



## Piperazinin *Galleria mellonella*'nın Yaşama ve Gelişimi Üzerine Etkisi

### *The Effect of Piperazine on Survivorship and Development of Galleria mellonella*

Nur Emine Sefer<sup>1\*</sup> , Kemal Büyükgüzel<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Zonguldak İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Zonguldak, Türkiye

<sup>2</sup>Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak, Türkiye

### Öz

Piperazin hayvanların parazit enfeksiyonlarında antihelmintik bir ilaç olarak kullanılır. Heksahidropirazin grubu bir antihelmintik olan piperazin heksahidratın farklı besinsel konsantrasyonlarının Büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarının ergin evreye kadar yaşama oranına ve gelişme süresine etkisi incelendi. Birinci evre larvaları farklı konsantrasyonlarda piperazin (% 0,001, 0,01, 0,1 ve 1) içeren yapay besinlerde erginleşinceye kadar yetiştirildi. Piperazin heksahidratın tüm besinsel konsantrasyonları larval evrede (7. evre) ve larva sonrası evrelerde (pup ve ergin evreler) yaşama oranını önemli derecede düşürdü. Kontrol besininde larvaların % 98,75±1,08'i 7. evreye ulaşırken bu larvaların % 90,00±2,5'i pup evresine, % 83,75±3,24'ü ise ergin evreye ulaştı. Piperazinin en yüksek konsantrasyonunu içeren besin 7. evreye ulaşan larvaların oranını % 26,25±5,96'ya, pup olma oranını % 21,25±5,69'a, ergin olma oranını ise % 20,00±6,37'ye önemli derecede düşürdü. Bu antihelmintik maddenin düşük konsantrasyonlarını içeren besinler ile beslenen larvaların 7. larval evreye ulaşma süreleri ve pup olma sürelerinin istatistiksel olarak etkilenmediği belirlendi. Buna karşılık ergin evreye ulaşma süresi piperazin heksahidratın %0,1'lik konsantrasyonundan itibaren önemli derecede uzadı. Besine ilave edilen en yüksek piperazin konsantrasyonu (% 1) böceğin birinci larval evreden ergin evreye kadar tüm gelişimini önemli derecede geciktirdi. Piperazinin bu konsantrasyonu ergin olma süresini 37,66±0,77 günden 41,32±2,31 güne ortalama 4 gün önemli derecede uzatmıştır. Piperazin insan ve diğer hedef olmayan organizmalara karşı düşük akut toksisiteye sahip olduğundan, konsantrasyonlarının iyi ayarlanması ile insektisit olarak kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Galleria mellonella*, Piperazin, Yaşama oranı, Beslenme

### Abstract

Piperazine is used in animal parasitic infection as an anthelmintic drug. The effects of different dietary concentrations of piperazine, which is belonging to hexahydropirazine compound, on survivorship and developmental time throughout adult emergence of Greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvae were investigated. First instar larvae were reared on diets containing different concentrations of piperazine (0.001, 0.01, 0.1 ve 1 %) to adult emergence. All dietary concentration of piperazine significantly decreased survivorship on larval (7th-instar) and postlarval stages (pupa and adults). Control diet produced 7th instars of 98.75±1.08 %, pupae of 90.00 %±2.5, and adults of 83.75±3.24 %. The diet with the highest concentration of piperazine hexahydrate significantly decreased the survivorship of 7th instars to 26.25±5.96 %, pupation to 21.25±5.69 % and adult emergence to 20.00±6.37 %. It was recorded that the diets with low concentrations of this anthelmintic had no significant effects on developmental time to 7th instar and pupation. However, developmental time to adult emergence was significantly prolonged by 0.1 % of piperazine. The highest concentration of piperazine (1 %) resulted in significant increase in whole developmental time from first instar to adult emergence. This concentration of piperazine significantly prolonged adult developmental time from 37.66±0.77 to 41.32±2.31 days by approximately 4 days. Because of relatively low acute toxicity of piperazine to human and other animals as nontarget organisms

**Keywords:** *Galleria mellonella*, piperazine, survivorship, nutrition


### 1. Giriş

Bal arısı kovanlarının önemli bir zararlısı olan *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvaları kovanlarda

bal peteği, mum ve bal gibi kovan ürünleri ile beslenerek önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Charriere ve Imdorf 1997). Zararlı böcekler ile mücadelede etkin ve çevreye duyarlı yeni kimyasal mücadele yöntemlerinin araştırılması ve geliştirilmesi son derece önemlidir. Ayrıca tarım zararlısı böcekler ile mücadelede, böceklerin fizyolojisi, biyokimyası ve beslenme ekolojilerinin detaylı olarak

\*Sorumlu yazarın e-posta adresi: eminesefer67@hotmail.com

Nur Emine Sefer  [orcid.org/0000-0002-7063-3394](https://orcid.org/0000-0002-7063-3394)

Kemal Büyükgüzel  [orcid.org/0000-0002-6959-8480](https://orcid.org/0000-0002-6959-8480)

bilinmesi gerekmektedir. Son zamanlarda model organizma olarak *G. mellonella* üzerinde çeşitli antibiyotiklerin, antihelmintiklerin ve antiviral ilaçların etkileri yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Bu çalışmalarda öncelikle denenen antihelmintik antibiyotiklerin böceğin biyolojik özellikleri üzerine, daha sonrasında ise böceğin çeşitli evrelerdeki bireylerin farklı dokularındaki oksidatif ve antioksidatif düzeyine etkisi çalışılmıştır (Büyükgüzel ve Kayaoğlu 2014). Böylece antihelmintiklerin yaşama ve gelişme üzerindeki etkilerinin mekanizması hakkında yeni bilgiler ortaya konulmaya gayret edilmektedir.

Diğer taraftan yapay besinler ile laboratuvar şartlarında yürütülen böcek yetiştirme ve beslenme çalışmaları esnasında önemli bir sorun olarak mikrobiyal kontaminasyonlara sıklıkla rastlanmaktadır. Bu besinler kimyasal ve besinsel içeriğinin zengin olmasından dolayı mikrobiyal etkenlerin çoğalması ve gelişmesi için oldukça uygun ortamlardır (Yazgan 1972, 1981, Kulkarni vd. 2012). Konak organizmaya toksik özelliği düşük olan antihelmintiklerin aynı zamanda antimikrobiyal etkisi sayesinde (Lingala vd. 2011, Ndhala vd. 2015) mikrobiyal kontaminasyon sorunu çözülebilirken bu antihelmintiklerin insektisit özellikleri de araştırılmaktadır. Bakteriyel, fungal ve diğer kaynaklı kontaminasyonlar ile mücadele amacıyla laboratuvar şartlarında böcekleri üretmek için kullanılan yapay besinlere katılan antibakteriyel maddelerin kontaminasyonları önledikleri ancak böceklerin yaşamını, gelişimini ve bazı fizyolojik özelliklerini de olumsuz etkiledikleri tespit edilmiştir (Singh ve House 1970a,b,c, Yazgan 1972, Büyükgüzel ve Yazgan 1996, Büyükgüzel and Yazgan 1999, Büyükgüzel 2001a, b, Hız vd. 2016). Antibakteriyel antibiyotikler ile yapılan bu çalışmalar antihelmintik ilaçların böcek üzerindeki etkilerinin de belirlenebileceği yönünde ışık tutmuştur. Bu yaklaşım bu maddelerin aynı zamanda insektisit özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların başlamasını sağlamıştır. Son zamanlarda laboratuvar şartlarında yapılan beslenme çalışmalarında yeni kuşak bazı antibakteriyel (Hamzaoğlu 2012), antifungal (Kastamonuluoğlu 2013), antiprotozoal (Vuran 2012) ve antihelmintik (Büyükgüzel ve Kayaoğlu 2014, Kılıç vd. 2015, Çalık vd. 2016, Sugeçti vd. 2016) antibiyotiklerin böcekler üzerinde olumsuz etkiye sahip oldukları gözlenmiştir.

*G. mellonella* larvaları laboratuvar şartlarında ucuz yapay besinlerde bol miktarda üretilebildiği için fizyoloji, biyokimya ve moleküler biyoloji çalışmalarında model olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyolojik mücadelede kullanılan parazitoid böceklerin yetiştirilmesinde doğal konak böcek olarak kullanılması, insektisit etkinlik denemelerinde, hatta insan ve diğer memelilerde hastalık

yapan mikroorganizmaların patojenitesinin (Ramarao vd. 2012) belirlenmesinde yaygın kullanılmasından dolayı önemi gittikçe artmaktadır. Ayrıca bu böceğin dahil olduğu ailenin içindeki bir çok türün depolanmış ürün zararlısı olmaları açısından tarımsal olarak da önemlidirler. Antihelmintikler ile ilgili çalışmalar insan parazitlerinin üzerindeki öldürücü etkisine ve etki mekanizmasının aydınlatmasına yöneliktir. Antihelmintiklerin böcekler üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalar henüz yeni olup oldukça azdır (Kılıç vd. 2015, Çalık vd. 2016).

Piperazin, heksahidropirazin grubu bir antihelmintiktir. İnsan ve hayvanların parazitler enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Haroz ve Greenberg 2006). Piperazin nematod kaslarında hiperpolarizasyon nedeniyle GABA (gamma aminobutirik asit) reseptörünü aktive eden ve bir GABA inhibitörüdür. Böylece GABA'nın etkisini inhibe ederek parazitin paralizine eden olur (Martin, 1982, Martin, 1985, Hondebrink vd. 2015). Piperazin için çeşitli etki mekanizmaları tarif edilmiştir. Asetilkolini (ACH) hidrolize eden bir enzim olan asetilkolinesterazın tersinir inhibitörü gibi etki etmektedir. AChE inhibisyonu kitlesel parazitlerin hareketliliğini bozar. Piperazin bağırsak parazitlerinde farklı bir mekanizma ile (Süksinat asit metabolizmasını inhibe etmektedir) enerji metabolizmasını bozmaktadır.

Bu bilgilerin ışığında değerlendirildiğinde klinik öneme sahip piperazinin böcekler üzerindeki etkisine yönelik çalışma yapılmadığı görülmüştür. Bu çalışmada, bu antihelmintik maddenin omurgasızların önemli bir grubu olan ökaryotik bir organizmadaki etkisinin araştırılmasının yanında ayrıca zararlı böceklerin mücadelesinde insektisit olarak kullanımının incelenmesi önemli olacaktır. Piperazinin tercih edilmesinin nedeni bu antibiyotığın memelilerde parazitlerin tedavisinde güvenilir olarak en az yan etki ile kullanılması ve bu özelliği sayesinde hedef olmayan canlılara başta insan ve diğer omurgalı hayvanlara toksisitesinin minimum olacağına düşünülmesidir. Bu çalışmada, *G. mellonella* larvaları bu maddeyi içeren besinlerde ergin evreye kadar beslenerek böceğin yaşama oranı ve gelişme süresindeki değişimler belirlendi.

## 2. Gereç ve Yöntem

### 2.1. Böcek Kültürü

Bırakılan yumurtalardan serbest kalan *G. mellonella* birinci evre larvaları laboratuvar ortamında yapay besin ile beslenerek erginleşen bireyler böcek kültürünün devamı için kullanıldı. Böcekler inkübatörde (Nüve, ES 500) 28±2 °C sıcaklık ve % 65±5 bağıl nemde yetiştirildi. Yaşama ve gelişme ile

ilgili deneylerde yumurtadan yeni çıkmış birinci evre larvaları kullanıldı.

*G. mellonella* larvalarını beslemek ve yetiştirmek amacıyla yapay besin kullanıldı. Bu 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 (Bronskill 1961). Bu 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 (Ortel 1995). Kavanozlardaki besinlerin üzerine 5-10 adet dişi bırakılarak kavanozların ağızları tel kafes içeren kapak ile kapatıldı. Gelişimlerini normal tamamlayan 7. evre larvaları alınarak pup olmalarını sağlamak için başka bir kavanoza bırakıldı. Larvalara kuru bir ortam sağlamak üzere pelur kağıt parçaları katlanarak kavanozun içine bırakıldı (Campos vd. 1990). Pupa olan bireyler gözlemlendi ve bu puplardan erginleşen bireyler alındı. Stok böcek kültürünün devamı bu erginlerin bir bölümü ile sağlandı. Diğer erginler ise piperazin ile ilgili beslenme deneylerinde kullanılacak larvaları elde etmek için ayrıldı.

## 2.2. Piperazin ile İlgili Beslenme Deneyleri

Stok kültürden erginleşen sağlıklı ve iyi görünümlü dişiler 30 ml'lik geniş ağızlı, vida kapaklı bir plastik kabın (ORLAB, L190030, 35x55 mm, İstanbul, Türkiye) içine yumurta bırakması için aktarıldı. Belirli süre (1-3 gün) içerisinde bırakılan yumurtaların açılması için kaplar  $28 \pm 2$  °C ve %65  $\pm$  5 bağıl nemde bekletildi. Laboratuvarında gerçekleştirilen beslenme deneylerinde bu yumurtaların açılması ile serbest kalan larvalar kullanıldı. Açılan larvalar tel kafes kapaklı cam kavanozların (60x120mm) içindeki yaklaşık 200 g besinin üzerine bırakıldı. Larvaların kavanozlardaki besinlere aktarılmasında zarar görmemeleri için yumuşak uçlu bir fırça (No: 0, Goya Toray) kullanıldı.

Hekzahidropirazin grubu bir antihelmintik olan piperazin heksahidratın (1,4-Diyazasikloheksan, Dietildiamin, suda çözünebilir,  $C_4H_{10}N_2$ , % 99, molekül ağırlığı 86.136 g/mol, Sigma-Aldrich Co. LLC. St. Louis, Missouri, United States)'ın beslenme deneylerinde denenen miktarları 100 gram besine katılacak gram miktar (% a/a) olarak belirlendi. Bu antihelmintik madde besin hazırlanırken doğrudan ilave edildi. Piperazin içermeyen kontrol besini ve piperazinin % 0,001, 0,01 ve 0,1 ve 1'ini içeren besinler olmak üzere beş besin denendi. Bu çalışmada denenen piperazin

konsantrasyonları *G. mellonella* (Büyükgüzel ve Kalender 2007, 2008, 2009) üzerinde antibiyotiklerin etkisinin araştırıldığı önceki çalışmalara göre tespit edildi. Ayrıca daha önce antihelmintikler niklozamid (Büyükgüzel ve Kayaoğlu 2014) ve triklobendazol (Kılıç vd. 2015) ile ilgili yapılan çalışmalar da değerlendirildi. Bu çalışmalardan yola çıkarak öncelikle denenecek konsantrasyonların aralığını belirlemek amacıyla ön beslenme deneyleri yürütüldü. Bunun için en düşük % 0,001 ve en yüksek % 2 aralığında farklı konsantrasyonlarda piperazin besinlere ilave edilerek yaşama ve gelişme 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.

Antihelmintik maddenin konsantrasyonlarını içeren her bir besin ve kontrol besini için 20 adet birinci evre larvası bu besinlere bırakıldı ve her deney dört defa tekrar edildi. Yedinci (7. evre) evreye ulaşan larvalar besinden alınarak pup olmaları için içlerinde katlanmış, ince pelur kağıt bulunan 30 ml'lik plastik örnek kaplarına (ORLAB, L190030, 35x55 mm, İstanbul, Türkiye) teker teker bırakıldı. Kavanozlara pelur kağıtlar larvaların pup olmaları için kuru ortam sağlamak amacıyla konuldu. Piperazinin farklı konsantrasyonlarını içeren besinlerdeki *G. mellonella*'nın 7. larval evre, pup ve ergin evredeki yaşama oranları ve bu evrelere ulaşmak için geçen ortalama süre (gün) belirlendi. Gelişme süresi ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde, tek yönlü "Varyans Analizi" (SPSS 1997) testi yapıldı. Ortalamalar arasındaki farkın önemini saptamak için "LSD Testi" (SPSS 1997) uygulandı. Yaşama ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde ise " $\chi^2$  (Chi square) Testi" (Snedecor ve Cochran 1989) kullanıldı. 0,05 olasılık düzeyinde ortalamaların önemi incelendi.

## 3. Bulgular

Piperazinin tüm besinsel konsantrasyonları larval evrede (7.evre) ve larva sonrası evrelerde (pup ve ergin evreler) yaşayan bireylerin yüzdesini önemli derecede düşürdü. Bu antihelmintik maddenin larval yaşama oranındaki olumsuz etkisi sırasıyla pup ve ergin evreye doğru daha da artmış olup, piperazinin en düşük besinsel konsantrasyonu ergin evrede yaşayan bireylerin yüzdesini %18 oranında önemli derecede azalttı. Piperazinin yüksek konsantrasyonları 7. evreye ulaşma süresini uzatmış olup bu antihelmintik maddenin en yüksek konsantrasyonu (%1) larval gelişme süresini istatistiksel olarak önemli derecede uzattı. Benzer etki pup olma süresinde de kaydedildi. Gelişme süresine en olumsuz etki piperazinin denenen yüksek konsantrasyonları

(% 0,1 ve 1) tarafından ergin evreye ulaşma süresi üzerinde de yapıldı.

Kontrol besininde larvaların % 98,75±1,08'i 7. evreye ulaşırken bu larvaların % 90,00±2,5'i pup evresine, % 83,75±3,24'ü ise ergin evreye ulaştı. Bu besine 0,001 gr (% 0,001) piperazin ilave edildiğinde 7. evreye ulaşan larva oranını % 82,50±3,75'e önemli derecede düşürdü. Bu besinde pupa ve ergin olma oranı da önemli derecede düşmüş olup pup oranı % 90,00±2,5'den % 71,25±4,8'e, ergin olma oranı da % 83,75±3,2'den % 65,00±3,06'ya önemli derecede azaldı (Çizelge 1). Besindeki piperazin miktarı % 0,01 oranına artırıldığında 7. evreye ulaşan larva oranını % 83,75±1,08'e düşürürken, pup olma oranını % 61,25±4,09'e, ergin olma oranını ise % 57,50±5,44'e düşürdü. Piperazinin % 0,1'ini içeren besinde beslenen larvalar kontrol besinine göre % 27'lik bir azalma ile % 71,25±9,41 oranında 7. evreye ulaştı. Bu besin ile larva sonrası evrelerde de yaşama oranı üzerinde benzer sonuçlar elde edildi. Bu besinle beslenen larvaların % 50,25±10,36'ı pup % 50'si ergin oldu. Piperazinin en yüksek konsantrasyonunu içeren besin 7. evreye ulaşan larvaların oranını % 26,25±5,96'ya, pup olma oranını % 21,25±5,69'a, ergin olma oranını ise % 20,00±6,37'ye düşürdü.

Piperazin içermeyen kontrol besini ile beslenen birinci evre larvaları 22,27±0,28 günde 7. evreye, 29,43±0,34 günde pupa evresine, 37,66±0,77 günde ise ergin evreye ulaştı. Kontrol besini ile beslenen larvalar ile kıyaslandığında bu antihelmintik maddenin en yüksek konsantrasyonu dışında, düşük konsantrasyonlarını içeren besinler ile beslenen larvaların 7. larval evreye ulaşma süreleri ve pup olma süreleri istatistiksel olarak etkilenmedi. Buna karşılık ergin evreye ulaşma süresi piperazinin % 0,1'lik konsantrasyonundan itibaren önemli derecede uzatıldı (Çizelge 1). Piperazinin düşük konsantrasyonlarını içeren besinler (% 0,001 ve 0,01) 7. larval evreye, pup ve ergin evrelere ulaşma süresi üzerinde önemli etki yapmadı. Besine % 0,1 oranında piperazin

ilave edildiğinde 7. evreye ulaşma süresi ve pup evresine ulaşma süresi ortalama 2 gün uzadı, ancak kontrol grubu ile önemli bir fark oluşmadı. Bu besin birinci evre larvalarının erginleşme süresini 37,66±0,77 günden 42,76±2,35 güne istatistiksel olarak önemli derecede uzatmış olup bu larvalar ortalama 5 gün daha geç ergin evreye ulaşmıştır. Besine ilave edilen en yüksek piperazin konsantrasyonu böceğin birinci larval evreden ergin evreye kadar tüm gelişimini önemli derecede geciktirdi. Piperazinin bu konsantrasyonu 7. evreye ulaşma süresini 22,27±0,28 günden 27,49±2,28 güne ortalama 5 gün, pup olma süresini 29,43±0,34 günden 33,01 güne ortalama 4 gün, ergin olma süresini ise 37,66±0,77 günden 41,32±2,31 güne ortalama 4 gün önemli derecede uzattı.

#### 4. Tartışma

Bu çalışmada piperazinin *G. mellonella*'nın ergin evreye kadar yaşam ve gelişimi üzerindeki etkisinin böceğin gelişme evrelerine ve denenen anthelmintik maddenin besinsel konsantrasyonlarına göre değiştiği açıkça gösterilmiştir. Piperazinin besinsel yüksek miktarları *G. mellonella* larvalarının ergin evreye doğru yaşama oranını düşürmüş, gelişme süresini ise yalnızca en yüksek miktarı önemli derecede uzatmıştır. Daha önce denenen bazı geleneksel ve yeni kuşak antibiyotik maddeler *G. mellonella* üzerinde piperazinin etkisine benzer etkiler göstermiştir. Bazı yumurta parazitoidleri (*Trichogramma* türleri) ile yapılan benzer araştırmalar besin ortamlarına küf ve mantar kontaminasyonunu önlemek için ilave edilen nistatin, sodyum benzoat ve metil *p*-hidroksibenzoat gibi bazı geleneksel antifungallerin böceğin ölüm oranını artırdığını göstermiştir (Xie vd. 1986, Grenier ve Liu 1990, 1991). Bu çalışmada benzer şekilde, piperazinin yüksek konsantrasyonları *G. mellonella*'nın tüm gelişme evrelerindeki yaşama oranını düşürmüş ve gelişme süresini uzatmıştır. Piperazinin besinin kimyasal ve fiziksel bileşimini etkilemesi ve bunun sonucunda besinsel kaliteyi

**Çizelge 1.** Piperazinin *G. mellonella* larvalarının yaşama oranı ve gelişme süresine etkisi.

Piperazin (g/100g)	7. evreye ulaşan larva oranı (%) (Ort±S.H) <sup>†</sup>	7. evreye ulaşma süresi (gün) (Ort±S.H) <sup>†</sup>	Pup olma oranı (%) (Ort±S.H) <sup>†</sup>	Pup olma süresi (gün) (Ort±S.H) <sup>†</sup>	Ergin olma oranı (%) (Ort±S.H) <sup>†</sup>	Ergin olma süresi (gün) (Ort±S.H) <sup>†</sup>
0,000 <sup>§</sup>	98,75±1,08a	22,27±0,28a	90,00±2,5a	29,43±0,34a	83,75±3,24a	37,66±0,77a
0,001	82,50±3,75b	22,58±0,61a	71,25±4,8b	28,60±0,72a	65,00±3,06b	37,47±0,78a
0,01	83,75±1,08b	21,81±1,38a	61,25±4,09bc	31,22±1,04ab	57,50±5,44b	39,60±1,27ab
0,1	71,25±9,41b	24,35±1,04ab	56,25±10,36c	31,52±1,08ab	50,00±12,11b	42,76±2,35b
1	26,25±5,96c	27,49±2,28b	21,25±5,69d	33,01±2,75b	20,00±6,37c	41,32±2,31b

<sup>†</sup>Dört tekrarın ortalaması, her bir tekrar için 20 larva kullanıldı.

<sup>†</sup>Aynı sütunda aynı harfi içeren değerler birbirinden farklı değildir,  $P > 0,05$  ( $\chi^2$  testi, LSD Testi).

<sup>§</sup>Kontrol besini (Piperazin içermeyen).

değiştirmesi beklenebilir. Besinsel içeriklerin oranlarının ve dolayısıyla besinsel dengenin değişmesi ile larvaların beslenme davranışı değişmiş olabilir. Bunun sonucunda, larvaların besin alma oranı değişebileceğinden böceğin biyolojik özellikleri olumsuz yönde etkilenmiş olabilir. Bazı araştırmacıların yapay besin ortamlarının yapısının bozulması sonucu besin kalitesinin azalmasının bu besinle yetiştirilen erginlerin biyolojik özelliklerini olumsuz etkilediğini belirtmesi (Slansky ve Scriber 1985) bizim bu konudaki görüşümüzü desteklemektedir. Ayrıca kimyasal yapısı değişmiş doğal besin ile beslenen bir örümcek türü *Pardosa prativaga* (L. Koch)'da antioksidan enzimatik savunmanın zayıfladığı (GST'nin aktivitesinin azaldığı) tespit edilmiştir (Nielsen ve Toft 2002).

Tarımsal bitkilere zarar veren böceklerin büyük bir bölümü Lepidoptera takımına ait böcekler olduğundan bunların laboratuvarında yetiştirilmeleri ve bu amaçla yapay besinlerin geliştirilmesi çalışmaları hız kazanmıştır. Bu böceklerin yapay besinler ile yetiştirilmeleri sırasında mikrobiyal kontaminasyonlara sıkça rastlanıldığından bu durum ancak besinlere çeşitli antimikrobiyal maddelerin ilave edilmesi ile çözülmeye çalışılmıştır (Clark vd. 1985, Costa vd. 1997). Diptera takımına ait olan *Agria affinis* (Fall.) (Diptera: Sarcophagidae)'in farklı antibakteriyel ve antifungal antibiyotikleri içeren besinler ile yetiştirilmesi sonucunda bu böceklerin son larva evresine gelişmesinin geciktiği, pup ve erginlerin oranının azaldığı, vücutlarında yapısal bozukluklar olduğu gözlenmiştir (Singh ve House 1970a, b, c). Benzer etkiler diğer bir Dipter olan böcek *Phryxe caudata* (Rondani) (Diptera: Tachinidae) üzerinde de gözlenmiştir (Grenier 1977). Bu konuda yapılan önemli bir çalışmada kimyasal yapısı bilinen sentetik besine ilave edilen penisilin, streptomisin ve rifampisin hımenopter *P. turionella*'nın yaşama oranını düşürdüğü ve gelişimini geciktirdiği belirlenmiştir (Büyükgüzel ve Yazgan 1996).

Besinsel olmayan bir katkı maddesi olarak bu çalışmada kullanılan piperazin, besinin kalitesini herhangi bir şekilde olumsuz yönde değiştirmiş olabilir. Antihelmintik bir madde olan triklabendazol ile *G. mellonella* üzerinde yapılan önceki bir beslenme çalışması (Kılıç vd. 2015) piperazinin böceğin yaşama ve gelişim evrelerindeki olumsuz etkilerinin besinin kimyasal yapısının değişmesi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Büyükgüzel ve Kalender (2007, 2008, 2009) tarafından yürütülen bir çalışmada insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde kullanılan penisilin ve streptomisin *G. mellonella*'nın yaşama, gelişme, vücut ağırlığı ve total protein miktarını etkilediği gösterilmiştir. Böylece besine ilave edilen antibiyotiklerin etkili oldukları hedef konaklarda asıl etki mekanizmaları farklı olmasına rağmen böceğin yaşama

oranını ve gelişme süresini olumsuz etkilemesi bu antibiyotiklerin besinsel etkisinden ileri gelebileceği düşüncesine destek verilmiştir.

Piperazin kimyasal olarak sekonder amin yapısında olup geniş spektrumlu, sentetik bir antihelmintik ilaçtır. İnsan ve hayvanlardaki paraziter enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Duyarlı helmintlerin hücrelerinde enerji azalmasına neden olur. Parazitler yeterli enerji kaynağına sahip olamaz ve sonuçta çoğalamazlar veya canlılıklarını kaybederler. Piperazin hayvan ve insanların gastrointestinal kanalından hızlıca emilir. İlaç verilmesinden 30 dk gibi kısa bir sürede idrarda belirlenebilir (Austin ve Monasterio 2004). Piperazin parazitlerde sinir hücresi zarlarını hiperpolarize (aşırı uyarama) ederek sinir uyarılarının kaslara geçmesini önler, böylece GABA'nın etkisini inhibe ederek parazitin paralizine eden olur (Martin 1982, 1985, 1997). Aynı zamanda parazitin süksinat üretimini de inhibe eder. Böylece paralize olmuş ve yeterli enerji üretmeyen parazit bağırsak peristaltik hareketleri ile dışarı atılır. Piperazinin temel etki mekanizması azalan süksinat üretimini paraziti paralize etmesi olup, bu durum sinir kas bağlantısından sinir uyarısının geçmesinin önler, aynı zamanda kaslarda aşırı uyarılmaya (hiperpolarizasyon) sebep olarak kas hücrelerinin asetilkoline duyarlılığını artırır (Bueding vd. 1959, Del Castillo vd. 1963, Parvatham ve Veerakumari 2013). Piperazin nematod kaslarında GABA (gamma aminobutirik asit) reseptörünü aktive eden ve GABA reseptör kanal kapılarını açan bir GABA inhibitörüdür. Piperazinin bazı biyolojik etkileri omurgasızlardan bir nematod türü *Caenorhabditis briggsae* (Fiaakpui 1967) ve omurgalılarından kurbağa spinal kordu (Constanti vd. 1976) üzerinde çalışılmış olup bu antihelmintik etkisini nöromusküler bağlantılardaki uyarı iletimini inhibe ettiği gösterilmiştir. *G. mellonella* ile yapılan beslenme çalışmasında piperazin böceğin yaşama oranını oldukça düşürmüş ve yaşayan bireylerin de gelişmesi gecikmiştir. Bu sonuçlar piperazinin *G. mellonella* larvalarının enerji üretimini azalttığı görüşü ile uyumlu olabilir. Böcekler de omurgasızların içinde önemli ökaryotik gruplardır. Piperazinin *G. mellonella*'nın yaşama ve gelişmesi üzerinde olumsuz etki göstermesi tarımsal zararlı böceklerin mücadelesi açısından değerlendirildiğinde ümit verici bir sonuçtur. Bu maddenin böceklerdeki metabolizması bilinmemekte olup muhtemelen memelilerdeki metabolitleri olan veya sindirim kanalındaki oksidasyon ürünleri ile etkisini gösterebilir. Piperazin mide suyunda N-mononitropiperazine dönüştürülmek üzere nitrolanır daha sonra N-nitroso-3-hidroksipirolidine metabolize olur. Piperazin ve piperazin türevi olarak dizayn edilen ilaçların metabolizmasında ilk basamak piperazin halkasının reaktif bir ara ürün oluşturmak üzere altı elektron vererek oksitlen-

mesi, ve bu reaktif ara ürünün glutatyon tarafından konjuge edilmesidir. Bu oksidasyon sırasında piperazin halkası açılır ve daha sonra halka kapanması ile imidazoline dönüşür. Piperazin kökünün metabolik parçalanması sonucunda etilendiamin veya anilin türevleri de görülebilir. Devamında metabolik faz 2 reaksiyonu ile metabolitlerin glukuronidasyonu gerçekleşir. (Maurer vd. 2004, Doss vd. 2005, Arbo vd 2012, Bolleddula vd. 2014). Farklı bireylerde piperazin ve türevlerinin metabolizmasında büyük bir değişkenlik bulunmaktadır, bu değişkenlik bu metabolitlerin toksisitesinin farklı olmasına yol açar (Austin ve Monasterio 2004).

Bu çalışmada piperazinin böceğin yaşama oranı ve gelişme süresini olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Aynı zamanda ergin öncesi yaşamsal parametrelerin piperazinin insektisit olarak kullanılabilirliğinin incelenmesinde önemli kriterler olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ancak ömür uzunluğu, yumurta verimi ve yumurta açılımı gibi bazı ergin özelliklerinin incelenmesi piperazinin etkisinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Bu çalışma aynı zamanda böcek beslenmesi açısından değerlendirildiğinde, böcek besinlerindeki kontaminasyonları önleyen ancak böcek üzerinde etkisiz olan antihelmintik madde miktarının belirlenmesine de öncülük edecektir. Bazı antihelmintiklerin antibakteriyel etkisinin bulunduğu bilinmektedir (Bowden ve Ross 1965, Lingala vd. 2011). Antihelmintiklerin belirtilen bu iki amaç için de düşük miktarlarda kullanılması çevresel etkinin en aza indirilmesi ve hedef olmayan canlıların korunması açısından da oldukça önemlidir. Ancak Kılıç vd. (2015)'nin de diğer bir antihelmintik olan triklabendazol için belirttiği gibi piperazinin besinsel etkileşim dışında hangi mekanizmasıyla böcek üzerinde olumsuz etki gösterdiğini tespit etmek amacıyla başka araştırmalara da gerek duyulmalıdır. Ancak bu çalışmanın devamında bu antihelmintik maddenin insektisit etkinlik testlerinin yapılması ve alan çalışmasının da yapılması gerekmektedir.

## 5. Teşekkür

Piperazin heksahidratın bir miktarını bizlere temin eden Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A. Ş. (Maslak, İstanbul)'e teşekkür ederiz. Bu çalışma "Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: 2016-73769380-02).

## 6. Kaynaklar

- Arbo, M.D., Bastos M.L., Carmo, H.F. 2012. Piperazine compounds as drugs of abuse. *Drug Alcohol Depend.* 22(3):174-85.
- Austin, H., Monasterio, E., 2004. Acute psychosis following ingestion of 'Rapture'. *Australas Psychiatry.* 12: 406-408.

- Bolleddula, J., DeMent, K., Driscoll, J.P., Worboys, P., Brassil P.J., Bourdet, D.L. 2014. Biotransformation and bioactivation reactions of alicyclic amines in drug molecules. *Drug Metab. Rev.* 46 (3): 379-419.
- Bowden, K., Ross, W.J. 1965. A comparison of anthelmintic and antibacterial activity of some phloroglucinol derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* 17(4): 239-242.
- Bronskill, J. 1961. A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pralidae). *J. Lep. Soc.* 15 (2): 102-104.
- Bueding, E., Saz, H.J., Farrow, G.W. 1959. The effect of piperazine on succinate production by *Ascaris lumbricoides*. *Brit. J. Pharmacol.* 14: 497-500.
- Büyüküzgel, E., Kalender, Y. 2007. Penicillin-induced oxidative stress: effects on antioxidative response of midgut tissues in larval instars of *G. mellonella*. *J. Econ. Entomol.* 100: 1533-1541.
- Büyüküzgel, E., Kalender, Y. 2008. *Galleria mellonella* survivors-hip, development and protein content in response to dietary antibiotics. *J. Entomol. Sci.* 43: 27-40.
- Büyüküzgel, E., Kalender, Y. 2009. Exposure to streptomycin alters oxidative and antioxidative response in larval midgut tissues of *Galleria mellonella*. *Pest. Biochem. Physiol.* 94: 112-118.
- Büyüküzgel, E., Kayaoğlu, S. 2014. The effect of niclosamide on some biological and physiological aspects of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Türk Entomol Derg.* 38 (1): 83-99.
- Büyüküzgel, K. 2001a. 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.
- Büyüküzgel, K. 2001b. 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.
- Büyüküzgel, K., Yazgan, Ş. 1996. Bazı Antibiyotiklerin Endoparazitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)'nın yaşama ve Gelişimine Etkileri. *Türk. J. Zool.* 20: 1-7.
- Büyüküzgel, K., Yazgan Ş. 1999. Combinational Effects of Some Antimicrobial Agents on the Survival and Development of the Endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Communications (séries C.)*. 48:1-14.
- Campos, F., Donskov, N., Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Atkinson, P.M., Werstiuk, N.H. 1990. Biological effects and toxicokinetics of DIMBOA in *Diadegma terebrans* (Hymenoptera: Ichneumonidae), an endoparasitoid of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralide). *J. Econ. Entomol.* 83: 356-360.

- Charriere, J.D., Imdorf, A. 1997.** Protection of honeycombs from moth damage. Swiss Bee Research Center Federal Dairy Research Station. *Comm.* 24: 1-14.
- Clark, A.G., Dick, G.L., Martindale, S.M., Smith, J.N. 1985.** Glutathione s-transferases from the New Zealand grass grub. *Costelytra zealandica*. *Insect Biochem.* 15: 35-44.
- Constanti, A., Nistri A. 1976.** A comparative study of the action of g-aminobutyric acid and piperazine on the lobster muscle fibre and the frog spinal cord. *Br. J. Pharmac.* 57: 347-358.
- Costa, H.S., Thomas, J.H., Nick, C.T. 1997.** Effect of antibacterial materials on *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) oviposition, growth, survival and sex ratio. *J. Econ. Entomol.* 90: 333-339.
- Çalık, G., Büyükğüzel, K., Büyükğüzel, E. 2016.** Reduced fitness in adults from larval, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) reared on media amended with the anthelmintic, mebendazole. *J. Econ. Entomol.* 109 (1): 182-187.
- Del Castillo, J., Demello, W.C., Morales, B.T. 1963.** Mechanism of the paralyzing action of piperazine on ascaris muscle. *Brit. J. Pharmacol.* 22: 463-477.
- Doss, G.A., Miller, R.R., Zhang, Z., Teffera, Y., Nargund, R.P., Palucki, B., Park, M.K., Yui S. Tang, Evans, D.C., Baillie, T.A., Stearns, R.A. 2005.** Metabolic activation of a 1,3-Disubstituted piperazine derivative: Evidence for a novel ring contraction to an imidazoline. *Chem. Res. Toxicol.* 18: 271-276.
- Fiakpui, E. Z. 1967.** Some Effects of piperazine and methyridine on the free-living nematode *Caenorhabditis Briggsae* (Rhabditidae). *Nematologica*, 13 (2): 241-255
- Grenier, S. 1977.** Effects nocif de la nipagine M sur le parasitoide *Phryxe caudata* [Dipt.: Tachinidae]. *Entomophaga*, 22(2): 223-236.
- Grenier, S., Liu, W.H. 1990.** Antifungals: Mold control and safe levels in artificial media for *Trichogramma* [Hymenoptera: Trichogrammatidae]. *Entomophaga*. 35(2): 283-291.
- Grenier, S., Liu, W.H. 1991.** Mold control and safe levels of antifungals in artificial media for egg parasitoids (Hymenoptera). *Les Colloques de l'INRA*. 56 : 141-144.
- Hamzaoğlu, M. 2012.** Diritromisininin *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)'nın bazı biyolojik ve biyokimyasal özelliklerine etkisi. Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak.
- Haroz, R., Greenberg. M. 2006.** New drugs of abuse in North America. *Clin. Lab. Med.* 26: 147-164.
- Hız, P., Erdem, M., Büyükğüzel, E., Büyükğüzel, K. 2016.** Gemifloksasinin *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) erginlerinin bazı biyolojik özelliklerine etkisi, Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 22 (5): 777-784.
- Hondebrink L., Hermans E.J, Schmeink S, van Kleef R.G, Meulenbelt J, Westerink R.H. 2015.** Structure-dependent inhibition of the human  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABAA receptor by piperazine derivatives: A novel mode of action. *Neurotoxicology*. 51: 1-9.
- Kastamonuluoğlu, S. 2013.** Terbinafinin *Galleria mellonella* L (Lepidoptera: Pyralidae)'nın bazı biyolojik ve biyokimyasal parametrelerine etkisi. Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak.
- Kılıç, A., Büyükğüzel, K., Büyükğüzel, E. 2015.** Antihelmintik triklabendazolun yapay besin ile beslenen *Galleria Mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarının yaşama ve gelişimine etkisi. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. (J. Fac. Vet. Med. Kafkas Univ.). 21(6): 841- 847 (DOI: 10.9775/kvfd.2015.13731).
- Kulkarni, N, Kushwaha, D.K, Mishara, V.K, Paunekar, S. 2012.** Effect of economical modification in artificial diet of Greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Indian J. Entomol.* 74 (4): 369-374.
- Lingala, S., Nerella, R., Rao, K.R.S.S. 2011.** Synthesis, antimicrobial and anthelmintic activity of some novel benzimidazole derivatives. *Der Pharma Chemica*. 3 (4): 344-352.
- Martin, R.J. 1982.** Electrophysiological effects of piperazine and diethylcarbamazine on *Ascaris suum* somatic muscle. *Br. J. Pharmacol.* 77: 255-265.
- Martin, R.J. 1985.** Gamma-Aminobutyric acid-and piperazine-activated single-channel currents from *Ascaris suum* body muscle. *Br. J. Pharmacol.* 84: 445-461.
- Martin, R.J. 1997.** Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet. J.* 154: 11-34.
- Maurer, H.H., Thomas, K., Dietmar S., Roland F.S. 2004.** Chemistry, pharmacology, toxicology, and hepatic metabolism of designer drugs of the amphetamine (Ecstasy), piperazine, and pyrrolidinophenone types: A synopsis. *Ther Drug Monit.* 26: 127-131.
- Ndhilala, A.R., Ghebrehiwot, H.M., Ncube, B., Aremu, A.O., Gruz, J., Šubrtová, M., Doležal, K., du Plooy, C.P., Abdelgadir, H.A., Van Staden, J. 2015.** Antimicrobial, anthelmintic activities and characterisation of functional phenolic acids of *Achyranthes aspera* Linn.: A medicinal plant used for the treatment of wounds and ringworm in East Africa. *Front Pharmacol.* 6: 274.
- Nielsen, S.A., Toft, S. 2002.** Responses of a detoxification enzyme to diet quality in the wolf spider. *Pardosa prativaga*. *European Arachnology*, eds. Toft S. and Scharff N., Aarhus University Pres, Aarhus, pp. 65-70.
- Ortel, J. 1995.** 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.

- Parvatham, K., Veerakumari, L. 2013.** Drug target prediction using elementary mode analysis in *Ascaris lumbricoides* energy metabolism. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 18: 491-500.
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., Lereclus, D. 2012.** The Insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J. Vis. Exp.* 70: 4392.
- Singh, P., House, H.L. 1970a.** Antimicrobials safe levels in a synthetic diet of an insect, *Agria affinis*. *J. Insect Physiol.* 16: 1769-1782.
- Singh, P., House, H.L. 1970b.** Effects of streptomycin and potassium sorbate in relation to nutrient levels on the larvae of *Agria affinis*. *J. Econ. Entomol.* 63: 449-454.
- Singh, P., House, H.L. 1970c.** Antimicrobial agents: their detrimental effects on size of an insect, *Agria affinis*. *Can. Entomol.* 102: 1340-1344.
- Slansky, JrF., Scriber, J.M. 1985.** Food consumption and utilization. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, eds. Kerkut G. A. and Gilbert L. I. Pergamon Pres, Oxford, pp. 87-163.
- Snedecor, G.S., Cochran, W.G. 1989.** Statistical Methods, *Iowa State University Press*, 8th ed., Ames, IA. 158-160.
- SPSS. 1997.** User's manual, version 10. SPSS, Chicago, IL.
- Sugeçti, S., Büyüküzel, E., Büyüküzel, K. 2016.** Laboratory Assays of the Effects of Oxfendazole on Biological Parameters of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Entomol. Sci.* 51 (2): 129-137
- Vuran, E. 2012.** Ornidazolun *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) 'nın bazı biyolojik ve biyokimyasal parametrelerine etkisi. Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak.
- Xie, Z.N, Nettles, Jr C.W, Morrison R.K, Irie, K, Vinson, S.B. 1986.** Three methods for the *In vitro* culture of *Trichogramma pretiosum* Riley. *J. Entomol. Sci.* 21(2): 133-138.
- Yazgan, Ş. 1972.** A chemically-defined synthetic diet and larval nutritional requirements of the endoparasitoid *Itopectis conquisitor* (Hymenoptera). *J. Insect Physiol* 18: 2123-2141.
- Yazgan, Ş. 1981.** A meridic diet and quantitative effects of tween 80, fatty acid mixtures and inorganic salts on development and survival of the endoparasitoid *Pimpla turionellae*. *L Z angew Ent.* 91: 433-441.