P<0.05$), (ab) 0.001% of gemifloxacin are not different from control or 0.01, 0.1, 1.0% of gemifloxacin ($P>0.05$)



besini ile beslenen larvalardan erginleşen dişilere göre, yumurta verimi önemli derecede azaldı. Kontrol besini ile yetiştirilen dişiler günde 134.46 adet yumurta bırakırken %0.001'lik gemifloksasin ile yetiştirilen dişilerin yumurta verimi 60.26'ya düştü. Buna karşılık besine %0.1 oranında gemifloksasinin ilave edilmesi dişilerin bıraktığı yumurta sayısını önemli derecede azaltarak (Şekil 4) bir günde ortalama 26.75 adet yumurta bırakılmasını sağladı. Gemifloksasinin besindeki en yüksek miktarı (%1) gemifloksasinin %0.1'lik konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında, yumurta sayısını iki katı artırdı. Antibiyotiğin bu iki konsantrasyonu etkileri bakımından kendi aralarında karşılaştırıldığında önemli bir istatistiksel fark oluşturmadı.

Yumurtaların açılma oranı bu antibiyotiğin denenen en düşük konsantrasyonunu içeren besin tarafından istatistiksel olarak önemli olmayan derecede düşürüldü. Gemifloksasin bırakılan yumurtaların açılma oranını besindeki artan antibiyotik konsantrasyonu ile ters orantılı olarak önemli derecede azalttı (Şekil 5). Gemifloksasin içermeyen kontrol besini ile yetiştirilen dişilerin bıraktığı yumurtaların %87.86'sı açılırken bu oran gemifloksasinin en yüksek konsantrasyonu tarafından %53.71'e düşürüldü.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları, klinik amaçlı olarak kullanılan yeni kuşak sentetik antibiyotik gemifloksasinin *G. mellonella* dişilerinin yumurta verimi ve açılma oranını olumsuz yönde etkilediğini açıkça gösterdi. Bu etkiler besindeki gemifloksasin miktarına bağlı olarak değişti. Klinik öneme sahip geleneksel antibiyotikler, penisilin ve streptomisin, *G. mellonella*'nın yaşama, gelişme, vücut ağırlığı ve total protein miktarına etkisi böceğin gelişme evreleri (larva, pup ve ergin) ile antibiyotiklerin türü ve dozuna bağlı olduğu gösterilmiştir [14,15]. Bu çalışmada denenen gemifloksasinin *G. mellonella* erginlerinin yumurta verimi ve açılma oranını artan antibiyotik konsantrasyonu ile ters orantılı olarak azalttığı belirlendi. Yapay besinlere küf ve mantar kontaminasyonunu önlemek için ilave edilen nistatin, sodyum benzoat ve metil p-hidroksibenzoat gibi bazı geleneksel antifungaller endoparazitoit *Trichogramma* türlerinin yumurtalarının açılma oranını azaltmış, farklı gelişme evrelerindeki ölüm oranını artırmıştır [6]. Benzer şekilde, bazı immün ve antioksidan savunmaya aracılık eden sinyal moleküllerinin biyosentezini engelleyen inhibitörlerin çeşitli böceklerin yaşama ve gelişmesi üzerinde önemli

derecede etkili olmadığı ancak yumurta veriminde önemli bir azalmaya sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır [23].

DNA giraz inhibitörü novobiyosinin, en düşük miktarını içeren besin endoparazitoit bir hymenopter türü olan *P. turionellae* larvalarının beşinci evreye ulaşmak için gereken süreyi kısaltmış, pup ve ergin yüzdesini önemli derecede artırmıştır. Oksolinik asitin en düşük miktarı yaşama üzerinde etkili olmazken böceğin gelişmesini geciktirmiştir. Antibiyotiklerin yüksek miktarları genellikle gelişme süresini uzatmış, yaşamayı düşürmüştür. Nalidiksik asitin denenen bütün miktarları ise yaşamayı dikkate değer bir şekilde artırmıştır [2]. Bu geleneksel DNA giraz inhibitörleri antibiyotiklerin bazı üçlü besinsel konsantrasyonları ergin parazitoitlerin erginlerinde böceklerde toplam protein miktarını ve yaş ağırlığı artırmıştır [11]. Gerek bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçlar gerekse diğer böcek türleri ile yapılan benzer çalışmaların sonuçları yapılan etkinin yeni kuşak bir DNA giraz inhibitörü olan gemifloksasinin besindeki miktarı yanında böcek türüne göre de değiştiğini göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar *A. affinis* ile yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında *G. mellonella*'nın *A. affinis*'e göre [5] genelde antibiyotiklerin daha yüksek miktarlarına tolerans gösterdiğini ortaya çıkardı. Bu böcek türlerinde böyle bir ayrıcalığı bulunması larval evredeki sindirim kanalının fiziksel ve kimyasal olarak farklı olmasından ileri gelebilir [7]. Lepidoptera takımına ait böceklerin sindirim kanalı alkali özellikte yüksek bir oksidasyon ve redüksiyon potansiyeline sahiptir [24].

Larval evrede alınan doğal ve yapay besin maddelerinin kalitesi ve besinsel dengesi böceklerin erginlerinin üreme ve diğer bazı özellikleri ile ömür uzunluğu (hayatta kalma süresi) üzerinde etkilidir [25]. Zararlı bir dipter tür olan Akdeniz meyve sineği *Ceratitis capitata*'nın larval evrede aldığı besinin ergin oluşumunu, vücut büyüklüğünü, eşeysel olgunluğu, yumurta bırakma davranışını ve yaşama süresini etkilediği bilinmektedir [26]. Gemifloksasinin denenen besinsel karışımlarının hiç biri *G. mellonella* erkek ve dişi erginlerinin ömür uzunluğu üzerinde istatistiksel olarak etkili olmamıştır. Bu sonuçlar böceğin ergin öncesi gelişme evresinde ve erginleşen bireylerin hayatta kalma süresi içerisinde bu antibiyotiği tolere edebildiği ancak erginlerin fizyolojik işlevlerinde bu antibiyotiğin subletal etkilerine karşı bazı adaptasyon tepkileri verebildiğini göstermiştir. Gemifloksasinin yalnızca yumurta verimi ve açılma oranını önemli derecede düşürmesi bu görüşü desteklemekte olup aynı zamanda farklı bir mekanizma ile etkili olabileceği düşünülmektedir. *G. mellonella*'nın ergin ömür uzunluğu mevsime (kış ve yaz ayları) göre değişmekte olup eşey oranları ise her mevsimde 1:1,1 (populasyon içi paylar %50: %55) oranındadır [27]. Bu çalışmada gemifloksasin böceğin eşey oranını ve ömür uzunluğunu önemli derecede etkilememiş olup özellikle yüksek antibiyotik konsantrasyonlarında erkeklere göre daha yüksek oranda dişi meydana geldiği görüldü. Bu sonucun antibiyotiğin etkisine bağlı

olup olmadığını araştırmak için birkaç nesil boyunca eşey oranı ve ömür uzunluğu izlenmelidir.

Gemifloksasinin tüm miktarlarını içeren besinlerde yetiştirilen dişilerin yumurta veriminde önemli bir azalma oldu, denenen yüksek gemifloksasin konsantrasyonlarında bırakılan yumurtaların büyük bir çoğunluğunun embriyonik gelişimi tamamlayamadığı ve normal olarak açılmadığı görüldü. Ekonomik olarak zarara sebep olan böceklerin yumurta sayısının azalması ve bu yumurtaların canlılık oranının düşük olması böceklerin kontrolünde önemlidir. Çeşitli antibiyotiklerin bazı takımlara ait böceklerin yumurta üretimini çoğunlukla olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir [28]. Örneğin toprakta bulunan *Folsomia fimetaria* L. ve *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta: Enchytraeidae)'nın ergin yaşama oranı ve verdikleri yeni nesil birey sayısının üzerine oksitetrasiklin ve tilozin antibiyotikleri düşük bir toksik etki yapmıştır. Oksitetrasiklin yaşama oranını etkilemezken tilozin önemli olmayan bir azalmaya sebep olmuştur. Buna karşılık oksitetrasiklin bu iki böceğin üreme oranını önemli derecede düşürmüştür [29]. Bazı antimikrobiyal maddelerden metronidazol, olankindoks, tiyamulin ve antihelmintik ivermektin *Folsomia fimetaria*'nın üreme oranını düşürmüştür [30]. Gemifloksasinin etkisinin araştırıldığı *G. mellonella* ile yaptığımız bu çalışma antibiyotiklerin böceklerdeki etkisinin belirlenmesinde ergin ömür uzunluğuna göre üreme ile ilgili özelliklerin daha hassas kriterler olduğunu gösterdi. Diğer çalışmaların sonuçları bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumludur. Örneğin, rifampisin *F. candida* Willem'in yumurta sayısını etkilemezken yumurtaların açılma oranını düşürmüştür [31]. Buna karşılık Pike ve Kingcombe [32] rifampisinin yumurta sayısında ve açılma oranında bir azalmaya sebep olduğu ancak tetrasiklinin yumurta sayısını düşürmediğini belirtmiştir. Kimyasal mücadelede kullanılan bazı nükleozit türevi antiviral maddelerin heteropter böceklerden *Pyrrhocoris apterus* (L.)'da ve *Dysdercus cingulatus* (Fabr.)'da ovaryum ve folikül hücrelerinin yapısının bozulmasına, embriyo gelişimi için önemli olan vitellin proteininin sentezinin önlenmesine bağlı olarak embriyonik gelişimin gerilemesine sebep olmuştur [33]. Bu nükleozit türevi antiviral maddelerin böceklerde ovaryumlardaki yumurta verimini juvenil hormon (JH) ve ovaryum ekdisteroidlerinin seviyesini değiştirmek suretiyle etkilediği ileri sürülmüştür [34-36]. Bu çalışmada denenen gemifloksasinin besinsel karışımları *G. mellonella* dişilerinin yumurta gelişimi ile ilgili hormonların işlevinde önemli değişikliklere sebep olabilir, ancak bu konuda kesin bir sonuca varabilmek için detaylı çalışmalara gerek bulunmaktadır.

Gemifloksasinin gerek besinin kimyasal bileşimleri arasındaki dengeyi gerekse böceğin bağırsak osmotik basıncını ve pH'ını değiştirmesi sonucu larvaların beslenme davranışı değişmiş ve besin tüketim oranı azalmış olabilir. Örneğin beta-laktam antibiyotiklerin, sefalosporinlerin ve gemifloksasin ile aynı grupta olan fluorokinolon yapısındaki ofloksasinin çeşitli canlıların bağırsaklarından emilim-

lerinde ise pH'nın önemli rol oynadığı belirtilmektedir [37]. Diğer taraftan, böcekleri beslemek için kullanılan besinlerin içeriğinin bozulması ve kalitesinin düşük olması erginlerin fizyolojik ve biyolojik özelliklerini olumsuz etkilediği bilinmektedir [25]. Omurgalı hayvanlar ile yapılan bir çalışmada beslenme şartlarına bağlı olarak genç evrelerde oluşan oksidatif stresin ergin özellikleri olumsuz etkilediği tespit edilmiştir [38]. Bu çalışmada besin tüketim oranının azalmasına bağlı olarak larvalar, erginleşecek bireylerin ömür uzunluğunu etkileyecek düzeyde gemifloksasin alamamış olabilir. Ancak tüm canlılarda olduğu gibi böceklerde de yumurta üretimi, embriyo gelişimi ve olgunlaşan embriyonun serbest kalması gibi üreme ile ilgili fizyolojik işlemler antibiyotiğin bu düşük miktarlarından etkilenmiş olabilir. Ancak bu konunun aydınlatılabilmesi için detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada gemifloksasin *G. mellonella*'nın yumurta verimi ve açılma oranını olumsuz yönde etkiledi. Buna karşılık eşey oranı ve ergin ömür uzunluğu etkilenmedi. Erginlerin üremesi üzerindeki subletal etkiler, bu antibiyotiğin konsantrasyonlarının hassas bir şekilde ayarlanmasıyla diğer zararlı böcek türlerinin mücadelesinde kullanılabilirliğini göstermektedir. Diğer taraftan böyle bir çalışma bu böceklerin sentetik besin ortamlarında yetiştirilmelerinde önemli bir sorun olan mikrobiyal kontaminasyonları önlemeye yönelik çalışmalara da ışık tutacaktır.

TEŞEKKÜR

Gemifloksasini bu çalışma için hediye eden Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A. Ş. (Maslak, İstanbul)'ye ve proje desteğinden dolayı Üniversitemiz yönetimine teşekkür ederiz. Bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (PROJE NO: 2012-10-06-07). Bu çalışmanın deneysel aşamalarının ve istatistikî analizlerinin yapılmasında, makalenin yazımında Meltem Erdem ve Ender Büyükgüzel görev almıştır.

KAYNAKLAR

1. Shaver TN, Raulston JR: A soybean-wheatgerm diet for rearing the tobacco budworm. *Ann Entomol Soc Am*, 64, 1077-1079, 1971.
2. Büyükgüzel K: Positive effects of some gyrase inhibitors on survival and development of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera:Ichneumonidae) larvae reared on an artificial diet. *J Econ Entomol*, 94, 21-26, 2001. DOI: 10.1603/0022-0493-94.1.21
3. Büyükgüzel E, Kayaoğlu S: Niklozamidin *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nın bazı biyolojik ve fizyolojik özelliklerine etkisi (The effect of niclosamide on some biological and physiological aspects of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Türk Entomol Derg*, 38 (1): 83-99, 2014.
4. Çalık G, Büyükgüzel K, Büyükgüzel E: Reduced fitness in adults from larval, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) reared on media amended with the anthelmintic, mebendazole. *J Econ Entomol*, 109, 1-6, 2016. DOI: 10.1093/jee/tov305
5. Singh P, House HL: Effects of streptomycin and potassium sorbate in relation to nutrient levels on the larvae of *Agria affinis*. *J Econ Entomol*, 63, 449-454, 1970. DOI: 10.1093/jee/63.2.449

6. Grenier S, Liu WH: Mold control and safe levels of antifungals in artificial media for egg parasitoids (Hymenoptera). *Les Colloques de l'INRA*, 56, 141-144, 1991. DOI: 10.1007/BF02374804
7. Büyükgüzel K, Yazgan Ş: Combinational effects of some antimicrobial agents on the survival and development of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Communication*, 48, 1-14, 1999.
8. Ensminger ME, Oldfield JE, Heinemann WW: Feed & Nutrition (Formerly, Feeds & Nutrition - Complete). 2nd ed., The Ensminger Publishing Company, Clovis, California, U.S.A. 1990.
9. Chamberlain WF, Schol PJ: New procedures to enhance survival of third instar *Hypoderma lineatum* (Villers) (Diptera: Oestridae) in artificial media. *J Med Entomol*, 82, 266-269, 1991.
10. Deecher DC, Brezner J, Tanebaum SW: Sublethal effects of avermectin and milbemycin on the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *J Econ Entomol*, 83, 710-714, 1990.
11. Büyükgüzel K, İçen E: Effects of gyrase inhibitors on the total protein content of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) larvae reared on an artificial diet. *J Econ Entomol*, 39 (1): 108-116, 2004.
12. Charriere JD, Imdorf A: Protection of honeycombs from moth damage. Swiss Bee Research Center Federal Dairy Research Station. *Communication*, 24, 1-14, 1997.
13. Jarosz J: Simplified technique for preparing germ-free specimens of greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *J Econ Entomol*, 82, 1478-1481, 1989. DOI: 10.1093/jee/82.5.1478
14. Büyükgüzel E, Kalender Y: Penicillin-induced oxidative stress: Effects on antioxidative response of midgut tissues in larval instars of *G. mellonella*. *J Econ Entomol*, 100, 1533-1541. 2007. DOI: 10.1093/jee/100.5.1533
15. Büyükgüzel E, Kalender Y: Exposure to streptomycin alters oxidative and antioxidative response in larval midgut tissues of *Galleria mellonella*. *Pestic Biochem Phys*, 94, 112-118, 2009. DOI: 10.1016/j.pestbp.2009.04.008
16. Ciesielczuk H, Betts J, Phee L, Doumith M, Hope R, Woodford N, Wareham DW: Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. *Virulence*, 6, 145-51, 2015. DOI: 10.4161/21505594.2014.988095
17. Tsai CJY, Loh JMS, Proft T: *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 2016. DOI: 10.1080/21505594.2015.1135289
18. Owens RC, Ambrose PG: Antimicrobial safety: Focus on fluoroquinolones. *Clin Infec Dis*, 41 (Suppl. 2): S144-S157, 2005. DOI: 10.1086/428055
19. Bronskill J: A cage to simplify the rearing of the greater wax moth. *Galleria mellonella* (Pyralidae). *J Lepid Soc*, 15, 102-104, 1961.
20. Campos F, Donskov N, Arnason JT, Philogene BJR, Atkinson PM, Werstruik NH: Biological effects and toxicokinetics of DIMBOA in *Diadegma terebrans* (Hymenoptera: Ichneumonidae), an endoparasitoid of *Ostrina nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol*, 83, 356-360, 1990.
21. SPSS Inc: User's Manual, Version 10. SPSS Inc., Chicago IL, 1997.
22. Snedecor GS, Cochran WG: Statistical Methods. 8th ed., 158-160, Iowa State University Press, Ames, IA. 1989.
23. Büyükgüzel E, Tunaz H, Stanley DW, Büyükgüzel K: The influence of chronic eicosanoid biosynthesis inhibition on life history of the Greater waxmoth, *Galleria mellonella* and its ectoparasitoid, *Bracon hebetor*. *J Insect Physiol*, 57, 501-507, 2011. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.01.015
24. Terra WR: Evolution of digestive systems of insects. *Ann Rev Entomol*, 35, 181-200, 1990.
25. Slansky Jr F, Scriber JM: Food consumption and utilization. In, Kerkut GA, Gilbert LI (Eds): Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. 87-163, Pergamon Pres, Oxford, 1985.
26. Chang CL, Albrecht C, El-Shall SSA, Kurashima R: Adult reproductive capacity of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) on a chemically defined diet. *Ann Entomol Soc Am*, 94, 702-706, 2001. DOI: 10.1603/0013-8746(2001)094[0702:ARCOCC]2.0.CO;2

27. **Chang CO, Hsieh FK:** Morphology and bionomics of *Galleria mellonella* L. *Chin J Entomol*, 12, 121-129, 1992.
28. **Giordano R, Weber E, Waite J, Bencivenga, Krogh PH, Soto-Adames F:** Effect of a high dose of three antibiotics on the reproduction of a parthenogenetic strain of *Folsomia candida* (Isotomidae: Collembola). *Environ Entomol*, 39, 1170-1177, 2010. DOI: 10.1603/EN10027
29. **Baguer AJ, Jensen J, Krogh PH:** Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere*, 40, 751-757, 2000. DOI: 10.1016/S0045-6535(99)00449-X
30. **Jensen J, Krogh PH, Sverdrup LE:** Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). *Chemosphere*, 50, 437-443, 2003. DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00336-3
31. **Timmermans MJTN, Ellers J:** *Wolbachia* endosymbiont is essential for egg hatching in a parthenogenetic arthropod. *Evol Eco*, 23, 931-942, 2008. DOI: 10.1007/s10682-008-9282-0
32. **Pike N, Kingcombe R:** Antibiotic treatment leads to the elimination of *Wolbachia* endosymbionts and sterility in the diplo-diploid collembolan *Folsomia candida*. *BMC Biol*, 7, 54, 2009. DOI: 10.1186/1741-7007-7-54
33. **Socha R, Gelbič I, Šula J:** Histopathological effects of (R,S)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenine on the ovaries of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *Acta Entomol Bohemoslov*, 85, 408-417, 1988.
34. **Šula J, Gelbič I, Socha R:** The effects of (RS)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenine on the reproduction and protein spectrum in haemolymph and ovaries of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *Acta Entomol Bohemoslov*, 84, 1-9, 1987.
35. **Gäde G, Hoffmann KH:** Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiol Entomol*, 30, 103-121, 2005.
36. **Gelbič I, Šula J:** Ovicidal and biochemical effects of hempa and a nucleoside analogue on *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Het., Pyrrhocoridae). *J Appl Entomol - Z Angew Entomol*, 109, 401-409, 1990.
37. **Rabbaa L, Dautrey S, Colas-Linhart N, Carbon C, Farinotti R:** Absorption of Ofloxacin isomers in the rat small intestine. *Antimicrob Agents Chemother*, 41 (10): 2274-2277, 1997.
38. **López-Arrabé J, Cantarero A, Pérez-Rodríguez L, Palma A, Moreno J:** Oxidative stress in early life: Associations with sex, rearing conditions, and parenteral physiological traits in nestling pied flycatchers. *Physiol Biochem Zool*, 2016 (in press). DOI: 10.1086/685476
39. **Kılıç A, Büyükgüzel K, Büyükgüzel E:** Antihelmintik triklabendazolun yapay besin ile beslenen *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarının yaşama ve gelişimine etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21, 841-847, 2015. DOI: 10.9775/kvfd.2015.13731
40. **Sugeçti S, Büyükgüzel K, Büyükgüzel E:** Laboratory assays of the effects of oxfendazole on biological parameters of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Entomol Sci*, 2016 (in press).