

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI



Beauveria bassiana AgB.20-02’NİN FARKLI PİRİNÇ
ÇEŞİTLERİNDE KİTLE ÜRETİM OLANAKLARININ
BELİRLENMESİ VE ISLATILABİLİR TOZ
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EBRU KURTARICI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. MEHMET ERHAN GÖRE

BOLU, TEMMUZ - 2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ebru KURTARICI tarafından hazırlanan “*Beauveria bassiana* AgB.20-02’NİN FARKLI PİRİNÇ ÇEŞİTLERİNDE KİTLE ÜRETİM OLANAKLARININ BELİRLENMESİ VE ISLATILABİLİR TOZ FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir. 28/07/2023

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Mehmet Erhan GÖRE
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Göksel ÖZER
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Harun BAYRAKTAR
Ankara Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,
- aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin 17/08/2023 tarihinde Turnitin adlı intihal tespit programından enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %11 olarak tespit edilmiştir.

.....
EBRU KURTARICI

ÖZET

***Beauveria bassiana* AgB.20-02’NİN FARKLI PİRİNÇ
ÇEŞİTLERİNDE KİTLE ÜRETİM OLANAKLARININ BELİRLENMESİ
VE ISLATILABİLİR TOZ FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
EBRU KURTARICI
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. MEHMET ERHAN GÖRE)**

**BOLU, TEMMUZ - 2023
XII + 33**

Entomopatojen funguslar içerisinde yer alan *Beauveria bassiana* tarım, orman ve veterinerlik çalışma alanında birçok zararlının kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Yürütülen bu tez çalışmasında *B. bassiana*’nın 12 farklı pirinç çeşidinde (Kırmızı 2020 R7, Siyah 1 Kargo, Tekcan, Çakmak, Siyah-Aromalı, Cammeo, Efe, Osmancık-97, 2020 GB, Yatkın, 2020 MB, Siyah 1) katı fermantasyon tekniğiyle kitle üretim potansiyeli araştırılmış ve en yüksek spor verimi Osmancık-97 ($4,9 \times 10^{11}$ konidi/g) çeşidinde saptanmıştır. Araştırmanın sonraki bölümünde, geliştirilen üç farklı ıslatılabilir toz formülasyonda etmenin bir yıl süreyle raf ömrü takip edilmiş ve canlılığın bu formülasyonlarda genel olarak 10^{10} konidi/mL olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Beauveria bassiana*, Pirinç, Kitle Üretim Potansiyeli, Biyoformülasyon

ABSTRACT

DETERMINATION OF MASS PRODUCTION POSSIBILITIES
OF *Beauveria bassiana* AgB.20-02 IN DIFFERENT RICE CULTIVARS
AND DEVELOPMENT OF WETTABLE POWDER FORMULATIONS
MSC THESIS
EBRU KURTARICI
BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION
(SUPERVISOR: PROF. DR. MEHMET ERHAN GÖRE)

BOLU, JULY 2023
XII + 33

Beauveria bassiana, which is among the entopathogenic fungi, plays an important role in the control of many pests in agriculture, forestry and veterinary research areas. In this thesis, the mass production potential of *B. bassiana* in 12 different rice cultivars (Kırmızı 2020 R7, Siyah 1 Kargo, Tekcan, Çakmak, Siyah-Aromalı, Cammeo, Efe, Osmancık-97, 2020 GB, Yatkın, 2020 MB, Siyah 1) was investigated by solid state fermentation technique and the highest spore yield was determined in Osmancık-97 ($4,9 \times 10^{11}$ conidia/g). In the next part of the study, the shelf life of three different wettable powder formulations developed for one year was followed and it was determined that the viability in these formulations was generally 10^{10} conidia/mL.

KEYWORDS: *Beauveria bassiana*, Rice, Mass Production Potential, Bioformulation

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ	x
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xi
TEŞEKKÜR	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	4
2.2. <i>Beauveria bassiana</i> Hakkında Genel Bilgi.....	4
2.3. <i>Beauveria bassiana</i> Patogenezi	4
2.4. Kitle Üretimi	5
2.5. <i>Beauveria bassiana</i> 'nın Kitle Üretimi Hakkında Yapılan Çalışmalar	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Çalışmada Kullanılan Entomopatojen Fungus Kültürü.....	13
3.2. <i>Beauveria bassiana</i> AgB.20-02'nin Kültür Koşulları	13
3.3. Katı Fermentasyon İçin İnokulum Üretimi	13
3.4. Pirinç Çeşitlerinin Katı Fermentasyon Tekniğiyle Kitle Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	14
3.7. Pirinç Çeşitlerinin Kitle Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi..	16
3.8. Islatılabilir Toz Formülasyonlar	16
3.10. İstatistiksel Analiz	18
4. BULGULAR	19
4.1. Pirinç Çeşitlerinin <i>Beauveria bassiana</i> 'nın Kitle Üretim Potansiyeline Etkisi	19

4.2. İslatılabilir Toz Formülasyonların Raf Ömrünün Belirlenmesi ..	21
5. TARTIŞMA	24
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	27
7. KAYNAKLAR.....	28



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1. <i>Beauveria bassiana</i> -80°C çıkarıldıktan sonraki kültür fotoğrafı ve çizgi ekim görüntüsü.....	13
Şekil 3.2. a): Otoklavdan çıkmış Sabaroud dekstrozu b) <i>Beauveria bassiana</i> 'nın rotary çalkalayıcıda gelişimi	14
Şekil 3.3. Pirinç çeşitlerine inokulum eklenmesi ve inkübasyona bırakılma işlemi	15
Şekil 3.4. Pirinçlerin öğütülülerek eleme işleminden geçirilmesi işlemi.....	15
Şekil 3.5. Islatılabilir toz formülasyonların hazırlık aşamaları.....	17
Şekil 4.1. Pirinç çeşitlerinde inokulumun gelişmiş hali; a) 2020 MB, b) Yatkın, c) Cammeo, d) Çakmak, e) Siyah-1, f) Efe, g) Kırmızı 2020 R7, h) Osmancık-97, i) Siyah 1 Kargo, k) 2020 MB, l) Tekcan Siyah ve m)Siyah-Aromalı görülmektedir.	19
Şekil 4.2. 12 farklı pirincin elendikten sonra canlılık ölçümü için ayrılmış hali...	19
Şekil 4.3. Pirinçte geliştirilen <i>Beauveria bassiana</i> 'nın canlılık değeri.....	20
Şekil 4.4. Pirinç çeşitlerinin kitle üretim potansiyelinin grafiği	21
Şekil 4.5. TNAPE-2 Canlılık değeri bakılan petri görüntüleri	21
Şekil 4.6. TNAPE-1 Formülasyonunun Zamana Göre Canlılık Değeri Değişimi.	22
Şekil 4.7. TNAPE-2 Formülasyonunun Zamana Göre Canlılık Değeri Değişimi.	22
Şekil 4.8. TNAPE-3 Formülasyonunun Zamana Göre Canlılık Değeri Değişimi.	23

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. WP formülasyonlar ve bileşimi.....	16
Tablo 4.1. Duncan testi sonucunda pirinç çeşitlerinin değerleri	20



KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
<i>B. bassiana</i>	: <i>Beauveria bassiana</i>
ha	: Hektar
g	: Gram
L	: Litre
rpm	: Revolutions per minute
cfu	: Colony-forming unit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Mili Molar
NaOCl	: Sodyum Hipoklorid
ppm	: Milyonda bir
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
vd.	: ve diğerleri
WP	: Islatılabilir toz
°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
%	:Yüzde
IPM	: Entegre Mücadele Yöntemi
EPF	: Entomopatojen Fungus
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
KSF	: Katı Substrat Fermantasyonu

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca tez çalışma konusunun seçiminde, yürütülmesinde, değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen ve her konuda tecrübeleriyle bana yol gösteren, gerek yazım gerekse laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. M. Erhan GÖRE'ye saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez yazım aşamasında her zaman desteğini hissettiğim Araş. Gör. Sezim ZHOLDOSHBKOVA, ve Yüksek Ziraat Mühendisi Melis GADIŞ BÜYÜKKESKİNE'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan ve eğitimimdeki en büyük destekçilerim olan sevgili aileme en içten teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım.

1. GİRİŞ

Mikrobiyal biyopestisitler gıdalarda kimyasal kalıntılar açısından güvenli olması, kimyasal pestisitlere olan bağımlılığı azaltması, organik tarım alanlarının her geçen gün büyümesi ve entegre zararlı yönetim (IPM) programlarının yaygınlaştırılması ve konsolidasyonu amacıyla dünya çapında toplumsal, hükümet ve pazar güdümlü talepler tarafından oldukça teşvik edilmektedir (W. Ravensberg, 2015; W. J. Ravensberg, 2011).

Mikrobiyal biyopestisitlerin geliştirilmesine olan ilgi son zamanlarda, büyük kimyasal tarım şirketleri arasında bile, sebze bitkilerinde zararlıların ve hastalıkların sürdürülebilir yönetimi için portföylerinin genişletilmesini zorunlu kılmıştır. 586 böcek türü, 325 kimyasal insektisitten en az 1'ine ve genetik olarak modifiye edilmiş organizmalar (GDO) beş insektisidal özelliğe karşı dirençlidir (Sparks ve Nauen, 2015). Neonikotinoidlerin arı popülasyonları üzerindeki olumsuz etkileri hakkındaki son gelişmeler (Van der Sluijs vd., 2013) böcek zararlılarını yönetmek için biyolojik yöntemler geliştirme ihtiyacını ve arzusunu daha da artırmıştır. Artık yeni sentetik pestisitlerin keşfi gittikçe daha zor ve maliyetli bir hale gelmiştir. Öyle ki, şirketler 250 milyon dolardan fazla yatırım gerektiren ve piyasaya sunulması en az 10 yıl süren yeni, ticari olarak kabul edilebilir bir sentetik böcek ilacı bulmak için en az 150.000 kimyasal molekülü taramak zorunda kalmaktadır (McDougall, 2017). Halbuki, bir mikrobiyal biyopestisite yapılan toplam yatırım 1-2 milyon dolar civarında bir bütçe gerektirmekte ve pazara ulaşmak sadece 3-5 yıl sürmektedir (Glare vd., 2012; Marrone, 2014). Bitki koruma endüstrisi, 1980'lerden bu yana küresel biyopestisit pazarında istikrarlı bir büyümeye tanıklık etmiş (%15,6 bileşik yıllık büyüme oranı) ve 2014 yılına kadar küresel bitki koruma pazarının yaklaşık %5,8'ini (3,3 milyar ABD doları) oluşturmuştur (Marrone, 2014). Bu alandaki iyimser haberler devam etmiş ve sektörün 2015'ten 2020 yılı sonuna kadar %18,8'lik bir bileşik yıllık büyüme oranına, 6.60 milyar dolara ulaşacağı öngörülmüştür (Market, n.d.). Mikrobiyal biyopestisitler arasında funguslar 2010 yılında satılan toplam biyopestisitlerin %19,4'lük kısmını oluşturmuştur (CPL Business Consultants, 2010). Ticari ölçekte piyasada yer alan toplam mikoinsektisitlerin %40'dan fazlası *Beauveria bassiana*'dır. Dünyanın farklı bölgelerinde *Beauveria*'nın seri üretimi,

formülasyonu ve uygulamaları hakkında oldukça yoğun araştırma faaliyetleri sürdürülmektedir (Faria ve Wraight, 2007; Zimmermann, 2007). Saprofitik yeteneği yüksek olan etmen besinsel içerik bakımından çok seçici olmayan karakteri nedeniyle kolayca üretilabilmektedir. Toprak biyolojik çeşitliliğinin doğal üyesi olan *B. bassiana*, hemen hemen tüm böcek türlerini kapsayan, kenelere ve akarlara uzanan geniş bir konukçunun fakültatif bir nekrotrofik patojenidir (Feng vd., 1994; Rehner vd., 2011).

Araştırmalar *Beauveria* izolatlarının patogenezi ve virulensliğinin in vivo toksikojenik metabolitlerin üretilmesi, kütikül ayrıştırıcı ve antioksidan enzimler ve konukçu içindeki aktif vejetatif gelişim yeteneği ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Ortiz-Urquiza vd., 2010, 2015; Quesada-Moraga ve Vey, 2003; Zimmermann, 2007). Bunun yanında, bazı araştırmalar *Beauveria*'nın toksik peptitlerinin her zaman virulenslik için bir ön şart olmadığını da bildirmektedir (Quesada-Moraga vd., 2006). Etmenin bir entomopatojen olarak insan sağlığı için sıfır veya minimum tehdit oluşturması ve genellikle hedef olmayan organizmalar için zararsız olması çevre açısından güvenli bir biyokontrol ajanı olarak kabul edilmesini beraberinde getirmektedir (Zimmermann, 2007).

Beauveria ve diğer fungal entomopatojenlerin seri üretimi, tipik bir temel kullanım stratejisi için gereklidir ve çok sayıda canlı, enfektif propagül sağlayan uygun maliyetli bir üretim ve stabilizasyon işlemi gerektirmektedir (Feng vd., 1994; Jackson et al., 2010; Jackson ve Jaronski, 2012; Jaronski, 2014). Katı substrat fermantasyonu kapsamında hava konidileri, *Beauveria* ve diğer entomopatojen funguslar için birincil enfektif propagüldür. Bu hidrofobik eşeysiz sporların kitle üretimi kolay ve seri üretime açıktır. Tipik olarak nemlendirilip sterilize edilmiş tahıl taneleri kullanılarak katı substrat fermantasyonu (KSF) yaygın bir şekilde gerçekleştirilmektedir (Jaronski, 2014).

Formülasyon teknolojileri ticari mikopestisitlerin geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır ve çok çeşitli seçenekler ve süreçler sunmaktadır. Formülasyon; nakliye, taşıma ve uygulamayı kolaylaştırarak ticari

“sağlamlık/kararlılık” sağlamak, oda sıcaklığı raf ömrünün uzatılması, daha tutarlı etkiler için böcek öldürücü aktivitenin artırılması, uygulama sonrası kalıcılığın iyileştirilmesi, fungal propagüllerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirmeden abiyotik çevresel streslere karşı koruma sağlaması bakımından önemlidir (Brar vd., 2006; Burges ve Jones, 1998; Jaronski, 1997). Formülasyon stratejileri aynı zamanda bir mikoinsektisit hedef zararlı spektrumunu yeni pazarlara genişletebilir ve belirli eklem bacaklılar için farklı türlerin zarar yükünü hafifletebilir (W. J. Ravensberg, 2011). Endüstriyel ölçekteki mikoinsektisit formülasyonlar genellikle tescillidir ve bu durum ürünü ortaya koyan kompozisyon veya bileşenler hakkındaki bilgilerimizi sınırlar.

Ticari *Beauveria* preparatları daha sofistike, stabil bir preparasyon için genellikle uyumlu adjuvanlar, dolgu maddeleri ve diğer gerekli katkı maddelerini içeren kuru ve sıvı formülasyonlardan oluşmaktadır. Formülasyon tipi fungal propagül (conidium veya blastospore), uygulama stratejisi ve hedef zararlı davranışı ve yaşam alanı tarafından yönetilmektedir. Ucuz ve doğal (biyolojik olarak parçalanabilen) formülasyon bileşenlerine duyulan ihtiyaç, ürünün nihai maliyeti ve çevresel kaygıları giderecek nitelikte olmalıdır.

İşte yürütülen bu tez projesiyle ülkemiz koşullarında ilk kez bir entomopatojen fungusun farklı pirinç çeşitlerinde kitle üretim potansiyelleri belirlenerek ıslatılabilir toz (WP) formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.2. *Beauveria bassiana* Hakkında Genel Bilgi

Beauveria bassiana ilk olarak böcek bilimci olan Agostino Bassi Di Lodi tarafından keşfedilmiş ve Vuillemin tarafından fungusa Bassi'nin ismi verilmiştir. Etmenin 1835'te İtalya da ipek böcekleri üzerinde beyaz pamuksu tabakalar oluşturan pebrine hastalığına neden olduğu saptanmıştır. Daha sonra fungusun beyaz bir toz ile kaplı olan ölü böceklerdeki görüntüsü, beyaz muskardin hastalığı olarak adlandırılmıştır.

Entomopatojenik fungus türlerinin büyük bölümü Entomophthoromycota ve Ascomycota şubeleri içerisinde yer almaktadır. *Beauveria*, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales'in Cordycipitaceae familyasında yer almaktadır. *Beauveria*, moleküler taksonomik tekniklerin ortaya çıkması öncesinde uzun süre Deuteromycetes içinde bulunmuştur (Rehner vd., 2011).

Beauveria bassiana yoğun bir şekilde kullanılan ilk ve en önemli entomopatojen funguslardan biridir. Etmenin ilk kez 1800'lerin ortalarında, ABD'nin Orta Batı'sında *Blissus leucopterus*'un kontrolünde kullanılmıştır (Lord, 2005). *Beauveria bassiana*'nın, Acari ve Insecta gibi birçok türde enfeksiyon oluşturabildiği ve geniş bir konukçu yelpazesine sahip olduğu bilinmektedir (Inglis vd., 2001; Zimmermann, 2007). Şu ana kadar entomopatojen funguslardan 12'sinin Oomycetes, 65'inin Chytridiomycota, 339'unun Microsporidia, 474'ün Entomophthoromycota, 238'inin Basidiomycota ve 476'sının Ascomycota üyesi olduğu saptanmıştır (Litwin vd., 2020). Bunlardan; *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Hirsutella* ve *Isaria*'nın yer aldığı birkaç cins entomopatojen fungus olarak sanayide daha ön planda kullanılmaktadır.

2.3. *Beauveria bassiana* Patogenezi

Enfeksiyonun gerçekleşmesi fiziksel kuvvetler yoluyla, konidinin konukçu kütikulasına bağlanması ve ardından hidrolitik enzimlerin (örn., proteazlar,

lipazlar, kitinazlar gibi) etkisiyle olmaktadır (Ortiz-Urquiza ve Keyhani, 2013). Gelişen hifler, besin açısından zengin hemolimfe ulaştıklarında hızla çoğalır ve buradaki besini kullanılır, iç dokularda kolonize olarak konukçunun bağışıklık sistemi (Humber, 2008) üzerinde etkili olan çeşitli toksik metabolitler (antimikrobiyal peptidler) üretmektedir. Bu metabolitler, konukçunun iç dokularının tahrip olmasına, besinlerin tüketilmesine ve konukçu bağışıklığının baskılanmasına neden olmaktadır. Bu sebeple zararlı organizmanın ölümü gerçekleşir (Gibson, 2014; Ortiz-Urquiza vd., 2010).

Konukçu zararlı öldükten sonra, fungus ölü böcekten çıkar ve çevresel koşullar, özellikle nem uygun olduğunda yüzeyde havai konidi oluşturmaktadır. Konidiler rüzgar, yağmur sıçratması ve diğer abiyotik ve biyotik faktörlerin etkisiyle taşınmaktadır. *Beauveria*'nın virulensliği, enfeksiyon döngüsünün temelinde yatan genler ve biyokimyasal mekanizmalar üzerine yapılan çalışmalar ile ele alınmıştır (Urquiza Gómez ve Cadenas, 2015; Valero-Jiménez vd., 2014). *Beauveria. bassiana*'nın maya benzeri konidileri, konukçunun bağışıklık sisteminin olası müdahalelerini konukçu dokularının hızlı kolonizasyonu ve besin maddelerinin kullanımıyla etkisiz kılmaktadır (Holder vd., 2007; Pendland vd., 1993).

2.4. Kitle Üretimi

Etmenin gelişiminin özel koşullar gerektirmemesi yada diğer bir değişle beslenme bakımından seçici olmayan karakteristiği, onun uygun maliyetli üretimini mümkün kılmaktadır (Jackson vd., 2010; Teja ve Rahman, 2017). Havai konidiler genellikle sterilize edilmiş, nemlendirilmiş tahıl taneleri kullanılarak katı substrat fermentasyonu (KSF) üretilmektedir (Jaronski ve Mascarin, 2017). Katı substrat fermentasyon tekniği; substrattaki vitaminler, tuzlar, karbon ve azot kaynakları vb. besin maddelerinin fermentasyon sürecinde kontrol edilmesini ve ortamın fiziksel özelliklerini korunması ve çevresel faktörlerinin değiştirilmesinde esneklik sunmaktadır (Jackson vd., 2010; Jaronski ve Mascarin, 2017). Spor üretimi için kullanılan kültür koşullarını optimize ederek entomopatojenik fungusların spor üretimini ve virulensliğini aynı anda iyileştirmek için birçok çalışma yapılmaktadır. Ortam bileşenleri, spor verimini, spor virulensliğini ve diğer ilgili spor özelliklerini etkileyebilmektedir (Qiu vd., 2013). Bir substrat

üzerindeki konidi verimi, ilk inokulumun konsantrasyonu, sıcaklık koşulları, nem, havalandırma ve inkübasyon süresi gibi faktörlerden etkilenmektedir (Vega-Granillo vd., 2007). Seçilen substratın konidi üretimi için uygun olması, bunun için gerekli olan yüksek karbonhidrat, nitrojen, mikro elementler, B-kompleks vitaminler ve iyonlara bağlı olarak, yüksek üretkenliğe ve verime sahip olması entomopatojenik fungusun spor gelişimini ve virulensliğini etkilemektedir (Volcy ve Pardo, 1994). Entomopatojenik fungusların kitle üretimi için; fungus türüne ait en uygun beslenme koşulları sağlayan substratlar gerekmektedir (Teja ve Rahman, 2017). Bu yöntemde substrat olarak pirinç, sorgum, bakla, fasulye, manyok küspesi, çavdar unu, manyok unu, şeker kamışı küspesi, patates artıkları gibi birçok substrat kullanıldığı bilinmektedir (Thomaz-Soccol vd., 1997). Yapılan çalışmalarda kitle üretiminin maliyetini azaltmak ve fazla konidi elde etmek için çoğunlukla pirinç tercih edilmektedir (Botella vd., 2007). Pirinç, karbonhidrat açısından zengin olması ve nemi muhafaza etme özelliğine sahip olması nedeniyle konidi üretiminde kullanılan standart substrat olarak bir çok çalışmada tercih edilmektedir (Mascarin vd., 2019).

Entomopatojen fungusların başarılı ticari bir ürün olarak geliştirilmesi, yalnızca etkili bir türün karakterizasyonuna ve patojenitesine değil, aynı zamanda laboratuvarında başarılı bir şekilde kitle üretimine de bağlı olmaktadır (Beach ve Rohlfing, 2018). Mikopestisit geliştirilmesi sırasında laboratuvar denemelerinde küçük miktarlarda yetiştirilebilir ve değişken ekonomik maliyetli yöntemlerde deneme yapılabilir.

2.5. *Beauveria bassiana*'nın Kitle Üretimi Hakkında Yapılan Çalışmalar

Entomopatojenik fungusla ilgili olarak Zimmermann (2007), tarafından yapılan çalışmada *Beauveria* spp.'nin aşağıdaki konuları kapsayan bir dizi özelliği incelenmiştir Kimliği; biyolojik özellikleri, doğal oluşumu ve coğrafi dağılımı, konukçu aralığı, etki şekli, metabolitlerin/toksinlerin üretimi, çevresel faktörlerin etkisi; Ayrıca bu çalışmalarda, *Beauveria* spp.'nin çevredeki davranışı (havada, suda ve toprakta hareketlilik ve kalıcılık), hedef olmayan organizmalar üzerindeki etkileri (bitkiler, toprak organizmaları, suda yaşayan organizmalar, avcılar, parazitoitler, bal arıları, solucanlar ve hedef olmayan eklembacaklılar), omurgalılar (balıklar, amfibiler, sürüngenler ve kuşlar) ve memeliler ile insan

sağlığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere dayanarak, bu çalışmada *Beauveria* spp.'nin çevre ve insan sağlığı için güvenli olduğu sonucuna varılmıştır.

Beauveria bassiana izolatu olan 5-4'ün seri üretimi için Barış vd. (2021), yaptıkları çalışmada bütün pirinç ve kırık pirinç substratları kullanılmıştır. Konidi üretimini değerlendirmek amacıyla katı hal fermantasyon tekniği kullanılarak substratların başarısı, ürün miktarı ve konidi sayısı açısından değerlendirilmiştir. Üretim sürecinde, 100 g substrat polipropilen torbalara konulmuş ve sterilizasyon işleminden sonra inokulum eklenerek torbaların ağızları kapatılmıştır. Ardından torbalar, 25°C'de 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, en yüksek ürün miktarı tam pirinç kullanılarak elde edilmiştir ve bu miktar 4,10 g/torba olarak belirlenmiştir. En yüksek konidi sayısı ise kırık pirinç ($1,024 \times 10^{11}$ konidyum/g) ve bütün pirinç ($9,62 \times 10^{10}$ konidyum/g) kullanılarak elde edilmiştir.

Beauveria bassiana konidi üretiminde değişken nem içeriği ve maya ekstraktı konsantrasyonun da Dhar vd. (2011), yaptıkları çalışmada pirinç (cılalı) ve pirinç kepeği kullanılmıştır. Nem içeriği ve maya ekstraktı konsantrasyonun çeşitli seviyelerde optimizasyonu, %35 nem içeriği ve %1,5 maya ekstraktı konsantrasyonunda karışık substrat (pirinç+buğday kepeği) için $2,8 \times 10^{10}$ /g en iyi konidi verimi olarak bulunmuştur.

Beauveria bassiana konidi üretimi Camara vd. (2022), yaptıkları çalışmada pirinç üzerinde büyük ölçekli üretim koşullarını optimize etmek için yapılmıştır. Konidi üretimi için en uygun substrat miktarı her bir kapta 200 g pirinç olarak belirlenmiştir. Substrat nem içeriği %52 olup, %2 oranında yemeklik yağ ile desteklenmiştir. Aşamalı üretimin sürecinde, 150 mL konidi süspansiyonu ($24,33 \times 10^7$ spor/mL'de), %4 glikoz ve %1,5 maya ekstraktı ile içeren SD sıvı ortamında 10 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra elde edilen SD ortamı, pirinç substratına inokülasyon amacıyla kullanılmıştır. Konidi süspansiyonunun substrata optimum oranı %20-25 olarak belirlenmiştir. Pirinç substrat sistemi, *B. bassiana* sporlarının kitle üretimi için kullanılabilir bir yöntem olarak değerlendirilmektedir.

Beauveria bassiana iki izolatu (IMI 389521 ve IMI 386243) üzerinde Taylor vd. (2013), yaptıkları çalışmada katı-substrat fazının, yani pirinç substratının kaynama, su ve yıkama rejimlerinin değiştirilmesinin konidi verimine ve çimlenmeye etkileyip etkilemediği araştırmışlardır. İzolatlar arasında konidi verimi açısından çok az fark görülmüştür. Tek önemli fark, yıkanmamış ve daha sonra 600 mL su/kg pirinçe kısmen kaynatılmış pirinçte (IMI 389521) görülmüş, yıkanmamış ve kaynatılmamış pirinçte IMI 386243'den daha fazla konidi verimi bulunmuştur. Her iki izolatın çimlenmesi üzerinde önemli farklılıklar bulunmuştur. Özellikle, akan musluk suyu altında 5 dakika yıkanmış ve kaynatılmamış pirinçte üretilen konidi çimlenmesi, her iki izolat için diğer tüm işlemlerden daha düşük olarak IMI 389521 için en yüksek konidi çimlenmesi, yıkanmamış ve ardından %96'da 600 mL su/kg ile kısmen kaynatılmış pirinç de bulunmuştur. IMI 386243 için en yüksek çimlenme, %72 ile yıkanmamış ve kaynatılmamış pirinçte bulunmuştur. Büyüme ortamı aşamalı olarak daha kuru hale getirildiğinden, pirinç uygulamalarının hiçbirisi için IMI 389521'in çimlenme seviyelerinde herhangi bir değişiklik olmamıştır. Buna karşılık, IMI 386243'ün iki uygulamasının çimlenmesi, yani 5 dakika akan musluk suyu altında yıkanmış, kaynatılmamış ve yıkanmadan sonra 300 mL su/kg ile kısmen kaynatılarak, önemli ölçüde düştüğü (sırasıyla %29 ve %35) görülmüştür.

Beauveria bassiana izolatının Gandarilla vd. (2013), yaptıkları çalışmada batık kültür ve bifazik ortamında konidi üretimi değerlendirilmiştir. Deney tasarımı tamamen rast gele seçilmiş ve ortalamalar Tukey testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Glikoz ve kazamino asitlerle formüle edilmiş sıvı kültür ortamında, , GHA suşu ($2,20 \times 10^8$ mL⁻¹) için en yüksek konsantrasyonda ve 26 g L⁻¹ biyokütleyle sahip olarak 72 saatte konidi üretimi elde edilmiştir. HIB- 4 izolatu ise en düşük konidi üretimini ($5,25 \times 10^7$ mL⁻¹) ve (7 g L⁻¹) biyokütlesini göstermiştir. İncelenen funguslar arasında HIB-2 izolatının diatomik toprakta %56 çimlenme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Katı fazda (pirinç tanesi), inkübasyonun 14. gününde, HIB-4 izolatu $1,82 \times 10^9$ konidi/g üretirken GHA suşu $2,35 \times 10^8$ konidi/g olarak bulunmuştur. Tüm funguslar için 4°C'de 4 haftalık depolama süresince canlılık oranı %90'dan daha yüksek olarak bulunmuştur.

Beauveria bassiana polipropilen torbada Villalba vd. (2009), yaptıkları çalışmada 30°C'de talaş desteği ve testere tozu kullanarak pirinç tozlarındaki

sporlanmasını araştırmışlardır. Sporlanma, Fransız yöntemine göre Neubauer'in kamerasındaki sporlar sayılarak 4 günlük büyümede belirlenmiştir. Termal integral, 4 günlük mahsul için hesaplanmış faktöriyel varyans analizi, katı substratlardaki sporların üretiminde ve uygulanan miktarlarda önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Pirinç ve mısır tozlarındaki substratlar, sırasıyla $3,4 \times 10^{10}$ ve 3×10^{10} konidi üretimi bulunmuş ve 1,6 g substrat tozu uygulanan formülasyona bir miktarda testere tozu desteği sağlandığında en yüksek konsantrasyonları bulunmuştur. Pirincin toz haline getirilmiş substratı, *B. bassiana* üretimine seçilen en iyi ürün olarak belirlenmiştir.

Beauveria bassiana'nın iki izolatında Posada vd. (2008), yaptıkları çalışmada plastik torbalarda difazik (sıvı-katı) fermantasyon kullanılarak haşlanmış pirinç üzerinde spor tozu üretimi ve hasat metodolojisi araştırılmıştır. Kurutulmuş kültürler, izolatlar ve hasat zamanı için önemli farklılıklar bulunmuştur. Sporlar, manuel ve mekanik olarak toplanmış ve kültürler, nem içeriği %10'a yakinken 9 gün boyunca kurutulduktan sonra paketlenmiştir. Formülasyonun, çimlenme, saflık, nem içeriği ve parçacık boyutu değerlendirmek üzere kalite kontrolüne tabi tutulmuştur. Haşlanmış pirinçte spor üretkenliği, hem manuel hem de mekanik olarak hasat metodolojisi kullanılarak 1×10^{10} spor/g'dan daha az ve 24 saatte çimlenme %75'in üzerinde bulunmuştur.

Beauveria bassiana'nın farklı sıcaklıklarda uzun süreli depolama için Silva vd. (2016), yaptıkları çalışmada konidi canlılığını koruyabilecek ambalaj paketleri araştırılmıştır. Çalışma, Londrina Eyalet Üniversitesi'ndeki (UEL) Böceklerin Mikrobiyal Kontrol Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. *B. bassiana*'nın granül haline getirilmiş bir karışımı (konidi ve yarı haşlanmış pirinç) kullanılmış (CG 432) ve 3 tip ambalajda paketlenmiştir. Coex, metalik polyester ve polietilen, 180 gün buzdolabında ($6^{\circ}\text{C} \pm 2$) ve iklimlendirme odasında ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$) saklanmıştır. Paketlemenin konidi canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için kullanılan parametreler çimlenme yüzdesi ve su içeriği olarak belirtilmiştir. Coex tipi ambalajlarda paketlenen konidi, depolama süresince buzdolabında ve oda sıcaklığında en yüksek çimlenme yüzdesini gösteren konidi olurken, depolama süresince konidi en düşük su kazanımını sağlayan ambalaj olarak bulunmuştur. Ambalajdan bağımsız olarak, buzdolabında saklanan konidi, oda

sıcaklığında ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$) saklananlara göre daha yüksek çimlenme yüzdesi göstermiştir.

Beauveria bassiana'nın (JEF-007) katı substrat kültürlerinden üretilen mikotize granülleri kullanarak Lee vd. (2016), yaptıkları çalışmada yeni bir elek torbası formülasyonu geliştirilmiştir. İzolat, darı taneleri üzerinde katı kültürlenmiş ve elek torbalara (gözenek boyutu: $-15\ \mu\text{m}$) paketlenmiştir. Mikotize granülleri içeren torbalar suya daldırmış ve konidi dağıtmak için çalkalanmış, ardından suya salınan konidi sayısı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, bir kontrol olarak granüllerin su içinde girdaplanmasından sonra salınan konidi sayısı ile karşılaştırılmıştır. Konidi salımı üzerindeki etkilerini değerlendirmek için suya çeşitli sürfaktanlar ilave edilmiştir. Silwet L-77, en yüksek konidi salınımı vermiştir. Bu çalışma ile standart WP formülasyonlar için uygun maliyetli olabileceği sonucuna varılmıştır.

Beauveria bassiana konidi üretkenliği ve termotolerans için Song vd. (2019), yaptıkları çalışmada katı kültür substratlarına odaklanmışlardır ve fungus konidisi zararlı kütikulasına etkili bir şekilde enfekte olması için yüzey aktif maddeleri üzerine çalışma yapılmışlardır. İlk olarak, ısıya dayanıklı fungus konidileri üretmek için, her bir *B. bassiana* izolatından 10 gün boyunca 2'şer olarak 13 tahıl substratı üzerinde inokulum geliştirilmiştir. Genel olarak, beş substrat (kahverengi pirinç, darı, yapışkan olmayan İtalyan tilki kuyruğu darı, arpa ve yapışkan İtalyan tilki kuyruğu darı), en fazla sayıda ısıya dayanıklı konidi üretmiştir. Seçilen substratlar tahıl tane miktarını azaltmak için mineraller, zeolit, perlit veya vermikülit ile karıştırıldığında, vermikülit kombinasyonu diğer mineral kombinasyonlarına göre nispeten yüksek konidi üretimi göstermiştir. *Beauveria bassiana*'nın konidisi zararlı kütikulasına verimli bir şekilde iletmek için altı yüzey aktif madde (CO-2.5, CO-12, LE-7, PE-61, TED-3 ve siloksan) ile birleştirilmiştir. İzolata bağlı olarak değişen %0,01 kombinasyonu, zararlı ölüm oranını önemli ölçüde artırmış ve virulens testler, izolatların konidi süspansiyonları ile zararlıya karşı virulentliklerini değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, bu test 20°C , 30°C ve 35°C yerine 25°C 'de yapıldığında izolatlar en yüksek virulens göstermiştir. Bu çalışma, tahıl tanesi substratları ve vermikülit kombinasyonunu, yüksek termotoleransa sahip ekonomik konidi üretim için düşünülebileceğini ve CO-12 sürfaktanın hedef

böceklerle etkili dağıtım için en uygun olduğunu ve 25°C virulenslik için en uygun sıcaklık olduğu bulunmuştur.

Beauveria bassiana konidileri formüle edilmiş beş farklı sıcaklıkta (0, 10, 20, 30 ve 40°C) Sandhu vd. (1993), yaptıkları çalışmada altı farklı bağıl nemde (RH) (%0, 33, 53, 75, 85 ve 98) konidi canlılığını araştırmışlardır. Konidi canlılığı 24 aylık bir süre boyunca takip edilip belirlenmiş, konidi daha düşük sıcaklıklarda (0-20°C) ve daha düşük bağıl nem seviyelerinde (%0-53 bağıl nem) en uzun süre canlı kaldığı belirtilmiştir. Daha yüksek sıcaklıklarda (30-40°C) konidi canlı kalamamış ve sıcaklık 30°C'den 0°C'ye düşürüldüğünde, neredeyse tüm bağıl nem seviyelerinde konidilerin raf ömrü arttığı belirlenmiştir.

Beauveria bassiana'nın farklı ışık koşullarındaki morfolojik değişimleri Zhang vd. (2009), yaptıkları çalışmada rapor etmişlerdir. Tamamen karanlıkta *B. bassiana* kültür hifleri birkaç farklı üreme yapısıyla sürekli olarak büyüyebilirken, beyaz ışıklı aydınlatmada bol miktarda konidi taşıyan konidioforların üretken oluşumuyla sonuçlanmıştır, Bu da ışığın *B. bassiana*'nın konidi üretimini uyarabileceğini göstermiştir.

Beauveria bassiana'nın Purnima vd. (2013), yaptıkları çalışmada talk bazlı ıslatılabilir toz formülasyonunun oda sıcaklığında (24°C $\pm$ 1), buzdolabında (+4°C) ve derin dondurucuda (-4°C ile -6°C) raf ömrünü değerlendirmişlerdir. Oda sıcaklığında %48 patojeniteye sahip olan $2,02 \times 10^8$ konidi/g ile konidinin canlılığı 180 gün kadar sürmüş, +4°C altında aynı conidi yoğunlu ancak %69,45 patojeniteye sahip olmuş ve 210 gün canlı kalabilmiştir. Derin dondurucuda, aynı canlılık konidi yoğunluğu ile 300 gün canlı kalabilmiş ancak patojenitesi %20'ye kadar düştüğü ölçülmüştür.

Beauveria bassiana'nın izolat 447 kullanarak Alves vd. (1996), yaptıkları çalışmada dört farklı ıslanabilir toz formülasyonları oluşturulmuş ve raf ömrü değerlendirilmiştir. Taşıyıcı malzemeler arasında talk (sulu magnezyum silikat), silika jel, toz pirinç ve mısır nişastası kullanılmıştır. Formülasyonlar plastik kaplarda oda sıcaklığı, buzdolabı (6 $\pm$ 2°C); ve dondurucu (10 $\pm$ 2°C) saklanmıştır. Ortam sıcaklığı koşullarında saklanan formülasyonlar 8 $\pm$ 1 ay sonra tamamen canlılığını kaybetmiş olarak bulunmuştur. Ortam koşulları altında saklanan formüle edilmemiş konidi sadece 2 ay sonra canlı kalabilmiştir. Buzdolabı ve

derin dondurucu koşullarında saklanan tüm formülasyonlar 7 yıl boyunca %100 canlılığını koruduğu görülmüştür.

Beauveria bassiana sporlarının Fargues vd. (1983), yaptıkları çalışmada toprakta, formüle edilmemiş konidi ve kil kaplı olarak canlı kalma süresini araştırılmıştır. Enfeksiyon potansiyeli, *Plutella maculipennis* ve *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerinde test edilmiştir. Formüle edilmemiş konidiler inkübasyonun ardından 3 haftalık inaktive edilirken, kil kaplı konidiler ise inkübasyonun ardından 20°C'de toprakta 2 aylık hala aktif olduğu görülmüştür. Araştırmada, kil kaplamanın toprakta bakterileri ve protozoa tarafından fungus propagüllerinin biyolojik bozunmasına karşı koruyucu bir rolü olduğunu göstermiştir. Entomopatojenik fungus formülasyonu için konidilerin kil kaplaması önerilmiştir.

Beauveria bassiana'nın (ERL836) konidi canlılığı Kim vd. (2019), yaptıkları çalışmada depolama sıcaklığına ve kültür substratına göre değerlendirilmiştir. Oda sıcaklığında (25 ve 30°C) ve +4°C'de saklanan mikotize tahıllardan (darı ve pirinç) canlılık oranları sırasıyla 24 ve 18 ay boyunca %85 olarak bulunmuştur. Buna karşılık, 37°C'de saklanan numuneler düşük canlılık oranı bulunmuştur (sadece 5 ay boyunca yaklaşık %80 canlılık bulunmuştur).

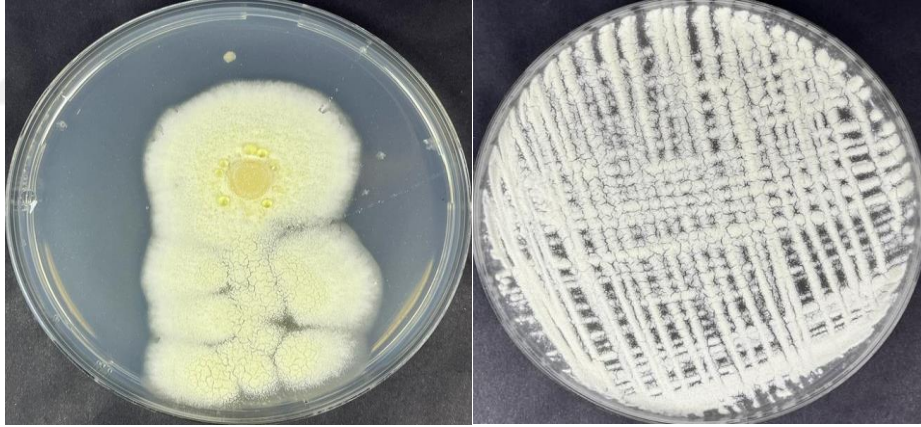
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Entomopatojen Fungus Kültürü

Beauveria bassiana AgB.20-02 izolatu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Mikoloji Laboratuvarı kültür stoklarından sağlanmıştır.

3.2. *Beauveria bassiana* AgB.20-02'nin Kültür Koşulları

Ultra derin dondurucuda, -80°C 'de, 2 mL'lik cryo tüplerde %35'lik gliserolde saklanan AgB.20-02 izolatından agar diskleri alınarak steril kurutma kağıdında 10 dakika tutulmuş ve sonrasında patates dekstroz agar (PDA: Merck, Darmstadt, Almanya) ortamına ekimler gerçekleştirilmiştir. Kültürler 2 hafta süreyle $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de gelişmeye bırakılmış ve tüm testlerde etmenin 2 haftalık kültürleri kullanılmıştır.

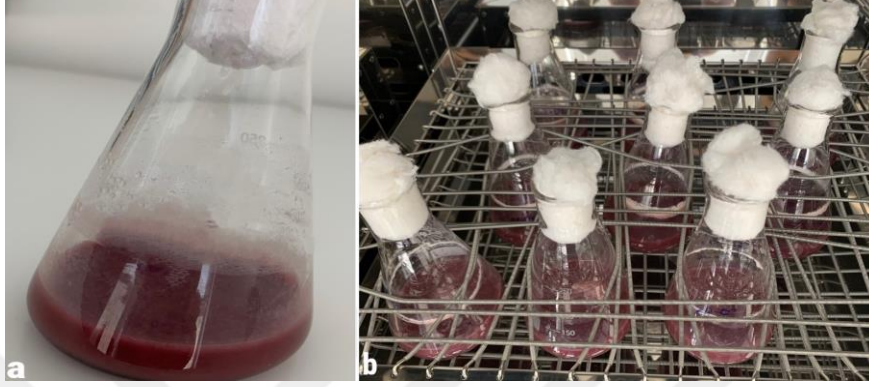


Şekil 3.1. *Beauveria bassiana* -80°C çıkarıldıktan sonraki kültür fotoğrafı ve çizgi ekim görüntüsü

3.3. Katı Fermentasyon İçin İnokulum Üretimi

Bu amaçla Sabouraud Dekstroz sıvı besiyeri kullanılmıştır (Dextrose 20 g, Peptone 10 g, D Sarbitol 1 g, pH 7.0 ± 2). Hazırlanan besiyeri 250 mL'lik erlenlere 100 mL olacak şekilde konulmuş ve 121°C 'de 1,1 atmosfer basınçta 20 dakika otoklavlanmıştır. PDA üzerinde gelişen *B. bassiana*'nın 2 haftalık kültürlerine ait her bir Petriye, 10 mL içerisinde %0,025 Tween 80 içeren steril saf su verilmiş ve

bagetle sporlar yıkanmış ve hemositometre (Superior Marienfeeld, Lauda-Königshofen, Almanya) kullanılarak spor yoğunluğu 3×10^7 konidi/mL'ye ayarlanmıştır. Daha sonra 250 mL'lik erlenlerde bulunan 100 mL Sabaroud dekstroz besiyerine 5 mL spor süspansiyonundan verilmiş ve rotary çalkalayıcıda 4 gün süreyle 26°C'de, 150 rpm'de gelişmeye bırakılmıştır.



Şekil 3.2. a): Otoklavdan çıkmış Sabaroud dekstroz b) *Beauveria bassiana*'nın rotary çalkalayıcıda gelişimi

3.4. Pirinç Çeşitlerinin Katı Fermantasyon Tekniğiyle Kitle Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

Agrobrest Grup Gen Kaynaklarından temin edilen ve bu tez çalışmasında kullanılan pirinç çeşitleri: Osmancık-97, Kırmızı 2020 R7, Tekcan Siyah, Cammeo, Siyah-Aromalı, Yatkın, Efe, Çakmak, 2020 GB, 2020 MB, Siyah 1 Kargo ve Siyah 1'dir. İlk aşamada pirinçler beher içine alınıp bol su ile yıkanmış ve 2 saat süreyle saf su da bekletilmiş ve sonrasında süzölmüştür. Pirinçler fırın torbalarına (25×38 cm) 250 g gelecek şekilde 4 tekerrürlü olarak yerleştirilmiş ve poşetlerin ağızları kapatılarak 121°C'de 25 dakika otoklav edilmiştir. Sıvı Sabouraud dekstrozda geliştirilen 4×10^7 konidi/mL kültürlerden soğutulan pirinç torbalarına %15 oranında (v:w) inokule edilmiştir. İnokulasyon sonrası pirinç torbalarına masaj yapılarak inokulum pirinç daneleri arasında dağıtılmış ve torbalar %1'lik NaOCI ile dezenfekte edilmiş ve 254 nm UV ışık altında 15 dakikada tutulan küvetlere yerleştirilmiştir. İnkubasyon 26±1°C'de 15 gün sürdürölmüştür ve 48 saat arayla torbalara masaj tekrarlanmış ve sporulasyon kolaylaştırılmıştır.



Şekil 3.3. Pirinç çeşitlerine inokulum eklenmesi ve inkübasyona bırakılma işlemi

Gelişimini tamamlayan pirinçler küvetlerine boşaltılmış ve aynı koşullarda 7 gün kurumaya bırakılmış, sonrasında öğütücüde 15 saniye boyunca öğütülüp, 14 ve 60 mesh eleklerden geçirililerek, 34°C'de $aw < 0,3$ 'e eşdeğer $< \% 5$ su içeriğine kadar kurutulmuştur.



Şekil 3.4. Pirinçlerin öğütülülerek eleme işleminden geçirilmesi işlemi

3.7. Pirinç Çeşitlerinin Kitle Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

Her çeşide ait spor + pirinç kompleksinden 10 g tartılarak steril 250 mL'lik erlenlere etiketlenerek konulmuş ve bunun üzerine içerisinde %0,025 Tween 80 bulunan 90 mL steril saf su eklenerek rotary çalkalayıcıda $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de, 150 rpm'de 45 dakika çalkalanmıştır. Daha sonra gerçekleştirilen seyreltme serilerinin -8 ve -10'undan 100 μL alınıp içerisinde PDA bulunan Petri kaplarına verilip baget ile yayıldıktan sonra $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 1 hafta inkubasyon gerçekleştirilmiş ve Petri kaplarındaki kolonilerin belirginleşmesinin ardından koloniler sayılarak canlılık oranları belirlenmiştir. Denemeler 3 tekerürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.8. Islatılabilir Toz Formülasyonlar

Islatılabilir toz formülasyonların (WP) gerçekleştirilmesinde kullanılan yöntem Dr. Göre'den alınmıştır. Denemelerde kullanılan kimyasal bileşim ve içeriği aşağıdaki tabloda verilmiştir. Bu denemelerde spor verimi bakımından en başarılı bulunan Osmancık-97 çeşidine ait pirinç + spor tozu karışımı kullanılmıştır. WP formülasyonlarda kullanılan taşıyıcılar; Kil-Ag-L, Kil- Ag-F ve Talc-Ag'dir. Bu taşıyıcılar Agrobrest Grup'un nazik desteği ile sağlanmıştır.

Tablo 3.1. WP formülasyonlar ve bileşimi

Formülasyon	Materyal	Miktar (g veya mL)
TNAPE -1	Talc - Ag	839
	Naftalinsülfanik Asit	30
	OP-10	30
	Askorbik Asit	1
	Spor + Pirinç Kompleksi	100
TNAPE -2	Kil - Ag - F	839
	Naftalinsülfanik Asit	30
	OP-10	30
	Askorbik Asit	1
	Spor + Pirinç Kompleksi	100
TNAPE -3	Kil - Ag - L	839
	Naftalinsülfanik Asit	30
	OP-10	30
	Askorbik Asit	1
	Spor + Pirinç Kompleksi	100

Canlılık değeri $4,9 \times 10^{11}$ spor/ml olarak ölçülen pirinç üretimi sonrasında yukarıda verilen işlemlerin formülasyon komponentleri belirtilen miktarlarda karıştırılmıştır (Tablo 3.1.). Protokolde önce 30 g naftalinsülfanik asit (CAS No: 26545-58-4), 30 g OP-10 (CAS No: 9002-93-2), 1 g askorbik asit (CAS No: 50-81-7), 839 g taşıyıcı materyal ve 100 g pirinç + spor kompleksi sırasıyla eklenerek karıştırılmıştır (Tablo 3.1. sırasıyla hazırlanmıştır.). Karışım 35°C 'de kurutma makinesinde 4 ile 8 saat arasında kurutmaya (6 saat) alınmıştır. Kurutma sürecinde her yarım saatte bir karıştırma işlemi yapılmıştır. Formülasyon daha sonra dezenfekte edilmiş küvetlere (31×39 cm) yayılarak 24 saat oda sıcaklığında ve loş bir ortamda kurutulmaya bırakılmıştır. Karışım daha sonra öğütücüde 9 (3×3) saniye işleme alınmıştır. Formülasyonun son kurutması 35°C 'de 3 saat kurutma fırınında gerçekleştirildikten sonra 100' er gramlık Mylar torbalara (21×14,5 cm) koyularak sealing yapılarak paketlenmiştir. Formülasyonların canlılığı denemenin kurulduğu ilk günden (0. gün) başlayarak bir yıl süreyle her 3 ayda bir "Pirinç Çeşitlerinin Kitle Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi" bölümünde belirtilen yöntemle gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.5.Islatılabilir toz formülasyonların hazırlık aşamaları

3.9. Formülasyonların Raf Ömrü

Her formülasyona ait her 1000 g'lık preparat 10 adet mylar (15cm×12cm) torbaya 100 g konularak paketlenmiş, 3 farklı formülasyon için 30 adet paket oda sıcaklığında ayrı ayrı etiketlenerek bir yıl süreyle muhafaza edilmiştir. Her

formülasyonun 1 paketi 3, 6, 9, 12 ayın sonunda açılarak 10 g alınmış ve 250 mL'lik erlende 90 mL %0,025'lik Tween 80 içeren steril suya konarak rotary çalkalayıcıda 26°C'de 150 rpm'de 45 dk çalkalanmıştır. Açılan paketler daha sonra aynı koşullarda korunmak üzere sealing yapılmıştır. Preparatların canlılık ölçümü yine “Pirinç Çeşitlerinin Kitle Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi” bölümünde belirtilen yöntemle gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6. Formülasyonların paketlenip etiketlenmesi

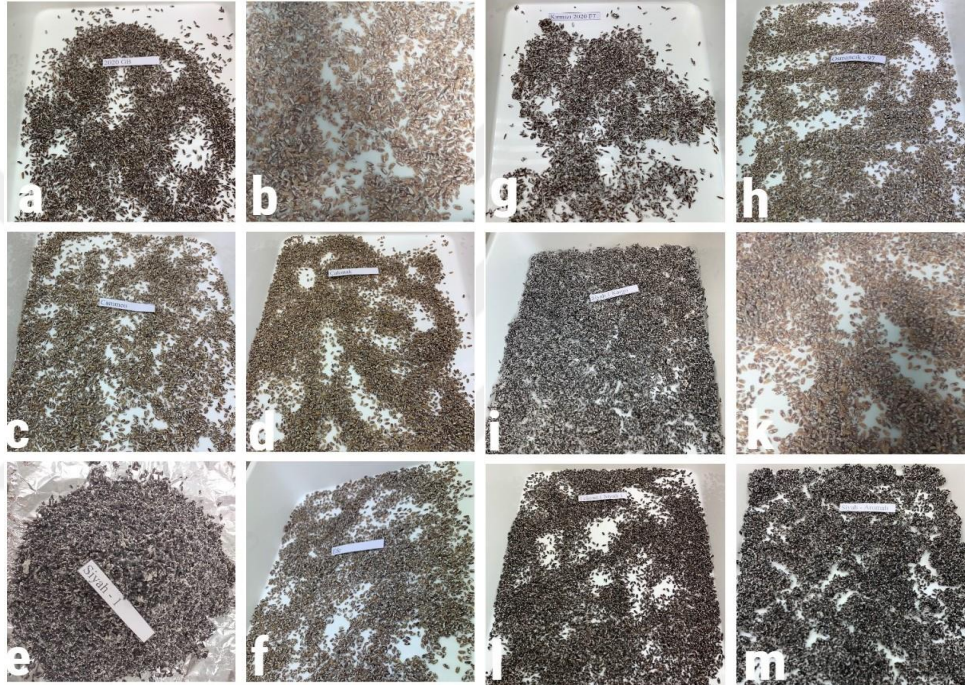
3.10. İstatistiksel Analiz

Çalışmada kullanılan pirinç çeşitleri üzerinde elde edilen sporlar, canlılık oranı bakımından değerlendirilmiştir. Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Elde edilen veriler SAS (SAS Institute, Cary, NC, ABD) programıyla varyans analizine tabi tutulmuş, ortalamaları karşılaştırmak amacıyla Duncan (DMRT) testi kullanılmıştır ($p<0,01$).

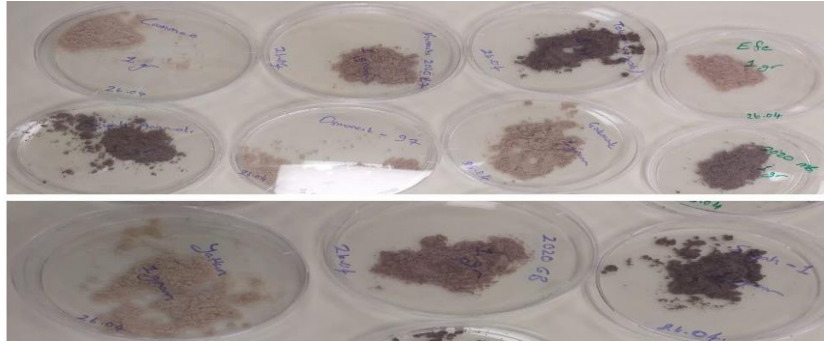
4. BULGULAR

4.1. Pirinç Çeşitlerinin *Beauveria bassiana*'nın Kitle Üretim Potansiyeline Etkisi

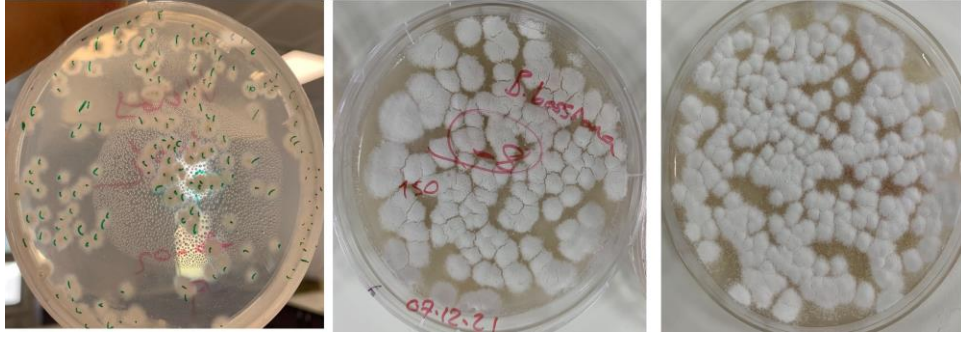
Beauveria bassiana'nın kitle üretiminde kullanılan pirinç çeşitlerinde ölçülen en yüksek canlılık değeri Osmancık-97 çeşidinde $4,9 \times 10^{11}$ konidi/g olarak gerçekleşmiştir (Tablo 4.1). Bunu 2020 MB ve Cammeo çeşitleri sırasıyla $4,7 \times 10^{11}$ ve $3,4 \times 10^{11}$ konidi/g olarak takip etmiştir.



Şekil 4.1. Pirinç çeşitlerinde inokulumun gelişmiş hali; a) 2020 MB, b) Yatkın, c) Cammeo, d) Çakmak, e) Siyah-1, f) Efe, g) Kırmızı 2020 R7, h) Osmancık-9, i) Siyah 1 Kargo, k) 2020 MB, l) Tekcan Siyah ve m) Siyah-Aromalı görülmektedir.



Şekil 4.2. 12 farklı pirincin elendikten sonra canlılık ölçümü için ayrılmış hali



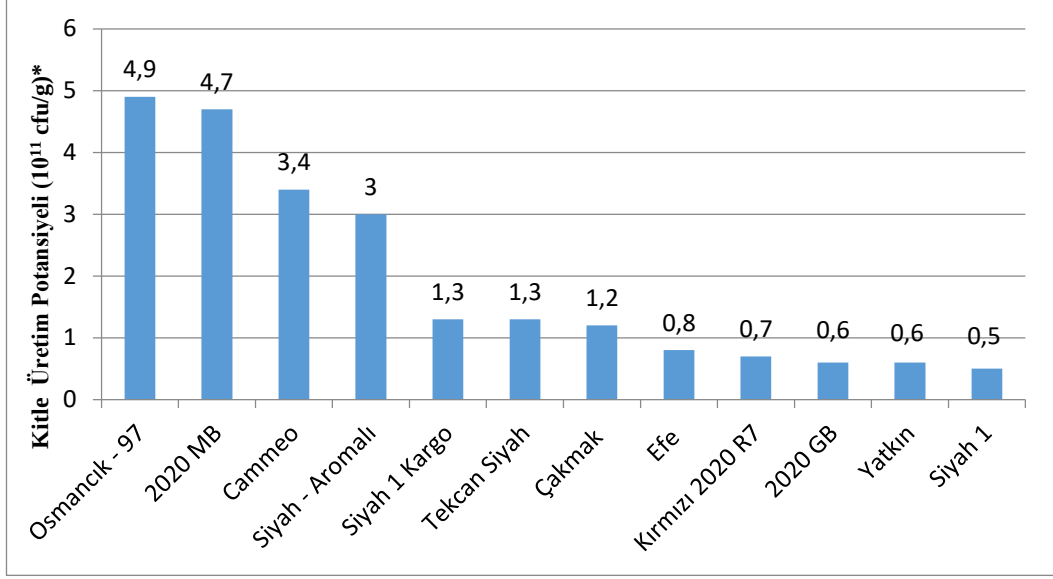
Şekil 4.3. Pirinçte geliştirilen *Beauveria bassiana*'nın canlılık değeri

Tablo 4.1. Duncan testi sonucunda pirinç çeşitlerinin değerleri

Sırası	Pirinç Çeşidi	Kitle Üretim Potansiyeli (cfu/g)*
1	Osmancık-97	$4,9 \times 10^{11a}$
2	2020 MB	$4,7 \times 10^{11ab}$
3	Cammeo	$3,4 \times 10^{11bc}$
4	2020 GB	3×10^{11c}
5	Tekcan Siyah	$1,3 \times 10^{11d}$
6	Siyah 1 Kargo	$1,3 \times 10^{11d}$
7	Çakmak	$1,2 \times 10^{11d}$
8	Efe	$0,8 \times 10^{11d}$
9	Siyah-Aromalı	$0,7 \times 10^{11d}$
10	Kırmızı 2020 R7	$0,6 \times 10^{11d}$
11	Yatkın	$0,6 \times 10^{11d}$
12	Siyah 1	$0,5 \times 10^{11d}$

* Aynı harfle gösterilen ortalama değerler, istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($p < 0,01$) (SAS Institute, Cary, NC, ABD).

İstatistiksel analizlere göre bir değerlendirme yapıldığında en yüksek spor verimine sahip Osmancık-97 çeşidi tek başına bir grup, bunu 2020 MB ve Cammeo yine ayrı gruplar olarak takip etmiştir (Tablo 4.1.) Araştırmada en büyük grubu Tekcan Siyah, Siyah 1 Kargo, Çakmak, Efe, Siyah-Aromalı, Kırmızı 2020 R7, Yatkın ve Siyah 1'in içinde yer aldığı pirinç çeşitleri oluşturmuştur (Tablo 4.1.).



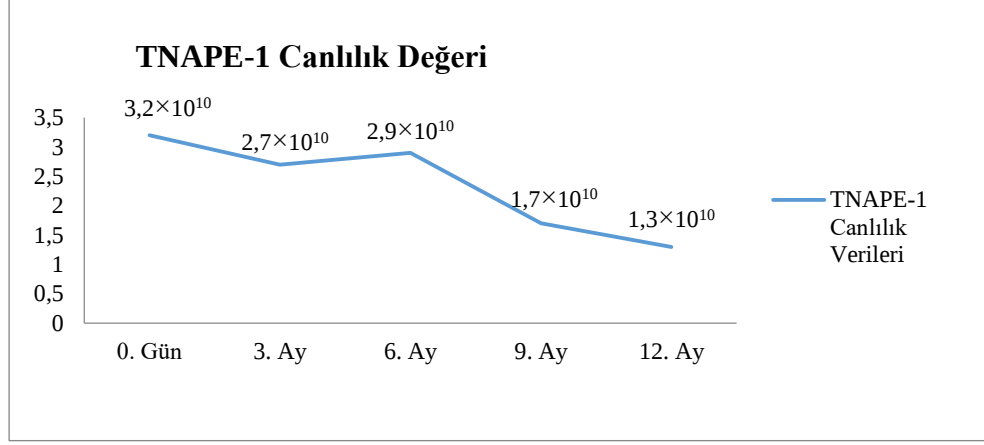
Şekil 4.4. Pirinç çeşitlerinin kitle üretim potansiyelinin grafiği

4.2. Islatılabilir Toz Formülasyonların Raf Ömrünün Belirlenmesi

Oda sıcaklığı koşullarında ve vakumlu olarak paketlenmiş üç farklı taşıyıcı materyalle (Talc-Ag, Kil-Ag-L ve Kil-Ag-F) WP formülasyonlar oluşturulmuş ve 25°C’de belirli periyotlarda bir yıllık canlılık değerlerine bakılarak raf ömürleri tespiti yapılmıştır. Canlılık değerleri zamana göre değişimi aşağıdaki şekillerde (Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8.) gösterilmiştir.

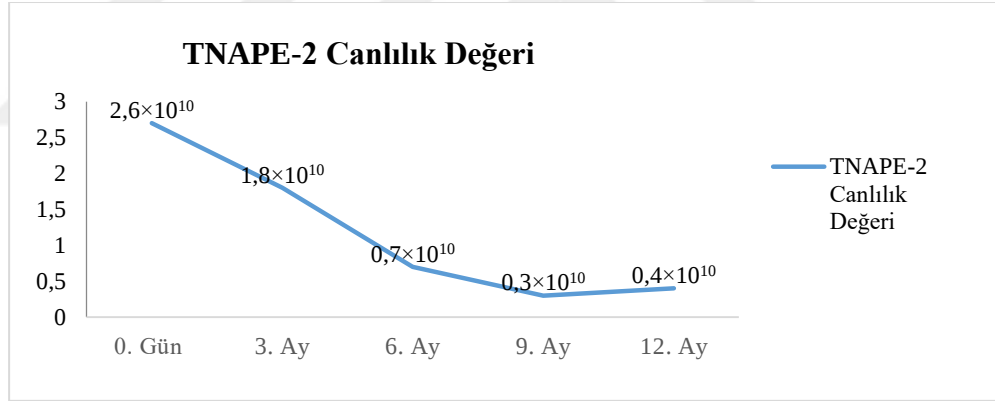


Şekil 4.5. TNAPE-2 Canlılık değeri bakılan petri görüntüleri



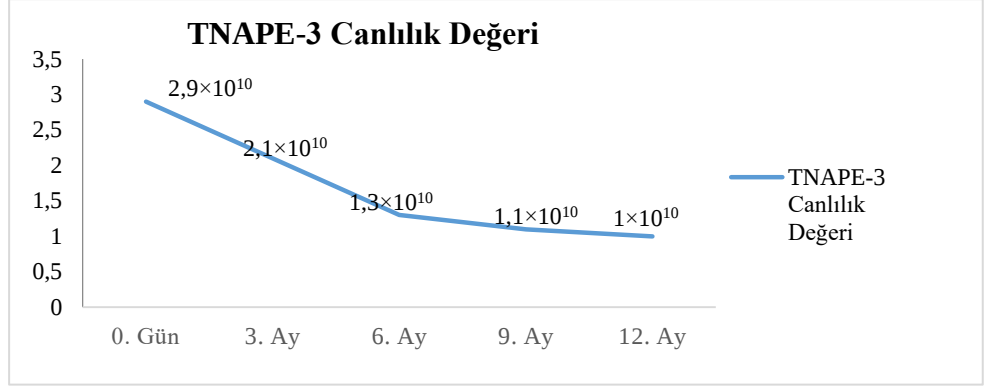
Şekil 4.6. TNAPE-1 Formülasyonunun Zamana Göre Canlılık Değeri Değişimi

TNAPE-1 WP formülasyonunun canlılık değeri zamana bağlı olarak $3,2 \times 10^{10}$ 'dan, $1,3 \times 10^{10}$ 'a gerilemiştir. Bu sonuç canlılığın formülasyonda sınırlı bir düşüş olsada korunduğunu göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar formülasyonun ticari olarak kullanılabilirliği bakımından ümit vermektedir.



Şekil 4.7. TNAPE-2 Formülasyonunun Zamana Göre Canlılık Değeri Değişimi

TNAPE-2 WP formülasyonunda canlılık değeri bir yıllık raf ömrü takibi sonucunda $2,6 \times 10^{10}$ 'dan $0,4 \times 10^{10}$ 'a düşmüştür. Benzer olarak canlılığın korunduğunu söylenebilir ve bu sonuç aynı şekilde sanayinin ilgisini çekebilir.



Şekil 4.8. TNAPE-3 Formülasyonunun Zamana Göre Canlılık Değeri Değişimi

TNAPE-3 WP formülasyonu $2,9 \times 10^{10}$ konidi/g olan başlangıç canlılığını bir yılın sonunda 1×10^{10} konidi/g olarak tamamlamıştır. Canlılığın formülasyonda kaybı diğer formülasyonlar gibi sınırlı olmuştur.

Elde edilen bu tek yıllık veriler en başarılı formülasyonun Talk formülasyonu olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın bir yüksek lisans çalışması olması ve süresinin belirli bir zaman dilimini kapsaması bu çalışmanın tek yıllık gerçekleştirilmesini zorunlu kılmıştır. Ancak konu iki ve daha fazla yılı kapsayacak araştırmalara açıktır.

5. TARTIŞMA

İnsan ve çevre sağlığının giderek önem kazandığı günümüzde kimyasal pestisitlerin geliştirilme ve ruhsatlandırılma aşamalarında süreçler uzamış, özellikle toksikolojik süreçlerde izleme ve takip artmıştır. Pestisit adayı moleküllerin bulunma süreci ve maliyetinin tezin önceki bölümlerinde belirtilen büyük bütçeli harcamaları gerektirmesi, yeni arayışları beraberinde getirmiştir. Bilindiği üzere modern pestisitlerde hedef zararlı veya hastalık etmenine yönelmeyle geniş etki spektrumu daraltılmış, birim alana kullanılan ilaç miktarında ciddi azalmalar sağlanmış, son ilaçlamayla hasat arasında geçmesi gereken süre kısaltılmış ve pestisitın çevrede parçalanma ve kalıcılığı, hedef dışı organizmalara etkisinin en düşük düzeylerde olması hedeflenmiştir. Bu kriterleri sağlayan yeni moleküllerin ortaya çıkarılması her geçen gün daha da zorlaşmaktadır. Dolayısıyla bu alanda yapılan yatırımların geri dönüşü ve karlılığında ciddi azalmaların yaşandığı söylenebilir. İşte bu noktada geçmişte bitmeyen senfoni olarak adlandırılan biyolojik savaşın son yıllarda ürünlerini birer birer piyasaya önde gelen pestisit firmaları tarafından çıkarıldığına tanık oluyoruz. Bunun temelinde biyolojik savaş ajanının geliştirilme maliyetinin kimyasal bir pestisite göre çok düşük olması, genellikle geniş spektrumlu olması, çevre ve insan sağlığı bakımından güvenli olması ve daha da önemlisi günümüz teknolojisinin artık bu biyolojik ajanların raf ömrü ve bu raf ömrü sonunda biyolojik etkinliklerini/virulensliklerini koruyabilecek bir veri ve teknolojik birikimine sahip olmasıdır.

Entomopatojen funguslar, biyoinsektisitler olarak geniş bir yelpazede böcek zararlılarının kontrolünde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu biyoinsektisitlerin ticarileştirilmesi, seri üretim ve formülasyonu yetersiz bilgi ve metodoloji gibi nedenlerle yavaş olmaktadır (Sundh ve Goettel, 2013). Her yerde bulunan entomopatojenik fungus *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Ascomycota: Hypocreales: Cordycipitaceae) en yaygın ticari fungal insektisitlerden biridir (Faria ve Wraight, 2007). Çoğu fungal biyokontrol ajanı, aktif madde olarak hava konidisi (aseksüel sporlar) içerir ve tipik olarak katı substrat fermantasyonu yoluyla üretilir (Dhar ve Kaur, 2011). Hidrofobik karakterdeki bu spor formları, makul depolama stabilitesi ve zararlı kontrol

etkinliği sağlayan sıvı ve toz formölasyonlar için uygundur (Burges ve Jones, 1998; de Faria ve Wraight, 2007). Hipokreal entomopatojenik fungusların hava konidileri (örn., *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., vb.), global olarak ticareti yapılan tüm mikopestisitlerin %70'inden fazlasının ana aktif maddesini oluşturmaktadır (Faria ve Wraight, 2007). Bu tür büyük ölçekli spor üretimi, ağırlıklı olarak katı substrat fermentasyon işlemlerine dayanmaktadır.

Formölasyon teknolojileri ticari mikopestisitlerin geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır ve çok çeşitli seçenek ve süreçleri gerektirmektedir. Formölasyon; nakliye, taşıma ve uygulamayı kolaylaştırarak ticari “sağlamlık/kararlılık” sağlamak, oda sıcaklığı raf ömrünün uzatılması, daha tutarlı etkiler için böcek öldürücü aktivitenin arttırılması, uygulama sonrası kalıcılığın iyileştirilmesi, fungal propagüllerin fiziko kimyasal özelliklerini değiştirmeden abiyotik çevresel streslere karşı koruma sağlaması bakımından önemlidir. Formölasyon stratejileri aynı zamanda bir mikoinsektisit hedef zararlı spektrumunu yeni pazarlara genişletebilir ve belirli eklemesizlikler için farklı türlerin zarar yükünü hafifletebilir. Endüstriyel ölçekteki mikoinsektisit formölasyonlar genellikle tescillidir ve bu durum ürünü ortaya koyan kompozisyon veya bileşenler hakkındaki bilgilerimizi sınırlar. Ticari *Beauveria* preparatları daha sofistike, stabil bir preparasyon için genellikle uyumlu adjuvanlar, dolgu maddeleri ve diğer gerekli katkı maddelerini içeren kuru ve sıvı formölasyonlardan oluşmaktadır. Formölasyon tipi fungal propagöl, uygulama stratejisi ve hedef zararlı davranışı ve yaşam alanı tarafından yönetilmektedir. Ucuz ve biyolojik olarak parçalanabilen doğal formölasyon bileşenlerine duyulan ihtiyaç, ürünün nihai maliyeti ve çevresel kaygıları giderecek nitelikte olmalıdır. Yürütölen bu tez çalışmasında entomopatojen fungus *B. bassiana*'nın kitle üretiminde bu bakımdan pirinç kullanılmıştır. Araştırmada pirinç çeşitleri kitle üretim bakımından oldukça geniş bir farklılık göstermiştir. En yüksek canlılık $4,7 \times 10^{11}$ konidi/g değerıyla Osmancık-97 çeşidinde ölçölmüştür ve araştırmanın sonraki bölümünde konu alınan WP formölasyonların geliştirilmesinde kullanılmıştır. Ulaşılabilen literatür kaynakları pirincin WP formölasyonların geliştirilmesinde oldukça yaygın bir şekilde kullanıldığını ortaya koymaktadır (Cherry ve Snelgrove, 1999; Mar ve Lumyong, 2012). Bu çalışmalarda elde edilen kitle üretim potansiyeli değerlerinin genel olarak 10^9 konidi/g olduğu

görülmektedir (Camara vd., 2022; Gandarilla-Pacheco vd., 2013; Villalba vd., 2009). Çalışmamızda ise 7 çeşit 10^{11} konidi/g, 5 çeşit ise 10^{10} konidi/g spor verimlilikleriyle bu değerlerin 10 ve 100 kat üstünde canlılık sergilemiştir. Buradan çıkan sonuç pirinç çeşitlerinin spor verimlilikleri bakımından geniş bir çeşitliliğe sahip olduklarıdır.

Beauveria bassiana'nın biyofarmülasyonuna dönük yürütülen çalışmalarımızda talk katkılı formülasyonun kil katkılı formülasyonlara göre daha stabil ve canlılık olarak daha yüksek değerler verdiği belirlenmiştir. Öyle ki talk katkılı formülasyonda canlılık ilk 6 ay boyunca oldukça stabil kalmış, 9. ayda canlılık $2,9 \times 10^{10}$ 'dan $1,7 \times 10^{10}$ gerilemiş ve 12. ayı $1,3 \times 10^{10}$ konidi/g olarak tamamlamıştır. Kil katkılı formülasyonlarda ise canlılığın 6. aya kadar çok hızlı azaldığı ve 6. aydan sonra biraz daha stabil kaldığı saptanmıştır. Kil katkılı formülasyon TNAPE-3 $2,9 \times 10^{10}$ 'dan birinci yılın sonunda 1×10^{10} 'a, TNAPE-2 ise $2,6 \times 10^{10}$ 'dan $0,4 \times 10^{10}$ konidi/g'a gerilemiştir. Bu sonuçlar seçilen kil formülasyonunun bile canlılığın korunmasında rol oynadığını göstermektedir. Bunun yanında yürütülen araştırmaların büyük bölümü canlılığın korunmasında talk katkılı formülasyonları kil katkılı formülasyonlara göre daha başarılı bulmaktadır (Bora vd., 2004). Yürütülen bu araştırmanın sonuçları da bu paraleldedir. Yürütülen bu araştırmalarda formülasyonların genel olarak canlılığı 10^8 cfu/g başlangıç canlılığına sahip olduğu ve bunun genel olarak 6 ay korunduğu bildirilmektedir (Purnima vd., 2013). Yürütülen bu tez çalışmasında gerek başlangıç canlılığının yüksek, gerekse de bunun bir yıl korunması sonuçları bakımından bu araştırmayı değerli ve umut verici kılmaktadır. Araştırmanın iki yıllık sonuçlarının benzer canlılık ve raf ömrü değerlerini vermesi durumunda, elde edilecek bu verilerin sanayinin de ilgi kapsamında olacağı değerlendirilmesi yapılmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Entomopatojen fungusların geçmişten günümüze tüm biyolojik savaş stratejileri içerisinde yer alması istenmiş ve IPM stratejilerinin ayrılmaz bir parçası olarak değerlendirilmiştir. Ancak araştırma sonuç ve teknolojilerinin paylaşımı ticari kaygılar nedeniyle saklı veya sınırlı kalmaktadır. Araştırmalar *Beauveria* izolatlarının patogeneze ve virulensliğinin *in vivo* toksikojenik metabolitlerin üretilmesi, kütikül ayrıştırıcı ve antioksidan enzimler ve konukçu içindeki aktif vejetatif gelişim yeteneği ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Etmenin bir entomopatojen olarak insan sağlığı için sıfır veya minimum tehdit oluşturması ve genellikle hedef olmayan organizmalar için zararsız olması çevre açısından güvenli bir biyokontrol ajanı olarak kabul edilmesini beraberinde getirmektedir. Çoğu fungal formülasyonlar aktif madde olarak hava konidisi (aseksüel sporlar) içerir ve tipik olarak katı substrat fermantasyonu yoluyla üretilir (Dhar ve Kaur, 2011). Hidrofobik karakterdeki bu spor formları sahip oldukları teknolojik üretim protokolleriyle hala yüksek depolama stabilitesi ve zararlı kontrol etkinliği sağlayan sıvı ve toz formülasyonlar için uygundur (Burgess ve Jones, 1998; Faria ve Wraight, 2007).

Yürütülen bu araştırma sonrasında elde edilen veriler biyofarmakasyonların ülkemizdeki geleceği için umut vardır. Entomopatojen *B. bassiana* AgB.20-02 için en iyi yetiştirme substratı ve kitle üretim potansiyeli belirlenmiş ve etmenin en iyi sonuç veren talk katkılı formülasyonu yanında 2 farklı kil formülasyonu daha geliştirilmiş ve bu formülasyonlarda sağlanan başarı birinci yılın sonunda oldukça umutvar bulunmuştur. Bu başarının yeniden kurulacak ve iki yıl sürecek denemelerle konfirmasyonu sonrasında elde edilecek ekonomik ve ulusal kazanımlar; ithalat ihtiyacını durdurma, üretim maliyetlerini ve giderlerini düşürme, ürün kalite ve standartlarını yükseltme, üründe ve üretim yöntemlerinde yenilik geliştirme, yeni ürüne yönelik araştırma, ihraç edilebilecek ürün geliştirilmesi, mevcut ürün kalite yükseltilmesi, verimliliği arttıran yeni ürün / süreç geliştirilmesi, yeni teknoloji geliştirme, yeni teknolojinin ülke koşullarına uyarlanması şeklinde olması ve bu karakteristikleriyle sanayinin ilgisini çekmesi beklenmektedir.

7. KAYNAKLAR

(Bu tez çalışmasında APA atıf sistemi kullanılmıştır.)

- Alves, S. B., Pereira, R. M., Stimac, J. L., & Vieira, S. A. (1996). Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures. *Biocontrol Science and Technology*, 6(4), 575-582.
- BARIŞ, C., & ER, M. K. (2021). Examining Some Cereals for Mass Production of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin Conidia by Solid State Fermentation. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24(6), 1263-1270.
- Beach, D., & Rohlfing, I. (2018). Integrating cross-case analyses and process tracing in set-theoretic research: Strategies and parameters of debate. *Sociological Methods & Research*, 47(1), 3-36.
- Bora, T., Özaktan, H., Göre, E., & Aslan, E. M. E. K. (2004). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. *Journal of Phytopathology*, 152(8-9), 471-475.
- Botella, P., Corma, A., & Navarro, M. T. (2007). Single gold nanoparticles encapsulated in monodispersed regular spheres of mesostructured silica produced by pseudomorphic transformation. *Chemistry of Materials*, 19(8), 1979-1983.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2006). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41(2), 323-342.
- Burges, H. D., & Jones, K. A. (1998). Trends in formulation of microorganisms and future research requirements. In *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments* (pp. 311-332). Springer.
- Camara, I., Cao, K., Sangbaramou, R., Wu, P., Shi, W., & Tan, S. (2022). Screening of *Beauveria bassiana* (Bals.) (Hypocreales: Cordycipitaceae) strains against *Megalurothrips usitatus* (Bagnall) (Thysanoptera: Thripidae) and conditions for large-scale production. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1), 85.
- Cherry, J. A., & Snelgrove, W. M. (1999). *Continuous-time delta-sigma modulators for high-speed A/D conversion: theory, practice and fundamental performance limits* (Vol. 521). Springer Science & Business Media.
- CPL Business Consultants (2010) The 2010 worldwide biopesticides market summary,zvol1. CPL Scientific, Wallingford, p 39.

- Faria, M. R., & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237-256.
- Dhar, P., & Kaur, G. (2011). Response surface methodology for optimizing process parameters for the mass production of *Beauveria bassiana* conidiospores. *African Journal of Microbiology Research*, 4(17), 2399-2406.
- Fargues, J., Reisinger, O., Robert, P. H., & Aubart, C. (1983). Biodegradation of entomopathogenic hyphomycetes: influence of clay coating on *Beauveria bassiana* blastospore survival in soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41(2), 131-142.
- Feng, M. G., Poprawski, T. J., & Khachatourians, G. G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4(1), 3-34.
- Gandarilla-Pacheco, F. L., Galán-Wong, L. J., Arévalo-Niño, K., Elías-Santos, M., & Quintero-Zapata, I. (2013). Evaluación de aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.(Hypocreales: Cordycipitaceae) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico. *Agrociencia*, 47(3), 255-266.
- Gibson, J. J. (2014). *The ecological approach to visual perception: classic edition*. Psychology press.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L., & Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, 30(5), 250-258.
- Holder, D. J., Kirkland, B. H., Lewis, M. W., & Keyhani, N. O. (2007). Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Cordyceps). *Microbiology*, 153(10), 3448-3457.
- Humber, R. A. (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 262-266.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential* (pp. 23-69). CABI publishing Wallingford UK.
- Jackson, M. A., Dunlap, C. A., & Jaronski, S. T. (2010). Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*, 55, 129-145.
- Jackson, M. A., & Jaronski, S. T. (2012). Development of pilot-scale fermentation and stabilisation processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 915-930.
- Jaronski, S. T. (1997). New paradigms in formulating mycoinsecticides. *ASTM Special Technical Publication*, 1328, 99-114.

- Jaronski, S. T. (2014). *Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art. Mass production of beneficial organisms*. Elsevier Inc., Amsterdam.
- Jaronski, S. T., & Mascarin, G. M. (2017). Mass production of fungal entomopathogens. *Microbial Control of Insect and Mite Pests*, 141-155.
- Kim, J. C., Lee, M. R., Kim, S., Lee, S. J., Park, S. E., Baek, S., Gasmi, L., Shin, T. Y., & Kim, J. S. (2019). Long-term storage stability of *Beauveria bassiana* ERL836 granules as fungal biopesticide. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22(2), 537-542.
- Lee, S. J., Kim, S., Skinner, M., Parker, B. L., & Kim, J. S. (2016). Screen bag formulation of *Beauveria* and *Metarhizium* granules to manage *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(3), 887-892.
- Litwin, A., Nowak, M., & Różalska, S. (2020). Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(1), 23-42.
- Lord, J. C. (2005). Low humidity, moderate temperature, and desiccant dust favor efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bruchidae). *Biological Control*, 34(2), 180-186.
- Mar, T. T., & Lumyong, S. (2012). Conidial production of entomopathogenic fungi in solid state fermentation. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 17(5), 762-768.
- Market, B. (n.d.). Biopesticides Market by Type (Bioinsecticides, Biofungicides, Bionematicides, and Bioherbicides), Source (Microbials, Biochemicals, and Beneficial Insects), Mode of Application, Formulation, Crop Application, and Region-Global Forecast to 2025.© 2020 [June, 2020]. *Diakses Dari* <https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/Biopesticide.Asp>.
- Marrone, P. G. (2014). The market and potential for biopesticides. In *Biopesticides: state of the art and future opportunities* (pp. 245-258). ACS Publications.
- Mascarin, G. M., Lopes, R. B., Delalibera Jr, Í., Fernandes, É. K. K., Luz, C., & Faria, M. (2019). Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 165, 46-53.
- McDougall, P. (2017). The global agrochemical market trends by crop. *Proceedings of the 11th China International Forum on Development of Pesticide Industry, Shanghai, China*, 28.
- Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2013). Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, 4(3), 357-374.
- Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., & Keyhani, N. O. (2015). Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 1057-1068.

- Ortiz-Urquiza, A., Riveiro-Miranda, L., Santiago-Álvarez, C., & Quesada-Moraga, E. (2010). Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(3), 270-278.
- Pendland, J. C., Hung, S. Y., & Boucias, D. G. (1993). Evasion of host defense by in vivo-produced protoplast-like cells of the insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. *Journal of Bacteriology*, 175(18), 5962-5969.
- Posada-Flórez, F. J. (2008). Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. *Journal of Insect Science*, 8(1), 41.
- Purnima, D., Hazarika, L. K., Bora, D., Puzari, K. C., & Surajit, K. (2013). Influence of storage conditions on viability and infectivity of talc based WP formulation of *Beauveria bassiana* against rice hispa, *Diurapha armigera* (Olivier). *Journal of Biological Control*, 27(3), 229-233.
- Qiu, Z., Zhou, B., Jin, L., Yu, H., Liu, L., Liu, Y., Qin, C., Xie, S., & Zhu, F. (2013). In vitro antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 428-437.
- Quesada-Moraga, E., Maranhao, E. A. A., Valverde-García, P., & Santiago-Álvarez, C. (2006). Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biological Control*, 36(3), 274-287.
- Quesada-Moraga, E., & Vey, A. (2003). Intra-specific variation in virulence and in vitro production of macromolecular toxins active against locust among *Beauveria bassiana* strains and effects of in vivo and in vitro passage on these factors. *Biocontrol Science and Technology*, 13(3), 323-340.
- Ravensberg, W. (2015). Crop protection in 2030: towards a natural, efficient, safe and sustainable approach. *International Symposium Swansea University*, 7-9.
- Ravensberg, W. J. (2011). *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods* (Vol. 10). Springer Science & Business Media.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G.-H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011a). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055-1073.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G.-H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011b). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055-1073.
- Sandhu, S. S., Rajak, R. C., & Agarwal, G. P. (1993). Studies on prolonged storage of *Beauveria bassiana* conidia: effects of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against chickpea borer, *Helicoverpa armigera*. *Biocontrol Science and Technology*, 3(1), 47-53.

- Silva, R. Z. da, & Neves, P. M. de O. J. (2016). Estabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. acondicionados em diferentes embalagens. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 83.
- Song, M. H., Yu, J. S., Kim, S., Lee, S. J., Kim, J. C., Nai, Y.-S., Shin, T. Y., & Kim, J. S. (2019). Downstream processing of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*-based fungal biopesticides against *Riptortus pedestris*: solid culture and delivery of conidia. *Biocontrol Science and Technology*, 29(6), 514-532.
- Sparks, T. C., & Nauen, R. (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 122-128.
- Sundh, I., & Goettel, M. S. (2013). Regulating biocontrol agents: a historical perspective and a critical examination comparing microbial and macrobial agents. *BioControl*, 58, 575-593.
- Taylor, B., Edgington, S., Luke, B., & Moore, D. (2013). Yield and germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* when grown on different rice preparations. *Journal of Stored Products Research*, 53, 23-26.
- Teja, C., & Rahman, S. J. (2017). Effect of media pH on the growth of entomopathogenic fungi isolated from different rhizosphere soils. *Int. J. Bioassays*, 6, 5325-5327.
- Thomaz-Soccol, V., Paulino, R. C., Castro, E. A., & Andreoli, C. V. (1997). Helminth eggs viability in sewage and biosolids sludge in Curitiba, Parana, Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 829-836.
- Urquiza Gómez, A., & Cadenas, H. (2015). Sistemas socio-ecológicos: elementos teóricos y conceptuales para la discusión en torno a vulnerabilidad hídrica. *L'Ordinaire Des Amériques*, 218.
- Valero-Jiménez, C. A., Debets, A. J. M., van Kan, J. A. L., Schoustra, S. E., Takken, W., Zwaan, B. J., & Koenraadt, C. J. M. (2014). Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. *Malaria Journal*, 13(1), 1-8.
- Van der Sluijs, J. P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J.-M., & Belzunces, L. P. (2013). Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 5(3-4), 293-305.
- Vega-Granillo, R., Talavera-Mendoza, O., Meza-Figueroa, D., Ruiz, J., Gehrels, G. E., López-Martínez, M., & de la Cruz-Vargas, J. C. (2007). Pressure-temperature-time evolution of Paleozoic high-pressure rocks of the Acatlán Complex (southern Mexico): Implications for the evolution of the Iapetus and Rheic Oceans. *Geological Society of America Bulletin*, 119(9-10), 1249-1264.

- Villalba, P. L., Grillo, H., & Cupull, R. (2009). Producción de esporas de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre polvos de arroz, sorgo y maíz. *Centro Agrícola*, 36(4), 25-32.
- Volcy, C. H., & Pardo, V. (1994). Principios de micología. *Universidad Nacional de Colombia. Medellín*.
- Zhang, Y.-J., Li, Z.-H., Luo, Z.-B., Zhang, J.-Q., Fan, Y.-H., & Pei, Y. (2009). Light stimulates conidiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, 19(1), 91-101.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9), 879-920.

