

Antihelmintik Triklabendazolun Yapay Besin ile Beslenen *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarının Yaşama ve Gelişimine Etkisi ^[1]

Ali KILIÇ ¹ Kemal BÜYÜKGÜZEL ¹✍ Ender BÜYÜKGÜZEL ²

⁽¹⁾ Bu çalışma "Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2014-84906727-05)

¹ Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, TR-67100 Zonguldak - TÜRKİYE

² Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, TR-67100 Zonguldak - TÜRKİYE

Article Code: KVFD-2015-13731 Received: 15.05.2015 Accepted: 20.07.2015 Published Online: 20.07.2015

Özet

Benzimidazol grubu bir antihelmintik olan triklabendazolun yapay besin kullanılarak Büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella* (L.) larvalarının ergin evreye kadar farklı gelişme evrelerinde yaşama oranına ve gelişme süresine etkisi incelendi. Triklabendazol yapay besine %0.001, 0.01 ve 0.1 oranlarında ilave edilerek birinci evre larvaları besinlerde ergin oluncaya kadar yetiştirildi. Antihelmintik maddenin düşük konsantrasyonlarında (0.001 ve 0.01 g/100 g besin), son evre larva oranı (7. evre) ve ergin olma oranı kontrole göre önemli derecede düşük bulunurken, pupa olma oranı bakımından kontrol ile arasında istatistiksel farklılık oluşmadı. Bunun tersine, denenen antihelmintik maddenin en yüksek besinsel konsantrasyonunda, pupa evresine ve ergin evreye ulaşma oranı kontrol grubundan önemli derecede düşük tespit edilirken 7. evreye ulaşan larva oranı bakımından kontrol ile arasında farklılık görülmedi. Triklabendazolun en yüksek konsantrasyonu (0.1 g/100 g besin) pupa olma oranını %81.6±4.32'den %43.3±7.45'e, ergin olma oranını %73.3±2.36'dan %13.3±2.36'ya düşürdü. En yüksek antihelmintik konsantrasyonu 7. evreye ulaşma süresini yaklaşık 3.8 gün uzatarak 22.8±1.54 güne ulaştırdı. Triklabendazolun %0.1 oranını içeren besin kontrol besinindeki 24.6±1.24 gün olan pupa olma süresini 28.4±1.24 güne, 35.3±1.27 gün olan ergin olma süresini 42.0±1.62 güne önemli derecede uzattı. Bu çalışma farklı kimyasal yapı ve etki mekanizmasına sahip antihelmintiklerin zararlı böceklerin mücadelesinde hedef olmayan canlılara ve çevreye karşı en az zararlı kullanılabilirliğinin araştırılması açısından önemlidir.

Anahtar sözcükler: *Galleria mellonella*, Triklabendazol, Yaşama oranı, Beslenme

The Effect of Anthelmintic Triclabendazole on Survival and Development of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) L. Reared on Artificial Diet

Abstract

The effect of triclabendazole, which is a benzimidazole anthelmintic, on the survival rate and developmental time in different stages of greater wax moth *Galleria mellonella* (L.) was investigated by rearing the larvae on the artificial diets. Triclabendazole was incorporated into diets at concentrations of 0.001, 0.01 or 0.1%. *G. mellonella* larvae was reared from first instar larvae to adult emergence on the artificial diets with different concentrations of triclabendazole. The survival rate in seventh instar (7th-instar) and adult stage were significantly lower at low concentrations of this anthelmintic agent (0.001 and 0.01 g per 100 g of diet) than the control, while there were no differences on pupation in comparison to control diet. However, the pupation and adult emergence were significantly lower at the highest dietary concentration of triclabendazole than control group but there were no differences on survival of 7th-instar larvae. The highest concentration of the anthelmintic agent (0.1 g/100 g diet) decreased pupation from 81.6±4.32% to 43.3±7.45%, adult emergence rate from 73.3±2.36 to 13.3±2.36. Triclabendazole at the highest concentration prolonged developmental time to 7th larval stage by 3.8 days reaching total 22.8±1.54 days. This diet containing 0.1% of triclabendazole significantly prolonged pupal developmental time from 24.6±1.24 days to 28.4±1.24 days, adult developmental time from 35.3±1.27 days to 42.0±1.62 days. This study is of importance in appreciation for usage of anthelmintic with different structure and mode of actions in the management of pest insects to reduce damage to environment and nontarget organisms.

Keywords: *Galleria mellonella*, Triclabendazole, Survival rate, Nutrition



İletişim (Correspondence)



+90 372 2574010/1757



buyukguzelk@hotmail.com

GİRİŞ

Böceklerin laboratuvar şartlarında yapay besinler ile yetiştirilmesi biyolojik, biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler araştırmaların yürütülebilmesi için önemli araçtır. Kimyasal yapısı belirli yapay besinlerin içeriğindeki besinsel değeri yüksek bileşenler mikrobiyal gelişim için oldukça uygun bir ortam oluşturmaktadır [1-3]. Laboratuvar şartlarında böcekleri yetiştirmek için kullanılan yapay besinlere bakteriyel, fungal ve diğer kaynaklı kontaminasyonlar ile mücadele amacıyla ilave edilen antimikrobiyal maddelerin kontaminasyonu önleme özelliği yanında böceklerin yaşamını, gelişimini ve bazı fizyolojik özelliklerini olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir [1,4-14]. Böcek üzerinde bu maddelerin düşük miktarlarda olumsuz etkiye sahip olması zararlı böcekler ile mücadelede etkin ve çevreye duyarlı yeni kimyasal mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önemlidir [15,16]. Bu amaçla son zamanlarda laboratuvar şartlarında yaptığımız bir beslenme çalışmasında yeni kuşak bazı antihelmintik maddelerin Büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella* (L.) üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu gözlenmiştir [17].

Galleria mellonella larvaları arı kovanlarındaki ürünler (bal peteği, mum ve bal) ile beslendiğinden arıcılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır [18]. Mum güvesi larvalarının laboratuvar ortamında yapay besinler ile yetiştirilmesi sırasında mikrobiyal kontaminasyonu önlemek ve fizyolojik araştırmalar için mikroorganizmadan arındırılmış steril böcekler yetiştirmek amacıyla bazı antibiyotikler besinlere ilave edilmiştir [19,20-23]. Bu böcek laboratuvar şartlarında ucuz yapay besinlerde bol miktarda üretilebildiği için fizyoloji, biyokimya ve moleküler biyoloji çalışmalarında yaygın olarak model böcek olarak kullanılmaktadır. Biyolojik mücadelede kullanılan parazitoid böceklerin laboratuvar ortamında yetiştirilmesinde doğal konak olarak ve insektisit etkinlik denemelerinde, hatta insan ve diğer memelilerde hastalık yapan mikroorganizmaların patojenitesinin belirlenmesinde yaygın kullanılmasından [24] dolayı önemi gittikçe artmaktadır.

Antibakteriyel, antifungal, antiviral maddelerin yüksek organizasyonlu ökaryotik organizmalardan, insanın da dahil olduğu memelilerin DNA replikasyonunu, transkripsiyonu, protein sentezini ve hücre ara metabolizmasını olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir [25]. Memeli hücrelerinde hücre iskeletinin oluşumunu veya sterol biyosentezini engelleyen geleneksel bazı antifungal maddeler ile RNA sentezi inhibitörü antibakteriyel maddelerin çeşitli zararlı böcek türlerinin biyolojik özelliklerini olumsuz yönde etkilediğine dair bilgiler mevcuttur [26,27].

Triklabendazol [5-kloro-6-(2,3-diklorofenoksi)-2-(metil-tiyo)-1H-benzimidazol] benzimidazol grubu yeni kuşak bir antihelmintik olup insan ve hayvanlarda enfeksiyona neden olan parazitlerin ergin evre ve ergin öncesi evreleri üzerinde oldukça etkilidir [28-31]. Triklabendazolün de içinde

bulunduğu bu bileşiklerinin etki mekanizması tam olarak anlaşılmamasına rağmen, benzimidazol mikrotübüllerin yapısal bir proteini olan β -tubulin molekülüne bağlanarak [32-36], hücre bölünmesi ve hücre içi taşıma gibi hücre işlevlerini bozarlar. Triklabendazolun metabolizma ürünleri (sülfoksit türevleri ve sülfon) aracılığıyla parazitlerde mikrotübül oluşumunu bozması sonucu glukoz alımı yapılmadığından hücredeki enerji mekanizmaları dolayısıyla homeostazi bozulmaktadır [37,38-40].

Antihelmintiklerin insan ve hayvanlarda enfeksiyona neden olan parazitlerde olduğu gibi zararlı böceklerde de benzer olumsuz etkilere sahip oldukları hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır. Ancak *G. mellonella*'nın mücadelesinde karbon dioksit, metil bromid, fosfin, sülfür, naftalin ve paradiklorobenzen gibi toksik kimyasalların uygulandığı yöntemlere kıyasla [18] triklabendazolun parazitlerdeki seçici etki mekanizmasından dolayı hedef olmayan memeli hayvanlara ve çevreye toksisitesinin düşük olduğu [35] bilinmektedir. Bu çalışmada insan ve hayvan sağlığı açısından klinik öneme sahip antihelmintiklerin zararlı böcekler üzerindeki etkilerinin model böcek *G. mellonella* üzerinde araştırılması amaçlanmıştır. Böylece antihelmintiklerin ekonomik öneme sahip zararlı böceklerin biyolojisi üzerindeki etkilerinin daha detaylı bilinmesine yönelik diğer çalışmalara öncülük edilmiş olacaktır. Benzimidazol grubu bir antihelmintik olan triklabendazol *G. mellonella*'nın tüm gelişme evrelerindeki yaşama oranını ve gelişme süresini olumsuz yönde etkilemiştir.

MATERYAL ve METOT

Böceklerin Laboratuvar ortamında Yetiştirilmesi

Dişilerin bıraktığı yumurtaların açılması ile serbest kalan *G. mellonella* birinci evre larvaları laboratuvar ortamında yapay besin ortamlarında beslenerek erginleşen bireylerden sürekli böcek kültürü oluşturuldu. Böcekler inkübatörde (Nüve, ES 500) $28 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve $\%65 \pm 5$ bağıl nemde yetiştirildi. Yaşama ve gelişme ile ilgili deneylerde yumurtadan yeni çıkmış birinci evre larvaları kullanıldı.

Laboratuvar ortamında *G. mellonella* larvalarını yetiştirmek ve çoğaltmak için yapay besin kullanıldı [41]. Besinin bileşiminde, 420 g buğday kepeği, 150 ml süzme bal, 150 ml gliserin, 20 g öğütülmüş koyu renkli eski petek ve 30 ml saf su bulunmaktadır. Bileşenler hazırlanacak besinin belirli bir miktarı için gerekli miktarlarda tartılarak karıştırıldı ve özel bir karıştırıcı ile homojen bir ortam sağlandı. Besinler cam kavanozlara taksim edildi. Kavanozun içindeki besinin üstüne bırakılacak dişilerin yumurta bırakmasını kolaylaştırmak ve bırakılan yumurtalardan yeni açılan larvaların ilk anda beslenmesi için besinin üzerine küçük bir parça kuru boş bal peteği konuldu [42]. Kavanozlardaki besinlerin üzerine 5-10 adet diş bırakılarak kavanozların ağızları solunumu sağlamak için tel kafes içeren vida kapak ile kapatıldı. Gelişimlerini normal tamamlayan 7. evre larvaları

alınarak pupa olmalarını sağlamak için başka bir kavanoza bırakıldı. Larvalara kuru bir ortam sağlamak üzere pelur kağıt parçaları katlanarak kavanozun içine bırakıldı^[43]. Pupa olan bireyler gözlemlendi ve pupalardan erginleşen bireyler alındı. Stok böcek kültürünün devamı bu erginlerin bir bölümü ile sağlandı. Diğer erginler ise triklabendazol ile ilgili deneylerde kullanılacak larvaları elde etmek için ayrıldı.

Böceğin Yaşama ve Gelişmesi Üzerine Triklabendazolun Etkisi

Stok kültürden erginleşen sağlıklı ve iyi görünümüne sahip dişiler 30 ml'lik geniş ağızlı, vida kapaklı bir plastik kabın (ORLAB, L190030, 35x55 mm) içine bırakıldı. Dişilerin yumurta bırakması için bir kaç gün beklendi. Bu süre içerisinde bırakılan yumurtaların açılması için kaplar $28\pm 2^\circ\text{C}$ ve %65±5 bağıl nemde bekletildi. Laboratuvarında gerçekleştirilen beslenme deneylerinde bu yumurtaların açılması ile serbest kalan larvalar kullanıldı. Açılan larvalar tel kafes kapaklı cam kavanozların (60x120 mm) içindeki yaklaşık 200 g besinin üzerine bırakıldı. Larvaların kavanozlardaki besinlere aktarılmasında zarar görmemeleri için yumuşak uçlu bir fırça (No: 0, Goya Toray) kullanıldı.

Triklabendazol benzimidazol grubu bir antihelmintiktir (C14H9Cl3N2O5) (5-kloro-6-(2,3-diklorofenoksi)-2-(metiltiyo)-1H-benzimidazol). Antihelmintik ilacın beslenme deneylerinde denenen miktarları 100 g besine katılacak gram miktar (% a/a) olarak belirlendi ve besin hazırlanırken doğrudan ilave edildi. Triklabendazol içermeyen kontrol besini ve triklabendazolün %0.001, 0.01 ve 0.1'ini içeren besinler üzere dört besin denendi. Çalışmada denenen triklabendazol konsantrasyonları *G. mellonella*^[21-23] ve bazı parazitoid böcek türleri üzerinde antibiyotiklerin etkisinin araştırıldığı önceki çalışmalara göre tespit edildi^[11-13]. Ayrıca daha önce antihelmintik niklozamid ile ilgili yapılan çalışma da dikkate alındı^[17]. Bu çalışmalardan yola çıkarak öncelikle denenecek konsantrasyonların aralığını belirlemek amacıyla ön beslenme deneyleri yürütüldü. Bunun için en düşük %0.001 ve en yüksek %3.5 oranlarındaki aralıklarda triklabendazol besinlere katılarak biyolojik parametreler üzerindeki etkilerine bakıldı. Yaşama ve gelişme üzerine etkilerinin belirlenebilmesi için larvaların ergin evreye kadar gelişebildiği konsantrasyon aralıkları tespit edildi. Daha sonra bu konsantrasyonların böceğin gelişim evrelerindeki yaşama oranı ve gelişme süresine etkisi tespit edildi.

Beslenme deneylerinde antihelmintik maddenin miktarlarını içeren her bir besin ve kontrol besini için 20 adet birinci evre larvası seçilerek besinlere bırakıldı. Her deney dört defa tekrar edildi. Yedinci (7. evre) evreye ulaşan larvalar besinden alınarak pupa olmaları için içlerinde katlanmış, ince pelur kağıt bulunan 30 ml'lik plastik örnek kaplarına (ORLAB, L190030, 35x55 mm) teker teker bırakıldı. Kavanozlara pelur kağıtlar larvaların pupa olmaları için kuru ortam sağlamak amacıyla konuldu. Pupa evresine ulaşan ve pupalardan erginleşen bireylerin sayısı belirlendi,

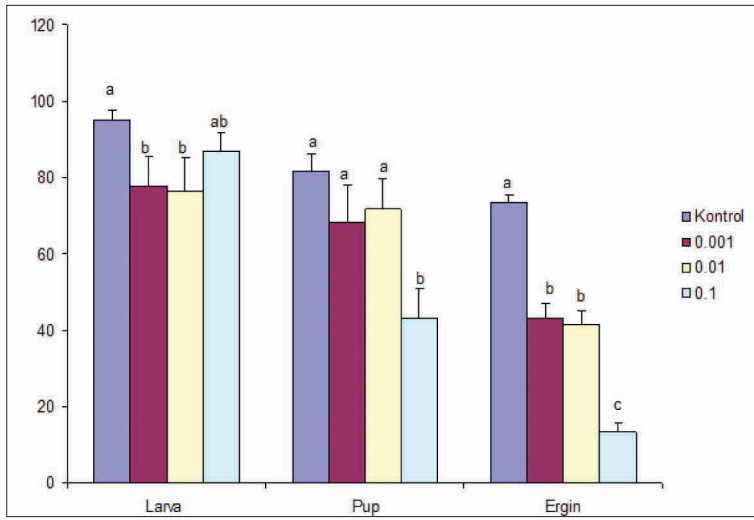
yüzde oranları hesaplandı ve bu evrelere ulaşan bireylerin ortalama gelişme süresi ayrıca hesaplandı.

Triklabendazolun farklı konsantrasyonlarını içeren besinlerdeki *G. mellonella*'nın yaşama oranı ve gelişimi üzerindeki etkileri 7. larval evre, pupa ve ergin evreye ulaşan bireylerin yüzdesi ve bu evreye ulaşmak için geçen ortalama süre (gün) belirlendi. Gelişme süresi ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde, tek yönlü "Varyans Analizi"^[44] testi yapıldı. Ortalamalar arasındaki farkın önemini saptamak için "LSD Testi"^[44] uygulandı. Yaşama ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde ise " χ^2 (Chi square) Testi"^[45] kullanıldı. 0.05 olasılık düzeyinde ortalamaların önemi incelendi.

BULGULAR

Triklabendazolün denenen en yüksek konsantrasyonu hariç besine ilave edilen miktarlarının yedinci evreye (7. evre) kadar gelişen larvaların oranını önemli derecede düşürdüğü tespit edildi. Kontrol besini ile karşılaştırıldığında bu antihelmintik ilacın belirtilen düşük konsantrasyonları (0.001 ve 0.01 g/100 g besin) besine katılan en düşük konsantrasyondan itibaren son evre larva oranını önemli derecede düşürdü ($P<0.05$). Triklabendazol larval yaşama oranında olduğu gibi en yüksek besinsel konsantrasyonda ergin evreye ulaşma oranını da önemli derecede düşürdü. Triklabendazol içermeyen kontrol besininde larvaların %94.8±2.77'si 7. evreye ulaşırken, besine %0.01 oranında triklabendazol ilave edildiğinde larvaların %77.9±7.45'inin 7. evreye ulaşması sağlamış olup kontrole göre yaşama oranı önemli derecede azaldı ($P<0.05$). Kontrol besini ile yetiştirilen larvaların %81.6±4.32'si pupa olurken %73.3±2.36'sı ise ergin olabildi. Triklabendazolün en düşük besinsel miktarı ise pupa ve ergin evredeki yaşama oranını sırasıyla %68.3±9.83 ve 43.3±3.72'ye kadar düşürdüğü halde pupa olma oranında kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir fark oluşmadı. Besine ilave edilen triklabendazol miktarı 10 katı artırıldığında (0.01 g/100 g besin) besinle beslenen larvaların %76.6±8.34'ü 7 evreye ulaşarak kontrol besinine göre yaklaşık %30'luk bir azalma kaydedildi. Triklabendazolün %0.01 oranı erginleşen bireylerin yüzdesini önemli derecede azaltarak, yaşama oranını %41.6±3.63'e düşürdü ($P<0.05$) (Şekil 1). Antihelmintik maddenin besindeki %0.1 oranı böceğin larval evredeki yaşama oranı dışında diğer gelişme evrelerindeki yaşama oranını önemli derecede düşürdü ($P<0.05$). Antihelmintik maddenin bu konsantrasyonu pupa olma oranını %81.6±4.32'den 43.3±7.45'e, ergin olma oranını %73.3±2.36'dan 13.3±2.36'ya azalttı.

Antihelmintik maddenin besine ilave edilen düşük miktarlarının larvaların yedinci evreye (7. evre) kadar gelişmeleri için gerekli olan süre üzerinde önemli derecede etkili olmadığı tespit edildi. Triklabendazol, %0.001 ve 0.01 oranında besine ilave edildiğinde, larvalar kontrol besinine göre sırasıyla yaklaşık 1.8 ve 1.0 gün daha geç 7. evreye ulaşmalarına rağmen gelişme süresindeki uzama

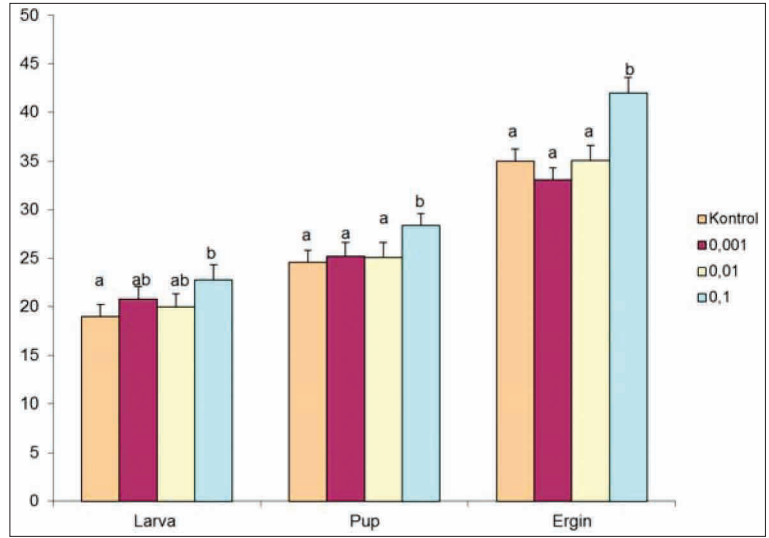


Şekil 1. *G. mellonella* larvalarının yaşama oranına triklabendazolün etkisi. Veriler dört tekrarın ortalaması olarak verilmiştir, her tekrarda yirmi larva kullanılmıştır. Aynı evrede farklı harfi içeren ortalamalar birbirinden farklıdır ($P<0.05$) (c^2 testi). (a-b) 7. larval evre ve ergin evredeki yaşama oranında kontrol ile triklabendazolün %0.001 ve %0.01'lik konsantrasyonlarının karşılaştırılması ($P<0.05$) ve pup evresindeki yaşama oranında kontrol ile triklabendazolün %0.1'lik konsantrasyonunun karşılaştırılması ($P<0.05$). (a-c) Ergin olma oranında kontrol ile triklabendazolün % 0.1'lik konsantrasyonunun karşılaştırılması ($P<0.05$).

Fig 1. The effect of triclabendazole on survival rate of *G. mellonella* larvae. Data are the average of four replicates, with 20 larvae per replicate. Values followed by the same letter in the same stage are significantly different from each other ($P<0.05$) (c^2 test). (a-b) Comparison of 0.001 and 0.01% of triclabendazole with control in survival rate of seventh instar and adult stage ($P<0.05$), and comparison of 0.1% of triclabendazole with control in pupation rate ($P<0.05$). (a-c) comparison of 0.1% of triclabendazole with control in survival rate of adult stage ($P<0.05$).

Şekil 2. *G. mellonella* larvalarının gelişme süresi üzerine triklabendazolün etkisi. Veriler dört tekrarın ortalaması olarak verilmiştir, her tekrarda yirmi larva kullanılmıştır. Aynı evrede farklı harfi içeren ortalamalar birbirinden farklıdır ($P<0.05$) (LSD Testi). (a-b) 7. larval evre, pupa ve ergin evreye gelişme süresinde kontrol ile triklabendazolün %0.1'lik konsantrasyonunun karşılaştırılması ($P<0.05$).

Fig 2. The effect of triclabendazole on developmental time of *G. mellonella* larvae. Data are the average of four replicates, with 20 larvae per replicate. Values followed by the same letter in the same stage are significantly different from each other ($P<0.05$) (LSD Testi). (a-b) Comparison of 0.1% of triclabendazole with control in developmental time to seventh instar, pupal and adult stage ($P<0.05$).



istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmadı ($P>0.05$). Buna göre kontrol besini ile yetiştirilen larvalar ortalama 19.0 ± 1.22 günde son larval evreye ulaşırken %0.001 ve 0.01 oranında antihelmintik içeren besinlerde larvalar ortalama 20 ve 21 günde son larval evreye ulaştı. Triklabendazolün besindeki en yüksek konsantrasyonu 7. evreye ulaşma süresini yaklaşık 3.8 gün geciktirerek 22.8 ± 1.54 güne uzattı. Kontrol besini ile karşılaştırıldığında antihelmintik maddenin besine katılan en düşük konsantrasyonu (%0.001) pupa evresine ulaşma süresini önemli derecede etkilemezken ergin evreye ulaşma süresini önemli olmayan derecede kısalttı. Antihelmintik maddenin bu konsantrasyonunu içeren besinde larvalar 25.2 ± 1.43 günde pupa evresine, 33.1 ± 1.27 günde ergin evreye ulaştı.

Triklabendazol içermeyen kontrol besininde larvalar 24.6 ± 1.24 günde pupa, 35.0 ± 1.27 günde ergin olurken besine %0.01 oranında triklabendazol ilave edildiğinde larvalar 25.1 ± 1.54 günde pupa, 35.1 ± 1.54 günde ise ergin oldu. Kontrol besinine %0.1 oranında triklabendazol ilave edildiğinde ise 7. larva evresine, pupa ve ergin evreye ulaşma süresinin kontrol besinine göre önemli dere-

cede uzadığı tespit edildi ($P<0.05$). Bu besin kontrol besinindeki 24.6 ± 1.24 olan pupa olma süresini 28.4 ± 1.24 güne, 35.3 ± 1.27 olan ergin olma süresini 42.0 ± 1.62 güne uzattı. Gelişme süresindeki uzama pupa evresine ulaşma süresinde yaklaşık 4 gün, ergin evreye ulaşma süresinde ise yaklaşık 7 gün olarak belirlendi (Şekil 2).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada triklabendazolün *G. mellonella*'nın biyolojisi üzerindeki etkisinin böceğin gelişme evrelerine ve denenen antihelmintik maddenin konsantrasyonlarına göre değiştiği tespit edildi. Triklabendazolün yüksek konsantrasyonlarının *G. mellonella* larvalarının ergin evreye doğru yaşama oranını düşürdüğü, gelişme süresini uzattığı belirlendi. Triklabendazolün *G. mellonella* üzerindeki etkilerine benzer etkiler diğer takımlara ait böcekler üzerinde bazı antibiyotikler ile yapılan çalışmalar ile elde edilmiştir. Örneğin, yumurta endoparazitoidi olan *Trichogramma* türleri ile yapılan önceki araştırmalar yapay besin ortamlarına küf ve mantar kontaminasyonunu

önlemek için ilave edilen nistatin, sodyum benzoat ve metil p-hidroksibenzoat gibi bazı geleneksel antifungallerin bırakılan yumurtaların açılma oranını azalttığı, farklı gelişme evrelerindeki ölüm oranını artırdığını göstermiştir [9,46,47]. Bu sonuçlara benzer şekilde, denenen triklabendazolun yüksek konsantrasyonları *G. mellonella*'nın hem larval gelişme hem de larva sonrası gelişme evrelerinde etkili olduğu, böceğin tüm gelişme evrelerindeki yaşama oranını ve gelişme süresini olumsuz yönde etkilediği tespit edildi.

Besine ilave edilen triklabendazol konsantrasyonlarının besinin kimyasal ve fiziksel bileşimini etkilemesi ve bunun sonucunda besinsel kaliteyi değiştirmesi beklenbilir. Besinsel içeriklerin oranlarının değişmesi ile larvaların beslenme davranışı değişmiş ve buna bağlı olarak böceğin biyolojik özellikleri olumsuz yönde etkilenmiş olabilir. Slansky ve Scriber'in [48] yapay besin ortamlarının yapısının bozulması sonucu besin kalitesinin azalmasının besinle beslenen larvalardan oluşan erginlerin biyolojik özelliklerini olumsuz etkilediğini belirtmesi bizim görüşümüzü desteklemektedir. Elde edilen bulgularımızı toksikolojik açıdan destekleyen diğer bir çalışma ise kimyasal yapısı bozulmuş doğal besin ile yürütülmüştür. Belirtilen doğal besin ile beslenen bir örümcek türü *Pardosa prativaga* (L. Koch)'da, besin bileşenlerinin oksidatif hasarına bağlı olarak artan oksidatif stres sonucu detoksifikasyon enzimi glutatyon S-transferaz (GST)'in aktivitesinin azaldığı ileri sürülmüştür [49].

Ekonomik öneme sahip böceklerin laboratuvar şartlarında yapay besinler ile yetiştirilmeleri sırasında olası mikrobiyal kontaminasyonların önlenmesi amacıyla besinlere ilave edilen antimikrobiyal maddelerin böcekler üzerinde bazı olumsuz etkilerine rastlanmıştır [50,51]. Bu konuda en önemli bir çalışma Singh ve House [4] tarafından yapılmıştır. Bir dipter tür olan *Agria affinis* (Fall.) (Diptera: Sarcophagidae)'in farklı antibakteriyel ve antifungalleri içeren besinler ile yetiştirilmesi sonucunda böceklerin son larva evresine gelişmesinin geciktiği, pupa ve erginlerin oranının azaldığı gözlenmiştir. Benzer etkiler Diptera takımına ait diğer bir böcek *Phryxe caudata* (Rondani) (Diptera: Tachinidae) ile de elde edilmiştir [7]. Bir parazitik hymenopter olan *Micropilis croceipes* Cresson larvaları ile yapılan beslenme çalışmalarında antifungal bir madde olan manganez etilenbisdiyokarbamat'ın 2.600 ppm'lik konsantrasyonu konak böceklerde yetiştirilen parazitik böceğin larvalarının gelişimini önlemiştir [52]. Ülkemizde antibiyotikler ile ilgili başlangıç niteliğinde bir çalışma Büyükgüzel ve Yazgan tarafından yapılmıştır. Çalışmada kimyasal yapısı bilinen sentetik besine ilave edilen penisilin, streptomisin ve rifampisin endoparazitoid hymenopter türü olan *P. turionellae*'nin yaşama oranını düşürdüğü ve gelişimini geciktirdiği belirlenmiştir [11]. Belirtilen çalışmalarda çeşitli takımlara ait böcekler üzerinde denenen farklı etki mekanizmalarına sahip antibakteriyel ve antifungallerin böceklerin biyolojik parametreleri üzerindeki olumsuz etkileri benzer olmuştur. Bu çalışmada anti-

mikrobiyal maddelerden farklı yapı ve etki mekanizmasına sahip antihelmintik triklabendazol *G. mellonella*'nın yaşama oranı ve gelişmesi üzerine benzer olumsuz etki yapmıştır. Olumsuz etkilerin farklı böcek takımlarına ve antibiyotiklerin asıl etki mekanizmalarına göre değişmediği açıkça görülmekte olup triklabendazol de dahil tüm klinik öneme sahip maddelerin böceklerde etki mekanizmaları dışında farklı bir mekanizma ile etkili olduğu düşünülmektedir. Bu düşüncenin doğrulanması için detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Timmermann ve ark.[53] besin bileşimlerinin birbirleri ile veya bunların besin katkı maddeleri ile etkileşiminin besin kalitesini bozduğunu buna bağlı olarak oluşan serbest radikallerin oksidatif etkisinden böceklerin biyolojik ve fizyolojik aktivitelerinin etkilendiğini açıklamışlardır. Cohen ve Crittenden [54] böceklerin biyolojik yaşam parametrelerinin olumsuz etkilenmesinin çoğunlukla serbest radikallerin toksisitesine bağlı olduğunu açıklamışlardır. Bu durumun böceklerin besin tüketim oranını da değiştirdiğini belirtilmiştir. Besinsel olmayan bir katkı maddesi olarak triklabendazol çalışmada kullanılan besinin kalitesini herhangi bir şekilde olumsuz yönde değiştirmiş olabilir. Antihelmintik bir madde olan niklozamid ile *G. mellonella* üzerinde yapılan önceki beslenme çalışması, maddenin böceğin yaşama ve gelişim evrelerindeki olumsuz etkilerinin oksidatif stres ile ilişkili olabileceğini göstermiştir [17]. Triklabendazol ile yürütülen bu çalışmada da olumsuz etkilerin oksidatif stres ile ilişkilendirilebilmesi için ilave deneylere ihtiyaç bulunmaktadır. Diğer taraftan bazı antibiyotikler ile *G. mellonella* üzerinde yapılan çalışmalarda görüşümüzü destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. Büyükgüzel ve Kalender [21-23] tarafından yürütülen böcek beslenmesi çalışmalarında insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerden penisilin ve streptomisin *G. mellonella*'nın yaşama, gelişme, vücut ağırlığı ve total protein miktarını etkilediği ortaya çıkarılmıştır. Etkiler böceğin gelişme evreleri ile denenen antibiyotiklerin türü, yapısı ve besinsel konsantrasyonuna göre değişmiştir. Çalışmalarda ayrıca antibiyotiklerin böceğin biyolojisi üzerine olan olumsuz etkileri ile ilişkili olarak *G. mellonella* larvalarının orta bağırsağında lipid peroksidasyonu ürünü malondialdehit (MDA) miktarı ve antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), GST, glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerinin böceğin larval evrelerine (3-7 evreler) göre değiştiği belirlenmiştir [21,22].

Triklabendazol geniş spektrumlu, sentetik bir antihelmintik ilaçtır. İnsan ve hayvanlardaki parazitler enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Triklabendazolun çeşitli helmint türlerinde yumurta ölümüne neden olduğu ve açılmasını engellediği bilinmektedir. Bu antihelmintik madde duyarlı helmintlerin hücrelerinde tübülün alt birimine bağlanarak mikrotübüller halinde polimerizasyonunu inhibe eder. Mikrotübüllerin kaybı glukoz alımını ve ATP yapımını azaltır ve glikojen rezervlerini tüketir. Parazitler ATP üretimi için yeterli enerji kaynağına

sahip olamaz ve çoğalamazlar veya canlılıklarını kaybederler^[55]. Tübülün memeli konakların hücrelerinde de bulunmasına rağmen benzimidazoller parazit tübülünlerine yüz kat daha fazla afinite ile bağlanırlar. Bu nedenle memeli hücrelerine toksisiteyi minimal düzeydedir. Triklabendazolun *G. mellonella*'nın yaşama ve gelişmesi üzerinde olumsuz etki göstermesi tarımsal zararlı böceklerin mücadelesi açısından değerlendirildiğinde ümit verici bir sonuçtur. Ayrıca triklabendazolun parazit tübülünlerine memeli konak organizmalarına göre yüz kat daha fazla ilgi ile bağlanması sebebiyle insan dahil hedef olmayan organizmalara etkilerinin düşük olabileceğini göstermektedir. Buna karşılık model olarak üzerinde çalıştığımız zararlı böcek ile mücadelede kullanılan kimyasallar ve zararlı böceklerin kontrolünde yaygın kullanılan organofosfatlı insektisitler omurgasızlardan omurgalılarına kadar tüm hayvanlar için ortak olan sinir sistemini bozarak etki göstermektedir^[18]. Triklabendazolun böceklerdeki metabolizması bilinmemekte olup muhtemelen memelilerdeki metabolitleri olan triklabendazol sülfoksit ve triklabendazol sülfon veya sindirim kanalındaki oksidasyon ürünleri ile^[39,40] böcekte etkisini gösterebilir. Ancak konunun aydınlatılabilmesi için ilave çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Triklabendazolun *G. mellonella*'nın biyolojisine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, böceğin yaşama oranı ve gelişme süresinin olumsuz etkilendiği tespit edildi. Yaşamsal parametrelerin triklabendazolun insektisit olarak kullanılabilirliğinin incelenmesinde önemli kriterler olduğu anlaşılmıştır. Larval evrede alınan besinin larva sonrası evrelerde ve özellikle erginlerde biyolojik ve fizyolojik özellikleri etkilediği göz önüne alındığında besinle alınan triklabendazolun yüksek konsantrasyonlarda böceğin biyolojik özelliklerini olumsuz etkilemesi normaldir. Ancak besinsel etkileşim dışında hangi mekanizmayla olumsuz etki gösterdiğini saptamak amacıyla ilave çalışmalar yapılmalıdır. Diğer yandan triklabendazol asıl etkisini parazit hücrelerinde mikrotübül polimerizasyonunu inhibe ederek gösterdiği için hedef olmayan insan dahil yüksek organizasyonlu ökaryotik canlılarda benzer etki mekanizmasını göstermesi ihtimali düşüktür. Böyle bir durumda antihelmintiklerin asıl etki mekanizmaları dışında başka bir etki mekanizması ile böcekler üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Besinlere antimikrobiyal maddeler ilave edilerek yapılan daha önceki çalışmalar^[16,22,56] bu maddelerin böceğin yaşama ve gelişmesi üzerindeki asıl etkilerinin belirlenmesinde böceklerin farklı evrelerindeki bireylerin dokularında biyokimyasal analizlerinin yapılması ve fizyolojik değişimlerin ortaya konulmasının gerektiğini ortaya çıkarmıştır.

TEŞEKKÜR

Laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Ahmet Erdoğan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu'ndan Yrd. Doç. Dr. Meltem ERDEM'e ve bir grup lisans öğrencimize, ayrıca triklabendazolun bir miktarını bizlere temin eden Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A. Ş. (Maslak, İstanbul)'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- 1. Yazgan Ş:** A chemically-defined synthetic diet and larval nutritional requirements of the endoparasitoid *Itopectis conquisitor* (Hymenoptera). *J Insect Physiol*, 18, 2123-2141, 1972. DOI: 10.1016/0022-1910(72)90244-2
- 2. Yazgan Ş:** A meridic diet and quantitative effects of tween 80, fatty acid mixtures and inorganic salts on development and survival of the endoparasitoid *Pimpla turionellae*. *Z Angew Entomol*, 91, 433-441, 1981. DOI: 10.1111/j.1439-0418.1981.tb04501.x
- 3. Kulkarni N, Kushwaha DK, Mishara VK, Paunekar S:** Effect of economical modification in artificial diet of Greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Indian J Entomol*, 74 (4): 369-374, 2012.
- 4. Singh P, House HL:** Antimicrobials safe levels in a synthetic diet of an insect, *Agria affinis*. *J Insect Physiol*, 16, 1769-1782, 1970. DOI: 10.1016/0022-1910(70)90275-1
- 5. Singh P, House HL:** Effects of streptomycin and potassium sorbate levels 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. Singh P, House HL:** Antimicrobial agents: Their detrimental effects on size of an insect, *Agria affinis*. *Can Entomol*, 102, 1340-1344, 1970. DOI: 10.4039/Ent1021340-10
- 7. Grenier S:** Effects nocif de la nipagine M. sur le parasite *Phryxe caudata* [Dipt.: Tachinidae]. *Entomophaga*, 22, 223-236, 1977. DOI: 10.1007/BF02377847
- 8. Thompson SN:** Nutrition and *In vitro* culture of insect parasitoids. *Ann Rev Entomol*, 31, 197-220, 1986. DOI: 10.1146/annurev.en.31.010186.001213
- 9. Xie ZN, Nettles Jr CW, Morrison RK, Irie K, Vinson SB:** Three methods for the *In vitro* culture of *Trichogramma pretiosum* Riley. *J Entomol Sci*, 21 (2): 133-138, 1986.
- 10. Rotundo G, Cavalloro R, Tremblay E:** *In vitro* rearing of *Lysiphlebus fabarum* (Hym.: Braconidae). *Entomophaga*, 33, 261-267, 1988. DOI: 10.1007/BF02372615
- 11. Büyükgüzel K, Yazgan Ş:** Bazı antibiyotiklerin endoparazitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)'nın yaşama ve gelişimine etkileri. *Türk J Zool*, 20, 1-7, 1996.
- 12. Büyükgüzel K, Yazgan Ş:** Combinational effects of some antimicrobial agents on the survival and development of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Commun Fac Sci Univ Ank (Séries C.)*, 48, 1-14, 1999. DOI: 10.1501/Commuc_0000000090
- 13. Büyükgüzel K:** Positive effects of some gyrase inhibitors on survival and development of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) larvae reared on an artificial diet. *J Econ Entomol*, 94 (1): 21-26, 2001. DOI: 10.1603/0022-0493-94.1.21
- 14. Büyükgüzel K:** DNA gyrase inhibitors: Novobiocin enhances the survival of *Pimpla turionellae* larvae reared on an artificial diet but other antibiotics do not. *J Appl Entomol*, 125, 583-587, 2001. DOI: 10.1046/j.1439-0418.2001.00585.x
- 15. Büyükgüzel K:** Antimicrobial agents: Their combined effects on total protein content of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Türk J Zool*, 26, 229-237, 2002.
- 16. 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 Entomol Sci*, 39, 108-116, 2004.
- 17. Büyükgüzel E, Kayaoğlu S:** The effect of niclosamide on some biological and physiological aspects of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Türk Entomol Derg*, 38 (1): 83-99, 2014.
- 18. Charriere JD, Imdorf A:** Protection of honey combs from moth damage. Swiss Bee Research Center Federal Dairy Research Station. *Comm*, 24, 1-14, 1997.
- 19. Jarosz J:** Use of oxytetracycline-nystatin combination in obtaining germ-free larvae of *Galleria mellonella* for gnotobiotic studies. *Cytobios*, 32, 107-120, 1981.
- 20. 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

- 21. 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
- 22. Büyükgüzel E, Kalender Y:** *Galleria mellonella* survivorship, development and protein content in response to dietary antibiotics. *J Entomol Sci*, 43, 27-40, 2008.
- 23. Büyükgüzel E, Kalender Y:** Exposure to streptomycin alters oxidative and antioxidative response in larval midgut tissues of *Galleria mellonella*. *Pest Biochem Physiol*, 94, 112-118, 2009. DOI: 10.1016/j.pestbp.2009.04.008
- 24. Mukherjee K, Raju R, Fischer R, Vilcinskis A:** *Galleria mellonella* as a model host to study gut microbe homeostasis and brain infection by the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 135, 27-39, 2013. DOI: 10.1007/10_2013_203
- 25. Kuhlmann I:** The prophylactic use of antibiotics in cell culture. *Cytotechnology*, 19, 95-105, 1996. DOI: 10.1007/BF00749764
- 26. Alverson J, Cohen AC:** Effect of antifungal agents on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). *J Econ Entomol*, 95, 256-260, 2002. DOI: 10.1603/0022-0493-95.2.256
- 27. Ruan YM, Xu J, Liu SS:** Effects of antibiotics on fitness of the B. biotype and a non-B. biotype of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Entomol Exp Appl*, 121, 159-166, 2006. DOI: 10.1111/j.1570-8703.2006.00466.x
- 28. Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schellenbaum M, Von Orelli M, Sarasin G:** Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet Rec*, 113, 315-317, 1983. DOI: 10.1136/vr.113.14.315
- 29. Fisher MA, Jacobs DE, Hutchinson MJ, Abbott EM:** Efficacy of fenbendazole and piperazine against developing stages of *Toxocara* and *Toxascaris* in dogs. *Vet Rec*, 132, 473-475, 1993. DOI: 10.1136/vr.132.19.473
- 30. Calvopina M, Guderian RH, Paredes W, Cooper PJ:** Comparison of two single day regimens of triclabendazole for the treatment of human pulmonary paragonimiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 97, 451-454, 2003. DOI: 10.1016/S0035-9203(03)90088-5
- 31. Keiser J, Engels D, Büscher G, Utzinger J:** Triclabendazole for the treatment of fascioliasis and paragonimiasis. *Expert Opin Investig Drugs*, 14, 1513-1526, 2005. DOI: 10.1517/13543784.14.12.1513
- 32. McKellar QA, Scott EW:** The benzimidazole anthelmintic agents - A review. *J Vet Pharmacol Ther*, 13, 223-247, 1990. DOI: 10.1111/j.1365-2885.1990.tb00773.x
- 33. Lubega GW, Prichard RK:** Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin from developing stages of thiabendazole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *Biochem Pharmacol* 41, 93-101, 1991.
- 34. Martin RJ:** Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J*, 154, 11-34, 1997. DOI: 10.1016/S1090-0233(05)80005-X
- 35. Lacey E, Brady RL, Prichard RK, Watson TR:** Comparison of inhibition of polymerisation of mammalian tubulin and helminth ovidical activity by benzimidazole carbamates. *Vet Parasitol*, 23, 105-119, 1987. DOI: 10.1016/0304-4017(87)90029-X
- 36. Shompole S, Yao C, Cheng X, Knox D, Johnson S, Jasmer DP:** Distinct characteristics of two intestinal protein compartments discriminated by using fenbendazole and a benzimidazole resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Exp Parasitol*, 101, 200-209, 2002. DOI: 10.1016/S0014-4894(02)00135-2
- 37. Schmidt J:** Effects of benzimidazole anthelmintics as microtubule-active drugs on the synthesis and transport of surface glycoconjugates in *Hymenolepis microstoma*, *Echinostoma caproni*, and *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*, 84, 362-368, 1998. DOI: 10.1007/s004360050411
- 38. Cumino AC, Elissondo MC, Denegri GM:** Flubendazole interferes with a wide spectrum of cell homeostatic mechanisms in *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasitol Int*, 58, 270-277, 2009. DOI: 10.1016/j.parint.2009.03.005
- 39. Apt W, Aguilera X, Vega F, Miranda C, Zulantay I, Perez C, Gabor M, Apt P:** Treatment of human chronic fascioliasis with triclabendazole: Drug efficacy and serologic response. *Am J Trop Med Hyg*, 19, 532-535, 1995.
- 40. Sanyal PK:** Pharmacokinetic study of triclabendazole in sheep and goat using a high performance liquid chromatography method. *Indian J Pharmacol*, 22, 200-203, 1994.
- 41. Bronskill J:** A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pralidae). *J Lep Soc*, 15 (2): 102-104, 1961.
- 42. Ortel J:** Accumulation of cd and pb in successive stages of *Galleria mellonella* and metal transfer to the pupal parasitoid *Pimpla turionellae*. *Entomol Exp Appl*, 77, 89-97, 1995. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1995.tb01989.x
- 43. Campos F, Donskov N, Arnason JT, Philogene BJR, Atkinson PM, Werstiuk 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. DOI: 10.1093/jee/83.2.356
- 44. SPSS:** User's Manual. Version 10. SPSS, Chicago, IL., 1997.
- 45. Snedecor GS, Cochran WG:** Statistical Methods. Iowa State University Press, 8th ed., 158-160, Ames, IA. 1989.
- 46. Grenier S, Liu WH :** Antifungals: Mold control and safe levels in artificial media for *Trichogramma* [Hymenoptera: Trichogrammatidae]. *Entomophaga*, 35, 283-291, 1990. DOI: 10.1007/BF02374804
- 47. 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.
- 48. Slansky JrF, Scriber JM:** Food consumption and utilization. In, Kerkut GA, Gilbert LI (Eds): *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 87-163, Pergamon Press, Oxford, 1985.
- 49. Nielsen SA, Toft S:** Responses of a detoxification enzyme to diet quality in the wolf spider. In, Toft S, Scharff N (Eds): *Pardosa Prativaga*. European Arachnolog. 65-70, Aarhus University Press, Aarhus, 2002.
- 50. Clark AG, Dick GL, Martindale SM, Smith JN:** Glutathione s-transferases from the New Zealand grass grub. *Costelytra zealandica*. *Insect Biochem*, 15, 35-44, 1985. DOI: 10.1016/0020-1790(85)90041-1
- 51. Costa HS, Thomas JH, Nick CT:** Effect of antibacterial materials on *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) oviposition, growth, survival and sex ratio. *J Econ Entomol*, 90, 333-339, 1997. DOI: 10.1093/jee/90.2.333
- 52. Felton GW, Dahlman DL:** Nontarget effect of a fungicide: Toxicity of Maneb to the parasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *J Econ Entomol*, 77, 847-850, 1984. DOI: 10.1093/jee/77.4.847
- 53. Timmermann SE, Zangerl AR, Berenbaum MR:** Ascorbic and uric acid responses to xanthotoxin ingestion in a generalist and specialist caterpillar. *Arch Insect Biochem Physiol*, 42, 26-36, 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6327(199909)42:1<26::AID-ARCH4>3.0.CO;2-G
- 54. Cohen AC, Crittenden P:** Deliberately added and cryptic antioxidants in three artificial diets for insects. *J Econ Entomol*, 97, 265-272, 2004. DOI: 10.1093/jee/97.2.265
- 55. Diniyanti L, Syahril P, Panusunan L:** Current status of the efficacy and effectiveness of albendazole and mebendazole for the treatment of *Ascaris lumbricoides* in North-Western Indonesia. *Asian Pac J Trop Med*, 5, 605-609, 2012. DOI: 10.1016/S1995-7645(12)60125-4
- 56. Eid MAA, El-Nakkadi AN, Saleh MA:** Functional adaptation of silk glands after administration of antibiotic to larvae of *Philosamia ricini* (Boisd). *Insect Sci Appl*, 10, 139-143, 1989.