

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



***Beauveria bassiana* strain AgG20.01ES’NİN UZATILMIŞ RAF
ÖMRÜ İÇİN BİR OPTİMİZE EDİLMİŞ STANDART SIVI
TAŞIYICI FORMÜLASYON**

BİTKİ KORUMA YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELİS GADIŞ BÜYÜKKESKİN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet Erhan GÖRE

BOLU, ARALIK 2024

KABUL VE ONAY SAYFASI

Melis GADIŞ BÜYÜKKESKİN tarafından hazırlanan “*Beauveria bassiana* strain AgG20.01ES’NİN UZATILMIŞ RAF ÖMRÜ İÇİN BİR OPTİMİZE EDİLMİŞ STANDART SIVI TAŞIYICI FORMÜLASYON ” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Bitki Koruma Ana Bilim Dalı Programında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği kabul edilmiştir. 30/12/2024

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
Doç. Dr. Aysun ÇAVUŞOĞLU
Kocaeli 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 Kılavuzu ve Şablonuna 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 Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

.....

MELİS GADIŞ BÜYÜKKESKİN

ÖZET

***Beauveria bassiana* strain AgG20.01ES’NİN UZATILMIŞ RAF ÖMRÜ İÇİN
BİR OPTİMİZE EDİLMİŞ STANDART SIVI TAŞIYICI FORMÜLASYON
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MELİS GADİŞ BÜYÜKKESKİN
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI
BİTKİ KORUMA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. MEHMET ERHAN GÖRE)**

BOLU, ARALIK - 2024

X + 27 sayfa

Kimyasal pestisitler, tarımda hastalık ve zararlılarla mücadelede yaygın olarak kullanılsa da çevresel ve sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Bu nedenle, bilim insanları biyolojik mücadele yöntemlerine yönelmektedir. Biyolojik mücadele, zararlı popülasyonları azaltmak için mikroorganizmaların kullanılmasıdır ve entomopatojenik funguslar bu alanda önemli bir rol oynamaktadır. Bu funguslar, böcekleri doğrudan kitin yolu ile istila ederler. *Beauveria bassiana*, en çok araştırılan ve ticari mikoinsektisitlerin büyük bir kısmını oluşturan entomopatojenik fungustur. Bu fungus, geniş bir konakçı yelpazesine sahiptir ve toprakta doğal olarak bulunur. Çeşitli böcek türlerine karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır.

Biyolojik mücadelede formülasyon teknolojisi, ürünlerin etkinliğini ve raf ömrünü artırmak için önemlidir. Formülasyonlar, fungal propagüllerinin çevresel streslere karşı korunmasını sağlamalıdır. Araştırmalar, farklı formülasyon stratejileri ile *Beauveria*’nın etkinliğini artırmayı hedeflemektedir.

Bu çalışmada, ülkemiz koşullarında ilk kez bir entomopatojen fungusun katı substrat ile farklı bileşik komponentleri birleştirilerek suda çözünabilir konsantre (SL) formülasyonlar geliştirilmiştir. Geliştirilen formülasyonlar bir yıl sonunda oda sıcaklığında en yüksek 1×10^7 konidi/mL, 4°C’de ise 4×10^9 konidi/mL canlılığın olduğu tespit edilmiştir. Hızlandırılmış raf ömrü için 42°C’de bekletilen paralelde ise en yüksek canlılık değerinin dokuzuncu günde 6×10^7 konidi/mL olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada, test edilen *B. bassiana* izolatının canlılık değerlerine bakılarak, SL formülasyonlar için batık sıvı kültürde, katı substrat tercih edilebileceği daha sonraki çalışmalar için yol gösterici olduğu sonucuna varılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: *Beauveria bassiana*, Kitle Üretim Potansiyeli, Sıvı Batık Kültür, Blastospor, Biyoformülasyon

ABSTRACT

AN OPTIMIZED STANDARD LIQUID CARRIER FORMULATION FOR EXTENDED SHELF-LIFE OF *Beauveria bassiana* strain AgG20.01ES

MASTER THESIS

MELİS GADIŞ BÜYÜKKESKİN

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

(SUPERVISOR: PROF. DR. MEHMET ERHAN GÖRE)

BOLU, DECEMBER 2024

X + 27 pages

Although chemical pesticides are widely used in agricultural pests and diseases control, they can cause environmental and health problems. For this reason, scientists are turning to biological control methods. Biological control is the use of microorganisms to reduce pest populations, and entomopathogenic fungi play an important role in this area. These fungi invade insects directly through chitin. *Beauveria bassiana* is the most researched entomopathogenic fungus and accounts for the majority of commercial mycoinsecticides. This fungus has a wide host range and naturally found in soil. It has been proven effective against a variety of insect species.

Formulation technology is important in microbial control to increase the efficacy and shelf life of products. Formulations should ensure that fungal propagules are protected against environmental stresses. Research aims to increase the efficacy of *Beauveria* with different formulation strategies.

In this study, for the first time in our country, water-soluble concentrated (SL) formulations were developed by combining solid substrate with different compound components of an entomopathogenic fungus. The highest viability of the developed formulations at room temperature was determined to be 1×10^7 conidia/mL, 4°C and 4×10^9 conidia/mL at the end of one year. In the parallel kept at 42°C for accelerated shelf life, it was concluded that the highest viability value was 6×10^7 conidia/mL on the ninth day.

In this study, when the viability values of the tested *B. bassiana* isolate were evaluated, it was concluded that solid substrate could be preferred in submerged liquid culture for SL formulations and that it would be a guide for further studies.

KEYWORDS: *Beauveria bassiana*, Mass Production Potential, Liquid Submerged Culture, Blastospore, Bioformulation

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	viii
FOTOĞRAF LİSTESİ	viii
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	ix
TEŞEKKÜR	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 <i>Beauveria bassiana</i> Hakkında Genel Bilgi.....	4
1.2 <i>Beauveria bassiana</i> 'nın Patogenezi.....	5
1.3 <i>Beauveria bassiana</i> 'nın Kitle Üretimi Hakkında Yapılan Çalışmalar	6
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	10
2.1 Çalışmada Kullanılan Entomopatojen Fungus Türü.....	10
2.2 <i>Beauveria bassiana</i> strain AgG20.01ES'nin Kültür Koşulları	10
2.3 Sıvı Fermentasyon İçin İnokulum Üretimi	10
2.4 Katı Fermantasyon Tekniğiyle Kitle Üretimi	11
2.5 Osmancık-97 Kitle Üretimindeki Canlılık Tayini	11
2.6 Sıvı Taşıyıcı Formülasyonlar.....	12
2.7 Formülasyonların Raf Ömrünün Tayini	16
2.8 İstatistiksel Analiz	17
3. BULGULAR	18
3.1 Katı Fermantasyon Tekniğiyle Üretilen İnokulumun Canlılık Değerlerinin Belirlenmesi.....	18
3.1 Formülasyonların Canlılık Değerlerinin Belirlenmesi	18
4. TARTIŞMA	20
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	22
KAYNAKLAR	24

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. İşlem 1'in formülasyon içeriği	12
Tablo 2.2. İşlem 2'nin formülasyon içeriği	13
Tablo 2.3. İşlem 3'ün formülasyon içeriği	13
Tablo 2.4. İşlem 4'nün formülasyon içeriği	14
Tablo 2.5. İşlem 5'in formülasyon içeriği	14
Tablo 3.1. 4°C'de 1 yıl süre ile saklanan formülasyonların aylara göre canlılık değerleri.....	18
Tablo 3.2. Oda sıcaklığında 1 yıl süre ile saklanan formülasyonların aylara göre canlılık değerleri.....	19
Tablo 3.3. Hızlandırılmış raf ömrü için 42°C'de 15 gün saklanan formülasyonların canlılık değerleri.....	19

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 2.1. <i>Beauveria bassiana</i> 'nın -80 °C'den çıkarılarak kültür koşullarında geliştirilmesi.....	10
Fotoğraf 2.2. <i>Beauveri bassiana</i> 'nın sabaroud dekstroz besiyerinde inkubasyonu	11
Fotoğraf 2.3. 42°C'de bulundurulan formülasyonlar.....	15
Fotoğraf 2.4. Oda sıcaklığında bulundurulan formülasyonlar	16
Fotoğraf 2.5. 4°C'de bulundurulan formülasyonlar.....	16
Fotoğraf 3.1. Katı substratta geliştirilen <i>Beauveria bassiana</i> 'nın canlılık görüntüleri	18



KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

B. bassiana : *Beauveria bassiana*

g : Gram

L : Litre

mg : Miligram

mL : Mililitre

mM : Mili Molar

NaOCl : Sodyum Hipoklorid

ppm : Milyonda bir

vd. : ve diğerleri

WP : Islanabilir toz

°C : Santigrat Derece

µg : Mikrogram

µL : Mikrolitre

% : Yüzde

IPM : Entegre Mücadele Yöntemi

EPF : Entomopatojen Fungus

KSF : Katı Substrat Fermantasyonu

SL : Suda Çözünen Konsantre

ULV : Ultra Düşük Hacim

PVP: Polyvinylpyrrolidone

PEG : Polyethylene Glycol

NaNO₃ : Sodyum Nitrat

KH₂PO₄ : Mono Potasyum Fosfat

NaCl : Sodyum Klorür

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim süresince, karşılaştığım her zorluğa karşı benden yardımlarını esirgemeyen, bilgi birikimlerinden faydalandığım, manevi olarak bana her zaman destek olan, anlayış ve sabrını esirgemeyen, bölümümüzün laboratuvar ve diğer imkânlarını sunan, değerli danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Erhan GÖRE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma ortamında bugüne kadar yardımlarını benden esirgemeyen ve bana her zaman destek veren çalışma arkadaşım Yüksek Ziraat Mühendisi Ebru KURTARICI'ya ve teşekkürlerimi sunarım.

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

Ayrıca tez çalışması sırasında karnımda, yazın aşamasında kucağımda olan canım kızım Yaz BÜYÜKKESKİN'e uysallığı ile bana bu olanağı sunduğu için, her zaman bana güç verdiği için teşekkürlerimi borç bilirim.

1. GİRİŞ

Kimyasal pestisitler, üreticiler tarafından, bitkisel üretimi tehdit eden zararlıların kontrolü için en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Ancak gıda ürünleri üzerindeki toksik maddeler, yeraltı suyu kirliliği, hedef olmayan organizmalara etkisi ve kimyasallara karşı hastalık ve zararlıların direncinin gelişmesi gibi olumsuzluklara karşı, bilim insanlarının araştırdığı alternatif çevre dostu önlemler arasında biyolojik savaş ajanlarının kullanılması en etkili yöntemlerden biridir. Biyolojik savaş, hastalık üreten aktiviteyi ve mahsul zararını engellemek amacıyla böcek popülasyonunu azaltmak için, biyolojik savaş ajanlarının kullanılması sonucu ortaya çıkan savaş yöntemidir. Entomopatojenik funguslar, biyolojik bitki koruma ve sürdürülebilir entegre mücadele programında (IPM) en önemli role sahip organizmalardır. Biyolojik savaş ajanları olarak bilinen entomopatojenler, klasik insektisitler ile karşılaştırıldığında çeşitli avantajlara sahiptir. Bunlar arasında düşük maliyetler, yüksek verimlilik, faydalı organizmalar için tehlike arz etmemesi, ekosistemde kalıntıların azaltılması ve artan biyoçeşitlilik sayılabilir (Lacey vd., 2001; Asi vd., 2013; Ortiz-Urquiza ve Keyhani, 2013).

Biyolojik savaş ajanları içerisinde konukçu yelpazesi çok geniş olması nedeniyle entomopatojen funguslar ön plana çıkmaktadır. Konukçunun besinini tüketmesi ve oluşturdukları toksinler nedeniyle konukçunun ölümüne neden olurlar (Inglis vd., 2001). Entomopatojen funguslar, çeşitli aktiviteleri aynı zamanda gerçekleştirebildiğinden kimyasal insektisitlere göre büyük bir avantaj sağlarlar (Roberts ve Selitrennikoff, 1988). Ayrıca entomopatojenik fungusların zengin çeşitlilikleri, IPM'ye yönelik sürdürülebilir bir çözüm sunar. Bu entomopatojenler, çevre dostu olmaları ve biyolojik kalıcılıkları nedeniyle, yaşam döngülerinin çeşitli aşamalarında böcekleri öldürmek için tercih edilirler. Böcekleri enfekte eden farklı sınıflardan çok çeşitli fungus türleri bulunur (Samson vd., 1988).

Entomopatojen funguslar arasında birçok özelliği ve avantajları nedeniyle üzerinde en çok çalışılan organizma *Beauveria bassiana* olup, biyolojik mücadele uygulamalarında kullanılan ve ticari olarak üretimi yapılan bir biyolojik savaş ajanı haline gelmiştir (Kamp ve Bidochka, 2002). *B.bassiana* tüm dünyaya yayılmış en geniş konak listesine sahip olan fungustur (Vilcinskis vd., 1997). Toprakta yaygın bir saprofit olarak bulunmaktadır ayrıca toksin üreten bir fungus olduğu bilinmektedir (Tanada ve Kaya, 1993).

Beauveria bassiana, dünya çapında toprakta doğal olarak gelişen ve çeşitli böcek türleri üzerinde patojen görevi görerek beyaz muskardin hastalığına neden olan bir fungustur; bu nedenle entomopatojenik fungus grubuna aittir. *Beauveria* sp. izolatlarının çoğu, son derece konakçıya özgüdür. Konakçının dış iskeletini, miselyumları ile kaplayarak istila ederler. Birçok zararlı böceğe karşı virülansının geniş spektrumlu olması nedeniyle *B. bassiana* insektisit olarak kullanılmaya oldukça uygundur.

Ticari ölçekte piyasada yer alan toplam mikoinsektisitlerin %70'den fazlası *B.bassiana*'dır. Dünyanın farklı bölgelerinde *Beauveria*'nın seri üretimi, formülasyonu ve uygulamaları hakkında oldukça yoğun araştırma faaliyetleri sürdürülmektedir (Faria ve Wraight, 2007; Zimmermann, 2007).

Formülasyon teknolojisi, ticari mikopestisit gelişimi için büyük önem taşımaktadır ve geniş bir süreç yelpazesi sunmaktadır. Formülasyon, nakliyyeyi, taşımayı ve uygulamayı kolaylaştırarak, ticaretini garanti altına alma açısından önemlidir. Biyolojik kontrol ajanlarının formülasyon haline getirilmesiyle, oda sıcaklığında raf ömrünün uzatılması; daha tutarlı etkinlik için böcek ilacı aktivitesinin artırılması; uygulamadan sonra kalıcılığın artırılması; fungus propagüllerinin fizikokimyasal özelliklerini değiştirmeden abiyotik streslere karşı koruma sağlaması amaçlanmıştır (Jaronski, 1997; Burges ve Jones, 1998; Brar vd., 2006).

Ticari *Beauveria* preparatlarında stabilite için genellikle uyumlu adjuvanlar, dolgu maddeleri ve diğer gerekli katkı maddeleri içeren kuru ve sıvı bileşimler kullanılarak formülasyonlar oluşturulmaktadır. Formülasyon tipi fungal propagül (conidium veya blastospor), 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.

Formülasyon bileşenlerinin toksisitesi farklı fungus paropagülleri için uzun alkil bazlı yüzey aktif maddeler de dikkatle ele alınmalıdır çünkü blastosporlar ve diğer bitkisel fungus hücreleri havadaki konidialardan daha hassas olabilir (Jaronski, 1997; Jackson vd., 2010). Sualtı fermantasyonu genellikle katı substrat fermantasyonundan farklı propagüller üretir, bunlar: blastosporlar, konidyumlar, stabilize miselyumlar ve mikro sklerotlardır. Blastosporlar, Ascomycetes şubesine ait bir fungusla enfekteli bir böceğin vücudu boyunca çoğaldığı vejetatif

hücrelerdir. Blastosporların çoğalması maya benzeridir ancak mayaların gerçek tomurcuklanması değildir. *Beauveria* türlerinin çoğu veya tamamı, uygun sıvı fermantasyon koşulları altında blastospor olarak büyür. Blastosporlar, hava konidyumları ile karşılaştırıldığında çevresel etkilere karşı daha hassastırlar. Özellikle kurutma işlemine tabii tutulduğunda daha dayanıklı hale getirmek için özel yaklaşımlar gereklidir. Bu nedenden dolayı, çalışmamızda raf ömrünün uzun olmasını amaçladığımız için hava konidilerini kullanarak kalıcılık seviyesini arttırdık. Formülasyon stratejilerine yapılan yatırımlar genellikle kuru ürünler için kurutmayı ve sıvı ürünler için yağ veya su bazlı preparatları içeren işlemlerle bağlantılıdır.

Sıvı formülasyonların, düşük nemde enfeksiyon (Prior vd., 1988; Bateman vd., 1993), termal stres toleransı (Hedgecock vd., 1995; Hong vd., 1997), güneş radyasyonu altında hayatta kalma gibi çevresel faktörlere karşı (Moore vd., 1993; Alves vd., 1998) diğer formülasyonlar ile karşılaştırıldığında daha iyi sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Hidrofobik olan kuru hava konidileri, saf yağ (ULV uygulamaları için) veya daha sonra püskürtme için suyla seyreltilmek üzere emülsiye edilebilir yağ formülasyonlarına kolayca dahil edilir (Burges ve Jones, 1998). Bazı araştırmacılar tarafından *Beauveria* ve diğer fungal entomopatojenlerin yağ bazlı formülasyonlar için belirtilen avantajlara rağmen karşıt raporlar konidinin yağ ve sulu preparatlarının benzer etkinliğini, geleneksel veya ultra düşük hacimle (ULV) uygulamalardan sonra filoplanlar üzerinde eşdeğer kalıcılığını belgelemektedir (Inglis vd., 1993; Behle vd., 2009).

Avrupa ve Kuzey Amerika'da kimyasal madde içermeyen mahsullere olan talebin artması ve pestisit kalıntılarına ilişkin düzenlemelerin sıkılaşması nedeniyle, ulusal düzenleyici kurumlar, geleneksel kimyasallara kıyasla her yıl daha fazla biyopestisit onaylanmasını teşvik etmektedir. Mikrobiyal biyopestisitlerin, çevre dostu ayak izine sahip etkili bir bitki koruma alternatifi olarak kabul görmesi ile birlikte, önde gelen birçok zirai ilaç şirketi, biyopestisit sektörüne giderek daha fazla yönelmektedir. Bu sebepten dolayı formülasyon teknolojisi sırasında oluşabilen kronik sıkıntılara farklı bir bakış açısı getirebilmek için, yürütülen bu tez çalışmasında ülkemiz koşullarında ilk kez *B. bassiana*'nın bir izolatının (AgG20.01ES) uzatılmış raf ömrü için katı spor kitlesi üretim potansiyeli belirlenerek suda çözünebilir konsantre (SL) formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma sonunda 5 farklı formülasyon elde edilerek kendi içlerinde karşılaştırıldığında en yüksek canlılık değerinin 1×10^7 konidi/mL olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlar hızlandırılmış raf ömrü testlerinin, oda sıcaklığında yapılan uzun süreli gözlemlerle tutarlı sonuçlar verdiğini göstermektedir. 42°C'de yapılan testlerde (hızlandırılmış raf ömrü), 9. günde canlılık miktarının belirli bir seviyeye (6×10^7 konidi/mL) ulaştığı gözlemlenmiş ve bu, 1 yıl boyunca oda sıcaklığında yapılan ölçümlerle benzerlik göstermiştir. Sonuç olarak, hızlandırılmış raf ömrü testlerinin, araştırmacılara zamandan tasarruf sağlayarak daha hızlı sonuç elde etmelerine olanak tanımaktadır. Bu durum, gelecekte araştırmaların daha verimli ve hızlı yapılmasına olanak sunabilir.

1.1 *Beauveria bassiana* Hakkında Genel Bilgi

Beauveria bassiana'nın etkinliği ilk kez 1835'te böcek bilimci olarak bilinen Agostino Bassi Di Lodi tarafından belirlenmiştir. Etmenin İtalya'da ipekböceklerinin lejyonlarını beyaz mumyalara dönüştüren pebrine hastalığına neden olduğu tespit edilmiştir. Patogenes sonucunda beyaz toz tabakasıyla kaplı kadvraların karakteristik görünümü, beyaz muskardin hastalığına yol açmıştır. İlerleyen dönemlerde Vuillemin tarafından fungusu Bassi'nin ismi verilmiştir (Lord, 2005).

Entomopatojenik fungus türlerinin çoğunluğu Entomophthoromycota ve Ascomycota şubesi içerisinde yer almaktadır. *Beauveria*, Ascomycota şubesinin, Sordariomycetes sınıfının, Hypocreales takımının Cordycipitacea familyasında yer almaktadır. *Beauveria*, moleküler taksonomik araştırmalardan önce uzun süre Deuteromycetes içinde bulunmuştur (Rehner vd., 2011).

Beauveria bassiana'yı yoğun bir şekilde kullanmaya yönelik ilk ve en önemli girişimlerden biri, 1800'lerin ortalarında, *Blissus leucopterus* adlı haşere böceklerin kontrolü için ABD Orta Batı'sında gerçekleşmiştir (Lord, 2005). Bu fungus, Acari ve Insecta sınıfındaki çeşitli türler de dahil olmak üzere 700'den fazla konakçı türünü enfekte edebilen, eklembacaklıların iyi bilinen patojenidir (Inglis vd., 2001; Zimmerman, 2007). Dünya'nın farklı yerlerinden binlerce izolatan toplandığı en yoğun çalışılan fungal entomopatojenlerden biridir (Rehner vd., 2011).

Beauveria biyolojik savaş için kullanılan başlıca fungal böcek patojenidir, bunun başlıca nedeni her yerde bulunmaları, kozmopolit dağılımları ve yapay

ortamlar kullanılarak kolay seri üretimleridir. Son kapsamlı incelemelere göre, tüm ticari biyopestisitlerin yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır (Faria ve Wraight, 2007). Dünyada satılan biyopestisitlerin neredeyse %90'ının katı substratla üretilen hava konidilerinden oluşması şartıdır. Buna karşılık blastosporları, miselyumu ve kompakt hyphal agregatları (mikrosklerotia) kapsayan bitkisel çoğalmalar, bu ürünlerin yalnızca küçük bir kısmını (%10'dan az) temsil etmektedir. Bununla birlikte, bu bitkisel propagüllerin araştırılmasına yönelik artan ilgi, sıvı kültür fermentasyon süreçlerinde yer alan kısa inkübasyon süresi ve emekten tasarruf sağlayan prosedürden kaynaklıdır. Örneğin, Brezilya'daki Koppert firması, nemli pirinç üzerinde katı hal fermentasyonu kullanarak *Beauveria*'yı (Boveril WP, ESALQ-PL63 şuşu) üretmiş olup yaklaşık 50.000 hektarlık bir alanda sprey uygulaması için 10 tona kadar saf kuru konidi verimine ulaşmıştır. Bu ürün akarlar ve beyaz sinek kontrolü için tavsiye edilmiştir (Faria ve Wraight, 2001, 2007; Lacey vd., 2001).

1.2 *Beauveria bassiana*'nın Patogenezi

Entomopatojen, enfeksiyon için fiziksel kuvvetler yoluyla konidinin konakçı kitinine bağlanması ve ardından hidrolitik enzimlerin (Proteazlar, lipazlar vb.) yardımı ile mekanik basıncı ve diğer faktörleri oluşturması gerekir (Ortiz-Urquiza ve Keyhani, 2013). Büyüyen hüfler, besin açısından zengin hemolimfe ulaştıklarında hızla çoğalarak besinlerden yararlanırlar. İç dokulara kolonize olarak konukçunun bağışıklık ve sinir sistemi (Rehner vd., 2008) üzerinde etkili olan çeşitli metabolitler (antimikrobiyal peptidler) üreterek bu dokuların tahrip edilmesine ve bağışıklığın baskılanmasına dahil olurlar. Dolayısıyla konakçının ölümüne yol açarlar (Ortiz-Urquiza vd., 2010).

Konukçu öldükten sonra, optimum çevre koşulları sağlandığında funguslar ölü böceklerden çıkarak yüzeyde havai konidilerini oluştururlar. Konidiler, abiyotik ve biyotik faktörlerin etkisiyle bulundukları konumdan başka bir konuma taşınırlar (Urquiza Gómez ve Cadenas, 2015; Valero-Jiménez vd., 2014). *B.bassiana*'nın konidileri, konukçu dokularını hızla kolonize ederek besin maddelerini kullanmaya başlar. Dolayısıyla konukçunun bağışıklık sistemini olumsuz etkileyerek konukçunun dirençsiz kalmasına sebebiyet verir (Holder vd., 2007; Pendland vd., 1993).

1.3 *Beauveria bassiana*'nın Kitle Üretimi Hakkında Yapılan Çalışmalar

Entomopatojen fungusların başarılı bir ticari ürün olarak piyasaya sürülmesi, sadece etkili türlerin karakterizasyonu ve patojenitesine bağlı olmayıp, aynı zamanda *in vitro* ortalarda başarılı kitle üretimine de dayanır (Brainstorm vd., 2018). Mikopestisitlerin geliştirilmesi aşamasında, *in vitro* denemelerinde küçük miktarlarda geliştirilebilir ve ekonomik açıdan maliyetli farklı yöntemler ile teste tabi tutulabilir olmalıdır.

Entomopatojenik fungusların arasında, *Beauveria bassiana*'nın kitle üretimi, diğer funguslara göre daha uygun maliyetli bir üretim sağlamaktadır (Jackson vd., 2010). Havai sporlar genellikle sterilize edilmiş, nemlendirilmiş tahıl kullanılarak katı substrat fermentasyonu (KSF) yöntemiyle üretilmektedir (Jaronski, 2023). Katı substrat fermentasyonunda, substrat doğrudan katı kültürden inokule edilmektedir. Pirinç ortamındaki vitaminler, tuzlar, karbon ve azot kaynakları gibi tüm fungus besin maddelerinin kontrol edilmesi, fermentasyon sırasında fiziksel ortamın değiştirilmesinde kolaylık sağlamak ve çevresel faktörlerde direnç sağlamaktadır (Jackson vd., 2010; Mascarin ve Jaronski, 2016). Spor üretimi için kullanılan kültür ortamlarını optimize ederek, entomopatojenik fungusların spor üretimini ve virülanslığını aynı anda iyileştirmeye yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Ortam bileşenleri, spor verimini, spor virülanslığı ve diğer önemli spor özelliklerini etkileyebilmektedir (Qiu vd., 2013). Bir substrattaki konidi verimi, ilk inokulum konsantrasyonu, sıcaklık koşulları, nem, havalandırma ve inkübasyon süresi gibi faktörlerden etkilenmektedir (Figueroa vd, 2007). Seçilen substratın, konidi üretimi için uygun olduğu düşünüldüğünde dahi, bunun için gerekli olan yüksek karbonhidrat, azot, mikro elementler, B-kompleks vitaminler ve iyonlar ile birlikte yüksek üretkenlik ve verim sağlayarak entomopatojenik fungusun spor gelişimini ve virülanslığını etkileyebilmektedir (Volcy ve Pardo, 1994). Entomopatojenik fungusların kitlesel üretimini gerçekleştirebilmek için, fungus türüne ait uygun ve en iyi beslenme koşullarını sağlayan substratlar gerekmektedir (Teja ve Rahman, 2017). Bu yöntemde substrat olarak pirinç, sorgum, bakla, fasulye, çavdar unu, şeker kamışı küspesi gibi çeşitli substratlar en çok kullanılanlar arasında yer almaktadır (Calderón vd., 1995; Thomaz vd., 1997; Santa vd., 2005). Yapılan araştırmalar, kitlesel üretimin maliyetini düşürmek ve fazla konidi elde etmek amacıyla pirinç kullanımının doğru olduğunu

göstermektedir (Fairbairn vd., 2007). Pirinç, karbonhidrat bakımından oldukça zengin olması ve nemi koruma özelliğiyle, spor üretiminde en çok tercih edilen substrat olarak kullanılmaktadır (Mascarin vd., 2010).

Hava konidileri, *Beauveria* ve diğer entomopatojenlerin birincil efeksiyöz propagülüdür. Bu hidrofobik aseksüel sporun seri üretimi nispeten kolay ve ucuzdur. Tipik olarak, hava konidileri genellikle sterilize edilmiş, nemlendirilmiş tahıl taneleri kullanılarak katı substrat fermentasyonu (SSF) ile üretilir (Jaronski, 2023).

Hava konidilerini seri üretmek için bir veya iki aşamalı teknik kullanılabilir. Tek aşamalı üretimde, substrat doğrudan katı kültürden inoküle edilir. İki aşamalı üretim, genellikle blastospor içeren inokulumun, su altında sıvı fermentasyon kullanılarak üretilmesini içerir, bu inokulum daha sonra katı substrat fazı için kullanılır.

Beauveria konidi'lerini büyük ölçekte üretmek için bazı şirketler üretim tesislerinde, tepsi yöntemini (Alves ve Pereira, 1989) benimsemiş olup verim büyük ölçüde substrata, oksijen seviyesine, başlangıç nemine ve izolata bağlı olduğu kanısına varılmıştır. 1980'lerde tepsi yöntemi denemeleri, buharda pişirilmiş pirinçte 6.2×10^9 konidi/g'a kadar verim sağlamıştır (Alves ve Pereira, 1989), bu da Brezilya'da *Beauveria* spp.'nin konidial üretimi için kullanılan başlıca nişasta açısından zengin substrat olmaya devam etmesini sağlamıştır. Katı substrat, fermentasyon sürecini önemli ölçüde ölçeklendirebilir ve otomatikleştirilebilir hale getirmiştir (Jaronski, 2023).

Entomopatojenik fungusların çoğu, sıvı ortamlarda dimorfik büyüme gösterir ve bu büyüme böcek hemoselinde gözlemlenen büyümeye benzer. *B. bassiana*, sıvı fermentasyondan, blastosporlar olarak adlandırılan, hidrofilik propagüller oluşturabilir (Holder ve Keyhani, 2005). Blastosporlar, morfolojik, fiziksel, biyokimyasal ve patolojik özelliklerine dayanarak hava konidilerinden ve su altında kalan konidilerden farklıdır (Hegedus vd., 1992; Holder vd., 2007). *Beauveria*'nın hava konidileri, *in vitro* blastosporları ve su altında kalan konidileri için hücre duvarının fizikokimyasal yüzey özellikleri açısından belirgin farklılıklar tanımlanmıştır (Holder vd., 2007).

Beauveria blastosporlarını sıvı kültür yöntemlerini kullanarak seri üretmeyi deneyen önceki çalışmalar, 5 günden fazla fermentasyon sürelerinde, zayıf kurutma toleransı ve zayıf depolama kararlılığı ile $<1 \times 10^9$ blastospor mL⁻¹ veriminde

ürettilmiştir (Samšináková, 1966; Humphreys vd., 1989; Rombach, 1989; Vidal vd., 1998; Vega vd., 2003; Pham vd., 2009; Chong-Rodriguez vd., 2011; Lohse vd., 2014). Düşük havalandırma oranları ve yetersiz beslenme zayıf sonuçlardan sorumludur. Daha yakın zamanda araştırmacılar, uygun beslenme koşulları altında yüksek havalandırma oranları ve yüksek ozmotik basınç kullanılarak *Beauveria* ve ilgili türlerin yüksek konsantrasyonlardaki blastosporlarının hızlı üretimi için gereken kritik beslenme ve çevre koşullarını tanımlamışlardır (Mascarin vd., 2015). Sonuca bakıldığında 2×10^9 mL⁻¹ blastospor konsantrasyonu görülmüş olup bu hücrelerin neredeyse yarısı sprey kurutma veya havayla kurutma yoluyla kurutulduktan sonra canlılıklarını yitirmişlerdir (Mascarin vd., 2015, 2016, Jackson ve Mascarin, 2016). Blastosporlar, hava konidyumlarına kıyasla çevresel etkilere karşı daha duyarlıdır. Özellikle kurutma işlemi sırasında daha dayanıklı olmalarını sağlamak için özel yöntemler uygulanması gereklidir. Bu da, formülasyon teknolojisinde maddi ve zamandan kayıp oluşturmamasından dolayı dezavantaj sağlamaktadır.

Dhar vd. (2011), yaptıkları çalışmada *Beauveria bassiana*'nın hava konidilerinin seri üretiminde farklı nem içeriği ve maya ekstraktı konsantrasyonlarını, pirinç ve pirinç kepeğine uygulamışlardır. %35 nem içeriği ve %1,5 maya ekstraktı konsantrasyonunda karışık substrat (pirinç + buğday kepeği) kullanıldığında 2.8×10^{10} konidi/g sonucu ile en iyi konidi verimi olarak bulunmuştur.

Camara vd. (2022), ticari olarak hava konidilerini elde etmek ve üretim koşullarını optimize etmek için bir çalışma yapmışlardır. Konidi üretimi için substrat nem içeriği %52 olup, %2 oranında yemeklik yağ ile desteklemişlerdir. Aşamalı üretimde, 150 mL konidi süspansiyonu (2.4×10^8 spor/ml), %4 glikoz ve %1,5 maya ekstraktı ile içeren SD sıvı ortamında 10 gün inkübe edilmiştir. Elde edilen SD ortamı, katı fermantasyonda inokülasyon amacıyla kullanılmıştır. %20-25 oranında konidi süspansiyonu belirleyerek, substrata uygulanması gerektiğini belirlemişlerdir. Pirinç substrat sistemi, *B. bassiana* sporlarının kitle üretimi için kullanılabilir bir yöntem olarak değerlendirilmektedir.

Beauveria bassiana'nın hava konidisi üretkenliği ve termotoleransı için Song vd. (2019), yaptıkları çalışmada katı kültür substratlarını ele almışlardır. Fungus konidisinin, zararlı kütikulasını başarılı bir şekilde enfekte edebilmesi için yüzey aktif maddeleri üzerine çalışma yapılmışlardır. İlk olarak, ısıya dayanıklı fungus

konidileri üretmek için, her bir *B. bassiana* izolatından 10 gün boyunca 13 tahıl substratı üzerinde inokulumu geliştirilmiştir. Genel olarak, beş substrat (kahverengi pirinç, darı, yapışkan olmayan İtalyan tilki kuyruğu darısı, arpa ve yapışkan İtalyan tilki kuyruğu darısı), en fazla sayıda ısıya dayanıklı konidi üretmiştir. Maliyet oranını azaltmak için başarılı olan substratlara mineraller, zeolit, perlit veya vermikülit ile karıştırıldığında, vermikülit kombinasyonu diğer mineral kombinasyonlarına göre nispeten yüksek konidi üretimi göstermiştir. *B. bassiana* hava konidilerinin zararlı kütikulasına başarılı bir şekilde bağlanması için altı yüzey aktif madde (CO-2.5, CO-12, LE-7, PE-61, TED-3 ve siloksan) ile birleştirilmiştir. Sonuç olarak, 20°C, 30°C ve 35°C yerine 25°C'de yapıldığında izolatlar en yüksek virülanslık oranını göstermiştir. Bu çalışma, tahıl substratları ile vermikülit kombinasyonunun, yüksek termotoleransa sahip ekonomik hava konidisi üretim için düşünülebileceğini ve hedef böceklere etkinliği için uygun olduğunu ve virülanslık için en uygun sıcaklığın 25°C olduğunu göstermiştir.

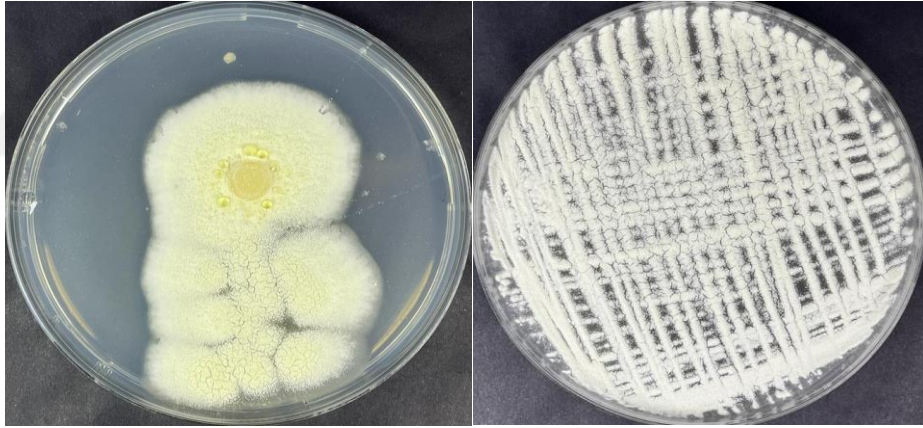
2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 Çalışmada Kullanılan Entomopatojen Fungus Türü

Beauveria bassiana strain AgG20.01ES izolatu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Mikoloji Laboratuvarı kültür stoklarından sağlanmıştır.

2.2 *Beauveria bassiana* strain AgG20.01ES'nin Kültür Koşulları

Beauveria bassiana strain AgG20.01ES izolatının daha önce Patates Dekstroz Agar (PDA: Merck, Darmstadt, Almanya) da geliştirilmiş olan petri kabından 10 mm çapında diskler alınarak içerisinde %35'lik gliserol bulunan 2 mL'lik cryo tüplerde -80 °C'de saklanmıştır. Çalışmada kullanılması için stokta bulunan agar diskleri alınarak PDA ortamına ekimleri gerçekleştirilmiştir. Kültürler 2 hafta süreyle 25±1°C'de gelişmeye bırakılmış.



Fotoğraf 2.1. *Beauveria bassiana*'nın -80 °C'den çıkarılarak kültür koşullarında geliştirilmesi

2.3 Sıvı Fermentasyon İçin İnokulum Üretimi

Sıvı fermentasyonda kullanılacak olan inokulumun üretimi için 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. *B. bassiana*'nın 2 hafta boyunca geliştirilen kültürlerinin her birine 10 mL %0.025 Tween 80 içeren steril saf su verilmiş ve baget yardımı ile sporları kazıyarak yıkanmıştır. Hemositometre (Superior Marienfeeld, Lauda- Königshofen,

Almanya) kullanılarak spor yoğunluğu 3×10^7 konidi/mL'ye ayarlanmıştır. Daha sonra 100 mL'lik Sabaroud dekstroza besiyerine 5 mL spor süspansiyonundan eklenerek rotary çalkalayıcıda 4 gün süreyle 26°C'de, 150 rpm'de gelişmeye bırakılmıştır.



Fotoğraf 2.2. *Beauveri bassiana*'nın sabaroud dekstroza besiyerinde inkubasyonu

2.4 Katı Fermantasyon Tekniğiyle Kitle Üretimi

Bu çalışmada kullanılan Osmancık – 97 pirinç çeşidi Agrobrest Grup Gen Kaynaklarından temin edilmiştir. İlk olarak pirinç beher içine alınarak bol su ile yıkanıp 2 saat saf su da bekletilip süzölmüştür. Pirinç, 250 g'lık gruplar olacak şekilde ayrılarak 4 adet fırın torbasına (25*38 cm) yerleştirilmiş ve poşetlerin ağızları kapatılarak 121°C'de 25 dakika otoklav edilmiştir. Sıvı Sabouraud dekstroza geliştirilen 4.10^7 konidi/mL kültürlerden pirinç torbalarına %15 oranında (v:w) inokulum eklenmiştir. Daha sonrasında pirinç torbalarına masaj yapılarak inokulumun pirinç daneleri arasına nüfuz etmesi sağlanmıştır. Torbalar %1'lik NaOCl ile dezenfekte edilmiş küvetlere yerleştirilmiştir. Küvetler $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 15 gün tutularak inkubasyon sağlanmıştır. 48 saat arayla torbalara masaj tekrarlanmış ve sporulasyon kolaylaştırılmıştır. İnkubasyon gelişimini tamamlayan pirinçler küvetlerine boşaltılarak aynı koşullarda 7 gün boyunca oda sıcaklığında kuruma işlemine tabii tutulmuştur, sonrasında öğütücüde 15 saniye öğütölüp, 14 ve 60 mesh eleklerden geçirilerek, 34°C 'de $<5\%$ su içeriğine kadar kurutulmuştur.

2.5 Osmancık-97 Kitle Üretimindeki Canlılık Tayini

Elde edilen spor + pirinç kompleksinden 10 g tartılmıştır. Önceden steril edilmiş 250 ml'lik erlen içerisine % 0.025 Tween 80 bulunan 90 mL steril saf su doldurularak spor + pirinç kompleksi eklenmiştir. Rotary çalkalayıcıda $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de,

150 rpm’de 45 dakika çalkalanmıştır. Süre sonunda seyreltme işlemi yapılarak 10^{-8} ve 10^{-10} ’dan içerisinde PDA bulunan herbir petriye 100 µL olacak şekilde 3 tekerrürlü yayma ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler $26\pm1^{\circ}\text{C}$ ’de 1 hafta inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerde kolonilerin belirginleşmesinin ardından koloniler sayılarak canlılık oranları belirlenmiştir.

2.6 Sıvı Taşıyıcı Formülasyonlar

Sıvı taşıyıcı formülasyonların (SL) gerçekleştirilmesinde kullanılan yöntem Dr. Göre’den alınmıştır. Formülasyon denemelerinde kullanılan kimyasal bileşim ve içerikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.1. İşlem 1’in formülasyon içeriği

SL Protokol	İçeri (g veya ml)	Materyal
İŞLEM 1	1,2 g	Whey
	15 ml	Gliserol
	0,3 g	Polyvinylpyrrolidone
	0,3 g	Polyethylene Glycol
	60 µl	Tween 80
	283 ml	Distile su
	6 ml	Bronopol (Antibiyotik)
	6 g	Spor

Tablo 2.2. İşlem 2'nin formülasyon içeriği

SL Protokol	İçeri (g veya ml)	Materyal
İŞLEM 2	1,2 g	Whey
	45 ml	Gliserol
	0,3 g	Polyvinylpyrrolidone
	0,3 ml	Polyethylene Glycol
	60 µl	Tween 80
	253 ml	Distile su
	6 ml	Bronopol (Antibiyotik)
	6 g	Spor

Tablo 2.3. İşlem 3'ün formülasyon içeriği

SL Protokol	İçeri (g veya ml)	Materyal
İŞLEM 3	0,48 g	Whey
	7,2 ml	Melas
	30 ml	Gliserol
	1,5 g	Polyvinylpyrrolidone
	1,5 ml	Polyethylene Glycol
	3 ml	Tween 80
	1,5 g	Glikoz
	1,5 g	Sodyum Klorür
	260 ml	Distile su
	6 ml	Bronopol (Antibiyotik)
	6 g	Spor

Tablo 2.4. İşlem 4'nün formülasyon içeriği

SL Protokol	İçeri (g veya ml)	Materyal
İŞLEM 4	1,2 g	Whey
	3 gr	Kil
	30 ml	Gliserol
	4,5 g	Polyvinylpyrrolidone
	4,5 ml	Polyethylene Glycol
	3 ml	Tween 80
	1,5 g	Glikoz
	1,5 g	Sodyum Klorür
	255 ml	Distile su
	6 ml	Bronopol (Antibiyotik)
	6 g	Spor

Tablo 2.5. İşlem 5'in formülasyon içeriği

SL Protokol	İçeri (g veya ml)	Materyal
İŞLEM 5	1,2 g	Whey
	3 gr	Kil
	45 ml	Gliserol
	0,9 g	Polyvinylpyrrolidone
	0,9 ml	Polyethylene Glycol
	3 ml	Tween 80
	1,5 g	Glikoz
	1,5 g	Sodyum Nitrat
	0,45 g	Mono Potasyum Fosfat
	0,45 g	Magnezyum Sülfat
	250 ml	Distile su

	6 ml	Bronopol (Antibiyotik)
	6 g	Spor

Herbir işlemde bulunan komponentler tablolarda (Tablo 2.1., Tablo 2.2., Tablo 2.3., Tablo 2.4. ve 2.5.) belirtilen miktarlarda (antibiyotik ve spor eklenmeden) toplam 300 mL olacak şekilde bir beherlerin içerisine koyuldu. Elde edilen 300 mL'lik solüsyon manyetik karıştırıcıda, homojen hale getirildi. Karışma işlemi gerçekleştirildikten sonra pH değerleri ölçüldü ve $5,6 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Beherde bulunan solüsyonlar, mezür yardımı ile üç adet erlene 100 ml olacak şekilde paylaştırıldı. Erlenlerin ağzı pamuk ile kapatılıp alüminyum folyo ile sarıldı. Sterilizasyon için 121°C 'de 1.1 atmosfer basınçta 20 dk otoklavlanarak steril edildi. Steril olmuş erlenlerin içerisine 2 g spor + pirinç kitlesi ve 2 mL antibiyotik (bronopol) eklendi. Solüsyonların homojen karışması için erlenler 5 dk 26°C 'de 200 rpm'de rotary çalkalayıcıya koyuldu. Karışım gerçekleştirildikten sonra işlemlerin bir paraleli 4°C 'de buzdolabında, bir paraleli 24°C 'de karanlık bir ortamda 1 yıl ve bir paraleli de 42°C 'de etüvde karanlık bir ortamda 15 gün boyunca saklandı.



Fotoğraf 2.3. 42°C 'de bulundurulan formülasyonlar



Fotoğraf 2.4. Oda sıcaklığında bulundurulan formülasyonlar



Fotoğraf 2.5. 4°C’de bulundurulan formülasyonlar

2.7 Formülasyonların Raf Ömrünün Tayini

Her bir işlemin referans değeri için 0. gün canlılık oranına bakılmıştır. Steril edilmiş 250 ml’lik erlenlerin içerisine % 0.025 Tween 80 bulunan 90 ml steril saf su konularak her bir işlemde 10 mL eklenmiştir. Elde edilen solüsyonlar rotary çalkalayıcıda 26°C’de 200 rpm’de 45 dk çalkalanmıştır. Süre sonunda seyreltme işlemi yapılarak 10^5 ve 10^9 ’dan içerisinde PDA bulunan her bir petriye 100 µL olacak şekilde 3 tekerrürlü yayma ekim yapılmıştır. Preparatların canlılık sayımı yine “Osmancık-97 Kitle Üretimindeki Canlılık Tayini” bölümünde belirtilen yöntemle gerçekleştirilmiştir.

Oda sıcaklığında ve 4 °C’de bulunan uygulamalar periyodik aralıklar ile (3 ayda bir) bir yıl boyunca raf ömrü takibi yapılmıştır. Hızlandırılmış raf ömrü için

42 °C sıcaklık uygulamasının ise 15 gün boyunca 3 gün ara ile raf ömrü takibi gerçekleştirilmiştir.

2.8 İstatistiksel Analiz

Çalışmada kullanılan sıvı taşıyıcı formülasyonlar, canlılık oranı bakımından değerlendirilmiştir. Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Elde edilen veriler SAS (SAS Institute, Cary, NC, ABD) programıyla varyans analizine tabi tutulmuş, ortalamaları karşılaştırmak amacıyla Duncan (DMRT) testi kullanılmıştır ($p < 0.01$).



3. BULGULAR

3.1 Katı Fermantasyon Tekniğiyle Üretilen İnokulumun Canlılık Değerlerinin Belirlenmesi

Beauveri bassiana'nın katı fermantasyon tekniği ile üretilen inokulumunun canlılık değerleri belirlenerek 4.9×10^{12} konidi/g olduğu tespit edilmiştir.



Fotoğraf 3.1. Katı substratta geliştirilen *Beauveria bassiana*'nın canlılık görüntüleri

3.1 Formülasyonların Canlılık Değerlerinin Belirlenmesi

Formülasyonlarımızın paralelleri 4°C, 42°C ve oda sıcaklığında olmak üzere farklı koşullarında saklanarak 1 yıllık canlılık oranları belirlenmiştir.

Tablo 3.1. 4°C'de 1 yıl süre ile saklanan formülasyonların aylara göre canlılık

4°C Canlılık Değerleri (konidi/mL)					
SL Protokoller	0. Gün	3.Ay	6.Ay	9.Ay	12.Ay
İşlem 1	$8,5 \times 10^{11}$	$7,1 \times 10^{11}$	$4,8 \times 10^9$	3×10^8	$2,8 \times 10^7$ c
İşlem 2	$1,1 \times 10^{11}$	1×10^{11}	7×10^{11}	$5,6 \times 10^9$	4×10^9 a
İşlem 3	$4,1 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{11}$	$6,3 \times 10^{10}$	$5,2 \times 10^8$	5×10^7 b
İşlem 4	$5,1 \times 10^{11}$	$4,8 \times 10^{11}$	$4,5 \times 10^9$	$3,4 \times 10^7$	$2,9 \times 10^6$ d
İşlem 5	$2,4 \times 10^{11}$	1×10^{11}	5×10^{10}	$2,2 \times 10^9$	$2,5 \times 10^6$ d

* Sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında 0.01 seviyesinde fark yoktur.

1 yıl sonunda 4°C'de bulunan işlem paralellin aylara göre spor canlılık oranlarının periyodik olarak azalmış olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 3.1). Kullanılan bileşimlerden dolayı işlemler arasında da canlılık oranlarının farklılık gösterdiği saptanmıştır. 1 yıl sonunda canlılık oranı en yüksek 4×10^9 konidi/mL ile İşlem 2'ye ait olduğu görülmüştür.

Tablo 3.2. Oda sıcaklığında 1 yıl süre ile saklanan formülasyonların aylara göre canlılık değerleri

Oda Sıcaklığı Değeri (konidi/mL)					
SL Protokoller	0. Gün	3.Ay	6.Ay	9.Ay	12.Ay*
İşlem 1	$8,5 \times 10^{11}$	5×10^{11}	6×10^{10}	$4,5 \times 10^8$	3×10^{6b}
İşlem 2	$1,1 \times 10^{11}$	7×10^{10}	$3,7 \times 10^{10}$	2×10^{10}	1×10^{7a}
İşlem 3	$4,1 \times 10^{11}$	$3,3 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^9$	3×10^{6b}
İşlem 4	$5,1 \times 10^{11}$	$1,7 \times 10^{10}$	$0,3 \times 10^9$	$0,3 \times 10^5$	3×10^{4c}
İşlem 5	$2,4 \times 10^{11}$	$2,7 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^8$	3×10^6	4×10^{4c}

* Sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında 0.01 seviyesinde fark yoktur.

Oda sıcaklığında bulunan işlem paralellerinin de aylara göre canlılık oranlarının periyodik olarak azalmış olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 3.2). 1 yıl sonunda bakıldığında en yüksek değer 1×10^7 konidi/mL ile İşlem 2'ye ait olduğu görülmüştür. Kullanılan bileşimlerden dolayı işlemler arasında da canlılık oranlarının farklılık gösterdiği saptanmıştır.

Tablo 3.3. Hızlandırılmış raf ömrü için 42°C'de 15 gün saklanan formülasyonların canlılık değerleri

42°C Canlılık Değerleri (konidi/mL)					
SL Protokoller	0. Gün	3. Gün	6. Gün	9.Gün	15. Gün
İşlem 1	$8,5 \times 10^{11}$	$6,1 \times 10^6$	0×10^6	0×10^1	0×10^1
İşlem 2	$1,1 \times 10^{11}$	$3,6 \times 10^9$	$0,5 \times 10^6$	6×10^7	0×10^1
İşlem 3	$4,1 \times 10^{11}$	$0,5 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	$0,5 \times 10^7$	0×10^1
İşlem 4	$5,1 \times 10^{11}$	$0,5 \times 10^9$	0×10^6	0×10^1	0×10^1
İşlem 5	$2,4 \times 10^{11}$	$2,5 \times 10^{10}$	0×10^6	0×10^1	0×10^1

Hızlandırılmış raf ömrüne tabi tutulan son paralel ise 15 gün 42°C'de saklanarak 3'er gün ara ile canlılık ölçümü yapılmıştır. Canlılık değerleri Tablo 3.3'te verilmiştir. En yüksek canlılık değeri 9. günde 6×10^7 konidi/mL olarak tespit edilmiştir ve değerlerin birbirinden farklı olduğu görülmüştür.

4. TARTIŞMA

Entomopatojen funguslar, zararlılara karşı biyolojik bitki koruma sağlamak amacıyla kullanılan ve kimyasal böcek ilaçlarına alternatif olan organizmalardır. Kimyasal pestisitler, hedef olmayan organizmalar üzerinde olumsuz etkiler yaratarak biyoçeşitlilik kaybına, gıda güvenliği sorunlarına ve böcek direncinin gelişmesine yol açabilir. Entomopatojen funguslar, bu kimyasalların kullanımını azaltarak çevreye zarar vermeden zararlı popülasyonlarını kontrol altında tutabilmektedir. (Soni, R. vd., 2022).

Jaronski (2023), yaptığı çalışmada *Beauveria* ve diğer entomopatojenlerin birincil efeksiyöz propagülü olarak hava konidilerini açıklamıştır. Tipik olarak, hava konidileri genellikle sterilize edilmiş, nemlendirilmiş tahıl taneleri kullanılarak katı substrat fermentasyonu (SSF) ile üretilebileceği ortaya konmuştur.

Hava konidilerini seri üretmek için bir veya iki aşamalı teknik kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır. Tek aşamalı üretimde, substrat doğrudan katı kültürden inoküle edilir. İki aşamalı üretim, genellikle blastospor içeren inokulumun, su altında sıvı fermentasyon kullanılarak üretilmesini içerir, bu inokulum daha sonra katı substrat fazı için kullanılır. Tez çalışmamızda, katı substrat fermentasyonu kullanarak hava konidilerini elde etmeyi amaçladık ve sonuç olarak $4,9 \times 10^{12}$ konidi/g canlılık elde ettik.

Beauveria bassiana izolatının, (Gandarilla-Pacheco vd., 2013) yapılan bir çalışmada batık kültür ve bifazik ortamında konidi üretimi değerlendirilmiştir. Sıvı kültür ortamında, en yüksek konidi üretimi $2,2 \times 10^8$ konidi/g olarak bulunmuştur ve katı fazda (pirinç tanesi), en yüksek konidi üretimi $1,8 \times 10^9$ konidi/g olarak bulunmuştur. Yürütülen bu çalışmada pirinç kitle üretim potansiyeli yapılan *B. bassiana*'nın konidi canlılık oranı $4,7 \times 10^{12}$ konidi/g olarak bulunmuştur ve çalışmamızla canlılık oranları arasında farklılık olduğu tespit edilmiştir.

Camara vd. (2022) *Beauveria bassiana* ile yaptıkları çalışmada pirinç ile konidi üretimi üzerine büyük ölçekli üretim koşullarını optimize etmişlerdir. Pirinçte gelişen *B. bassiana* konidisi yürüttüğümüz çalışmada olduğu gibi üretim periyotlarından geçilerek canlılık oranını $7,1 \times 10^9$ konidi/g olarak bulunmuştur. Tez çalışmamızda ise katı substrat olarak pirinçten kitle üretimi yapılan *B. bassiana*'nın konidi canlılık oranı $4,7 \times 10^{12}$ konidi/g olarak bulunmuştur. Katı substrattan kitle

üretim periyotları aynı olsa da canlılık oranları 1000 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Buda bizim çalışmamızın sonraki çalışmalar için yol gösterici olabileceğini ifade etmektedir (Camara vd., 2022).

Yapılan çalışmalara bakıldığında katı substrat ile kitle üretim potansiyeli üzerine birçok çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalarda konidi canlılık oranı genellikle 10^{10} 'u geçmemektedir (Camara vd., 2022; Gandarilla-Pacheco, F. L. vd., 2013; Villalba vd., 2009). Tez çalışmamızda ise konidi canlılık oranı 10^{12} olarak bulunmuştur ve bu da çalışmamızı diğer çalışmalardan öne çıkarmaktadır. Substrat seçiminin, entomopatojenik funguslar için kitle üretim prosedürün de çok önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Ticari kullanım için, bir miko insektisit, genellikle oda sıcaklığında en az bir yıl boyunca spor canlılığında minimum kayıp olarak kabul edilen “kabul edilebilir raf ömrüne” sahip olması gereklidir. Ticari bir *B. bassiana* için tipik bir konidial canlılık eğilimi, uzun ömürlülüğün sıcaklıkla ters orantılı olduğu bilinmektedir. 30°C'nin üzerindeki depolama sıcaklıkları, ticari olarak kabul edilemez raf ömrüne (<1 yıl) neden olurken, 20°C'den düşük sıcaklıklarda çok yıllık depolamaya izin verir. Fungal biyopestisitlerinin depolama stabilitesine ilişkin temel dayanak, raf ömrünün kısalmasıdır (Jaronski, 1997). Bizim çalışmamızda ise bir yıl sonunda oda sıcaklığında bulunan paralelin 1×10^7 konidi/mL, 4°C'de bulunan paralelin 4×10^9 konidi/mL ve oda sıcaklığında bulunan işlemlerin onaylanması için hızlandırılmış raf ömrüne tabii tutulan 42°C'de bulunan paralelin ise 12 ay sonunda 6×10^7 konidi/mL olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı şekilde çalışmamız Jaronski (1997) ile karşılaştırıldığında sonuçlarımızın uyumlu olduğu kanısına varılmıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Beauveria bassiana, biyolojik kontrol stratejilerinde ilerleme için sağlam bir temel oluşturmaktadır. *Beauveria*'nın çoklu etkilerle sergilediği çok yönlü ekolojik rollere ilişkin yeni bulgular, son kullanıcılara işlev ve değer katmakta olup bu durumda bir mikopestisit veya bitki büyüme destekleyicisi (biyostimülant) olarak nihani ticarileşmesini kolaylaştıracaktır. Son olarak, kapsamlı zararlı yönetimi stratejileri içinde geniş çapta benimsenmesini teşvik etmek için *Beauveria*'nın bulunabilirliği ve kullanımı konusunda yetiştiricilerin ve yayımcıların eğitiminin gerçekleştirilmesi ve yaygınlaştırılmasına ihtiyaç olduğuna inanmaktayız.

Ulaşılabilen kaynaklar göz önünde bulundurulduğunda; yürütülen bu tez çalışmasında ülkemiz koşullarında ilk kez bir entomopatojen fungusun katı substrat ile farklı bileşik komponentleri birleştirilerek suda çözünebilir konsantre (SL) formülasyonlar geliştirilmiş ve belirli periyotlarla bir yıllık canlılık değerleri ölçülerek raf ömrü tespiti yapılmıştır. Katı substratla üretilen sıvı formülasyonlar içinde en yüksek canlılık değerleri İşlem 2'ye ait olduğu sonucuna varılmıştır. Bir yıl sonunda oda sıcaklığında 1×10^7 konidi/mL, 4°C'de ise 4×10^9 konidi/mL canlılığın olduğu tespit edilmiştir. Hızlandırılmış raf ömrü tespiti için 42°C'de bekletilen uygulamalarda ise en yüksek değer 9. günde yine 6×10^7 konidi/mL canlılıkla İşlem 2'ye ait olduğu sonucuna varılmıştır. Hızlandırılmış raf ömrü bakılan işlemler ile 1 yıl oda sıcaklığında bulunan uygulamalarımızın canlılık sonuçları birbirleri ile örtüşmektedir. Bu da ilerleyen dönemlerde araştırmacıların zamandan kazanç sağlaması için 1 yıl beklemeyip hızlandırılmış raf ömrü ile hızlı test sonucuna varabileceğini kanıtlamıştır.

Bu çalışmada, test edilen *B. bassiana* izolatu SL formülasyonlar için batık sıvı kültürde, katı substrat tercih edilebileceğini göstermiştir. Değerlendirmenin ana amacı yüksek konidi verimi elde etmek olduğundan substrat olarak pirinç seçilebilir ve bu sonuç SL formülasyon için yapılan başka substrat denemelerine de yol gösterici olabilir.

Beauveria bassiana hedef zararlıyı aktif olarak enfekte etme ve öldürme yetenekleri nedeniyle “su baskını” biyokontrolünde kullanım için benzersiz adaylardır. Bu yaklaşımdan dolayı kullanılan *B. bassiana*'nın üreticilere ulaşmasını sağlayan uygun maliyetli bir üretim ve stabilizasyon sürecini gerektirir. Bu nedenle

ticari gelişimi açısından kritik öneme sahiptir. Biyokontrol ajanı, son kullanıcıya maliyet açısından fayda sağlamalı (düşük maliyetli olmalı), makul derecede uzun bir raf ömrüne sahip olmalı (depolama sırasında canlı ve bulaşıcı kalmalı) ve tarla koşulları altında tutarlı böcek kontrolü sağlanmalıdır. Bu niteliklerin herhangi birindeki eksikli ticari bir ürün haline gelmesini engelleyebilir. Genel olarak ürün maliyeti ve depolama stabilitesi, üretim ve formülasyon süreçlerinin gelişimini yönlendirmiştir. Çoğunlukla bu üretim hedefleri, tutarlı enfeksiyon ve böcek hedefinin kontrolüne yönelik ekolojik ve çevresel gerekliliklerle çalışmaktadır. Biyoinsektisitlerin tek başına veya zararlı yönetiminde entegre bir yaklaşımın parçası olarak kullanılmasında başarıyı garantilemek için zararlı mücadelesi ile tarımsal sistem arasındaki ilişkinin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Alves, R. T., Bateman, R. P., Prior, C., & Leather, S. R. (1998). Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop protection*, 17(8), 675-679.
- Alves, S. B., & Pereira, R. M. (1989). Production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill in plastic trays.
- Asi, M. R., Bashir, M. H., Afzal, M., Zia, K., & Akram, M. (2013). Potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae).
- Bateman, R. P., Carey, M., Moore, D. E., & Prior, C. (1993). The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Annals of Applied Biology*, 122(1), 145-152.
- Behle, R. W., Compton, D. L., Laszlo, J. A., & Shapiro-Ilan, D. I. (2009). Evaluation of soyscreen in an oil-based formulation for UV protection of *Beauveria bassiana* conidia. *Journal of economic entomology*, 102(5), 1759-1766.
- Brainstorm Consortium, Anttila, V., Bulik-Sullivan, B., Finucane, H. K., Walters, R. K., Bras, J., ... & Avbersek, A. (2018). Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science*, 360(6395), eaap8757.
- 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). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Calderón, G., Mateos, J. L., & Moshinsky, M. (1995). Resonant spectra and the time evolution of the survival and nonescape probabilities. *Physical review letters*, 74(3), 337.
- 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.
- Chong-Rodríguez, M. J., Maldonado-Blanco, M. G., Hernández-Escareño, J. J., Galán-Wong, L. J., & Sandoval-Coronado, C. F. (2011). Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation-tolerance, viability and toxic activity using different liquid media. *African Journal of Biotechnology*, 10(30), 5736-5742.
- 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.
- Fairbairn, D. J., Cavallaro, A. S., Bernard, M., Mahalinga-Iyer, J., Graham, M. W., & Botella, J. R. (2007). Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. *Planta*, 226, 1525-1533.
- 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.
- Figuroa, A., Baynard, T., Fernhall, B., Carhart, R., & Kanaley, J. A. (2007). Endurance training improves post-exercise cardiac autonomic modulation in obese women with and without type 2 diabetes. *European journal of applied physiology*, 100, 437-444.
- Gandarilla-Pacheco, F. L., Galán-Wong, L. J., López-Arroyo, J. I., Rodríguez-Guerra, R., & Quintero-Zapata, I. (2013). Optimization of pathogenicity tests for selection of native isolates of

- entomopathogenic fungi isolated from citrusgrowing areas of México on adults of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Florida Entomologist*, 96(1), 187-195.
- Hedgecock, S., Moore, D., Higgins, P. M., & Prior, C. (1995). Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in an oil formulation. *Biocontrol Science and Technology*, 5(3), 371-378.
- Hegedus, D. D., Bidochka, M. J., Miranpuri, G. S., & Khachatourians, G. G. (1992). A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied microbiology and biotechnology*, 36, 785-789.
- Holder, D. J., & Keyhani, N. O. (2005). Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to substrata. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5260-5266.
- Holder, D. J., Kirkland, B. H., Lewis, M. W., & Keyhani, N. O. (2007). Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana*. *Microbiology*, 153(10), 3448-3457.
- Hong, T. D., Ellis, R. H., & Moore, D. (1997). Development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity. *Annals of Botany*, 79(2), 121-128.
- Humphreys, A. M., Matewele, P., Trinci, A. P., & Gillespie, A. T. (1989). Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* in batch and fed-batch culture. *Mycological research*, 92(3), 257-264.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., & Johnson, D. L. (1993). Persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on phylloplanes of crested wheatgrass and alfalfa. *Biological control*, 3(4), 258-270.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. E. R. M. A. N. N. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential* (pp. 23-69). Wallingford UK: CABI publishing.
- 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.
- Jaronski, S. T. (2023). Mass production of entomopathogenic fungi—state of the art. *Mass production of beneficial organisms*, 317-357.
- Jaronski¹, S. T. (1997). New paradigms in formulating mycoinsecticides. *Pesticide formulations and application systems*, 1328, 99.
- Kamp, A. M., & Bidochka, M. J. (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied microbiology*, 35(1), 74-77.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., & Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: do they have a future?. *Biological control*, 21(3), 230-248.
- Lohse, R., Jakobs-Schönwandt, D., & Patel, A. V. (2014). Screening of liquid media and fermentation of an endophytic *Beauveria bassiana* strain in a bioreactor. *AMB Express*, 4, 1-11.
- 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.
- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-26.
- Mascarin, G. M., Alves, S. B., & Lopes, R. B. (2010). Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 753-761.

- Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Behle, R. W., Kobori, N. N., & Júnior, Í. D. (2016). Improved shelf life of dried *Beauveria bassiana* blastospores using convective drying and active packaging processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 8359-8370.
- Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Kobori, N. N., Behle, R. W., & Júnior, Í. D. (2015). Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of invertebrate pathology*, 127, 11-20.
- Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Kobori, N. N., Behle, R. W., Dunlap, C. A., & Delalibera Júnior, Í. (2015). Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 6653-6665.
- Moore, D., Bridge, P. D., Higgins, P. M., Bateman, R. P., & Prior, C. (1993). Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Annals of Applied Biology*, 122(3), 605-616.
- 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., 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. (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.
- Pham, T. A., Kim, J. J., Mm, S. G., & Kim, K. (2009). Production of blastospore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture. *Mycobiology*, 37(3), 218-224.
- Prior, C., Jollands, P., & Le Patourel, G. (1988). Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(1), 66-72.
- 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.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055-1073.
- Roberts, W. K., & Selitrennikoff, C. P. (1988). Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Microbiology*, 134(1), 169-176.
- Rombach, M. C. (1989). Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina. Hyphomycetes) sympoduloconidia in submerged culture.
- Samšináková, A. (1966). Growth and sporulation of submersed cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. *Journal of Invertebrate Pathology*, 8(3), 395-400.
- Samson, R. A., Evans, H. C., & Latge, J. P. (1988). Atlas of entomopathogenic fungi Springer. Verlag., Berlin, Heidelberg, New York, 1-187.
- Santa, H. S. D., Santa, O. R. D., Brand, D., Vandenberghe, L. P. D. S., & Soccol, C. R. (2005). Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 51-60.
- 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.
- Soni, V., Khosla, A., Singh, P., Nguyen, V. H., Van Le, Q., Selvasembian, R., ... & Raizada, P. (2022). Current perspective in metal oxide based photocatalysts for virus disinfection: A review. *Journal of Environmental Management*, 308, 114617.
- Tanada Y, Kaya HK (1993). *Insect Pathology*. Academic Press, Inc. San Diego pp. 322-358.
- 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, Paraná, Brazil.
- 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., van Kan, J. A., Schoustra, S. E., Takken, W., Zwaan, B. J., & Koenraadt, C. J. (2014). Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. *Malaria journal*, 13, 1-8.
- Vega, F. E., Jackson, M. A., Mercadier, G., & Poprawski, T. J. (2003). The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 363-368.
- Vidal, C., Fargues, J., Lacey, L. A., & Jackson, M. A. (1998). Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycopathologia*, 143, 33-46.
- Vilcinskas, A., Matha, V., & Götz, P. (1997). Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmotocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 43(12), 1149-1159.
- 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.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and tech*