

T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİMETHOATE UYGULAMASININ BÜYÜK BAL MUMU GÜVESİ *Galleria mellonella* L. LARVALARINDAKİ BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ

AHMET GÜNAY

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2017

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİMETHOATE UYGULAMASININ BÜYÜK BAL MUMU GÜVESİ *Galleria mellonella* L. LARVALARINDAKİ BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ

AHMET GÜNAY

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez 18/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Doç. Dr Mustafa COŞKUN
BAŞKAN (DANIŞMAN)**

**Doç. Dr. Tamer KAYIŞ
ÜYE**

**Doç. Dr. Hikmet Yeter ÇOĞUN
ÜYE**

**Prof. Dr. Refet KARADAĞ
Enstitü Müdür V.**

Bu çalışma Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: FEFYL/2016-0005

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DİMETHOATE UYGULAMASININ BÜYÜK BAL MUMU GÜVESİ *Galleria mellonella* L. LARVALARINDAKİ BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ

Ahmet GÜNAY

Adıyaman Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Mustafa COŞKUN

Yıl: 2017, Sayfa: 51

Jüri : Doç. Dr. Mustafa COŞKUN

: Doç. Dr. Tamer KAYIŞ

: Doç. Dr. Hikmet Yeter ÇOĞUN

Büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella* L'nin lipid, karbonhidrat, protein, malondialdehit (MDA) miktarı ile antioksidan enzimlerden katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine farklı dimethoate (10, 25, 50, 75 ve 100 µg/ml) oranlarının toksik etkisi araştırıldı. Dimethoate hamilton enjektörü kullanılarak larvalara uygulandı. Biyokimyasal parametreler spektrofotometre kullanılarak tespit edildi.

Karbonhidrat, lipid ve protein miktarı tüm zamanlarda yüksek dimethoate konsantrasyonlarında (75 ve 100 µg/ml) kontrolle göre önemli derecede düşmüştür. MDA miktarı doz artışına bağlı olarak denenen tüm dimethoate enjeksiyonlarında ölçüm yapılan tüm zamanlarda artmıştır (24, 48, 72 ve 96 saat). Düşük dimethoate oranlarında Katalaz ve SOD aktivitesi düşük dimethoate konsantrasyonlarında kontrole göre artarken yüksek konsantrasyonlarda azalmıştır.

Sonuç olarak MDA miktarı dimethoate kontaminasyonuna bağlı olarak model organizma *Galleria mellonella* larvalarında güvenilir bir biyomarkır olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Dimethoate, Enzim, süperoksit dismutaz, lipid, *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECTS OF DIMETHOATE APPLICATION ON SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THE GREATER WAX MOTH *Galleria mellonella* L. LARVAE

Ahmet GÜNAY

Adıyaman University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Mustafa COŞKUN

Year: 2017, Number of Pages: 51

Jury : Assoc. Prof. Dr. Mustafa COŞKUN

: Assoc. Prof. Dr. Tamer KAYIŞ

: Assoc. Prof. Dr. Hikmet Yeter ÇOĞUN

The toxic effects of different dimethoate rations (10, 25, 50, 75 and 100 µg/ml) were investigated on the amount of lipid, protein, carbohydrate, malondialdehyde (MDA) of the larvae of greater wax moth *Galleria mellonella* L. and on the activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) which are antioxidant enzyme. Dimethoate were injected into *G. mellonella* larvae using a hamilton syringe. The biochemical parameters were measured using spectrophotometric methods.

The amount of protein, lipid and carbohydrate significantly lowered in the high concentrations of dimethoate (75 and 100 µg/ml) at all times. We found that all different concentration of dimethoate injection resulted in gradually increased the MDA content at 24, 48, 72 and 96 hours. MDA content increased in a dose-dependent. Although SOD and catalase enzyme activity were increased at low dimethote (10, 25, 50 µg/ml), the activity of SOD and catalase tended to decrease at high level of dimethate (75 and 100) compared with the control.

MDA content can be used as a reliable biomarkır of dimethoate contamination in model insect *G. mellonella*.

Keywords: Dimethoate, enzyme, superoxide dismutase, lipid, *Galleria mellonella*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin süresince benden kıymetli bilgilerini, birikimlerini esirgemeyen, tecrübeleriyle bana her zaman destek olan değerli danışman hocam Doc. Dr. Mustafa COŞKUN' a, çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Biyoloji bölümü öğretim üyesi Doc. Dr. Tamer KAYIŞ' a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında Biyoloji bölümü laboratuvarı imkanlarından faydalanmamı sağlayan Adıyaman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığına teşekkürlerimi sunarım.

Yine tez çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan, yardımlarıyla birlikte desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Murat ALTUN' a ve Sait YÜCEL'e teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarında da bana destek olan aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Antioksidan Enzimler.....	1
1.2. Dimethoate'nin Yapısı ve Özellikleri.....	2
1.3. Biyomarkır (Biyobelirteç) ve Biyoindikatör.....	3
1.4. <i>Galleria mellonella</i> L. (Büyük Bal Mumu Güvesi) Kültürü.....	4
2. KAYNAK ÖZETLERİ	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Çalışmalarda Kullanılan <i>Galleria mellonella</i> L. Kültürünün Yetiştirilmesi.....	13
3.2. LD ₅₀ Değerinin Hesaplanması ve Sublethal Dozların Belirlenmesi.....	13
3.3. Larvaların Enjeksiyonu ve Genel Uygulamalar.....	14
3.4. Biyokimyasal Analizler	14
3.4.1. Analizler için gerekli olan kimyasallar.....	14
3.4.2. Analizler için gerekli olan malzemeler ve cihazlar.....	14
3.4.3. Homojenizasyon ve fosfat tamponu çözeltisi.....	14
3.4.4. Protein tayini ve gerekli olan çözeltiler.....	15
3.4.5. Katalaz aktivitesinin tayini ve gerekli olan çözeltiler.....	16
3.4.6. Süperoksit dismutaz aktivitesinin tayini ve gerekli olan çözeltiler.....	18
3.4.7. Malondialdehit (MDA) tayini ve gerekli olan çözeltiler.....	19
3.4.8. Lipid tayini ve gerekli olan çözeltiler	20
3.4.9. Karbonhidrat tayini ve gerekli olan çözeltiler	21
3.5. Verilerin Değerlendirilmesi.....	22

4. BULGULAR	24
4.1. Dimethoate'nin <i>G. mellonella</i> 'nin Toplam Protein Miktarına Etkileri.....	24
4.2. Dimethoate'nin <i>G. mellonella</i> 'nin Toplam Lipid Miktarına Etkileri.....	26
4.3. Dimethoate'nin <i>G. mellonella</i> 'nin Toplam Karbonhidrat Miktarına Etkisi	28
4.4. Dimethoate'nin <i>G. mellonella</i> 'nin SOD Enzim Aktivitesine Etkisi.....	31
4.5. Dimethoate'nin <i>G. mellonella</i> 'nin Katalaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	33
4.6. Dimethoate'nin <i>G. mellonella</i> 'nin Malondialdehit (MDA) Düzeyine Etkileri	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	38
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	51

ÇİZELGELERİN DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Dimethoate'nin özellikleri	3
Çizelge 4.1. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın toplam protein miktarına etkileri.....	24
Çizelge 4.2. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın toplam lipid miktarına etkileri.....	26
Çizelge 4.3. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın toplam karbonhidrat miktarına etkileri.....	29
Çizelge 4.4. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın SOD enzim aktivitesine etkileri.....	31
Çizelge 4.5. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın Katalaz enzim aktivitesine etkileri.....	33
Çizelge 4.6. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın MDA düzeyine etkileri.....	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Dimethoate'nin yapısal formülü	2
Şekil 1.2. <i>Galleria mellonella</i> L. 7. evre larvası	5
Şekil 1.3. <i>Galleria mellonella</i> L. pupa evresi	6
Şekil 1.4. <i>Galleria mellonella</i> erkek ergini	7
Şekil 1.5. <i>Galleria mellonella</i> dişi ergini	7
Şekil 3.1. Laboratuvar ortamında yetiştirilen <i>Galleria mellonella</i> L. larvaları.....	13
Şekil 3.2. <i>Galleria mellonella</i> L. larvasının homojenizasyonu	15
Şekil 3.3. Protein miktarı analizi öncesi örneklerdeki renk değişimi	16
Şekil 3.4. Spektrofotometrede katalaz okuma	17
Şekil 3.5. Spektrofotometrede katalaz okunurken azalan eğri grafiği	17
Şekil 3.6. SOD analizi öncesi kördeki ve örnekteki renk değişim farkı	19
Şekil 3.7. MDA analizi için örneklerin hazırlanışı	20
Şekil 3.8. Lipid analizi öncesi örneklerdeki renk değişimi	21
Şekil 3.9. Karbonhidrat analizi öncesi örneklerdeki renk değişimi	22
Şekil 4.1. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın toplam protein miktarına etkileri	25
Şekil 4.2. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın toplam Lipid miktarına etkileri	27
Şekil 4.3. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın toplam karbonhidrat miktarına etkileri.....	30
Şekil 4.4. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın SOD enzim aktivitesine etkileri	32
Şekil 4.5. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın katalaz aktivitesine etkileri	34
Şekil 4.6. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının <i>G. mellonella</i> 'nın MDA miktarına etkileri	37

SİMGELER DİZİNİ

AChE	: Asetilkolinesteraz
CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksironükleik asit
GR	: Glutasyon redüktaz
GST	: Glutasyon-S-transferaz
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
MDA	: Malondialdehit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz

1. GİRİŞ

Tarım potansiyeli yüksek olan ülkelerde tarımsal ürünlerin verimliliği ülke ekonomisi açısından çok önemlidir. Tarım ürünlerinin verimliliğini artırmak için pestisitler yoğun olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda asıl amaç pestlerle (zararlılarla) mücadele ederek besinleri korumak, günümüz toplumunda insanların besin ihtiyaçlarını olması gereken kalitede karşılamaktır. Tarımsal mücadelede pestisit kullanımı 1940'lı yıllardan itibaren başlamıştır (Gultekin vd. 2001). Pestisit kullanımıyla bir yandan toplumun temel ihtiyaçlarına yönelik amaçlar, diğer yandan ekonomik amaçlar gerçekleştirilmek istenir ancak bu uygulamaların olumsuz yan etkilerinin olduğu da bir gerçektir. Bu noktada esas amaçlardan bir tanesi de yapılan uygulamalarda hedefte olmayan canlılar için olası yan etkileri minimum seviyeye indirmek ve sadece hedef organizmaların (zararlıların) etkilenmesini sağlamaktır.

Pestisit tarımsal alanda zararlılarla mücadelede kullanılabilen her türlü kimyasal olarak tarif edilebilir. Zararlıları kontrol altına almak, engellemek, azaltmak amacıyla kullanılabilen kimyasal bir madde, virüs, bakteri gibi araçlar pestisit örneği olabilir.

1.1. Antioksidan Enzimler

Tüm canlı hücrelerinde meydana gelen çeşitli metabolik olaylar ve mitokondride enerji üretilmesi sırasında başlıca reaktif oksijen türleri (ROS) ve diğer bazı oksidanlar oluşmaktadır. Antioksidan savunma sistemlerinin etkin olmalarındaki en önemli özelliklerinden biri de sistemin tüm bileşenlerin reaktif oksijen türlerine yönelik birbirleriyle uyumlu bir şekilde görev almalarıdır. Bu uyumlu çalışma neticesinde antioksidan enzimler hücresel dengenin sağlanmasında hayati bir önem taşır. Normal durumlarda canlılardaki ROS'un oluşumu ve etkisinin azaltılıp uzaklaştırılması arasında bir denge söz konusudur. ROS oluşumunun daha fazla olması halinde organizmada oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidatif stresin engellenebilmesi için süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon-S-transferaz (GST) gibi enzimatik antioksidan savunma sistemleri faaliyet gösterir (Almeida vd. 2007).

SOD, katalaz, GR gibi antioksidan enzimler serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücresel sistemleri korurlar (Kehrer 1993). Bu antioksidan enzimler serbest

radikallerin DNA, protein, lipid gibi hücresel yapılara zarar vermemesi için hücre kompartmanları arasında geçişleri önleyebilmektedir.

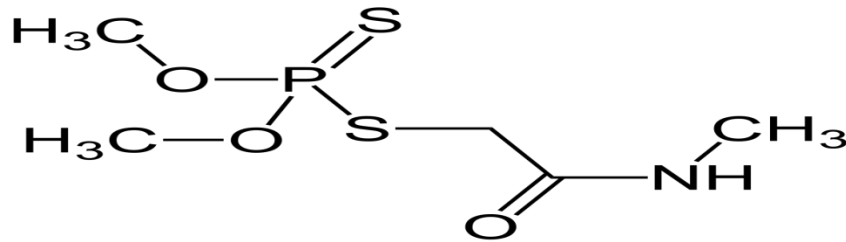
Oksijenli solunum yapan bütün canlı hücrelerde SOD bulunur. SOD, süperoksit radikali anyonunu hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalize ederek bu radikallerin etkisini azalttığı için oksidatif strese karşı faaliyet gösteren antioksidan enzim savunma sistemlerinin önemli yapılarıdır (Pisochi ve Pop 2015).

Gelişmiş yapılı hücrelerin peroksizomlarında ve sitozolde bulunan katalaz, SOD enziminin faaliyeti ile süperoksit radikali anyonunun etkisinin azaltılması reaksiyonu sonucu oluşan hidrojen peroksitin moleküler oksijen ve suya dönüşümünü katalizleyen önemli bir enzimdir (Van der Oost vd. 2003).

Hidrojen peroksitin detoksifikasyonu reaksiyonunda okside formuna dönüşen glutatyonun tekrar kullanılabilmesi için redükte GSH'a dönüştürülmesi gerekmektedir. Glutatyon redüktaz NADPH varlığında glutatyon disülfiti tekrar redükte glutatyon (GSH) çevirir (Hermes-Lima ve Zenteno-Savin 2002).

1.2. Dimethoate'nin Yapısı ve Özellikleri

Zararlı böcekler için kullanılan pestisitler genel olarak insektisit olarak adlandırılır. Dimethoate (*O, O*-dimethyl *S*-methylcarbamoylmethyl Phosphorodithioate) zararlılarla mücadelede kullanılan organofosforlu bir insektisittir (Şekil 1.1). 1956 yılında ruhsatlandırılmış olup zeytin güvesi, yaprak biti, ağaç sarı kurdu gibi zararlılara karşı mücadelede kullanılır. Genel özellikleri Çizelge 1.1'de verilen dimethoate, organofosforlu bir insektisit olup vücuda mide yolu, solunum yolları ve diğer organofosforlular gibi dermal yolla emilim şeklinde nüfuz edebilir (Marutirao 2013).



Şekil 1.1. Dimethoate'nin yapısal formülü.

Dimethoate'nin özellikleri;

Çizelge 1.1. Dimethoate'nin özellikleri (URL 1)

Kimyasal Formülü	$C_5H_{12}NO_3PS_2$
Molekül Ağırlığı	229,3 gr/mol
Parlama Noktası (°C)	107
Erime Noktası (°C)	52
Kaynama Noktası (°C)	108
Yoğunluk	1,28 gr/cm ³
Çözünürlük	Suda az (25 gr/lt), organik çözücülerde farklı oranda çözünür.
Fiziksel Görünümü	Kristal
Renk	Beyaz
Koku	Kendine özgü bir kokusu var.

Mikroorganizmaların kısa süre içerisinde parçalaması sayesinde dimethoate'nin topraktaki kalıcılığı yüksek değildir ve yarılanma ömrü 4-16 gün arasında değişmektedir. (Kidd ve James 1991). Dimethoate toksik etkisini organizmalarda genellikle sindirim kanalı yolları, inhalasyon ve dermal yollar ile gösterir (Gallo ve Lawryk 1991).

1.3. Biyomarkır (Biyobelirteç) ve Biyoindikatör

Geçmişten günümüze genel bir değerlendirme yapıldığına artan insan aktivitesi sonucu tarımsal, evsel ve endüstriyel bazlı çok sayıda yabancı madde karasal ve sucul ekosistemi önemli ölçüde etkilemektedir. Bu ortamlarda tespit edilen yabancı maddeler; herbisitler, ağır metaller, fungusitler, fenoller, polistrenler, dioksinler gibi yapılardır. Bu kirlетici maddeler bulundukları ortamlardaki canlı gruplarında ciddi hasarlara neden olmaktadır. Bu etkilenmeler biyoindikatör ve biyobelirteç (biyomarkır) olarak adlandırılan organizma veya süreçler kullanılarak analiz edilebilmektedir.

Biyomarkırlar hastalık veya sağlık hallerindeki değişiklikleri gösterebilen patolojik durumların belirlenmesini sağlayan çeşitli biyolojik süreçlerin göstergeleridir (Hewitt vd. 2004, Tesch 2010). Organizmada görülen ksenobiyotiklerin neden olduğu çok sayıda biyokimyasal değişiklik biyomarkır olarak kullanılabilir (Bernet vd. 1999).

Örnek olarak kolinesteraz enziminin aktivitesi, ağır metallerin ve organofosforlu pestisitlerin sularda oluşturduğu kirliliğin belirlenmesinde biyomarkır olarak kullanılmaktadır (De La Torre vd. 2002). Biyomarkır terimi 1989 yılında US National Academy of Sciences Report' da ilk defa kullanılmıştır. Bu kavramı WHO (Dünya Sağlık Örgütü) canlı organizmalarda ortaya çıkan hastalıkların etkilerinin veya sonuçlarının tahmini için vücutta ölçülebilir olan her bir madde, yapı ve süreçler olarak tanımlamıştır. Bu tanım AGİT (Avrupa Güvenlik ve İş Birliği Teşkilatı) gibi önemli teşkilatlar tarafından da kabul edilmektedir (Akay 2004). Ulusal Kanser Entitüsü tarafından biyomarkerler; kan ve vücut sıvıları veya dokularda bulunan normal veya anormal bir durumun ya da hastalığın göstergesi olan biyolojik bir molekül olarak tanımlanmaktadır (Mobasheri ve Cassidy 2010).

Biyointikatörler ekosistemde yaşayan bazı spesifik tür veya tür gruplarını içerir. Biyointikatörler bulundukları çevredeki kirletici, zararlı maddeleri kendi doku ve organlarında biriktiren spesifik bitki ve hayvan türleridir. Biyointikatör seçiminde çevreye özgü spesifik türler ve bölgeye özgü sorunları temsil edecek tür grupları tercih edilmelidir (Holt ve Miller 2010). İdeal biyointikatörler canlıların; taksonomik sınıflandırılması kolay, geniş ve kozmopolit bir dağılıma sahip, hareketliliği az olan, ekolojik özellikleri iyi bilinen, sayısal açıdan bol, laboratuvar çalışmalarına adapte edilebilen ve çevresel stres etkenlerine duyarlı türler olması gerektiği belirtilmiştir (Li vd. 2010).

1.4. *Galleria mellonella* L. (Büyük Bal Mumu Güvesi) Kültürü

Zararlılarla mücadelede daha etkili sonuçlara ulaşabilmek için zararlı türün biyolojik yapısı, yaşayabileceği optimal koşullar, ilgili yapılara zarar verme yolu, larvanın gelişim süreçleri ve larva integümenti hakkında bilgi sahibi olunması büyük avantaj sağlar. *G. mellonella* L. arıcılık faaliyetleri yapılan bölgelerde bu faaliyetleri engelleyen ve ürün kalitesini düşüren, lepidoptera takımının Pyralidae familyasına ait zararlı canlı grubudur. *G. mellonella* dişi erginleri gece, ışığın olmadığı karanlık zamanlarda bal arısı kovanlarına girerek peteklerin olduğu bölgelere yumurtalarını bırakıp kovani terk eder. Yumurtadan çıkan larvalar çeşitli çatlakların olduğu bölgelerde koloniler oluştururlar. Zamanla gelişen ve güçlenen büyük bal mumu güvesi larvaları

peteği besin olarak kullanırken aynı zamanda zayıf arı kolonilerine saldırarak zarar verirler.

Düşük rakımlı ve ılıman iklimi olan bölgeler *G. mellonella* kültürü için en elverişli yaşam koşullarıdır. Büyük bal mumu güvesinin ergin, pupa ve yumurta evresindeki bireyleri bal peteklerinde zarara neden olmazken larva evresindeki bireyleri uygun sıcaklık, nem ve besin olan ortamlarda bal peteklerine farklı oranlarda zarar vermektedirler. Büyük bal mumu güvesi ortam sıcaklığının 4 °C'nin üzerinde ve nemin %70 civarında olduğu ortam şartlarında gelişmekte, peteklerin iç kısımlarında tüneller açarak peteğin kullanılamaz bir hale gelmesine sebep olmaktadırlar (Ritter vd. 1992, Haewoon 1995).

Galleria mellonella'nın yaşam döngüsü yumurta evresi, larva, pup ve ergin evrelerinden oluşur. Yumurtadan çıkan *G. mellonella* larvaları başlangıçta beyaza yakın bir renkte olup çok hareketli bir yapıdadır. Uygun besin ortamında gelişimlerini tamamlarken gri tonlarına doğru renk değişimi gözlemlenir. Larvalar bulundukları besinin kalitesine göre ve diğer şartların uygunluğuna bağlı olarak 1-5 ay arasında gelişimlerini tamamlayabilmektedirler. Bu dönemde daha çok petek ile beslenmeleri arıcılık sektöründe büyük kayıplara yol açmaktadır. Larval dönemin son evresi olan 7. evre larvaları gelişimlerini tamamlamış olup beslenme faaliyetleri sona erer ve pupa dönemi başlar (Ellis vd. 2013).



Şekil 1.2. *Galleria mellonella* L. 7. evre larvası

Şekil 1.2’de son larval evreye ulaşan büyük bal mumu güvesi larvaları bu evrenin gelişim sürecini tamamladıktan sonra beslenme faaliyetlerini sona erdirip ipek liflerden oluşan bir salgı örerek pupa dönemini başlatır. Başlangıçta açık kahverengi tonunda olan pupa gelişim süreci devam ettikçe daha koyu bir görünüm kazanır. Uygun şartlarda pupa dönemi 8-14 gün arasında değişiklik gösteren beslenme olmadığı için peteğe zarar vermeyen bir metamorfoz sürecidir (Charriere ve Imdorf 1999).



Şekil 1.3. *Galleria mellonella* L. pupa evresi

Şekil 1.3’de gösterilen pupa evresinden sonra puplardan ergin bireyler çıkar. Dişi ve erkek ergini bireyler morfolojik olarak birbirlerinden rahatlıkla ayırt edilebilir. Dişi erginlerinin vücutları erkeklere göre daha büyüktür ve dişi erginlerinin palpleri erkek erginlerinkinden daha öne doğru olması bu ayırt ediciliği daha da kolaylaştırmıştır (Şekil 1.4 ve Şekil 1.5). Dişi erginler ömürleri boyunca 300-1000 kadar yumurta bırakabilirler. Yumurtlama evresinde olan bir dişi ergini gözlemlendiğinde yumurtaların bir zincir şeklinde kümeler halinde bırakıldığı, her kümedeki yumurta sayısının 50-150 arasında değişebileceği ve yumurtaların şeffaf bir yapıda olduğu görülür. Yumurtalar 0,45 mm uzunluğunda, 0,40 mm çapında ve ağırlığı 0,028 mg olup çok küçük oldukları için gözle görülmeleri oldukça zordur (Charriere ve Imdorf 1999). Yumurta gelişim süresi ısıya bağlı olarak değişmekle birlikte 25-30 °C aralığında 7-8 gündür, 9 °C’nin altındaki sıcaklıklarda ise gelişim tamamen durmaktadır (Charriere ve Imdorf 1999, Allan 2000, Cyborovsky 2000).



Şekil 1.4. *Galleria mellonella* erkek ergini



Şekil 1.5. *Galleria mellonella* dişi ergini

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Stone vd. (2001), kirli bölgelerde yaşayan böceklerin temiz bölgelerde yaşayan böceklerle göre açlığa karşı daha az tolerans gösterdiğini belirtmişlerdir. Kirli bölgedekiler 120 gün yaşarken kontrol böcekleri 165 gün yaşamıştır. Kirli bölgelerdeki *Pterostichus oblongopunctatus* F. bireylerinin 0.1 µg dimethoate'a maruz bırakılması durumunda ömür uzunluklarının kontrole göre önemli derecede düştüğü tespit edilmiştir.

Augustyniak vd. (2005), araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada metal kirliliği olan bölgelerdeki çekirgeler üzerine farklı oranlarda dimethoate uygulamaları yapılmış ve antioksidan enzim aktivitelerine bakılmıştır. Ağır metal kirliliği olmayan bölgelerdeki bir böceğe 0.32 µg dimethoate uygulaması asetilkolinesteraz aktivitesinin %50 oranında inhibe olmasına neden olmuştur. Ağır metal kirlilik düzeyi yüksek olan bölgelerden alınan böcekler üzerine yapılan çalışmada Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinde düşme gözlenmemiş olup araştırmacılar bu durumu *Chorthippus brunneus* bireylerinin çevre kirliliğine adaptif kontrol mekanizması olarak yorumlamışlardır.

Davies (2007), birçok insektisit uzun süreli kullanımı kimyasalları böceklerle karşı etkisiz hale getiren direnç mekanizmalarını geliştirme kabiliyetin ortaya çıkmasını sağladığını belirtmişlerdir.

Amara vd. (2012), ergin farelerde yapılan çalışmada vitamin E ve selenyumun dimethoate üzerine koruyucu etkisi araştırılmıştır. MDA, SOD ve katalaz aktivitesi yükselirken asetilkolinesteraz aktivitesinin düştüğü rapor edilmiştir. E vitamini ve selenyumun dimethoate üzerine antioksidan role sahip olduğu belirtilmiştir.

Velki ve Hackenberger (2012), *Eisenia andrei* ve *Octolasion lacteum* türleri üzerine 0.001, 0.005, 0.01, 0.5 ve 1 µg/cm² dimethoate uygulanmış ve 24 saat sonunda asetilkolinesteraz ve katalaz aktivitelerine bakılmıştır. Sonuç olarak asetilkolinesteraz ve katalaz aktivitelerinin inhibe olduğu tespit edilmiştir. Tür bazında farklılık olmakla birlikte iki türde dimethoate uygulamasından etkilenmiştir.

Baghban vd. (2014), *Helicoverpa armigera* Hübner larvaları 12.5, 25 ve 50 mg/kg kadmiyum, 25, 50 ve 100 mg/kg bakır ve 25, 50 ve 100 mg/kg çinko konsantrasyonlarına maruz bırakmışlardır. Larvaların yapay diyetleri içerisine bu metaller koyduktan 24 saat sonra 7 gün boyunca larvaların protein, glikojen, kolesterol

ve trigliserit seviyelerini ölçmüşlerdir. Trigliserit miktarının tüm kadmiyum gruplarında önemli ölçüde azaldığını, 12.5 ve 25 mg/kg kadmiyum konsantrasyonlarında kolesterol miktarının arttığını gözlemlemişlerdir. Glikojen, protein ve kolesterol miktarının tüm çinko gruplarında arttığını, tüm bakır konsantrasyonu gruplarında glikojen miktarının arttığını, protein ve kolesterol miktarının 25 ve 50mg/kg gruplarında azaldığını ve trigliserit miktarının çinkonun 50mg/kg'lık gruplarında arttığını bulmuşlardır. Sonuç olarak ortamda bu metallerin varlığının *H. armigeranın* beslenmesi ve biyokimyasal tepkimeleri üzerinde yoğun bir etkiye sahip olduğunu saptamışlardır.

Wu ve Yi (2014), bu çalışmada krom (Cr) ve kurşunun (Pb) *G. mellonella*'nın bağışıklık ve antioksidan sistemler üzerindeki etkilerini analiz etmiştir. Özellikle larvalar çevresel olarak uygun konsantrasyonlarda (5, 50 ve 100 µg/g) Cr veya Pb içeren besinlere bırakılmış ve doğal immün parametrelerdeki değişiklikler ve endojen enzimlerin aktivitesi ölçülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Cr ve Pb'nin en düşük dozları (5 µg/g), larvaların doğuştan gelen bağışıklık parametrelerini anlamlı düzeyde arttırdığını ve hemolenf bağışıklık enzimi aktiviteleri en yüksek dozlarda (100 µg/g) inhibe ettiğini, antioksidan enzimlerin aktivitesi besinlerdeki Cr ve Pb konsantrasyonlarının artması ile anlamlı artışlar gösterdiğini ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu; *G. mellonella* larvalarını, Cr veya Pb'nin deneysel konsantrasyonları ile beslemek, incelenen tüm parametrelerin benzer modellerine yol açtığı saptanmıştır. Mevcut çalışma, orta miktarda Cr ve Pb'nin *G. mellonella*'nın doğal immünitesini arttırdığını fakat bu miktarın larva bağışıklık fonksiyonunun inhibisyonuna yol açtığını ve aynı zamanda Cr ve Pb'nin deneysel konsantrasyonlarının güçlü oksidatif streslere neden olduğu belirtilmiştir.

Altuntaş (2015a), bitkilerin olgunlaşmasını düzenleyen Ethephon'nun hemolenf metabolitleri üzerindeki toksik etkilerini araştırmış olduğu çalışmada, farklı dozlarda (250-390 µg/5µl) ethephon *G. mellonella* besiyerine ilave ettikten 24 ve 48 saat sonra glikoz, protein ve lipid düzeylerinin spektrofotometrik ölçümlerini yapmıştır. Sonuç olarak glikoz, protein ve lipidlerin düzeylerinin doza ve zamana bağlı olarak değişiklik gösterdiğini bulmuştur ve çevre dostu biopestisit olan EFT'nin entegre zarar yönetiminde kullanmada umut verici bir ajan olarak kullanılabileceğini önermişlerdir.

Altuntaş (2015b), *G. mellonella* larvalarında, antioksidan enzimlerin nasıl etkilendiğini araştırmak için farklı gibberellik asit dozlarıyla beslemişlerdir. Süperoksit

dismutaz, GST ve katalaz aktivite seviyeleri ölçmüştür. Besine gibberellik asit eklenmesi ile yapılan uygulama, düşük dozlarında (50-1,000 ppm) hem kontrol hem de yüksek dozlar açısından SOD ve GST aktivitelerinde kayda değer bir artış sağlamıştır. Katalaz aktivitesi, tüm dozlarda, uygulama yapılmamış larva hemolenfindeki aktiviteyle karşılaştırıldığında önemli ölçüde artmıştır. Sonuç olarak, gibberellik asit larvalar için doza bağımlı olarak larvalar üzerinde toksik olabileceği serbest doğal bir radikal kaynak olduğundan böceklerin antioksidan savunma sisteminin aktivasyonunda etkili olduğu bulunmuştur. GST, SOD ve katalaz aktivasyonundaki artışın, gibberellik asit bağılı stresi dengelemek için fizyolojik bir uyumu desteklediği belirtilmiştir.

Erdem ve Büyükgüzel (2015), Allelokimyasal olan ksantotoksin *G. mellonella* larvalarının yaşam süresi, erkek ve dişi erginlerinin yaşam süresi, ve üreme yeteneklerine etkisini araştırılmıştır. *G.mellonella* erginlerinde oksidatif stres göstergeleri, lipid peroksidasyon ürünü malondialdehit ve protein oksidasyon ürünleri, protein karbonil bileşenleri ve detoksifikasyon enzimi glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesini belirlemişlerdir. En düşük ksantotoksin konsantrasyonu (% 0.001), MDA miktarında yaklaşık altı kat artış sağlamıştır. En yüksek ksantotoksin konsantrasyonu, MDA miktarında 3 kat azalmaya neden olmuş ve GST aktivitesini de 2 kat azaltmıştır.

Kayis vd. (2015), farklı dichlorvos oranlarının *G. mellonella* larvalarında enzim aktivitesi ve lipid peroksidasyonunun araştırıldığı çalışmada SOD, katalaz aktivitesi ve MDA miktarının DDVP'nin oluşturduğu oksidatif strese bağılı olarak değişim gösterdiği ortaya konmuştur. Bununla birlikte *G. mellonella* larvalarının model organizma olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Krams vd. (2015), çalışmalarında, yüksek ve ortalama besin kalitesindeki besinlerle beslenen 3 grup *G. mellonella* larvası büyüme, bağışıklık ve yaşam süresi arasındaki dengeleri test etmiştir. Yüksek enerjili besin gruplarındaki larvaların hızlı büyüme ve zayıf bağışıklık gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Ortalama beslenme kalitesindeki besin gruplarında gelişme daha uzun sürmüştür. Larvaların düşük enerjili besin grubunda büyüme süresinin uzadığını ve larvalarda en uzun yaşam süresi oranlarını gözlemlemişlerdir. Yüksek enerjili besin grubunda gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, *G. mellonella* larvalarının besin değeri ve yaşantı özellikleri ile besin türleri arasında ilişki kurmaya yardımcı olduğu saptanmıştır.

Sugeçti vd. (2015), *G. mellonella* larvalarını, benzimidazol türevi antihelmintik ilaç olan oksfendazolun çeşitli konsantrasyonları (0, 0.0015, 0.015, 0.15 ve % 1.5) ile hazırlanmış besinlere koymuştur. Larvaların yaşam süresini, gelişim dönemlerini ve üreme yeteneklerini gözlemlemişlerdir. Araştırmada % 1.5 oksfendazol içeren besine maruz kalan larvaların larval, pupal ve ergin dönemlerinde, yaşam süresinde belirgin bir düşüş olduğu, erişkin dönemine ulaşma süresini ve yetişkinlerin yaşam süresini azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca oksfendazolun tüm konsantrasyonlarda dişilerin yumurta bırakma oranını önemli ölçüde düşürdüğü ve yumurta açılımını düşürdüğü belirlenmiştir. Sonuç olarak, antihelmintik ilaç olan oksfendazolun böcek zararlılarının kontrolü için başvurulabilecek bir yöntem olarak göstermişlerdir.

Bhagat vd. (2016), Çeşitli zehirli maddelere maruz kalmış salyangozlarda glutatyon S-transferaz (GST), katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve lipid peroksidasyonu (LPO) ile yapılan araştırmaların çevresel izleme programlarına etkileri özetlenmiştir. Sonunda, olgunun daha iyi anlaşılması için oksidatif biyolojik belirteçlerin yanıtlarındaki değişimleri etkileyen farklı faktörler tartışılmıştır.

Dubovskiy vd. (2016) böcek bağışıklık sisteminin gelişimi, patojenlerin ve parazitlerin izolasyonunu ve nötralizasyonunu mümkün kılan kapsül oluşumu ve nodülasyon ile kapsamlı bir hücresel savunma sisteminin oluşturulmasına yol açtığını belirtmiştir.

Hız vd. (2016), *G. melonella* larvaları yapay besin ortamında bir antibiyotik olan gemifloksasin ile ergin evreye kadar beslenmiştir. Verilen besinlerin erkek ve dişi eşey oranı ile erginlerin ömür uzunluğu üzerinde etkili olmadığı ancak yumurta verimini önemli oranda düşürdüğü belirlenmiştir. Çalışmada erginlerin biyolojik özelliklerinin gemifloksasin tarafından önemli derecede etkilendiği bulunmuştur. Büyük bal mumu güvesi *G. mellonella* L. mikrobiyal enfeksiyolarının ve klinik ilaçların çalışılmasında memeli modellerine alternatif bir model olarak bilindiği ve insektisit etkinliği çalışmalarında da model olarak kullanıldığı ifade edilmiştir.

Wilczek vd. (2016), laboratuvar ortamında yapılan çalışmada dimethoate ve açlığın *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) üzerine genotoksik etkisi araştırılmıştır. Hemosit ve orta bağırsak salgı hücrelerindeki DNA hasarı comet analiz yöntemiyle belirlenmiştir. Araştırmacılar DNA hasarının dimethoate uygulaması sonucu oluştuğunu

tesbit etmişlerdir, bununla birlikte DNA hasarlarının hemositlerde orta bağırsak hücrelerine göre daha fazla olduğu açık bir şekilde ortaya konmuştur.

Vadim vd. (2017), *Metarhizium robertsii* ve *G. mellonella*'nın sıcaklık moderatörlüğünde etkileşimlerini incelediği çalışmada bal mumu güvesi *G. mellonella*'nın önemli bir model oluğu, arı kovanlarında larvaların en iyi 34 °C sıcaklık civarında geliştiğini bulmuşlardır. Bal mumu güvesi larvalarının enzim esaslı bağışıklık sisteminin sıcaklığın artmasıyla daha yüksek aktivite gösterdiği vurgulanmıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmalarda Kullanılan *Galleria mellonella* L. Kültürünün Yetiştirilmesi

Stok *G. mellonella* kültürü Bronskill (1961) tarafından geliştirilen sentetik besinle beslenen ergin *G. mellonella* bireylerinden elde edilmiştir. Bunun için içerisinde sentetik besin bulunan kavanozlara ergin *G. mellonella* dişi ve erkek bireyleri konularak dişilerin yumurta bırakmaları sağlanmış, açılan yumurtalar aynı besiyerinde son evreye gelinceye kadar beslenmiştir (Şekil 3.1). Deneylerde 28 ± 2 °C, 70 ± 5 bağıl nem içeren ve 24 saat karanlık fotoperiyodu uygulanan laboratuvar koşullarında elde edilmiş stok *G. mellonella* son evre larvaları kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Laboratuvar ortamında yetiştirilen *Galleria mellonella* L. larvaları

3.2. LD₅₀ Değerinin Hesaplanması ve Sublethal Dozların Belirlenmesi

LD₅₀ değerinin hesaplanması ve sublethal dozların belirlenmesi için 7. evreye ulaşmış olan 10 adet larva seçildi. Farklı dimethoate konsantrasyonlarından 10 µl alınarak buz üzerinde hareketleri yavaşlatılmış olan larvalara enjekte edildi. Enjeksiyon sonrasında larvalar ayrı petri kaplarına alınarak 24, 48, 72 ve 96. saatlerde ölen ve hayatta kalan larva sayıları kaydedildi. 96 saatlik periyot sonunda elde edilen verilerden istatistik hesabı yapılarak (Probit analiz) LD₅₀ değeri 232 µg/ml olarak hesaplandı. Buna göre 10, 25, 50, 75 ve 100 µg/ml'lik sublethal dimethoate dozları belirlendi.

3.3. Larvaların Enjeksiyonu ve Genel Uygulamalar

Her bir deney serisinin her tekrarı için 10 µl insektisit belirlenen dozlarda larvalara Hamilton enjektörü ile enjekte edildi. Kontrol grubu için belirlenen larvalara herhangi bir enjeksiyon işlemi uygulanmadan kullanıldı. Enjeksiyon öncesinde larvalar tartıldı ve enjeksiyonu takiben 24, 48, 72 ve 96. saatlerde larvalar alınarak biyokimyasal analizler yapılınca kadar -80 °C’de saklandı. Deneyler 5 tekrar halinde gerçekleşti.

3.4. Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Analizler için gerekli olan kimyasallar

KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, NaOH, Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na-K-tartarat, Folin-ciocalteu, H_2O_2 , ksantin, EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit), NBT (Nitro Blue Tetrazolium), BSA (Bovin Serum Albumin), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Ksantin Oksidaz, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, TBA (Tiyobarbitürik asit), TCA (Triklosetik asit), Na_2SO_4 , Vanilin, Kloroform, Metanol, Antron, Mısır yağı, Glikoz.

3.4.2. Analizler için gerekli olan malzemeler ve cihazlar

Spektrofotometre, cam ve plastik deney tüpleri, ependorf tüpleri, balon joje, erlen, hassas terazi, -80 °C derin dondurucu, sıcak su banyosu, soğutmalı masaüstü santrifüjü, otomatik pipetler, pH metre, etüv, saf su cihazı, buz makinesi, çelik başlıklı homojenizatör, ısıtıcı manyetik karıştırıcı, hamilton enjektörü.

3.4.3. Homojenizasyon ve fosfat tamponu çözeltisi

Fosfat Tamponu Çözeltisi: 6.81 gr KH_2PO_4 (Potasyum Fosfat), 7.1 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Di Sodyum Hidrojen Fosfat) tartılarak balon joje içerisine konuldu. Üzerine 1000 ml olacak şekilde saf su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözünmesi sağlandı, pH = 7.4 olacak şekilde ayarlandı.

Analizler için yaş ağırlıkları belirlenen larvalar -80 °C dondurucudan çıkarılıp tüplere konuldu ve oda sıcaklığında buzları çözüldükten sonra melaninleşmeyi önlemek için tüplere birkaç fenilthioure kristali eklendi. 1/20 oranında fosfat tamponu (pH=7.4) eklenerek 24000 devir/dk da homojenize edildi (Şekil 3.2). Homojenizasyon sonrası tüpler 10000 devir/dk da 30 dk boyunca sanrifüj edildi, süpernatant alındı, tüplerin dibinde kalan çökelek ise lipid ve karbonhidrat miktarının tayini için dondurucuda saklandı.



Şekil 3.2. *Galleria mellonella* L. larvasının homojenizasyonu

3.4.4. Protein tayini ve gerekli olan çözeltiler

Çözelti A [% 2 Na_2CO_3 (0.1 N NaOH içinde)]: 4 gr NaOH tartılarak balon joje içerisinde üzerine 1000 ml olacak şekilde saf su eklenerek çözüldü (0.1 N NaOH çözeltisi). Daha üzerine 20 gr Na_2CO_3 (Sodyum Karbonat) eklenerek çözüldü.

Çözelti B1 (%1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): 0.1 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Bakır Sülfat) tartılarak balon joje içerisinde üzerine 10 ml olacak şekilde saf su eklenerek çözüldü.

Çözelti B2 (%2 Na-K-tartarat): 0.2 gr Na-K-tartarat (Sodyum Potasyum Tartarat) tartılarak balon joje içerisinde üzerine 10 ml olacak şekilde saf su eklenerek çözüldü.

Çözelti C: Erlen içerisine 1000 ml çözelti A, 10 ml çözelti B1, 10 ml çözelti B2 eklenip karıştırılarak çözelti C hazırlandı.

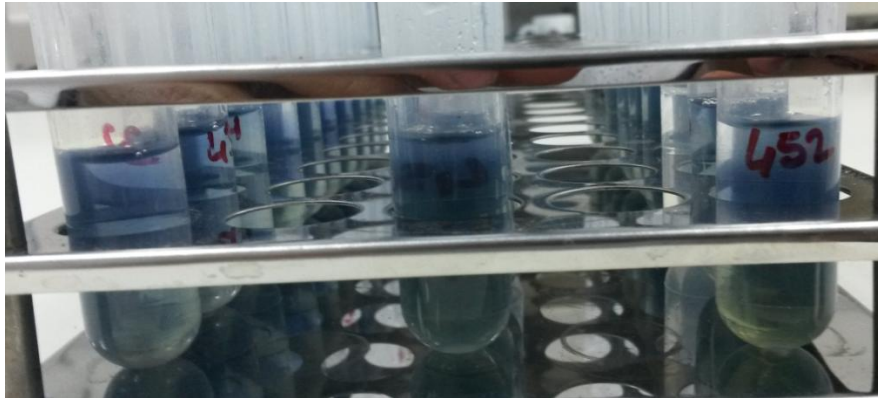
Folin-ciocalteu çözeltisi: 1/1.5 oranında bidistile saf su ile seyreltilerek kullanıldı.

Protein tayininde; Şekil 3.3' de olduğu gibi proteinlerin alkali CuSO_4 ilavesiyle fosfotungstik asit ile mavi renkli kompleks oluşturması ilkesine dayanan Lowry vd. (1951) metodu kullanıldı.

Örneklerden 300 μl alınıp tüplere konuldu, tüpün içerisine 3ml çözelti C ilave edildi, karıştırıldı ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Üzerine 300 μl Folin-ciocalteu çözeltisi ilave edilerek 750 nm' de köre karşı okundu.

KÖR : 300 μl saf su + 3000 μl çözelti C ilave edildi, oda sıcaklığında 15 dk bekletildi üzerine 300 μl Folin-ciocalteu çözeltisi eklendi.

Protein miktarının hesaplanabilmesi için; 0.1 gr BSA tartılarak 100 ml'ye saf su ile tamamlandı. Bu çözeltiden farklı konsantrasyonlara sahip (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 ve 1 mg/ml) standart çözeltiler hazırlandı. Her bir standart çözeltinin Lowry vd. (1951) metodu kullanılarak absorbans değerleri okundu. Protein miktarı bu okunan absorbanslardan elde edilen regresyon denkleminde konularak hesaplandı.



Şekil 3.3. Protein miktarı analizi öncesi örneklerdeki renk değişimi

3.4.5. Katalaz aktivitesinin tayini ve gerekli olan çözeltiler

H_2O_2 (30 mM) çözeltisi: Önceden hazırlamış olduğumuz pH 7.4 olan 1000 ml'lik fosfat tamponu üzerine 3.4 ml H_2O_2 (Hidrojen Peroksit) eklenerek H_2O_2 (30mM) çözeltisi hazırlandı.

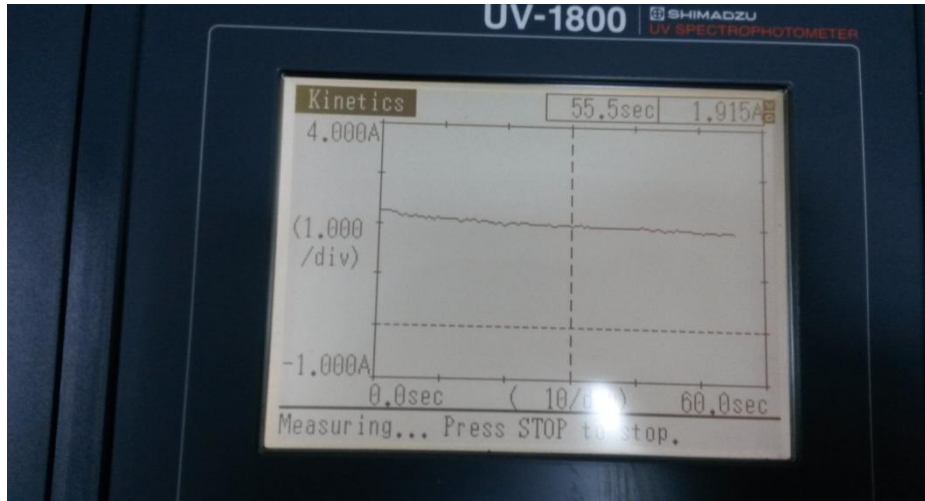
Katalaz aktivitesinin belirlenmesinde katalazın hidrojen peroksiti nötralize etme esasına dayanan Aebi (1984) metodu kullanılmıştır.

Kör İçin; 2.8 ml hazırlanan çözeltiden alınıp üzerine 200 µl fosfat tamponu eklendi. Küvet içine hazırlanan çözeltiden 2.8 ml hazırlanan çözeltiden konuldu, üzerine 200 µl fosfat tamponu eklenerek hızlı bir şekilde karıştırılıp spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda okundu.

Şekil 3.4’de katalaz aktivitesinin tayini için quartz küvete 2.8 ml H₂O₂ (30mM) konuldu ve üzerine 200 µl örnek eklenip hızlı bir şekilde çalkalanarak spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 0. sn, 30. sn ve 60. sn’ deki enzim aktiviteleri kinetik olarak ölçüldü (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. Spektrofotometrede katalaz okuma



Şekil 3.5. Spektrofotometrede katalaz okunurken azalan eğri grafiği

3.4.6. Süperoksit dismutaz aktivitesinin tayini ve gerekli olan çözeltiler

Reaktif Çözeltisinin Bileşenleri :

1N NaOH çözeltisi: 4 gr NaOH tartılarak Balon joje içerisinde 100 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanarak çözünme sağlandı.

Ksantin Çözeltisi: 4.56 mg ksantin tartılıp balon joje içerisine konularak üzerine birkaç damla 1N NaOH çözeltisi eklenerek çözünme sağlandı. Daha sonra üzerine 100 ml olacak şekilde saf su eklenerek çözelti hazırlandı.

EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit): 22.3 mg EDTA tartılarak balon joje içesine konuldu üzerine 100 ml olacak şekilde saf su eklenip çözünme sağlanarak hazırlandı

NBT (Nitro Blue Tetrazolium): 12.3 mg NBT tartılıp balon joje içesine konuldu üzerine 100 ml olacak şekilde saf su eklenip çözünme sağlanarak hazırlandı.

Na₂CO₃ çözeltisi: 4.24 gr Na₂CO₃ tartılıp balon joje içerisine konuldu üzerine 100 ml olacak şekilde saf su eklenip çözünme sağlanarak çözelti hazırlandı.

BSA (Bovin Serum Albumin): 50 mg BSA tartılarak balon joje içerisine konulup üzerine 50 ml olacak şekilde saf su eklenerek çözünme sağlandı.

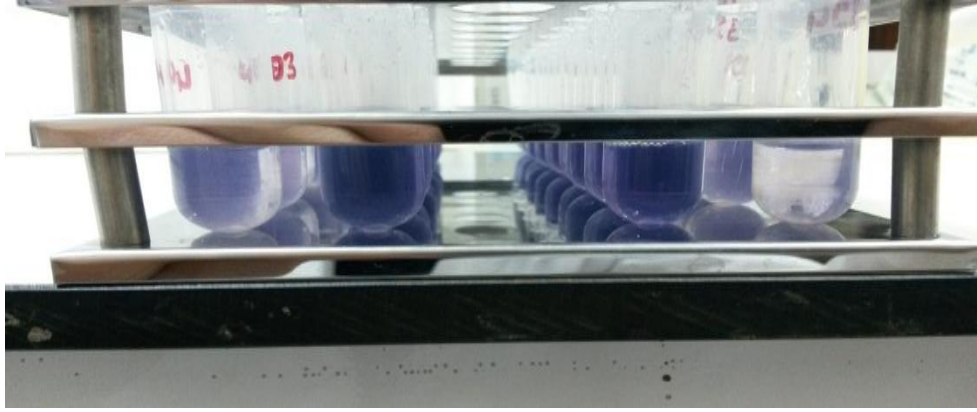
Reaktif Çözeltisi: 300 ml ksantin çözeltisi, 150 ml EDTA çözeltisi, 150 ml NBT çözeltisi 90 ml Na₂CO₃ çözeltisi ve 45 ml BSA çözeltisi alınarak erlen içerisinde karıştırılarak reaktif çözeltisi elde edildi.

(NH₄)₂SO₄ çözeltisi: 6.6075 gr (NH₄)₂SO₄ (Amonyum Sülfat) tartılarak balon joje içerisinde 25 ml olacak şekilde saf su eklenip çözünme sağlanarak hazırlandı.

Ksantin Oksidaz: (167 U/L) enziminden 240 µl alınarak buz soğukluğunda 15 ml (NH₄)₂SO₄’ de çözülerek hazırlandı.

CuCl₂.2H₂O çözeltisi: 13.6 mg CuCl₂.2H₂O tartılarak balon joje içerisine konulup üzerine 100 ml olacak şekilde saf su eklenip çözülmesi sağlanarak çözelti hazırlandı.

SOD aktivitesinin belirlenmesinde Sun vd. (1988) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. Yöntem, enzimatik bir reaksiyonla üretilen süperoksit radikallerinin ortamda bulunan nitro blue tetrazolium’ u (NBT) indirgenmesinin örnekteki SOD tarafından engellenmesi esasına dayanır. Deneyde her bir örnek için bir adet kör tüpü olacak şekilde örnekler ve körler hazırlandı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. SOD analizi öncesi kördeki ve örnekteki renk değişim farkı

Kör ve örnek için gerekli olan madde oranları.

	KÖR	ÖRNEK
Reaktif	1.425 ml	1.425 ml
Örnek		50 µl
Ksantin oks.	25 µl	25 µl
Oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi		
CuCl ₂ .2H ₂ O	50 µl	50 µl
Örnek	50 µl	

Örnek ve kör saf suya karşı 560 nm dalga boyunda okundu.

3.4.7. Malondialdehit (MDA) tayini ve gerekli olan çözeltiler

Hazırlanan çözeltiler:

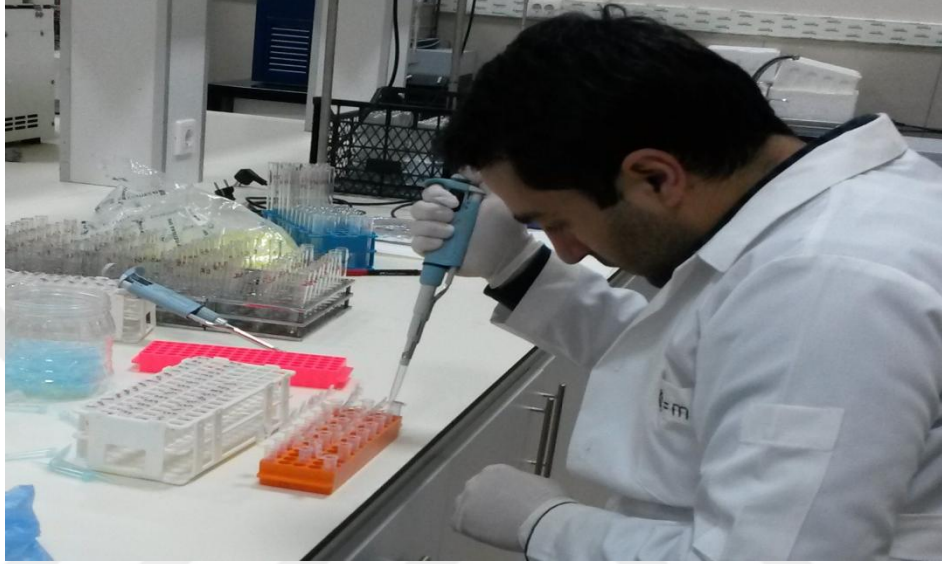
TBA çözeltisi (%0.8): 0.8 gr TBA (Tiyobarbiturik asit) tartılarak balon joje içerisinde 100 ml olacak şekilde saf su eklenip bir yandan da ısıtılarak TBA' nın çözünmesi sağlanıp çözelti hazırlandı.

TCA çözeltisi (%20): 10 gr TCA (Triklosetik asit) tartılarak balon joje içerisinde 50 ml olacak şekilde saf su eklenip çözünmesi sağlanarak çözelti hazırlandı.

MDA' nın ölçümü tiyobarbiturik asit (TBA) ile inkübasyonu sonucu oluşan kompleksin 535 nm' de absorbans ölçümü esasına dayanır. Ölçüm Bar-Or vd. (2001) tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır.

Şekil 3.7’de MDA tayini için örnekten 250 µl alınıp üzerine 125 µl TCA ilave edilerek karıştırıldı. Elde edilen örnek 15000 devir/dk +4 °C de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant alındı. Süpernatant üzerine 200 µl TBA ilave edilerek karıştırıldı, 60 dakika 90 °C deki sıcak su banyosunda bekletildi ve 535 nm de köre karşı okundu.

KÖR: 250 µl saf su + 125 µl TCA + 200 µl TBA



Şekil 3.7. MDA analizi için örneklerin hazırlanışı

3.4.8. Lipid tayini ve gerekli olan çözeltiler

Hazırlanan çözeltiler:

Na₂SO₄ çözeltisi: 10 gr Na₂SO₄ tartılarak balon joje içerisine konulup üzerine 500 ml olacak şekilde saf su eklenip çözünmesi sağlanarak çözelti hazırlandı.

Vanilin Fosforik çözeltisi: 600 mg vanilin tartılarak 100 ml sıcak saf suda çözülüp üzerine 400 ml %85’lik H₃PO₄ (Fosforik Asit) eklenerek çözelti hazırlandı.

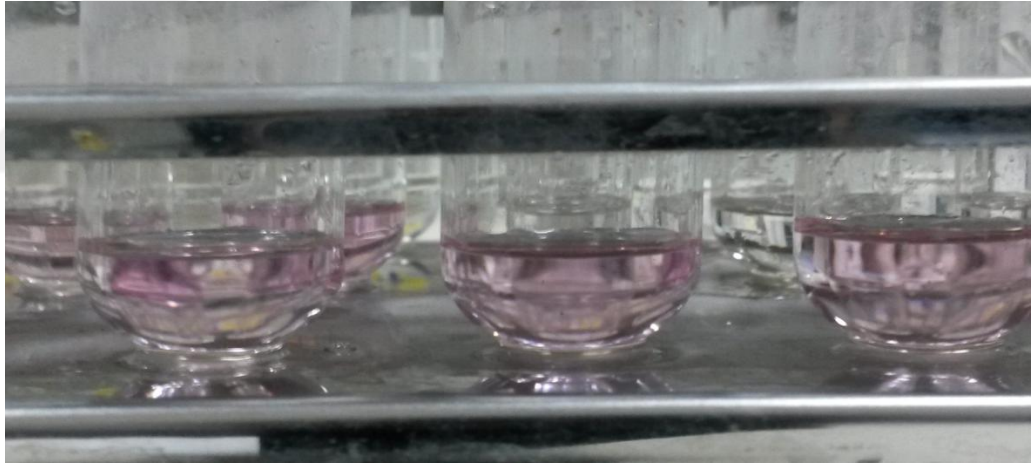
Kloroform/Metanol çözeltisi: 360 ml kloroform ile 720 ml metanol erlenmayer içerisinde karıştırılarak hazırlandı.

Van Handel (1985b)’in geliştirmiş olduğu yönteme göre yapıldı. Homojenizasyon ve santrifüj sonrası tüplerin dibinde kalan çökelek halindeki örnekler kullanıldı. Tüplerdeki örnek üzerine 2 ml Na₂SO₄ ilave edildi, karıştırıldı, üzerine 8 ml kloroform/metanol karışımı ilave edilip karıştırıldı. Karışım 10 dakika 1000 devir/dk’da santrifüj edildi. Süpernatanttan 200 µl alındı, 90°C de sıcak su banyosunda

kloroform/metanol' ün tamamen buharlaşması sağlandı. Kloroform/metanol buharlaştıktan sonra tüpler sıcak su banyosundan çıkarıldı. Tüplere 40 µl H₂SO₄ eklendi. 90°C de sıcak su banyosunda 2 dakika bekletildi. Tüpler soğuduktan sonra üzerine 960 µl vanilin fosforik çözeltisi ilave edildi ve karıştırıldı. Hazırlanan örnekler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve 525 nm de köre karşı okundu (Şekil 3.8).

KÖR: 200 µl saf su + 40 µl H₂SO₄ + 960 µl vanilin fosforik asit ilave edilir.

Örneklerin lipid miktarının belirlenmesi için; 0.1 ml mısır yağı alındı, 1/2 oranında hazırlanan kloroform/metanol karışımı ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözeltiden farklı konsantrasyonlara sahip (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 ve 1 mg/ml) standart çözeltiler hazırlandı. Her bir standart çözeltinin Van Handel (1985b) metodu kullanılarak absorbans değerleri okundu. Lipid standartlarına ait regresyon denklemi elde edildi. Örneklerin absorbansları bu denklemde yerine konularak lipid miktarı belirlendi.



Şekil 3.8. Lipid analizi öncesi örneklerdeki renk değişimi.

3.4.9. Karbonhidrat tayini ve gerekli olan çözeltiler

Hazırlanan Çözeltiler:

Na₂SO₄ çözeltisi: 10 gr Na₂SO₄ tartılarak balon joje içerisine konulup üzerine 500 ml olacak şekilde saf su eklendi çözünme sağlanarak çözelti hazırlandı.

Antron çözeltisi: 150 ml saf su bulunan balon joje içerisine 380 ml konsantre H₂SO₄ (Sülfürik Asit) ekledikten sonra üzerine 750 mg antron tartılıp eklenerek çözünmesi sağlanıp çözelti hazırlandı.

Kloroform/Metanol çözeltisi: 360 ml kloroform ile 720 ml metanol erlenmayer içerisinde karıştırılarak hazırlandı.

Van Handel (1985a)'ın geliştirdiği yöntem uygulandı. Homojenizasyon ve santrifüj sonrası tüplerin dibinde kalan çökelek halindeki örnekler kullanıldı. Tüplerdeki örnek üzerine 2 ml Na_2SO_4 ilave edildi, karıştırıldı, üzerine 8 ml kloroform/metanol karışımı ilave edilip karıştırıldı. Karışım 10 dakika 1000 devir/dk da santrifüj edildi. Üst kısımdan 200 μl alındı, 90°C de sıcak su banyosunda kloroform/metanol' ün tamamen buharlaşması sağlandı. Tüpler soğuduktan sonra üzerine 950 μl antron çözeltisi ilave edildi. 90 °C de sıcak su banyosunda 15 dakika bekletildi ve örnekler 625 nm' de köre karşı okundu (Şekil 3.9).

Kör için: 200 μl saf su + 950 μl antron kullanıldı.

Karbonhidrat miktarının hesaplanabilmesi için; 0.1 gr glikoz tartılarak 100 ml'ye saf su ile tamamlandı. Bu çözeltiden farklı konsantrasyonlara sahip (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 ve 1 mg/ml) standart çözeltiler hazırlandı. Her bir standart çözeltinin Van Handel (1985a) metodu kullanılarak absorbans değerleri okunarak karbonhidrat standartlarına ait regresyon denklemi elde edildi. Örneklerin absorbans değerleri bu denklemde yerine konularak karbonhidrat miktarı belirlendi.



Şekil 3.9. Karbonhidrat analizi öncesi örneklerdeki renk değişimi

3.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Dimethoate'nin beş farklı konsantrasyonu ile kontrol grubu için dört farklı periyotta (24, 48, 72 ve 96 saat) beş tekrarın yapıldığı çalışmada her bir deney

serisinden elde edilen veriler kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Verileri karşılaştırmak için varyans analiz yöntemi ve ortalamalar arasındaki farkın kontrolü için Student Newman Keul's (SNK) testi, bilgisayarda SPSS istatistik veri paketi kullanılarak uygulandı.



4. BULGULAR

4.1. Dimethoate'nin *G. mellonella*'nın Toplam Protein Miktarına Etkileri

Çizelge 4.1.'de farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın toplam protein miktarına olan etkileri gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın toplam protein miktarına etkileri

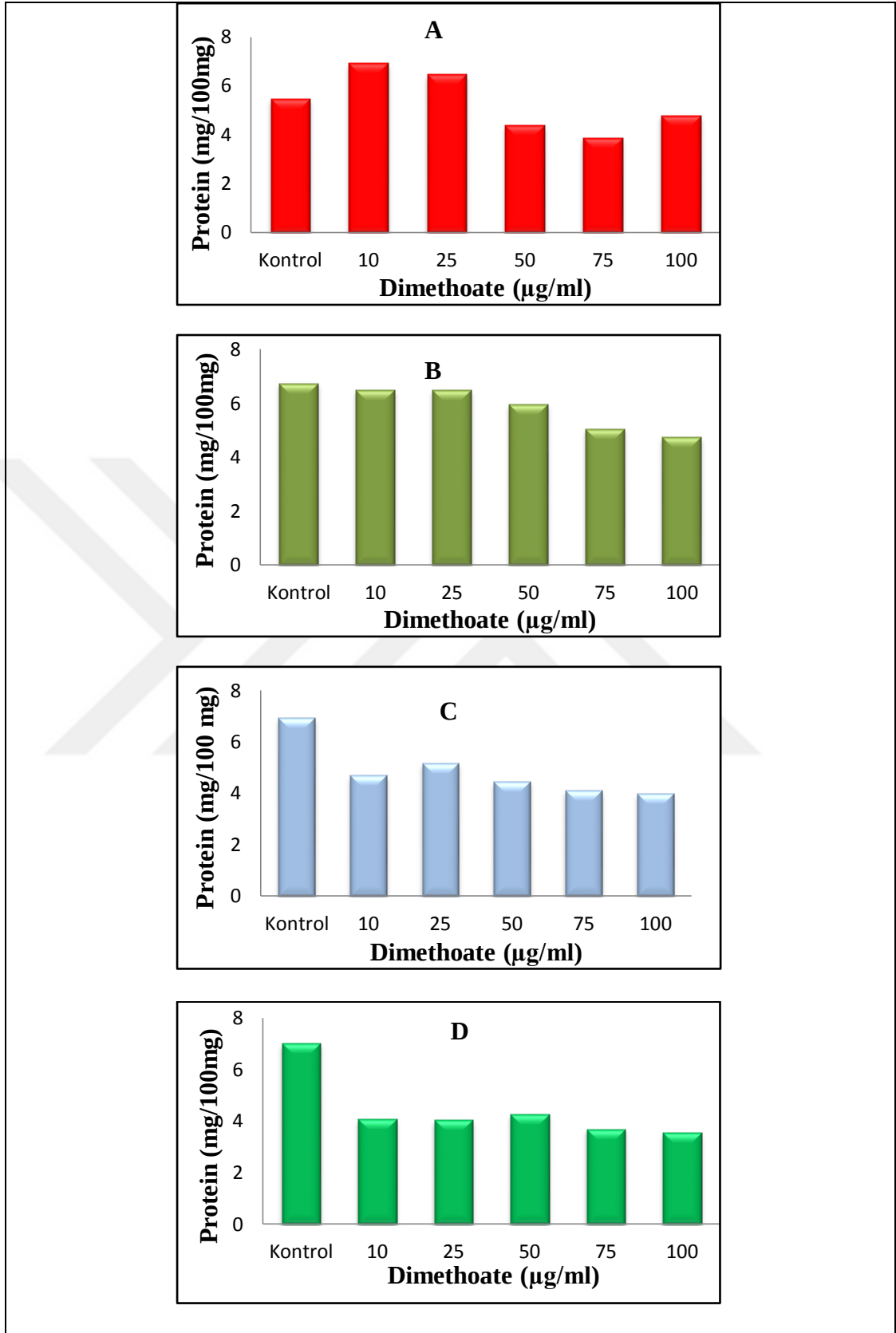
Konsantrasyon	PROTEİN(mg/100mg)			
	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	5.46±0.13c	6.73±0.21a	6.93±0.21a	7.03±0.30a
10 µg/ml	6.92±0.07a	6.50±0.19a	4.68±0.24c	4.09±0.20b
25 µg/ml	6.47±0.16b	6.49±0.30a	5.17±0.04b	4.04±0.04b
50 µg/ml	4.38±0.07e	5.96±0.17a	4.45±0.05cd	4.26±0.09b
75 µg/ml	3.87±0.07f	5.06±0.16b	4.09±0.14d	3.69±0.21b
100 µg/ml	4.79±0.22d	4.76±0.19b	3.98±0.07d	3.56±0.09b

*: a, b, c, d, e, f harfleri ortalamalar arasındaki farkları göstermektedir. Aynı sütundaki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiksel ayırım yoktur ($P>0.05$)

(Ort±Std): Beş tekrarın ortalaması±standart hata

Enjeksiyon işleminden 24 saat sonra elde edilen veriler incelendiğinde kontrol grubunda 5.46 mg/100 mg olan protein miktarı, 10 µg/ml ve 25 µg/ml konsantrasyonlarında kontrole göre önemli düzeyde artmıştır. En düşük protein miktarı 3.87 mg/100 mg değeri ile 75 µg/ml olan konsantrasyondan elde edilmiştir. Kullanılan dimethoate konsantrasyonunun 50 µg/ml'nin üstüne çıkması protein miktarını kontrole ve daha düşük konsantrasyonlara göre düşürmüştür. 24 saatlik deney periyodu haricinde ölçüm yapılan hiçbir deney periyodunda denenen hiçbir konsantrasyon protein miktarını arttırmamıştır.

Deney periyodunun 48. saatteki veriler incelendiğinde 75 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında protein miktarı kontrole göre düşmüştür. Protein miktarı sırasıyla 5.06 ve 4.76 mg/100mg olarak gerçekleşmiştir. 10, 25 ve 50 µg/ml dimethoate enjeksiyonu protein miktarına kontrole göre olumlu veya olumsuz bir etkide bulunmamıştır.



Şekil 4.1. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nin toplam protein miktarına etkileri (A:24 Saat, B:48 Saat, C:72 Saat, D:96 Saat)

Protein miktarı 72. saatteki veriler incelendiğinde tüm dozlarda önemli şekilde düşmüştür (Şekil 4.1). Denenen konsantrasyonlar arasında en yüksek protein miktarı 5.17 mg/100mg ile dimethoate oranın 25 µg/ml olduğu deney serisinden elde edilmiştir. Bu değer kontrolden sonra en yüksek protein miktarıdır.

Deney periyodunun 96. saatindeki protein miktarı denenen konsantrasyonlarda kendi aralarındaki veriler incelendiğinde istatistiki olarak bir değişim gözlenmemiş olmakla birlikte kontrole göre önemli oranda düşüşler tespit edilmiştir. En yüksek protein miktarı 7.03 mg/100mg ile kontrolde ortaya çıkmıştır.

4.2. Dimethoate'nin *G. mellonella*'nın Toplam Lipid Miktarına Etkileri

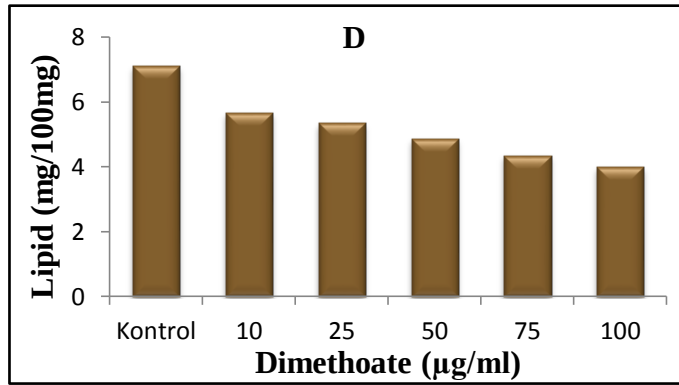
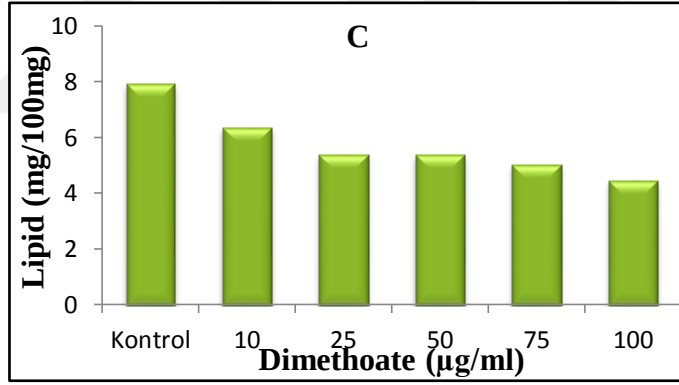
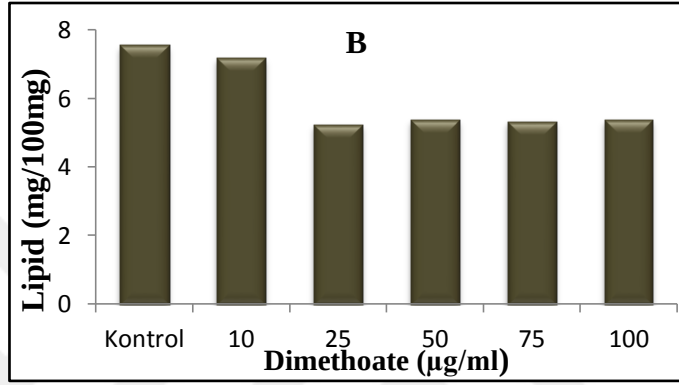
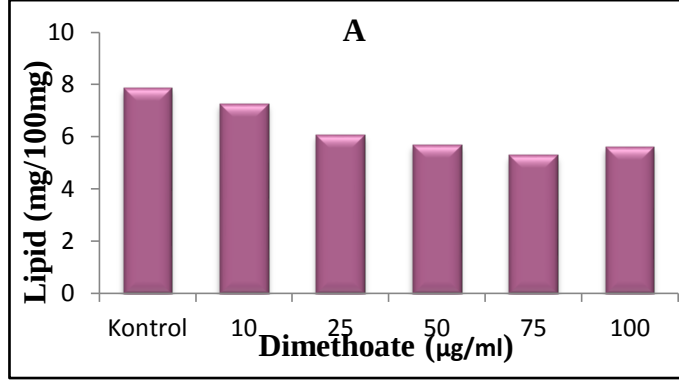
Çizelge 4.2'de farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın toplam lipid miktarına etkileri gösterilmiştir. 24, 48, 72 ve 96 saat dilimleri incelendiğinde her saat için artan doz miktarına bağlı olarak kontrole göre düşüş gözlemlenmekle birlikte özellikle 72 ve 96 saatlerinde kontrole göre lineer bir düşüş söz konusudur.

Çizelge 4.2. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın toplam lipid miktarına etkileri

Konsantrasyon	LİPİD (mg/100mg)			
	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	7.88±0.20a	7.56±0.43a	7.93±0.38a	7.11±0.21a
10 µg/ml	7.26±0.24b	7.19±0.31a	6.37±0.38b	5.66±0.22b
25 µg/ml	6.08±0.18c	5.24±0.19b	5.39±0.18c	5.35±0.14b
50 µg/ml	5.70±0.20cd	5.38±0.23b	5.38±0.25c	4.87±0.05c
75 µg/ml	5.28±0.16d	5.34±0.19b	5.02±0.08c	4.35±0.06d
100 µg/ml	5.60±0.17cd	5.38±0.25b	4.45±0.08c	3.99±0.07d

*: a, b, c, d harfleri ortalamalar arasındaki farkları göstermektedir. Aynı sütundaki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiksel ayırım yoktur ($P>0.05$)
(Ort±Std): Beş tekrarın ortalaması±standart hata

Lipid miktarı kontrol grubunda 24. saatte 7.88 mg/100mg olarak ölçülmüştür. Denen tüm konsantrasyonlardan elde edilen değerler kontrole göre düşmüştür.



Şekil 4.2. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın toplam Lipid miktarına etkileri (A:24 Saat, B:48 Saat, C:72 Saat, D:96 Saat)

Denenen dimethoate oranları arasında en yüksek lipid miktarı, konsantrasyonun 10 µg/ml olduğu durumunda 7.26 mg/100mg olarak hesaplanmıştır. Diğer denenen insektisit oranlarından elde edilen veriler arasında istatistiki bir ayırım söz konusu değildir.

48. saatte elde edilen veriler incelendiğinde 10 µg/ml konsantrasyonu lipid miktarına kontrole göre herhangi bir etki yapmamıştır. Söz konusu oranda lipid miktarı 7.19 mg/100mg olarak ölçülmüştür. Diğer oranlardan elde edilen veriler arasında istatistiki olarak bir fark olmamakla birlikte lipid miktarı kontraole göre önemli ölçüde düşmüştür.

Deney periyodunun 72. saatindeki veriler incelendiğinde lipid miktarı tüm dimethoate oranlarında kontrole göre düşmüştür. 25, 50, 75 ve 100 µg/ml dimethoate oranlarında elde edilen veriler arasında istatistiki bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.2). En yüksek ikinci veri 6.37 mg/100mg ile oranın 10 µg/ml olması durumunda elde edilmiştir.

Son saat dilimindeki verilere göre en yüksek lipid miktarı kontrol serisinden elde edilmiştir. Denenen oranlar lipid miktarını önemli derecede düşürmüştür en düşük lipid miktarları ise dimethoate oranın 75 ve 100 µg/ml olduğu durumda sırasıyla 4.35 ve 3.99 mg/100mg olarak gerçekleşmiştir.

4.3. Dimethoate'nin *G. mellonella*'nın Toplam Karbonhidrat Miktarına Etkisi

Çizelge 4.3'de farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın toplam karbonhidrat miktarına etkisi gösterilmiştir. 24, 48, 72 ve 96 saat dilimleri incelendiğinde uygulanan dozlarda kontrole göre bir düşüş gözlemlenmekle birlikte 48 ve 96 saatlerinde bu düşüş doz artışına bağlı olarak lineer bir şekilde devam etmiştir. 48. saat haricinde en yüksek lipid miktarı kontrol serisinde gözlenmiştir.

Karbonhidrat miktarı 24. saatte 10 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlarda sırasıyla 6.02 ve 5.89 mg/100mg olarak gerçekleşmiştir. Bu veriler arasında istatistiki ayırım yoktur. Söz konusu oranlar karbonhidrat miktarını kontrole göre düşürmüş olmakla birlikte denenen diğer konsantrasyonlara göre karbonhidrat miktarını arttırmıştır. 50, 75 ve 100 µg/ml dimethoate uygulaması sonucu oluşan karbonhidrat oranları arasında istatistiki bir fark bulunamamıştır. En düşük ilk iki dimethoate konsantrasyonu 48.

saatte karbonhidrat miktarına kontrole göre önemli bir etkide bulunmamıştır. Minimum lipid oranı 100 µg/ml'lik konsantrasyonda 4.86 mg/100mg olarak ölçülmüştür.

48. saatte larvalara 50 µg/ml ve daha yüksek dimethoate uygulanması karbonhidrat miktarını kontrole göre önemli ölçüde etkileyerek düşürmüştür.

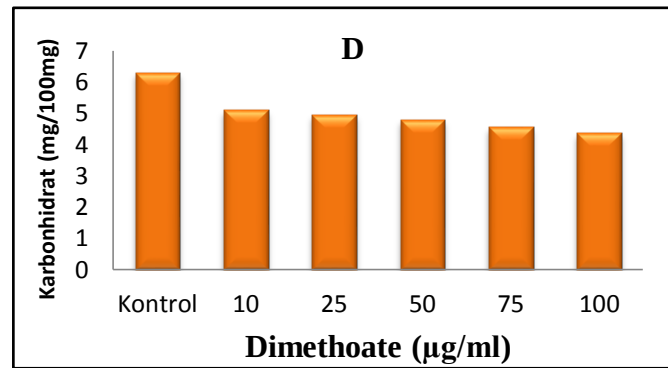
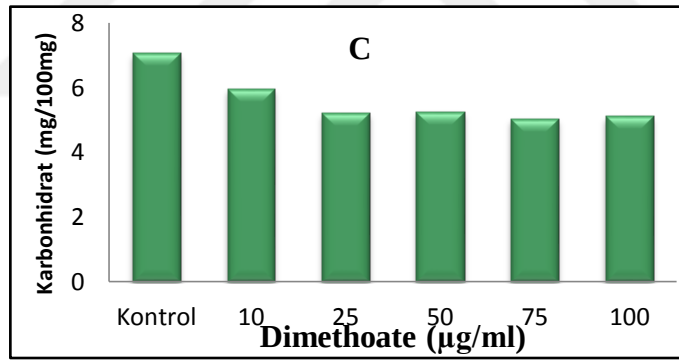
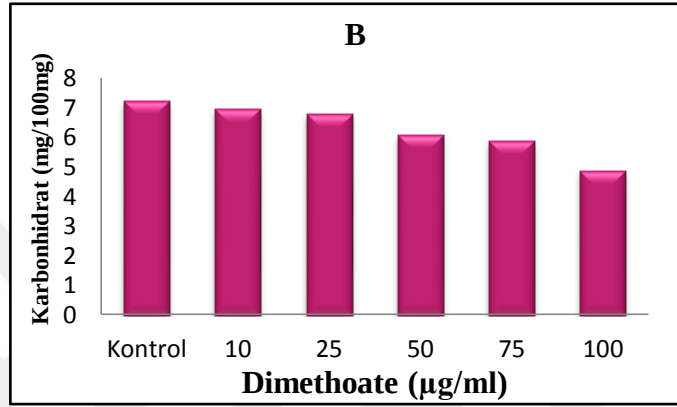
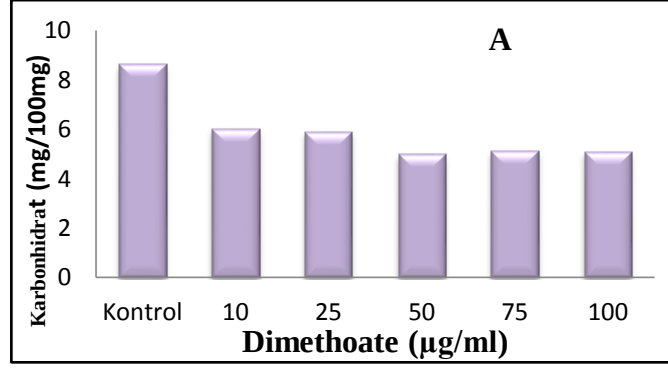
Çizelge 4.3. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın toplam karbonhidrat miktarına etkileri

KARBONHİDRAT (mg/100mg)				
Konsantrasyon	24 Saat	48 Saat	72 Saat	96 Saat
	(Ort±Std)	(Ort±Std)	(Ort±Std)	(Ort±Std)
Kontrol	8.64±0.33a	7.24±0.21a	7.06±0.29a	6.29±0.11a
10 µg/ml	6.02±0.13b	6.98±0.18a	5.96±0.32b	5.10±0.23b
25 µg/ml	5.89±0.05b	6.80±0.10a	5.22±0.23b	4.95±0.15b
50 µg/ml	4.98±0.24c	6.08±0.28b	5.24±0.21b	4.80±0.08bc
75 µg/ml	5.11±0.28c	5.89±0.24b	5.03±0.31b	4.55±0.09bc
100 µg/ml	5.09±0.10c	4.86±0.25c	5.11±0.35b	4.36±0.16c

*: a, b, c harfleri ortalamalar arasındaki farkları göstermektedir. Aynı sütundaki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiksel ayırım yoktur ($P>0.05$)

(Ort±Std): Beş tekrarın ortalaması±standart hata

72. saatte elde edilen verilere göre karbonhidrat miktarında doz artışına bağlı olarak bir değişiklik olmamakla birlikte denen tüm konsantrasyonlarda kontrole göre karbonhidrat miktarı düşmüştür. 96. saatteki veriler için doz artışına bağlı olarak lineer bir azalma söz konusudur (Şekil 4.3). Kontrolde 6.29 mg/100mg olan karbonhidrat miktarı insektisit oranının 25 µg/ml olması durumunda 4.95 mg/100mg, oranının 100 µg/ml olması durumunda ise 4.36 mg/100mg olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.3. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nin toplam karbonhidrat miktarına etkileri (A:24 Saat, B:48 Saat, C:72 Saat, D:96 Saat)

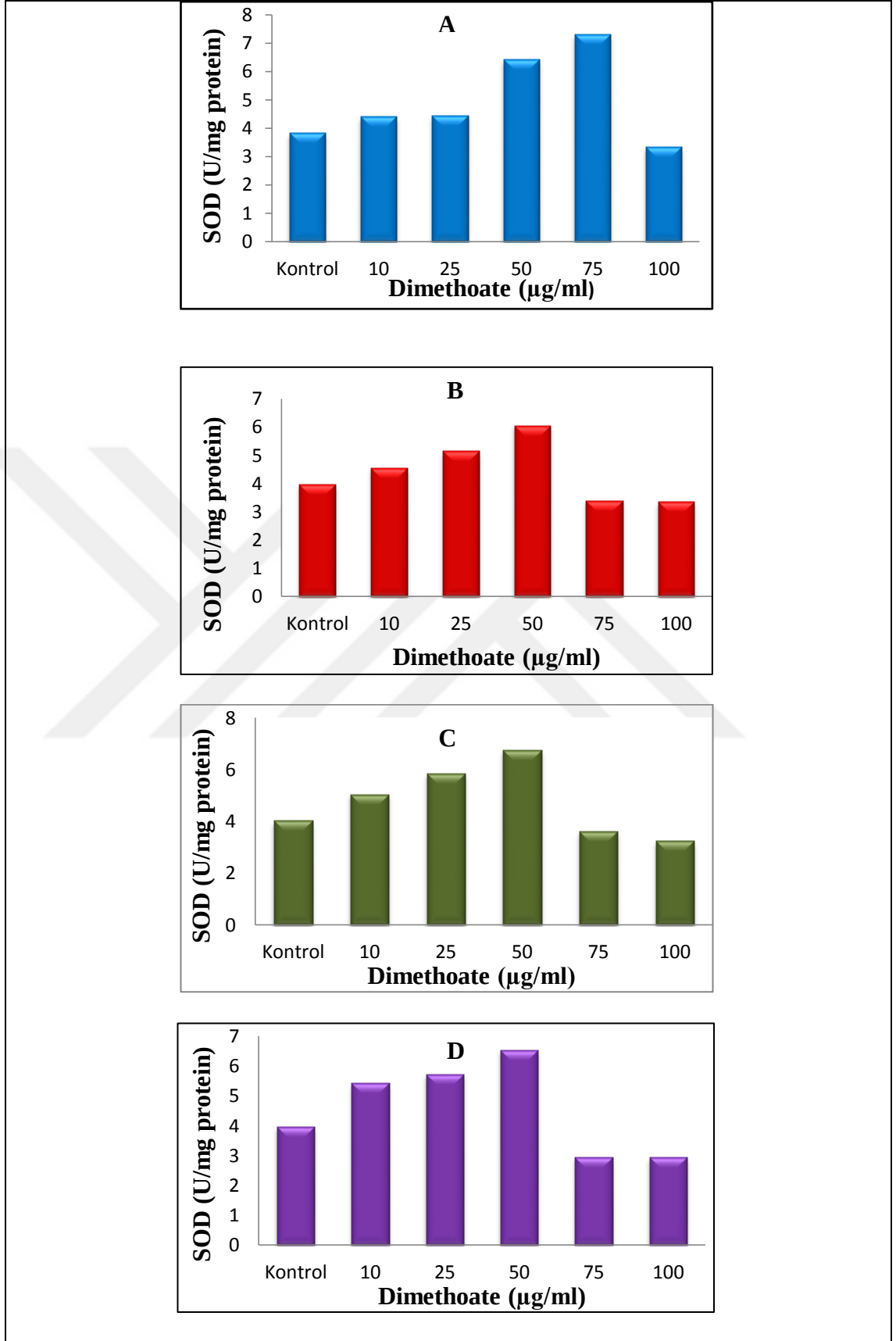
4.4. Dimethoate'nin *G. mellonella*'nın SOD Enzim Aktivitesine Etkisi

Çizelge 4.4'te farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın SOD enzim aktivitesine etkileri gösterilmiştir. 24 saat diliminde; 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 75 µg/ml konsantrasyonlarında kontrole göre önemli bir artış söz konusu iken 100 µg/ml konsantrasyonunda kontrole göre düşüş gözlemlenmiştir. En yüksek insektisit dozunda SOD aktivitesi bir önceki konsantrasyon olan 75 µg/ml göre önemli bir düşüş göstermiş olup söz konusu oranda elde edilen veri en düşük enzim aktivitesini göstermektedir.

Çizelge 4.4. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın SOD enzim aktivitesine etkileri

Konsantrasyon	SOD (U/mg protein)			
	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	3.830±0.077d	3.975±0.270d	4.024±0.069d	3.962±0.174c
10 µg/ml	4.401±0.168c	4.540±0.041c	5.046±0.060c	5.439±0.283b
25 µg/ml	4.453±0.067c	5.159±0.133b	5.853±0.090b	5.719±0.101b
50 µg/ml	6.436±0.170b	6.056±0.107a	6.741±0.150a	6.527±0.232a
75 µg/ml	7.307±0.072a	3.401±0.056e	3.615±0.048e	2.942±0.193d
100 µg/ml	3.341±0.060e	3.370±0.095e	3.237±0.090f	2.950±0.266d

*: a, b, c, d, e, f harfleri ortalamalar arasındaki farkları göstermektedir. Aynı sütundaki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiksel ayırım yoktur ($P>0.05$)
(Ort±Std): Beş tekrarın ortalaması±standart hata



Şekil 4.4. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın SOD enzim aktivitesine etkileri. (A:24 Saat, B:48 Saat, C:72 Saat, D:96 Saat)

SOD aktivitesinde 48, 72 ve 96 saat dilimleri arasında, 10 µg/ml, 25 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında kontrole göre artış tespit edilmiş olup 75 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında kontrole göre azalma söz konusudur.

Her üç zaman dilimi için en yüksek SOD aktivitesi 50 µg/ml dimethoate uygulamasından elde edilmiştir. Söz konusu orana kadar SOD aktivitesi lineer bir artış gösterirken dimethoate dozunun artışına bağlı olarak SOD aktivitesi ani bir düşüş göstermiştir (Şekil 4.4).

4.5. Dimethoate'nin *G. mellonella*'nın Katalaz Enzim Aktivitesine Etkisi

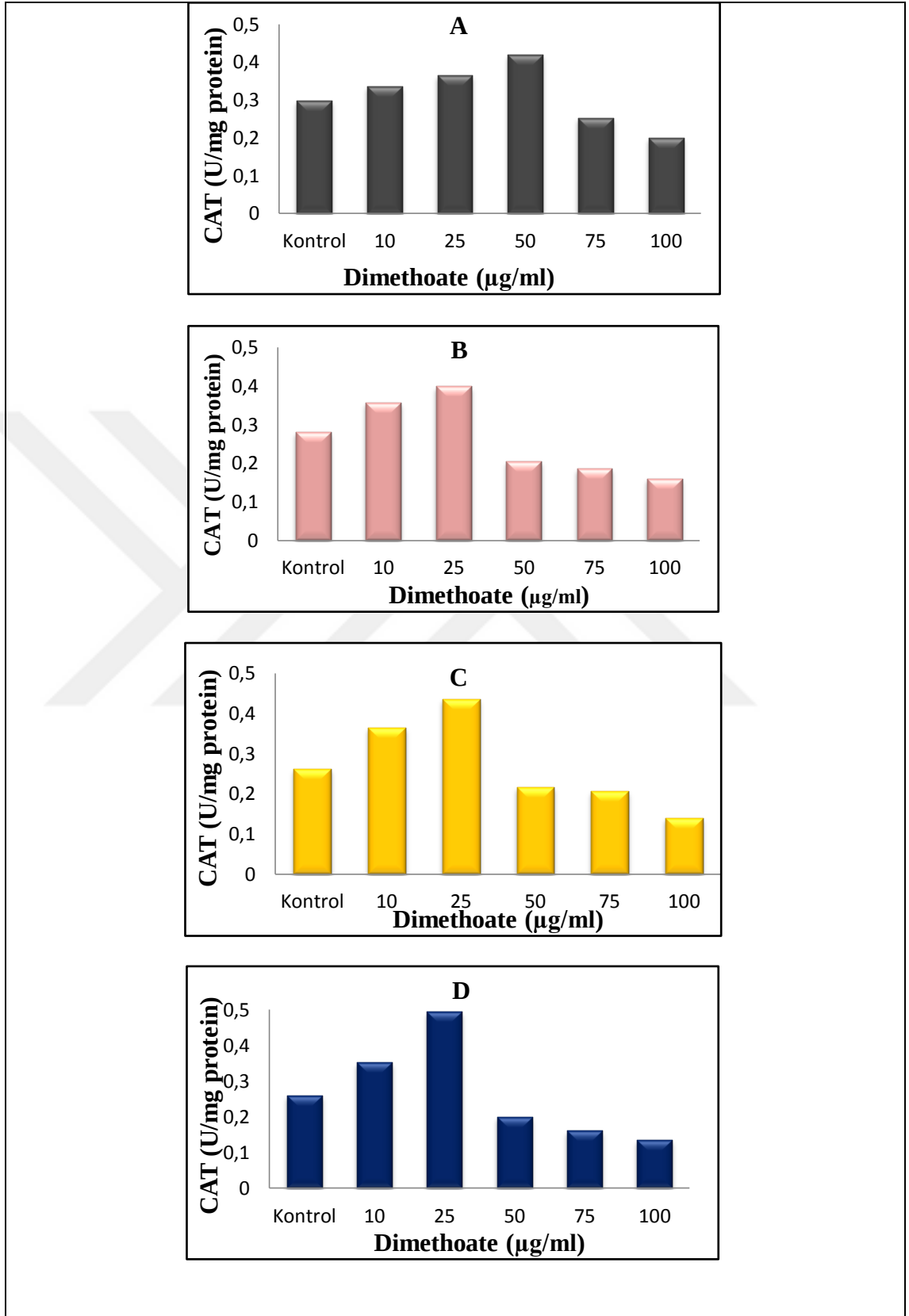
Çizelge 4.5'de farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın katalaz enzim aktivitesine etkisi gösterilmiştir. 24 saat dilimi incelendiğinde 10 µg/ml, 25 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında kontrole göre artış söz konusu iken 75 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında kontrole göre azalma gözlemlenmiştir. En yüksek katalaz aktivitesi 50 µg/ml konsantrasyonunda 0.420 U/mg protein olarak gerçekleşirken en düşük aktivite en yüksek insektisit oranında 0.200 U/mg protein olarak tespit edilmiştir. 48, 72 ve 96 saatlerinde elde edilen veriler incelendiğinde 10 µg/ml ve 25 µg/ml konsantrasyonlarında kontrole göre artış söz konusu olup 50 µg/ml, 75 µg/ml ve 100 µg/ml artan konsantrasyonlarında kontrole göre lineer bir düşüş gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın Katalaz enzim aktivitesine etkileri

Konsantrasyon	Katalaz (U/mg protein)			
	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	0.298±0.005d	0.281±0.008c	0.261±0.019c	0.259±0.004c
10 µg/ml	0.336±0.008c	0.357±0.006b	0.365±0.003b	0.352±0.010b
25 µg/ml	0.366±0.004b	0.399±0.009a	0.436±0.014a	0.494±0.010a
50 µg/ml	0.420±0.009a	0.205±0.007d	0.216±0.005d	0.200±0.004d
75 µg/ml	0.253±0.009e	0.186±0.002d	0.206±0.009d	0.161±0.006e
100µg/ml	0.200±0.003f	0.160±0.002e	0.139±0.002e	0.136±0.006f

*: a, b, c, d, e, f harfleri ortalamalar arasındaki farkları göstermektedir. Aynı sütundaki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiksel ayırım yoktur ($P>0.05$)

(Ort±Std): Beş tekrarın ortalaması±standart hata



Şekil 4.5. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın katalaz aktivitesine etkileri (A:24 Saat, B:48 Saat, C:72 Saat, D:96 Saat)

48. saatte kontrol grubundaki katalaz aktivitesi 0.281 U/mg protein olarak hesaplanmış 25 µg/ml dimethoate enjeksiyonu bu oranın 0.399 U/mg protein olarak gerçekleşmesine neden olmuştur. Söz konusu değer bu serideki en yüksek enzim aktivitesinindir. En düşük katalaz aktivitesi 0.160 U/mg protein değeri ile oranın 100µg/ml olduğu durumda gerçekleşmiştir. Benzer sonuçlar 72 ve 96 saat verileri içinde söz konusudur. 72. saatte en yüksek katalaz aktivitesi 0.436 U/mg protein, 96 saatteki en yüksek aktivite ise 0.494 U/mg protein ile dimethoate oranın 50 µg/ml olduğu durumda hesaplanmıştır (Şekil 4.5).

4.6. Dimethoate'nin *G. mellonella*'nın Malondialdehit (MDA) Düzeyine Etkileri

Çizelge 4.6.'da farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın MDA düzeyine etkileri gösterilmiştir. 24, 48, 72 ve 96 saat dilimlerinde genel olarak tüm konsantrasyonlarda kontrole göre belirgin bir artış söz konusudur.

Çizelge 4.6. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın MDA düzeyine etkileri

Konsantrasyon	MDA (nmol/mg protein)			
	24 Saat (Ort±Std)	48 Saat (Ort±Std)	72 Saat (Ort±Std)	96 Saat (Ort±Std)
Kontrol	11.938±0.211c	10.411±0.353d	10.184±0.321e	9.836±0.570d
10 µg/ml	12.192±0.413c	12.434±0.630c	14.591±0.338d	15.877±0.588c
25 µg/ml	14.835±0.274b	12.783±0.228c	14.042±0.315d	15.651±0.476c
50 µg/ml	16.947±0.820a	14.437±0.536bc	16.569±0.366c	15.998±0.803c
75 µg/ml	16.121±0.710ab	15.970±0.734b	19.473±1.140b	18.449±0.320b
100 µg/ml	17.676±0.434a	19.618±1.013a	21.590±0.671a	21.586±0.734a

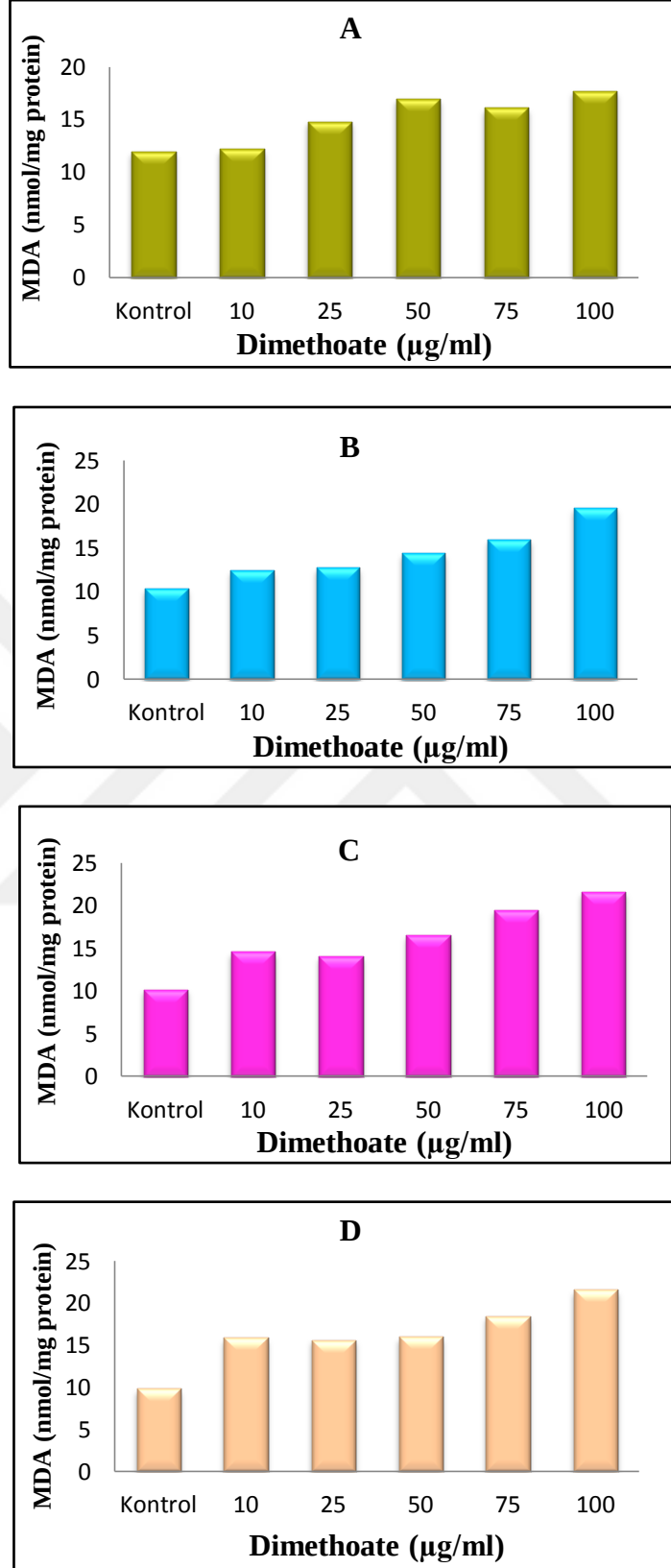
*: a, b, c, d, e harfleri ortalamalar arasındaki farkları göstermektedir. Aynı sütundaki aynı harfi içeren veriler arasında istatistiksel ayırım yoktur ($P>0.05$)
(Ort±Std): Beş tekrarın ortalaması±standart hata

Deney grubundaki tüm veriler incelendiğinde MDA miktarı sadece 24 saatlik deney periyodunda 10 µg/ml dimethoate enjeksiyonu sonunda kontrole göre bir değişim göstermemiştir. Diğer konsantrasyonlarda MDA miktarı kontrole ve en düşük dimethoate dozuna göre önemli ölçüde artmıştır. En düşük MDA miktarı kontrol grubunda gözlenmekle birlikte bu oran 24. saate 11.938 nmol/mg protein, 48. saate

10.411 nmol/mg protein, 72. saate 10.184 nmol/mg protein ve son saat diliminde ise 9.836 nmol/mg protein olarak hesaplanmıştır.

Genel olarak en yüksek MDA miktarı ise larvalara 100 µg/ml dimethoate enjeksiyonu sonucu ortaya çıkmıştır (Şekil 4.6). Fakat 24 saat verilerinde en yüksek değer 17.676 nmol/mg protein ile 100 µg/ml dimethoate uygulaması sonucu ortaya çıkarken bu oran ile 75 µg/ml enjeksiyon durumundaki elde edilen sonuç ile istatistiki bir fark meydana getirmemiştir.





Şekil 4.6. Farklı dimethoate konsantrasyonlarının *G. mellonella*'nın MDA miktarına etkileri (A:24 Saat, B:48 Saat, C:72 Saat, D:96 Saat)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tarımsal zararlıların ortadan kaldırılması için gerekli işlemlerin hemen hemen hepsi bilimsel anlamda yapılan çalışmalarından elde edilen çıktılar ile yukarı doğru bir ivme kazanacaktır. Zararlı canlıları ortadan kaldırmak için ise en etkin ve kolay yöntem insektisit kullanımıdır. İnsektisitlerin bilinçsiz kullanımı sonucu ekolojik dengenin bozulması kaçınılmaz bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır. Yeniden yapılanma süreci ise uzun zaman aldığından bu zararlılara karşı alternatif metotların geliştirilmesi gerekmektedir.

Böceklerin popülasyon yoğunluğunun artmasında, üreme potansiyelini etkileyen, besinin ve sahip oldukları total karbonhidrat, lipid ve protein miktarı gibi faktörlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir (Olson vd. 2000, Hogervorst vd. 2007). Diğer tüm hayvanlarda olduğu gibi böcekler de gelişme, büyüme, üreme gibi yaşamsal faaliyetleri için proteinlere gereksinim duymaktadırlar (Dadd 1985). Amino asitler sinirsel iletimde, fosfolipitlerin sentezinde, enerji üretiminde ve morfogenetik işlemlerde önemli bir biyolojik role sahiptir (Chen 1985). Lipidler böceklerde eşeysel olgunluğa ulaşmada, yumurta üretiminde (Olson vd. 2000) ve enerji ihtiyacının karşılanmasında (Ryan ve Van der Horst 2000) rol oynamaktadır. Karbonhidratlar ise böceklerin yaşamları boyunca enerji ihtiyaçlarının karşılanmasında rol oynayan önemli bir makromoleküldür (Chen ve Fadamiro 2006).

Canlılar üzerine ksenebiyotiklerin etkilerinin ortaya çıkartılabilmesi için, *G. mellonella* L. oldukça iyi bir model organizma olmuştur. Fizyolojik, immünolojik, biyokimyasal ve parazitolojik çalışmada model organizma olarak *G. mellonella*'nın kullanılma nedenleri arasında hızlı yaşam döngüsü, larva büyüklüğü ve sentetik ortamlarda kolay büyümesi sayılabilir. (Buyukguzel 2006, Coskun vd. 2006, Dubovskiy vd. 2008).

Çevresel zararlı olarak adlandırılan kimyasal maddeler hücresel seviyede, membran transport mekanizmasını etkiler, lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin oksidatif hasarına yol açar, reaktif oksijen türlerinin oluşumuna, lipid peroksidasyonuna, antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin aktivitelerinde değişikliğe yol açarken, organizma düzeyinde ise besinlerin alınımını, sindirimini, hormonların salınımı ve sentezini etkileyebilir (Damien vd. 2004).

Serbest radikal oluşumu, antioksidan sistemin zarar görmesi ve oksidatif hasar, pestisitlerin de dahil olduğu birçok ksenebiyotik toksisitesi sonucu uyarılmaktadır (Maran vd. 2009, Ozden vd. 2013). Oksidanlardan örneğin süperoksit anyonları, hidroksil ve hidrojen peroksit, antioksidan sistemlerin inhibe olması sonucu proteinlerin oksidasyonuna, lipid peroksidasyonuna ve hatta apoptosise neden olabilir (Krishnan ve Kodrik 2006). Üreme ve bağışıklık sistemindeki bozukluklar ile yaşam süresinin düşüşü oksidatif stresin uzun süreli etkisi sonucunda ortaya çıkabilir (Banerjee vd. 1999). Bundan dolayı oksidatif stres parametrelerindeki değişikliğin belirlenmesi, çevresel risk değerlendirmesinde ve çevre kirliliğinin erken tespitinde biyomarkör olarak kullanılması yüksek yapıli organizmaların bu kirleticilere karşı vereceği tepkiler açısından önemli olabilir (Leomanni vd. 2015).

Askorbat peroksidaz, SOD, katalaz, peroksidaz, GST, askorbik asit ve vitamin E böceklerdeki antioksidan savunma sisteminin en önemli bileşenleridir. (Felton ve Summers 1995). SOD organizmada oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) 'nin H_2O_2 dönüşümünü sağlarken oluşan H_2O_2 katalaz ve askorbat peroksidazlar sayesinde elimine edilir. Bununla birlikte, GST lipid peroksidasyonuna sebep olan etkenleri ortadan kaldırırken aynı zamanda hücrelerden hidrojen peroksiti uzaklaştırır (Barbehenn, 2002, Dubovskiy vd. 2008).

İnsektisitlerin neden olduğu oksidatif stres altında karbonhidrat ve lipid gibi enerji kaynaklarının sentezi, depolanması ve kullanımı değişiklik gösterebilir (Saleem vd. 1998). Toksik maddeler organizmaya girdikten hemen sonra detoksifikasyon enzimleri tarafından ortadan kaldırılmaya çalışılır. Bu işlem için büyük miktarda enerji gereksinimi vardır (Choi vd. 2001, Maryanski vd. 2002). Yapılan çalışmalarda, *Pimpla turionellae* (Sak vd. 2006) ve *Spodoptera littoralis*'de (Rashwan 2013) lipid miktarının, *Oreochromis mossambicus* (Raj ve Joseph 2015) ve *Drosophila melanogaster*'de (Kissoum ve Soltani 2016) karbonhidrat miktarının benzer şekilde düştüğü gösterilmiştir.

Sunulan çalışmada özellikle yüksek dimethoate konsantrasyonlarında lipid ve karbonhidrat miktarının önemli derecede düşmüş olması daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Lipid ve karbohidrat miktarındaki bu azalmanın yukarıda bahsedildiği gibi enerji ihtiyacını karşılamaya yönelik olduğu düşünülmektedir.

Bununla birlikte zararlı maddelerin söz konusu biyomoleküllerin yapısal anlamda bozulmalarını tetiklemiş olmaları da kaçınılmazdır.

Akut (Akbar vd. 2012) ve uzun süreli (Adamski vd. 2003, Büyükgüzel 2006, Wu vd. 2011) insektisitlere maruz bırakılan böceklerin antioksidan enzim aktivitelerinde görülen değişiklikler söz konusu pestisitlerin fizyolojik ve toksik etkilerinin ortaya çıkarılmasında önemli rol oynar.

SOD aktivitesi, genel olarak denenen düşük dimethoate konsantrasyonlarında önemli ölçüde artmıştır. Gözlenen bu aktivite artışı, dimethoate'nin neden olduğu oksidatif stres sonucu artan süperoksit radikallerinin ortamdan uzaklaştırılabilmesi için SOD aktivitesinin arttığını açıkça göstermesi açısından dikkat çekicidir. Bulunan sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Emre vd. 2013, Kayis vd. 2015). Çalışmalarda reaktif oksijen türevlerindeki artışa bağlı olarak SOD aktivitesinde artış bildirilmiştir (Krishnan ve Kodrik 2006, Karthi vd. 2014), bununla birlikte süperoksit anyonlarının birikmesi SOD aktivitesinde düşüşe neden olabilmektedir (Polte ve Tyrrell 2004).

Katalaz aktivitesinde aynı SOD aktivitesinde olduğu gibi benzer sonuçlar göstermiştir. Dimethoate'nin neden olduğu oksidatif stres sonucu artan hidrojen peroksitin ortamdan uzaklaştırılabilmesi için katalaz aktivitesinde artan SOD aktivitesi ile birlikte lineer bir artış gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda ise hem SOD hem de katalaz aktivitesi azalmıştır bu durum her iki enziminde artan dimethoate konsantrasyonuna bağlı olarak ihbibe olduğunun açık bir göstergesidir. Bununla birlikte dimethoate konsantrasyonuna bağlı olarak azalan katalaz aktivitesi, aşırı miktarda oluşan süperoksit radikallerinin katalaz aktivitesini inhibe etmiş olabileceği fikrini akla getirmektedir. Benzer şekilde katalaz inhibisyonu kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres altındaki *G. mellonella* larvalarında gösterilmiştir (Emre vd. 2013). Bununla birlikte chlorpyrifos ile *Cydia pomonella* üzerine yapılan çalışmada katalaz ve SOD enzim aktivitelerinin önemli bir değişim olmadığı bildirilmiştir (Morales vd. 2017). Başka bir çalışmada ise SOD ve katalaz aktivitesinin insektisit uygulaması sonucu değiştiği fakat bu değişimin doza bağlı olmadığı bildirilmiştir (Wu vd. 2011).

Bazı araştırmalar böceklerin düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2 'i ortadan kaldırmak için askorbat peroksidaz (APOX) ve dehidroaskorbat reduktaz (DHAR)

enzimlerini kullandıklarını bildirmişlerdir (Summers ve Felton 1993, Mathews vd. 1997).

Çalışmamızda ortaya çıkan katalaz aktivitesindeki azalmanın, çok miktarda oluşan ve SOD aktivitesi sonucu ortamdaki uzaklaştırılamayan süperoksit radikallerinin, katalaz enzimini inhibe etmesi sonucu meydana geldiği ve oluşan H_2O_2 'nin yukarıda bahsedilen diğer enzimler tarafından temizlenmiş olabileceği düşünülmektedir. Fakat bu mekanizmanın nasıl gerçekleştiğinin tam olarak anlaşılması için bu enzimlerin aktivitelerinin hepsinin birlikte araştırıldığı bir çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çok sayıda yapılan çalışmada böceklerde insektisit stresi altında antioksidan enzim aktivitelerinde ve MDA seviyelerinde değişikliklerin gözlemlendiği belirtilmiştir (Icen vd. 2005, Büyükgüzel 2009, Aslantürk vd. 2011). Lipid peroksidasyonunun belirteci olan MDA düzeyi benzer bir şekilde birçok çalışmada insektisit etkisinde artmıştır. Örneğin malation ve chlorpyrifos *Oxya chinensis* (Wu vd 2011), organofosforlu insektisitler olan trichlorfon ve dimethoate uygulaması sonucu (Sharma vd. 2005, Catalgol vd. 2007), MDA üretiminin arttığı rapor edilmiştir. Sunulan çalışmadaki dimethoate konsantrasyonlarına bağlı olarak MDA miktarının artması daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak dimethoate *G.mellonella*'da artan konsantrasyonuna paralel olarak oksidatif strese neden olmuştur. Antioksidan enzim aktivitelerini etkilemiş ve protein, lipid ve karbonhidrat kaynaklarında önemli azalmalara neden olmuştur.

KAYNAKLAR

- Adamski, Z., Ziemnicki, K., Fila, K., Žikić, R. and Štajn, A., (2003). Effects of long-term exposure to fenitrothion on *Spodoptera exigua* and *Tenebrio molitor* larval development and antioxidant enzyme activity, *Biological Letters*, 40: 43–52.
- Aebi, H., (1984). Catalase *in vitro*, *Methods Enzymol*, 105: 121–126.
- Akay, C., (2004). Biomarkörlerin toksikolojide kullanımı, *Gülhane Tıp Dergisi*, 46 (1): 73–83.
- Akbar, S.M.D., Sharma, H.C., Jayalakshmi, S.K. and Sreeramulu, K., (2012). Effect of pyrethroids, permethrin and fenvalerate, on the oxidative stress of *Helicoverpa armigera*, *World Journal of Science and Technology*, 2: 1–5.
- Allan, L., (2000). Wax moth and its control, Department of Agriculture Western Australia, <http://www.agric.wa.gov.au/agency/pubns/farmnote/2000/f00697.htm>.
- Almeida, E. A., Bainy, A.C.D., Loureiro, A.P.M., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Onuki, J. and Barbosa, T., (2007). Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicator of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants lipid peroxidation and DNA damage, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146A: 588-600.
- Altuntaş, H., (2015a). Effects of ethephon on the hemolymph metabolites of the greater wax moth *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: Pyralidae), *Acta Physica Polonica A*, 128: 2-B.
- Altuntaş, H., (2015b). Determination of gibberallic acid (GA₃)-Induced oxidative stress in model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), *Environmental Entomology*, 44(1): 100-105.
- Amara, I. B., Soudani, N., Troudi, A., Hakim, A., Zeghal, K.M., Boudawara, T. and Zeghal, N., (2012). Dimethoate induced oxidative damage and histopathological changes in lung of adult rats, *Modulatory Effects of Selenium and/or Vitamin E*, *Biomed Environ Sci*, 25(3): 340-351.
- Aslanturk, A., Kalender, S., Uzunhisarcikli, M. and Kalender, Y., (2011). Effects of methidathion on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in midgut tissues of *Lymantria dispar* (Lepidoptera) larvae, *Journal of Entomological Research Society*, 13: 27–38.

- Augustyniak, M., Babczynska, A., Migula, P., Wilczek, G., Kafel, A., Augustyniak, M. and Laszczyca, P., (2005). Joint effects of dimethoate and heavy metals on metabolic responses in a grasshopper (*Chorthippus brunneus*) from a heavy metals pollution gradient, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 141(4): 412-419.
- Baghban, A., Sendi, J.J., Zibae, A. and Khosravi, R., (2014). Effect of heavy metals (Cd, Cu and Zn) on feeding indices and energy reserves of the cotton boll worm *helicoverpa Armigera Hübner* (Lepidoptera:Noctuidae), *Journal of Plant Protection Research*, 54(4): 367-373.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S.T. and Chakraborty, A.K., (1999). Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers, *Toxicology Letters*, 107: 33-47.
- Barbehenn, R.V., (2002). Gut-based antioxidant enzymes in a polyphagous and a graminivorous grasshopper, *Journal of Chemical Ecology*, 28:1329-1347.
- Bar-Or, D., Rael, L.T., Lau, E.P., Rao, N.K.R., Thomas, G.W., Winkler, J.V., Yukl, R.L., Kingston, R.G. and Curtis, C.G., (2001). An analog of the human albumin N-terminus (Asp-Ala -His- Lys) prevents formation of copper induced reactive oxygen species, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284: 856-862.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. and Wahli, T., (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution, *Journal of Fish Diseases*, 22: 25-34.
- Bhagat, J., Ingole, B. S. and Singh, N., (2016). Glutathione S-transferase, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipid peroxidation as biomarkers of oxidative stress in snails, *Invertebrate Survival Journal*, 13: 336-349.
- Bronskill, J.K., (1961). A cage to simplify the rearing of greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae), *Journal Lep. Society*, 102-104.
- Buyukguzel, E., (2009). Evidence of oxidative and antioxidative responses by *Galleria mellonella* larvae to malathion, *Journal of Economic Entomology*, 120(1): 152-159.

- Buyukguzel, K., (2006). Malathion-induced oxidative stress in a parasitoid wasp: Effect on adult emergence, longevity and oxidative and antioxidative response of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae), Journal of Economic Entomology, 99: 1225– 1234.
- Büyükgüzel, K., (2006). Malathion-induced oxidative stress in a parasitoid wasp: effect on adult emergence, longevity, fecundity, and oxidative and antioxidative response of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae), Journal of Economic Entomology, 99: 1225–1234.
- Catalgol, B.K., Ozden, S. and Alpertunga, B., (2007). Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes, Toxicology in Vitro, 21: 1538–1544.
- Charriere, J. D. and Imdorf, A., (1999). Protection of honey combs from wax moth damage, American Bee Journal, 139: 627-630.
- Chen, P. S., (1985). Amino acid and protein metabolism in: Kerkut G. A. and L. I. Gilbert (eds), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, pp. 177–219.
- Chen L. and Fadamiro H.Y., (2006). Comparing the effects of five naturally occurring monosaccharide and oligasaccharide sugars on longevity and carbohydrate nutrient levels of a parasitic phorid fly, *Pseudacteon tricuspis*, Physiological Entomology, 31: 46-56.
- Choi, J., Roche, H. and Caquet, T., (2001). Hypoxia, hyperoxia and exposure to potassium dichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae) larvae, Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology and Pharmacology, 130(1): 11-17.
- Coskun, M., Kayis, T., Sulanc, M. and Ozalp, P., (2006). Effects of different honeycomb and sucrose levels on the development of greater wax moth *Galleria mellonella* larvae, International Journal of Agriculture and Biology, 6: 855-858.
- Cyborovsky, B., (2000). Temperature dependent regulatory mechanism of larval development of the wax moth (*Galleria mellonella*), Acta Biochemical Polonica, 47(1): 215-221.

- Dadd, R.H., (1985). Nutrition organisms, in comprehensive insect physiology, Biochemistry and Pharmacology, Eds. Kerkut GA, Gilbert LI, Pergamon, Oxford National Academy Press, Washington, 8: 313-390.
- Damien, C., Chantal, V.H., Pirouz, S., Zerimech, F.H., Laurence, J. and Jean, M.H., (2004). Cellular impact of metal trace elements in Terricolous lichen *Diploschistes muscorum* (Scop.) R. Sant.–identification of oxidative stress biomarkers, Water Air and Soil Pollution, 152: 55–69.
- Davies, T.G.E., (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels, 59(3):151-162.
- De La Torre, F. R., Ferrari, L. and Salibian, A., (2002). Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species, Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 131: 271-280.
- Dubovskiy, I. M., Martemyanov, V. V., Vorontsova, Y. L., Rantala, M. J., Gryzanova, E. V. and Glupov, V. V., (2008). Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae), Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 148:1-5.
- Dubovskiy, I.M., Kryukova, N.A., Glupov, V.V., Ratcliffe, N.A., (2016). Encapsulation and nodulation in insects, Invertebrate Survival Journal, 13: 229-246.
- Ellis, J.D., Graham, J.R. and Mortensen, A., (2013). Standard methods for wax moth research, Journal of Apicultural Research, 52(1): 1-17.
- Emre, I., Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O. and Cogun, H.Y., (2013). Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and malondialdehyde content in cadmium-treated *Galleria mellonella* larvae, Annals of the Entomological Society of America, 106(3): 371-377.
- Erdem, M. and Büyükgüzel, E., (2015). The effects of xanthotoxin on the biology and biochemistry of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralide), Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 89(4): 193-203.
- Felton, G.W. and Summers, C.B., (1995). Antioxidant systems in insects, Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 29: 187–197.
- Gallo, M. A., Lawryk, N. J., (1991). Organic Phosphorus Pesticides, Academic Press, New York, 2: 917–1123.

- Gultekin, F., Delibas, N., Yasar, S. and Kilinc, I., (2001). In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rat, *Archives of Toxicology*, 75: 88-96.
- Haewoon, O., (1995). Developing periods and damage patterns of combs by the greater wax moth, *Galleria mellonella*, *Korean Journal Apiculture*, 10(1): 5-10.
- Hermes-Lima, M. And Zenteno-Savin, T., (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology*, 133: 537-556.
- Hewitt, S. M., Dear, J. and Star, R.A., (2004). Discovery of protein biomarkers for renal diseases, *Journal of the American Society Nephrology*, 15: 1677–1689.
- Hız, P., Erdem, M., Büyükgüzel, E. ve Büyükgüzel, K., (2016). Gemifloksasinin *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: pyralidae) erginlerinin bazı biyolojik özelliklerine etkisi, *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 22(5):777-784.
- Hogervorst, P.A.M., Wäckers, F.L. and Romeis, J., (2007). Effect of honeydew sugar composition on the longevity of *Aphidius ervi*, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 122: 223-232.
- Holt, E. A. and Miller, S. W., (2010). Bioindicators: Using organisms to measure environmental impacts, *Nature Education Knowledge*, 3(10): 8
- Icen, E., Armutcu, F., Buyukguzel, K., and Gurel, A., (2005). Biochemical stress indicators of greater wax moth exposure to organophosphorus insecticides, *Journal of Economic Entomology*, 98: 358–366.
- Karthi S., Sankari R. and Shivakumar M.S., (2014). Ultraviolet-B light induced oxidative stress: effects on antioxidant response of *Spodoptera litura*, *Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology*, 135:1–6.
- Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O. and Emre, I., (2015). Alterations in antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation and ion balance induced by dichlorvos in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Annals of the Entomological Society of America*, 108(4): 570-574.
- Kehrer, J.P., (1993). Free radical as mediator of tissue injury and disease, *Critical Reviews in Toxicology*, 23: 21–48.

- Kidd, H. and James, D.R., (1991). Organophosphates Eds. the agrochemicals handbook, royal society of chemistry information services, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 3: 5-14.
- Kissoum, N. and Soltani, N., (2016). Spiromesifen, an insecticide inhibitor of lipid synthesis, affects the amounts of carbohydrates, glycogen and the activity of lactate dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*, Journal of Entomology and Zoology Studies, 4(1): 452-456.
- Krams, I., Kecko, S., Kangasselo, K., Moore, F. R., Jankevics, E., Inashkina, I., Krama, T., Lietuvielis, V., Meija, L. and Rantala, M. J., (2015). Effects of food quality on trade-offs among growth, immunity and survival in the greater wax moth *Galleria mellonella*, Insect Science, 22(3): 431-439.
- Krishnan, N. and Kodrik, D., (2006). Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? Journal of Insect Physiology, 52: 11-20.
- Leomanni, A., Schettino, T., Calisi, A., Gorbi, S., Mezzelani, M., Regoli, F. and Lionetto, M.G., (2015). Antioxidant and oxidative stress related responses in the Mediterranean land snail *Cantareus apertus* exposed to the carbamate pesticide carbaryl, Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 168: 20–27.
- Li, L., Zheng, B. and Liu, L., (2010). Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions approaches and trends, Procedia Environmental Sciences, 2: 1510-1524.
- Lowry, O. H., Rose Brough, N. J., Farr, A. L. and Randall, V. J., (1951). Protein measurement with the folin phenol, Journal of Biological Chemistry, 193: 265.
- Maran, E., Fernandez, M., Barbieria, P., Font, G. and Ruiz, M.J., (2009). Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters, Ecotoxicology and Environmental Safety, 72: 922–930.
- Marutirao, G.R., (2013). “ Histopathological changes in the ovary of fresh water fish *Puntius ticto* under dimethoate toxicity ”, The Bioscan, 8 (3) : 989-992.
- Maryanski, M., Kramarz, P., Laskowski, R., and Niklinska, M., (2002). Decreased energetic reserves, morphological changes and accumulation of metals in Carabid Beetles (*Poecilus cupreus* L.) exposed to zinc or cadmium contaminated food, Ecotoxicology, 11: 127–139.

- Mathews, C.M., Summers, C.B. and Felton, G.W., (1997). Ascorbate peroxidase: A novel antioxidant enzyme in insects, *Archives Insect Biochemistry Physiology*, 34: 57-68.
- Mobasheri, A. and Cassidy, J.P., (2010). Biomarkers in veterinary medicine: Towards targeted, individualised therapies for companion animals, *The Veterinary Journal*, 185: 1–3.
- Morales, L.B.P., Alzogaray, A., Cichón, L., Garrido, S., Soleño, J. and Montagna, C. M., (2017). Effects of chlorpyrifos on enzymatic systems of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) adults, *Insect Science*, 24: 455-466.
- Olson, D. M., Fadamiro, H., Lundgren, J. G. and Heimpel, G. E., (2000). Effects of sugar feeding on carbohydrate and lipid metabolism in a parasitoid wasp, *Physiology Entomology*, 25: 17-25.
- Ozden, S., Catalgol, B., Gezginici-Oktayoglu, S., Karatug, A., Bolkent, S. and Alpertunga, B., (2013). Acute effects of methiocarb on oxidative damage and the protective effects of vitamin E and taurine in the liver and kidney of Wistar rats, *Toxicology Industrial Health*, 29: 60–71.
- Pisochi, A. M. and Pop, A., (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97: 55-74.
- Polte T. and Tyrrell R.M., (2004). Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression, *Free Radical Biology and Medicine*, 36: 1566–1574.
- Raj, S. J, and Joseph, B., (2015). Impact of acetamiprid toxicity on biochemical biomarkers (protein and carbohydrate) in some tissues of the fish *Oreochromis mossambicus*, *International Journal of Zoological Research*, 11 (5): 222-227.
- Rashwan, M., (2013). Biochemical impacts of rynaxypyr (Coragen) and spinetoram (Radiant) on *Spodoptera littoralis* (Boisd.), *Nature and Science*, 11(8): 40-47.
- Ritter, W., Perschil, F. and Vogel, R., (1992). Comparison of the effect of various methods for the control of wax moths, *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung*, 26: 11-13.
- Ryan, R.O. and Van der Horst, D.J., (2000). Lipid transport biochemistry and its role in energy production, *Annual Review Entomology*, 45: 233-260.

- Sak, O., Uckan, F. and Ergin, E., (2006). Effects of cypermethrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Belgian Journal of Zoology*, 136(1): 53-58.
- Saleem, M.A., Shakoori, A.R. and Mantle, D., (1998). Macromolecular and enzymatic abnormalities induced by a synthetic pyrethroid, Ripcord (cypermethrin) in adult beetles of stored grain pests, *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Col. Tenebrionidae), *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 39: 144-154.
- Sharma, Y., Bashir, S., Irshad, M., Datta Gupta, S. and Dogra, T.D., (2005). Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats, *Toxicology*, 206: 49–57.
- Stone, D., Jepson, P., Kramarz, P. and Laskowski, R., (2001). Time to death response in carabid beetles exposed to multiple stressors along a gradient of heavy metal pollution, *Environmental Pollution*, 113(2): 239-244.
- Sugeçti, S., Büyükgüzel, E. and Büyükgüzel, K., (2015). Laboratory assays of the effects of oxfendazole on biological parameters of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Journal of Entomological Science*, 51(2): 129-137.
- Sun, Y., Oberley, L.W. and Li, Y., (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase, *Clinical Chemistry*, 34(3): 497–500.
- Summers, C.B. and Felton, G.W., (1993). Antioksidant role of dehydroascorbic acid reductase in insects, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1156: 235-238.
- Tesch, G.H., (2010). Serum and urine biomarkers of kidney disease: A pathophysiological perspective, *Nephrology*, 15 (6): 609-616.
- URL 1: <http://www.solverkimya.com> (2017).
- Vadim, Y., Olga N., Miranda, M., Maksim V., Katherine, J., Nadja, R., Viktor, V., İvan, M. and Tariq, M., (2017). Fungal infection dynamics in response to temperature in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*, *Insect Science*, 00: 1-13.
- Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N. P. E., (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.
- Van Handel, E., (1985a). Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes, *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1: 199-301.

- Van Handel, E., (1985b). Rapid determination of total lipid's mosquitoes, Journal of the American Mosquito Control Association, 1: 302-304.
- Velki, M. and Hackenberger B. K., (2012). Species-specific differences in biomarker responses in two ecologically different earthworms exposed to the insecticide dimethoate, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 156: 104-112.
- Wilczek, G., Medrzak M., Augustyniak, M., Wilczek, P. and Stalmach, M., (2016). Genotoxic effects of starvation and dimethoate in haemocytes and midgut gland cells of wolf spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae), Environmental Pollution 213: 370-378.
- Wu, G. and Yi, Y., (2014). Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 167: 131-139.
- Wu, H.H., Zhang, R., Liu, J.Y., Guo, Y.P. and Ma, E.B., (2011). Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Arididae), Chemosphere, 83: 599–604.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ahmet GÜNAY
Doğum Yeri : Hınıs
Doğum Tarihi : 04.01.1990
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Erdemir Lisesi - 2006

Lisans : Adıyaman Üniversitesi Fen Bilgisi Öğretmenliği -
2012

Yüksek Lisans : Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü –
2017

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

- Kahta İlçe Milli Eğitim Müdürlüğü Şehit Medet Mat Ortaokulu,
2017