

**ENTOMOPATOJEN FUNGUSLARIN SENTEZLEDİĞİ  
BEAUVERİSİNİN BAZI TARIM ZARARLILARI  
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF  
BEAUVERICIN SYNTHESIZED BY  
ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ON SOME HARMFUL  
INSECT PESTS**

**MELTEM ULUSOY**

**PROF. DR NEVİN KESKİN**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

Sevgili Ailem'e

## ÖZET

# ENTOMOPATOJEN FUNGUSLARIN SENTEZLEDİĞİ BEAVERISININ BAZI TARIM ZARARLILARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI I

Meltem ULUSOY

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nevin KESKİN

Mayıs 2022, 154 sayfa

Bu çalışmada fungal kaynaklardan beauverisin saflaştırılmasında moleküler baskılanmış kriyojel kolon kullanılmıştır.

Çalışmanın amacı; 3 farklı *Beauveria bassiana* (Lül1, KVL 03129, Ank12) ve 3 farklı *Paecilomyces fumosoroseus* (Bey9, 0614, Bb12) suşlarının sentezlediği BEA'yı moleküler baskılanmış kriyojel kolon ile saflaştırmak ve farklı uygulama yöntemleri ve değişik konsantrasyonlar (0.001 M, 0.0001 M, 0.00001 M ve 0.000001 M BEA) kullanarak *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor* ve *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki entomopatojen etkinin test edilmesidir.

Çalışmada, 3 farklı *B. bassiana* ve 3 farklı *P. fumosoroseus* suşlarından sentezlenen BEA, moleküler baskılanmış kriyojel kolon kullanılarak saflaştırılmıştır. Beauverisin-baskılanmış kriyojel kolondaki maksimum BEA adsorpsiyonunun, pH 6.5 MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] tamponunda, 25°C'de 1 mL/dk akış hızında gerçekleştiği bulunmuştur.

Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA enjeksiyon ve püskürtme yöntemleri ile *G. mellonella* ve *T. molitor* larvaları üzerinde denenmiştir. *G. mellonella* larvaları üzerinde enjeksiyon ve püskürtme yöntemi ile uygulanan Ank12-BEA; böcek popülasyonunun yarısını sırasıyla, 2.370 günde ve 2.819 günde öldürmüştür. *T. molitor* larvaları üzerinde enjeksiyon ve püskürtme yöntemleri kullanılarak uygulanan KVL 03129-BEA böcek popülasyonunun yarısını sırasıyla 1.904 günde ve 4.918 günde öldürmüştür. Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA enjeksiyon, püskürtme ve yaprak daldırma yöntemleri ile *L. decemlineata* larvaları üzerinde denenmiştir. *L. decemlineata* larvaları üzerinde enjeksiyon, püskürtme ve yaprak daldırma yöntemleri kullanılarak uygulanan 0614-BEA böcek popülasyonunun yarısını sırasıyla 8.053 gün, 9.160 gün ve 10.831 günde öldüğü bulunmuştur.

Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA, tüm uygulama yöntemleri ve tüm BEA konsantrasyonlarında zararlı böcekler üzerinde başarılı bulunmuştur. LT<sub>50</sub> değerlerine göre en yüksek BEA konsantrasyonunun en etkili olduğu bulunmuştur. 5., 8. ve 10. günlerdeki öldürücü doz değerlerine göre, BEA'ya böceklerin maruz kalma süresi arttıkça, böcek popülasyonunun yarısını öldürmek için gereken BEA dozu azaldığı bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Biyolojik mücadele, Beauverisin, Moleküler baskılama, *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, *Leptinotarsa decemlineata*

## ABSTRACT

# THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF BEAUVERICIN SYNTHESIZED BY ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ON SOME HARMFUL INSECT PESTS

Meltem ULUSOY

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nevin KESKİN

May 2022, 154 pages

In this study, a molecularly imprinted cryogel column was used to purify beauvericin from fungal sources.

The aim of this study was to purify beauvericin synthesized from 3 different *B. bassiana* (Lül1, KVL03129, Ank12) and 3 different *P. fumosoroseus* (Bey9, 0614, Bb12) strains with a molecularly imprinted cryogel column and to test the entomopathogenic diverse effect of beauvericin on the larvae of *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor* and *Leptinotarsa decemlineata* with different application methods at different concentrations (0.001M, 0.0001M, 0.0000 M, and 0.000001 M BEA) of beauvericin.

In the study, beauvericin synthesized from 3 different *B. bassiana* and 3 different *P. fumosoroseus* strains were purified using a molecularly imprinted cryogel column. It was found that the maximum adsorption of BEA from the beauvericin-

imprinted cryogel column occurred in MES buffer pH 6.5, at 25°C, at a flow rate of 1 mL/min.

Beauvericin purified from six different fungal sources and commercial BEA were tested on *G. mellonella* and *T. molitor* larvae by injection and spraying methods. It was found that Ank12-BEA applied by injection and spraying methods on *G. mellonella* larvae killed half of the insect population in 2.370 days, and 2.819 days, respectively. KVL 03129-BEA applied on *T. molitor* larvae using injection method and spraying methods killed half of the insect population in 1.904 days, and 4.918 days, respectively. Beauvericin purified from six different fungal sources and commercial BEA were tested on *L. decemlineata* larvae by injection, spraying, and leaf dipping methods. It was found that 0614-BEA applied by injection, spraying and leaf dipping methods on *L. decemlineata* larvae killed half of the insect population in 8.053 days, 9.160 days, and 10.831 days, respectively. Beauvericin purified from six different fungal sources was found to be successful on insects at all application methods and all beauvericin concentrations. According to  $LT_{50}$  values, the highest BEA concentration was found to be the most effective. Based on the lethal dose values on the 5th, 8th, and 10th days, it was found that as the exposure time of insects to BEA increased, the dose of BEA needed to kill half the insect population decreased.

**Keywords:** Biological control, Beauvericin, Molecular imprinting, *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, *Leptinotarsa decemlineata*

## TEŞEKKÜR

Lisans ve lisans üstü eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, çalışmalarım için gerekli imkanı sağlayan, karşılaştığım sorunların çözümünde desteğini aldığım, sevgi ve ilgisini her zaman hissettiğim sevgili danışman hocam, Prof. Dr. Nevin KESKİN' e,

Doktora çalışmamda Kimya Bölümü Laboratuvarını kullanmama olanak sağlayan, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bana yardımcı olan sevgili hocam Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye,

Tez çalışmamı başından itibaren, bilgi ve tecrübesiyle destekleyen, katkıda bulunan yapıcı önerilerini esirgemeyen, çalışmamı kolaylaştıran sevgili hocam Prof. Dr. İsmail KARACA'ya,

Tezimin kimya ile ilgili kısmında karşılaştığım her sorunun çözülmesinde, her zaman yardım ve desteğini aldığım motivasyonumu artıran sevgili hocam Dr. Sevgi Aslıyüce'ye,

Bu yolla birlikte ilerlediğim, beraber gülüp eğlendiğim, zorluklar karşısında birbirimizi destekleyerek aştığımız, birlikte olumlu ve olumsuz birçok şeyi tecrübe edip başardığımız ve her zaman yanımda olan canım arkadaşım İrem Çelebier'e,

Bu zor süreçte birbirimizi motive ettiğimiz, desteğini esirgemedi bana her daim yardımcı olan sevgili Semiha Selda Yıldız'a

Bu uzun ve yorucu süreçte her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Elifnur Birtürk'e, Özgecan Erdeme'e ve Sevgi Yorulmaz'a, Zeynep İğde'ye

Özel çalışma öğrencilerimizden Müge Özdemir'e ve Hazal Yılmaz'a

Hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, attığım her adımda yanımda olan ve beni tüm kalpleri ile destekleyen canım aileme; Vuslat Bektaş'a, Müşerref Bektaş'a, Atilla Bektaş'a ve Ilgın Bektaş'a

FHD-2019-17721 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Biyolojik Mücadele .....	5
2.1.1. Entomopatojen funguslar.....	8
2.1.1.1. <i>Beauveria bassiana</i> .....	10
2.1.1.2. <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> (syn. <i>Isaria fumosorosea</i> ).....	12
2.1.1.3. Entomopatojen fungus enfeksiyonu.....	14
2.1.2. Sekonder metabolitler.....	17
2.1.2.1. Beauverisin (BEA).....	18
2.2. Moleküler baskılama .....	21
2.2.1. Temel birleşenler .....	23
2.2.1.1. Kalıp molekül.....	23
2.2.1.2. Fonsiyonel monomer.....	24
2.2.1.3. Çapraz bağlayıcı.....	24
2.2.1.4. Başlatıcılar.....	24
2.2.1.5. Çözücüler.....	25
2.2.2. Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulanma alanları .....	25
2.3. Kriyojeller .....	26



2.3.1. Kriyojellerin uygulanma alanları .....	28
2.4. Moleküler baskılanmış kriyojel.....	29
2.4.1. Moleküler baskılanmış kriyojel karakterizasyonu .....	30
2.5. Deneyde kullanılan tarım zararlılarının genel özellikleri.....	30
2.5.1. <i>Galleria mellonella</i> .....	30
2.5.2. <i>Tenebrio molitor</i> .....	35
2.5.3. <i>Leptinotarsa decemlineata</i> .....	37
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	45
3.1. Deneyde kullanılan böceklerin laboratuvarında üretilmesi.....	45
3.1.1. <i>Galleria mellonella</i> üretimi .....	45
3.1.2. <i>Tenebrio molitor</i> üretimi .....	45
3.1.3. <i>Leptinotarsa decemlineata</i> üretimi .....	45
3.2. Kullanılan kimyasallar ve besiyerleri .....	45
3.2.1. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) .....	45
3.2.2. Sabouraud Dekstroz Agar + Yeast Extract (SDAY) .....	46
3.2.3. Tween 80 .....	46
3.2.4. Adamek's sıvı besiyeri .....	46
3.2.5. <i>Galleria mellonella</i> besiyeri .....	46
3.2.6. Moleküler baskılanmış ve baskılanmamış kriyojel kolon sentezinde kullanılan kimyasallar .....	46
3.3. Beauverisin baskılanmış ve beauverisin baskılanmamış kriyojel kolon sentezlenmesi.....	47
3.4. Kriyojel kolon karakterizasyonu .....	48
3.4.1. FTIR .....	48
3.4.2. Yüzey alanı ölçümü.....	48
3.4.3. Yüzey morfolojisi .....	49
3.4.4. Denge şişme deneyi.....	49
3.5. Adsorpsiyon çalışmaları.....	50
3.5.1. pH .....	50
3.5.2. İyon şiddeti.....	51
3.5.3. Sıcaklık .....	51
3.5.4. Akış hızı .....	51

3.5.5. Başlangıç derişimi .....	51
3.6. Adsorpsiyon izotermi .....	52
3.7. Seçicilik deneyi .....	52
3.8. Tekrar kullanılabilirlik.....	53
3.9. Beauverisin üretimi ve saflaştırılması.....	54
3.9.1. Entomopatojen fungus üretimi.....	54
3.9.2. Fungus spor solüsyonunun hazırlanması .....	54
3.9.3. Beauverisin üretimi .....	55
3.9.4. Beauverisinin kısmi saflaştırılması.....	55
3.9.5. Fungal kaynaklardan BEA'nın moleküler baskılanmış kriojel kolondan saflaştırılması.....	56
3.10. Beauverisinin böcekler üzerinde denenmesi.....	57
3.10.1. Beauverisinin <i>Galleria mellonella</i> larvaları üzerindeki etkisinin incelenmesi.....	57
3.10.1.1. Beauverisinin farklı uygulama yöntemleri ile <i>Galleria mellonella</i> larvalarına uygulanması.....	57
3.10.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki beauverisinin <i>Galleria mellonella</i> larvalarına uygulanması.....	58
3.10.2. Beauverisinin <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerindeki etkisinin incelenmesi.....	58
3.10.2.1. Beauverisinin farklı uygulama yöntemleri ile <i>Tenebrio molitor</i> larvalarına uygulanması.....	58
3.10.2.2. Farklı konsantrasyonlardaki beauverisinin <i>Tenebrio molitor</i> larvalarına uygulanması.....	59
3.10.3. Beauverisinin <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerindeki etkisinin incelenmesi.....	59
3.10.3.1. Beauverisinin farklı uygulama yöntemleri ile <i>Leptinotarsa</i> <i>decemlineata</i> larvalarına uygulanması.....	59
3.10.3.2. Farklı konsantrasyonlardaki beauverisinin <i>Leptinotarsa</i> <i>decemlineata</i> larvalarına uygulanması.....	60
3.11. İstatistiksel Çalışmalar .....	61

4. SONUÇLAR .....	62
4.1. Beauverisin baskılanmış ve beauverisin baskılanmamış kriyojel kolon sentezlenmesi.....	62
4.1.1. Kriyojel kolon karakterizasyonu.....	62
4.1.1.1. FTIR.....	62
4.1.1.2. Yüzey alanı ölçümü.....	63
4.1.1.3. Yüzey morfolojisi.....	63
4.1.1.4. Denge şişme deneyi.....	64
4.1.2. Adsorpsiyon çalışmaları .....	65
4.1.2.1. pH.....	65
4.1.2.2. İyon şiddeti.....	66
4.1.2.3. Sıcaklık.....	67
4.1.2.4. Akış hızı.....	68
4.1.2.5. Başlangıç derişimi.....	69
4.1.3. Adsorpsiyon izotermi.....	70
4.1.4. Seçicilik deneyi .....	72
4.1.5. Tekrar kullanılabilirlik.....	73
4.2. Beauverisin üretimi ve saflaştırılması .....	74
4.2.1. Fungus spor solüsyonları .....	74
4.2.2. Fungal kaynaktan beauverisin saflaştırılması .....	75
4.3. Saflaştırılan beauverisinin böcekler üzerinde denenmesi .....	77
4.3.1. Beauverisinin <i>Galleria mellonella</i> larvaları üzerindeki etkisinin incelenmesi .....	78
4.3.1.1. Beauverisinin farklı uygulama yöntemleri ile <i>Galleria mellonella</i> larvalarına uygulanması.....	77
4.3.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki beauverisinin <i>Galleria mellonella</i> larvalarına uygulanması.....	83
4.3.2. Beauverisinin <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerindeki etkisinin incelenmesi .....	87

4.3.2.1. Beauverisinin farklı uygulama yöntemleri ile <i>Tenebrio molitor</i> larvalarına uygulanması.....	87
4.3.2.2. Farklı konsantrasyonlardaki beauverisinin <i>Tenebrio molitor</i> larvalarına uygulanması.....	93
4.3.3. Beauverisinin <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerindeki etkisinin incelenmesi.....	101
4.3.3.1. Beauverisinin farklı uygulama yöntemleri ile <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvalarına uygulanması.....	101
4.3.3.2. Farklı konsantrasyonlardaki beauverisinin <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvalarına uygulanması.....	109
5. TARTIŞMA .....	116
6. KAYNAKLAR .....	130
EKLER.....	151
EK 1 - Tezden Türetilmiş Yayınlar .....	151
EK 2 - Tezden Türetilmiş Bildiriler.....	152
EK 6 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
ÖZGEÇMİŞ .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Entomopatojen fungus enfeksiyon şeması.....	16
<b>Şekil 2.2.</b> Beauverisin moleküler yapısı.....	19
<b>Şekil 2.3.</b> Moleküler baskılama.....	22
<b>Şekil 2.4.</b> Kriyojel şeması .....	27
<b>Şekil 2.5.</b> Büyük balmumu güverisinin yaşam döngüsü (Fotoğraf: Meltem ULUSOY 2015).....	32
<b>Şekil 2.6.</b> Sarı un kurdunun yaşam döngüsü (Fotoğraflar: Meltem ULUSOY, 2015). ....	36
<b>Şekil 2.7.</b> Colorado patates böceğinin yaşam döngüsü (Fotoğraflar: Meltem ULUSOY, 2019). ....	39
<b>Şekil 2.8.</b> Colorado patates böceğinin, patates bitkisine verdiği hasar (Fotoğraf: Meltem ULUSOY, 2021).....	41
<b>Şekil 3.1.</b> Improved Neubauer lamında bulunan kareler ve sayım yapılan alanlar .....	54
<b>Şekil 4.1.</b> Sentezlenen kriyojel kolonlar .....	62
<b>Şekil 4.2.</b> Poli(HEMA), MATrp ait FTIR spektrum (A) ve MIP-BEA ait FTIR spektrum (B).....	63
<b>Şekil 4.3.</b> Beauverisin baskılanmış (MIP-BEA) poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin SEM görüntüleri (A), Beauverisin baskılanmamış (NIP-BEA) poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin SEM görüntüleri (B).....	64
<b>Şekil 4.4.</b> Poli(HEMA), BEA baskılanmış poli(HEMA-MATrp) (MIP-BEA) ve BEA baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) (NIP-BEA) kriyojellerin denge şişme oranları .....	65
<b>Şekil 4.5.</b> BEA adsorpsiyonuna pH etkisi (BEA: 0.5 mg/mL; T: 25°C; zaman: 120 dk).....	66
<b>Şekil 4.6.</b> BEA adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi (BEA derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 6.5; T: 25°C; zaman: 120 dk).....	67
<b>Şekil 4.7.</b> BEA adsorpsiyon kapasitesine sıcaklığın etkisi (BEA derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 6.5; zaman: 120 dk.).....	68
<b>Şekil 4.8.</b> Adsorpsiyon kapasitesine akış hızının etkisi. (BEA derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 6.5; T: 25°C; zaman: 120 dk). ....	69
<b>Şekil 4.9.</b> BEA konsantrasyonunun adsorpsiyon kapasitesine etkisi (pH: 6.5; T: 25°C; zaman: 120 dk).....	70
<b>Şekil 4.10.</b> Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	71
<b>Şekil 4.11.</b> Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	71
<b>Şekil 4.12.</b> MIP-BEA ve NIP-BEA kriyojel kolonlar ile seçicilik deneyi (Bassiatin: 1.0 mg/mL; akış hızı: 1.0 mL/dak; pH: 6.5; T:25°C; zaman: 120 dk).....	72
<b>Şekil 4.13.</b> BEA-baskılanmış kriyojel kolonun tekrar kullanılabilirliği (BEA: 0.5 mg/mL; pH: 6.5; T: 25°C, desorpsiyon ajanı: 0.1 M NaOH ve 0.1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ). ....	74
<b>Şekil 4.14.</b> Üç farklı <i>Beauveria bassiana</i> suşundan (Lül1, Ank12, KVL 03129) ve üç farklı <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> suşundan (Bey9, 0614, Bb12) saflaştırılan beauverisinin yüksek çözünürlüklü kütle spektrofotometre analizi.....	76

<b>Şekil 4.15.</b> Beauverisin ile inoküle edilen <i>Galleria mellonella</i> larvaları (Fotoğraf: Meltem ULUSOY, 2019) .....	78
<b>Şekil 4. 16.</b> <i>Galleria mellonella</i> larvaları üzerine enjeksiyon tekniği ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisin, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı. ....	80
<b>Şekil 4.17.</b> <i>Galleria mellonella</i> larvaları üzerine püskürtme tekniği ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisin, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı. ....	81
<b>Şekil 4.18.</b> <i>Galleria mellonella</i> larvaları üzerinde test edilen 6 farklı fungusdan elde edilen beauverisin ve ticari BEA'nın dört farklı konsantrasyonunun BEA'nın 5., 8., 10., 15. ve 27. günlere göre ölüm oranı.....	85
<b>Şekil 4.19.</b> Beauverisin ile inoküle edilen <i>Tenebrio molitor</i> larvaları (Fotoğraf: Meltem ULUSOY, 2019).....	88
<b>Şekil 4.20.</b> <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerine enjeksiyon tekniği ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisin, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı. ....	91
<b>Şekil 4.21.</b> <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerine püskürtme tekniği ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı. ....	91
<b>Şekil 4.22.</b> <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerinde test edilen 6 farklı fungusdan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın dört farklı konsantrasyonunun BEA'nın 5., 8., 10., 15. ve 28. günlere göre ölüm oranı. ....	96
<b>Şekil 4.23.</b> Beauverisin ile inoküle edilen <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları (Fotoğraf: Meltem ULUSOY, 2019).....	101
<b>Şekil 4.24.</b> <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerine enjeksiyon tekniği ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı. ....	105
<b>Şekil 4.25.</b> <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerine püskürtme ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı. ....	105
<b>Şekil 4.26.</b> <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerine püskürtme ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı. ....	106
<b>Şekil 4.27.</b> <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerinde test edilen 6 farklı fungusdan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın dört farklı konsantrasyonunun BEA'nın 5., 8., 10., 15. ve 30. günlere göre ölüm oranı. ....	111

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> <i>Beauveria bassiana</i> ve <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> sentezlediği bazı sekonder metabolitler .....	17
<b>Çizelge 4.1.</b> BEA baskılı kriyojel kolonu için Langmuir ve Freundlich izotermi .....	72
<b>Çizelge 4.2.</b> Sekonder metabolitlerin dağılıma (Kd), seçicilik (k) ve bağıl seçicilik katsayı (k') değerleri .....	73
<b>Çizelge 4.3.</b> <i>Beauveria bassiana</i> ve <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> suşlarının spor konsantrasyonları .....	75
<b>Çizelge 4.4.</b> <i>Beauveria bassiana</i> ve <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> suşları tarafından sentezlenen beauverisin miktarları.....	77
<b>Çizelge 4.5.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan beauverisin ve ticari beauverisinin enjeksiyon yöntemi ile <i>Galleria mellonella</i> larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ ). .....	81
<b>Çizelge 4.6.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan beauverisin ve ticari beauverisinin püskürtme yöntemi ile <i>Galleria mellonella</i> larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ ).....	82
<b>Çizelge 4.7.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın <i>Galleria mellonella</i> larvalarındaki $LT_{50}$ değerleri .....	82
<b>Çizelge 4.8.</b> Enjeksiyon ve püskürtme yöntemleriyle uygulanan altı farklı kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın <i>Galleria mellonella</i> larvalarındaki $LT_{50}$ değerleri.....	83
<b>Çizelge 4.9.</b> Altı farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisin ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonunun uygulandığı <i>Galleria mellonella</i> larvalarının $LT_{50}$ değerleri .....	86
<b>Çizelge 4.10.</b> <i>Galleria mellonella</i> larvaları üzerinde denenen altı farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisinin ve ticari BEA'nın 5., 8. ve 10. günlerdeki $LC_{50}$ değerleri.....	86
<b>Çizelge 4.11.</b> Dört farklı BEA konsantrasyonunun <i>Galleria mellonella</i> larvalarındaki $LT_{50}$ değerleri .....	87
<b>Çizelge 4.12.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın enjeksiyon yöntemi ile <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ ).....	92
<b>Çizelge 4.13.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın püskürtme yöntemi ile <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ ).....	92
<b>Çizelge 4.14.</b> . Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın <i>Tenebrio molitor</i> larvalarındaki $LT_{50}$ değerleri.....	93
<b>Çizelge 4.15.</b> Enjeksiyon ve püskürtme yöntemleriyle uygulanan altı farklı kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın <i>Tenebrio molitor</i> larvalarındaki $LT_{50}$ değerleri. ....	93

<b>Çizelge 4.16.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.000001M konsantrasyonunun <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ ).....	97
<b>Çizelge 4.17.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.00001M konsantrasyonunun <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ ).....	97
<b>Çizelge 4.18.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.0001M konsantrasyonunun <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ ).....	98
<b>Çizelge 4.19.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.001M konsantrasyonunun <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ ).....	98
<b>Çizelge 4.20.</b> Altı farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisin ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonunun uygulandığı <i>Tenebrio molitor</i> larvalarının LT <sub>50</sub> değerleri .....	99
<b>Çizelge 4.21.</b> <i>Tenebrio molitor</i> larvaları üzerinde denenen altı farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisinin ve ticari BEA'nın 5., 8. ve 10. günlerdeki LC <sub>50</sub> değerleri .....	100
<b>Çizelge 4.22.</b> Dört farklı BEA konsantrasyonunun <i>Tenebrio molitor</i> larvalarındaki LT <sub>50</sub> değerleri .....	100
<b>Çizelge 4.23.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın enjeksiyon yöntemi ile <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ ). .....	106
<b>Çizelge 4.24.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın püskürtme yöntemi ile <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ ). .....	107
<b>Çizelge 4.25.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın yaprak daldırma yöntemi ile <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ ). .....	107
<b>Çizelge 4.26.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvalarındaki LT <sub>50</sub> değerleri .....	108
<b>Çizelge 4.27.</b> Enjeksiyon ve püskürtme yöntemleriyle uygulanan altı farklı kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvalarındaki LT <sub>50</sub> değerleri .....	108
<b>Çizelge 4.28.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.000001M konsantrasyonunun <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ ). .....	112
<b>Çizelge 4.29.</b> Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.00001M konsantrasyonunun <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ ). .....	112



- Çizelge 4.30.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.0001M konsantrasyonunun *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ). ..... 113
- Çizelge 4.31.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.001M konsantrasyonunun *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ). ..... 113
- Çizelge 4.32.** Altı farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisin ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonunun uygulandığı *Leptinotarsa decemlineata* larvalarının  $LT_{50}$  değerleri.. 114
- Çizelge 4.33.** *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerinde denenen altı farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisinin ve ticari BEA'nın 5., 8. ve 10. günlerdeki  $LC_{50}$  değerleri. .... 115
- Çizelge 4.34.** Dört farklı BEA konsantrasyonunun *L. decemlineata* larvalarındaki  $LT_{50}$  değerleri. .... 115

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
atm	Atmosfer
cm	Santimetre
cm <sup>2</sup>	Santimetre Kare
M	Molar
mg	Miligram
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar

### Kısaltmalar

APS	Amonyum Persülfat
ATR	Zayıflatılmış Toplam Yansıma
BEA	Beauverisin
BET	Brunauer-Emmet-Teller yöntemi
FTIR	Fourier dönüşümlü infrared spektrofotometre
HEMA	2-Hidroksietil metakrilat
kDa	Kilodalton
Kon/mL	Konidia/mL
LC <sub>50</sub>	Lethal konsantrasyon

LT <sub>50</sub>	Letal time
MATrp	N-metakriloil-(L)-triptofan
MBAAM	N,N-metilen bisakrilamid
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
NaOH	Sodyum hidroksit
NIP	Moleküler baskılanmamış polimer
Poli(HEMA)	Poli(2-hidroksietil etakrilat)
ppm	Parts per Million
rpm	Dakikadaki Dönüş Hızı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metil-etilendiamin
UV	Ultraviyole



# 1. GİRİŞ

Artan dünya nüfusuyla birlikte besin ihtiyacının da giderek artması; tarımda verimliliğin artırılmasını, tarlada, depoda ve işleme sırasındaki ürün kayıplarının azaltılmasını ve tarım zararlılarıyla mücadelede kullanılan kimyasal ilaçların üründe bıraktığı kalıntı nedeniyle, sağlık ve çevreye verdiği zararın önlenmesini gerektirmektedir. 2050 yılında yaklaşık 9 milyar olacağı öngörülen dünya nüfusunun, yeterli miktarda besine ulaşması için tarımsal üretimde verimliliğin en az %40 oranında artırılması gerekmektedir [1,2]. Tarım zararlıları, bitkinin toprak altı ve toprak üstü kısımları ile beslenerek, tarım ürünlerine önemli zararlar verebilmekte, önemli miktarda ürün kayıplarına neden olabilmektedirler. Ayrıca bazı depo zararlısı böcekler, depolanan tarım ürünlerini besin olarak kullanmakta, gömlek kalıntılarını, yumurtalarını ve pisliklerini bırakarak üründe bozulmaya ve ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Ayrıca bazı bitki hastalıkları da zararlı böcekler tarafından bulaşmaktadır [3]. Patates Çizgi virüsü (Potato Y potyvirus), Patates yaprak kıvrıma virüsü, (Potato leafroll luteovirus) yaprak bitlerinden, Patates X virüsü ise patates böcekleri tarafından bitkiye bulaşabilmektedir [4]. Her yıl tarım zararlısı böcekler, tarım ürünlerinde %40 oranında kayba neden olmaktadır. Dünyada ve ülkemizde tarım zararlıları ile mücadelede en önemli payı kimyasal pestisitler almaktadır [2]. Tarım zararlıları ile mücadelede kimyasal pestisitler 50 yıldan fazladır tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal pestisitlerin bilinçsizce uzun süreli kullanımı ile doğada ekolojik denge bozulmakta, zararlı böceklerde direnç gelişmekte, üründe kalıntı sorunu oluşmakta ve ortamdaki diğer faydalı organizmalar da olumsuz şekilde etkilenmektedir. Bu nedenle ekolojik dengeyi koruyan biyolojik mücadele ajanları, tarımda alternatif mücadele yöntemlerinden biri olarak çok önem kazanmıştır. Biyolojik mücadele; farklı organizmalar kullanılarak zararlı bir organizmanın popülasyon yoğunluğunun veya zararlı etkisinin olabildiğince aza indirilmesi için yapılan mücadele yöntemidir [5]. Böceklerin de diğer canlı organizmalar gibi doğada düşmanları vardır. Böceklerde doğal yollarla enfeksiyon oluşturabilen bakteri, virüs ve funguslara entomopatojen denir [6]. Entomopatojen funguslar; biyolojik mücadelede geniş konak dağılımına sahip olmaları ve böcek tarafından yenilmeseler de enfeksiyona sebep olabilmeleri nedeniyle diğer biyolojik

mücadele ajanlarından daha avantajlıdır [1] örneğin; bazı fungus türleri böcekleri enfekte ederek bakteri ve virüslerin neden olduğundan daha şiddetli epizootiklere neden olabilmektedir [7]. En önemli entomopatojen funguslar Ascomycetes filumuna bağlı; *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* ve *Paecilomyces* cinslerine ait fungus türleridir [8].

Entomopatojen fungus olan *Beauveria bassiana* ve *Paecilomyces fumosoroseus* toprak florasının doğal üyesi olarak dünyada yaygın bir dağılışa sahiptir. *Beauveria bassiana* dünyanın hemen her tarafında ılıman ve tropikal bölgelerde, enfekte olmuş böceklerin üzerinde bulunabilmektedir. *Beauveria bassiana* yaklaşık 700'den fazla böcek türünü enfekte edebilmekte ve beyaz muskarin hastalığına yol açmaktadır [9]. Dünyada yaygın olarak bulunan *Paecilomyces fumosoroseus*, özellikle Lepidoptera takımına ait böceklerden ve ayrıca, bitki, hava ve topraktan izole edilebilmektedir [10]. Bu çalışmada *Isaria fumosorosea* sinonimi olan *Paecilomyces fumosoroseus* kullanılmıştır [11]. *Beauveria bassiana* ve *Paecilomyces fumosoroseus*, enfeksiyon sırasında, sentezledikleri BEA, bassianolides, ennalın, oosperin gibi sekonder metabolitler ile böceğin bağışıklık sistemini alt ederek ölümüne neden olmaktadır [12]. BEA anti-tümör, anti-fungal, anti-bakteriyel ve insektisidal etkilere sahiptir. Beauverisinin inseksidal özelliği ilk olarak *Artemia salina* (tuzlu su karidesi) üzerinde denenmiş ve etkili olduğu saptanmıştır [13].

Fungal kaynaktan BEA'nın, saflaştırılmasında moleküler baskılama teknolojisi (MIT), kullanılmıştır [14]. Moleküler baskılanmış kriyojel kolonların sentezlenmesi üç aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşamada, istenilen molekül ve onunla etkileşime girebilecek olan fonksiyonel monomer arasında ön-kompleks oluşturulur. İkinci aşamada, uygun bir çapraz bağlayıcının yeterli miktardaki varlığında, üç boyutlu bir polimer ağı oluşturulur. Üçüncü aşamada ise istenilen molekül, uygun desorpsiyon ajanı ile, polimer matriksten uzaklaştırılır. Bu teknik ile istenilen moleküle özgül boyut, şekil ve kimyasal işlevler açısından tamamlayıcı özgün tanıma bölgeleri kazandırılır [15]. Moleküler baskılanmış

polimerlere (MIPs), baskılama işleminde kullanılan istenilen molekül için, yüksek afinite ve seçiciliğe sahip olma önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Arıcılıkta verimi azaltan zararlılardan *Galleria mellonella* (Büyük bal mumu güvesi) önemli bir yere sahiptir. *G. mellonella* kovanda, depolanan ve işlenmiş peteklerde zarar sebep olarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *G. mellonella* larvaları; polen, balmumu, bal ve dökülmüş bal arısı derileri ile beslenmekte ve petek taraklarında tüneller oluşturmaktadır. Kovanda büyük ölçekte *G. mellonella* istilası olması, genellikle arı kolonisi kayıplarına yol açmaktadır. Büyük balmumu güvesinin erginleri ve larvaları ayrıca patojen vektör taşıyabilmektedir [16,17].

Depo zararlılarından dolayı tahıl ürünlerinde her yıl, %10-30 oranında kayıp meydana gelmektedir [18]. Depo zararlıları, tahıllarla beslenerek doğrudan ya da bıraktıkları vücut kalıntıları nedeniyle dolaylı olarak tahıllara zarar vermektedir. Depo zararlıları bulaştıkları ürünü tüketerek, ürünün tohumluk özelliğinde düşmeye, üründe ağırlık kaybına, kalite ve besin değerlerinin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca zararlıların ürüne bulaştırdığı, pislikler, vücut kalıntıları ve salgıladıkları ağ ve benzeri yapılar da ürün kalitesinde bozulmaya ve kayıplara yol açmaktadır. Un, bir besin maddesi olması yanı sıra gıda sanayisinde önemli bir hammadde ve gıda katkı maddesidir. Unun depolanması sırasında *Tenebrio molitor* (sarı un kurdu) önemli kalite kayıplarına neden olmaktadır. *T. molitor*, ürüne bulaştığında, ürünle beslenerek fire ve ağırlık kaybına, ayrıca bıraktığı gömlek kalıntısı, pislikleri nedeniyle ciddi boyutta kalite kayıplarına yol açabilmektedir [19].

Patates dünya ülkelerinin %79'unda yetiştirilen, üretim miktarı buğday, mısır ve pirinçten sonra 4. sırada olan önemli bir tarımsal üründür. Patates, pirinç, buğday ve mısırla birlikte dünya gıda enerji ihtiyacının %50'sinden fazlasını karşılamaktadır. Patates gıda olarak doğrudan tüketildiği gibi, gıda sanayiinde dondurulmuş olarak, cips, püre, granül ve toz formlarda da işlenerek

pazarlanmaktadır. Ayrıca, yan ürün olarak hayvan yeminde, alkol ve nişasta yapımında ve gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Patates üretiminde ciddi ürün kayıplarına neden olan zararlılardan biri *Leptinotarsa decemlineata* 'dır. Eğer *L. decemlineata* ile mücadele edilmezse, patates üretiminin yaklaşık %75'i bu böcekten zarar görebilmektedir [20]. Colorado patates böceği ile mücadele edildiği halde bile, yer yıl patates üretiminde yaklaşık %40 oranında kayıp meydana geldiği bildirilmiştir [21,22].

Bu çalışmada; topraktan daha önceden izole edilen entomopatojen funguslardan *Paecilomyces fumosoroseus* (Bey9, 0614, Bb12) suşları, *Beauveria bassiana* (Lül1, Ank12) suşları [23–25] ve standart *B. bassiana* suşu olan KVL 03129 (ARSEF 8032) kullanılmıştır. *P. fumosoroseus* ve *B. bassiana* suşlarının sentezlediği BEA'yı saflaştırmak için BEA baskılanmış kriyojel kolon sentezlenmiştir. Saflaştırılan BEA'nın *G. mellonella*, *T. molitor* ve *L. decemlineata* tarım zararlıları üzerindeki etkisi araştırılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Biyolojik Mücadele

Zararlı organizmanın popülasyon yoğunluğu ve etkisini azaltmak için canlı organizmaların kullanıldığı mücadele yöntemidir [26]. Biyolojik mücadelenin tarihi oldukça eskilere gitmektedir. İlk başlarda zararlı böcekler üzerinde etkili olan bitkiler kullanılmıştır. Daha sonra, zararlı böceklerin kuş, yılan ve fareler tarafından yenildiği fark edilince biyolojik mücadele farklı bir boyut kazandırmıştır. Yaklaşık 1700 yıl önce Çin'de turuncgillere zarar veren böceklerle karşı karınca kullanılmıştır [27]. 1734 yılında Rene Reamur, afid yiyen sinek yumurtalarını seralara bırakarak, bitki için zararlı olan afidlere karşı biyolojik mücadele yapmıştır. Agostino Bassi di Lodi 1835 yılında *B. bassiana*'nın böceklerde hastalık yapabileceğini ilk kez ipek böceği türü olan *Bombyx mori*'de göstermiştir. Agostino Bassi di Lodi, fungusun neden olduğu hastalığa, böcek kütikülünden çıkan konidial yapının rengine göre, beyaz muskardin adını vermiştir [28]. Böylece mikroorganizmaların zararlı böcekler ile mücadelede kullanılabileceği gösterilmiş ve bu biyolojik mücadeleye başka bir boyut kazandırmıştır. Elie Metchnikoff, yeşil muskarin hastalığına neden olan *Metarhizium anisopliae* (eski adı- *Entomophthora anisopliae*)'u ekin bambulu da denilen tahıl zararlısı (*Anisoplia austriaca* (Coleoptera: Rutelidae)) üzerinden izole ederek, bu fungusu ait sporları üretilip arazi uygulamaları yapmıştır [29]. 1901 yılında Japon biyolog Shigetane Ishiwatari, *Bacillus thuringiensis* (Bt) türünün ipekböceklerinde hastalığa neden olduğunu gözlemlenmiştir. 1911 yılında Ernst Berliner, *B. thuringiensis*'in Akdeniz un güvesi tırtıllarında [*Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae)] hastalığa neden olduğunu bulmuştur [30]. Baculovirus'un zararlı böcek popülasyonlarını kontrol edebileceği 1940'lı yıllarda bulunmuştur [31]. Steinhaus ve arkadaşları Yonca tırtılı (*Colias euwortheme* Boisduval: Lepidoptera) ile mücadele etmek için araziye nükleopolihedrovirüs (NPV) uygulamışlardır [32].

Üç farklı biyolojik mücadele stratejisi vardır. Bunlar; Klasik biyolojik mücadele, ögmenatif (çoğaltma) biyolojik mücadele ve konservatif (Koruyucu) biyolojik mücadeledir. Zararlı böcek doğal düşmanının olmadığı bir ortama girdiğinde, kısa

sürede populasyonunu artırarak ekonomik zararlara neden olabilmektedir. Bu zararın önlenmesi için dışarıdan zararlının bulunduğu ortama doğal düşmanın getirilmesine klasik biyolojik mücadele stratejisi denir. Zararlının bulunduğu ortamda doğal düşman etkinliğinin düşük olması durumunda da aynı strateji uygulanabilmektedir. Boston çevresinde tesadüfen bulunan, meşe ve kavak gibi ağaçların yapraklarıyla beslenen *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae) larvaları 10 yıl içinde bölgede geniş bir dağılım göstermiştir. Amerika 50'den fazla predatör böcek ve hastalık etmeni organizma, bu böcek ile mücadele için ithal etmiştir. 1989-1990 yılları arasında *Lymantria dispar* (çingene güvesi) populasyonundaki düşüşün nedeninin entomopatojen fungus olan *Entomophaga maimaiga* olduğu bulunmuştur. Amerika'nın 11 eyaletindeki *Lymantria dispar* kaynaklı yaprak dökümünün 1995 yılında 1996 yılına göre %85 oranında azaldığı gözlenmiştir [33]. Türkiye'de ilk klasik biyolojik mücadele Avusturya kökenli turunçgil zararlısı olan *Icerya purchasi* Maskell (Hemiptera: Monophlebidae) karşı, *Rodolia cardinalis* Muls. (Coleoptera: Coccinellidae) getirilmesi ile başlamıştır [19].

Zararlı böcek ve doğal düşmanı aynı ortamda bulursa da doğal düşman zararlıyı baskı altına alabilecek populasyon düzeyinde değilse ya da sonradan ortama bırakılan doğal düşman, faunaya yerleşip çoğalamıyorsa, doğal düşmanlar belli aralıklarda üretilip, zararlının bulunduğu ortalama bırakılır. Bu biyolojik mücadele stratejisine çoğaltma (augmentation) denilmektedir. Burada inokülatif (inoculation) ve inundatif (inundation) olmak üzere iki farklı yaklaşım vardır. İnokülatif mücadelede; ekonomik zarar eşiğine gelmeden önce zararlı böcek popülasyonunun kontrolü için ortama biyolojik mücadele ajanı konulur. Zararlı böcek popülasyonu bu şekilde kontrol edilir. Yöntemin amacı, doğal düşmanın populasyonunu artırarak zararlıyı kontrol altına almaktır. Entomopatojen fungusların, zararlı böcek populasyonlarında epizootik oluşturması, belli bir süre için ortama yayılması ve zararlı böcek populasyonunu ekonomik eşik değerinin altında tutması için ürünün ekimi sırasında küçük miktarda araziye uygulanması mümkündür. *Melolontha melolontha* larvaları, çim yonca kökleri ile beslenerek zarar verirken, erginleri akçaağaç, meşe, erik ve kayın olmak üzere çeşitli ağaçların yaprakları ile beslenerek zarar vermektedir. Bu böcek mücadelesinde,

*Beauveria brongniartii* blastosporlarının yağsız süt (skimmed milk) formülasyonu kullanılmıştır. İsveç'te bu böceğe karşı yapılan mücadele 9 yıl sürmüş ve fungus blastospor formülasyonu orman kenarlarında kümelenen yetişkin dişilere uygulanmıştır. Yetişkin ve larva *Melolontha melolontha* sayısında fungal enfeksiyondan kaynaklı bir azalma gözlenmiştir [34]. İnundatif biyolojik mücadelede; ortama çok sayıda biyolojik mücadele ajanı bırakılarak hızlı bir kontrol sağlanır. Bu şekilde zararlı böcek popülasyonu ve ortama bırakılan biyolojik mücadele ajanı popülasyonunda azalma sağlanacaktır.

Konservatif (Koruyucu) biyolojik mücadele stratejisinde; doğal düşmanlar korunmakta ve popülasyonlarını artıracak uygulamalar yapılmaktadır. Bu stratejide, biyolojik mücadele ajanının ortama bırakılmasına gerek yoktur. Bu yöntemde, ortamdaki doğal düşman popülasyonunun muhafaza edilmesi ve artırılması zararlı böcek popülasyonunun ekonomik zarar eşiğinin altında tutulmasına sağlar. Örneğin, doğal düşman olarak entomopatojen funguslar kullanıldığında, ortamda pestisit kullanımını azaltarak ve nem oranını artırarak fungusun etkinliğinin artırılması sağlanabilir [26].

Biyolojik mücadelenin giderek daha önemli hale gelmesinin nedeni, zararlı böcekler ile mücadelede kullanılan kimyasal pestisitlerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileridir. Biyolojik mücadele yöntemi, etkisinin uzun sürmesi, yan etkilerinin olmaması, böceklerde direnç oluşumunu tetiklememesi, çevreyi ve insan sağlığını olumsuz etkilememesi nedeniyle avantajlıdır [35,36]. Biyolojik mücadelede amaç zararlı popülasyonunu ekonomik eşik değerinin altında tutmaktır. Biyolojik mücadelede mikroorganizmalardan omurgalılara kadar, birçok organizma kullanılabilir.

Entomopatojenler, zararlı böcekleri doğal yollarla öldürebilen ya da etkisini azaltan patojenlerdir. Bakteri, virüs, fungus ve nematod olabilen entomopatojenler, zararlı böcek popülasyonlarının kontrolünde önemli bir yere sahiptir [7,37]. Entomopatojenler ile enfekte olan böceklerin; üreme potansiyellerinde ve besin tüketimlerinde azalma görülmektedir.

Entomopatojen funguslar geniş konak dağılımına sahip olmaları, uygun koşullar altında zararlı böceklerde salgın oluşturmaları ve diğer biyolojik mücadele ajanlarından (virüs, bakteri) farklı olarak, konak böcek tarafından yenilmeye gerek olmadan enfeksiyona neden olmalarından dolayı, biyolojik mücadelede önemli bir yere sahiptirler.

Entomopatojen funguslar, böceğin tüm gelişim evrelerinde etkili olup, enfeksiyona neden olabilmektedir [38], Entomopatojen funguslar böceklerin; konak bitki bulma [39], beslenme [40], doğurganlık ve ömür uzunluğu [41] gibi parametrelerini değiştirerek, zararlı böcek popülasyonlarını kontrol edebilmektedir [42,43].

### 2.1.1. Entomopatojen funguslar

Dünya tarihinde son 400 milyon yıl boyunca funguslar ile böcekler bir arada var olmuş ve birbirleriyle farklı etkileşimler geliştirmişlerdir. Bu etkileşimlerden biri olan patojenite; belli bir fungus grubunun arthropoda popülasyonunun doğal düşmanı olmasıdır. Entomopatojen funguslar, böceğin ölümüne yol açan enfeksiyona neden olarak, zararlı böcek popülasyonlarında epizootiğe yol açmaktadır. Bu yolla doğadaki zararlı böcek popülasyonları kontrol altına alınabilmektedir [36]. Entomopatojen fungusun epizootik oluşturması; fungusun böcek ile olan etkileşimine, fungus sporunun virülansına, sporun yoğunluğuna ve dağılımına bağlıdır [44]. Entomopatojen funguslarda yaşam döngüsü konaklarının gelişme dönemleriyle eş zamanlı olarak meydana gelmektedir [34]. Şimdiye kadar, 12 Oomycetes, 65 Chytridiomycota, 339 Microsporidia, 474 Entomophthoromycota, 238 Basidiomycota ve 476 Ascomycota'ya ait entomopatojen fungus türü bulunmaktadır. Doğada sıklıkla ve en çok Ascomycota ve Entomophthoromycota'ya ait entomopatojen fungus türleri görülmektedir. Literatürde, Ascomycota'da; *Metarhizium* (*M. anisopliae*, *M. globosum*, *M. lepidiotae*, *M. robertsii*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. rileyi*, *M. guizhouense*, *M. brunneum*, *M. flavoviride*, ve *M. pingshaense*), *Beauveria* (*B. brongniartii* ve *B. bassiana*), *Isaria* (*I. tenuipes*, *I. farinosa* ve *I. fumosorosea*), *Cordyceps* (*C. militaris*), *Ophiocordyceps* (*O. unilateralis*, *O. sinensis*), *Pochonia*

(*P. chlamydosporia*), *Torubiella* (*T. ratticaudata*), *Hirsutella* (*H. thompsonii*, *H. nodulosa*, *H. aphidis*), *Lecanicillium* (*L. lecani*), cinsleri ve *Purpureocillium lilacinum*, *Paecilomyces variotii* türleri yer almaktadır [45,47] En yüksek insektisidal aktivite gösteren Entomophthorales'e ait türler *Furia*, *Conidiobolus*, *Entomophaga* ve *Erynia* cinsleridir. Ancak laboratuvar koşullarında üretim sıkıntılarından dolayı, bu fungusların biyolojik preparatlarda bileşen olarak kullanımları zordur [48]. *Beauveria* ve *Metarhizium* cinsine ait entomopatojen funguslar, sadece eklembacaklı popülasyonlarını kontrol etmekle kalmaz, aynı zamanda bitkilerle de karmaşık ilişkiler kurabilmektedirler [49]. Fungus endofit ve epifit olarak, bitki köklerinde, yapraklarında ve sürgünlerinde kolonize olup, bitkiyi böceklerle karşı daha dirençli hale getirebilmektedir. Ayrıca bitkide hastalığa neden olabilecek mikroorganizmaları baskılayarak ya da bitkinin savunma sistemini güçlendirerek, bitkiyi koruyabilmektedir. Endofit fungusların bitki gelişimini olumlu yönde etkilediğine dair çalışmalar bulunmaktadır [50,51].

Entomopatojen fungusların konak özgüllüğü, fungus türlerine ve fungus suşlarına göre farklılık göstermektedir. Entomopatojen funguslar Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera, Orthoptera ve Hymenoptera takımlarına ait birçok böcek türünü enfekte etmektedir [52]. *B. bassiana* ve *M. anisopliae*, tespit edilen en geniş konak dağılımına sahip entomopatojen funguslardır [53].

Entomopatojen fungusların topraktaki yayılımı ve varlığı bazı faktörlere bağlıdır. Organik madde içeriği yüksek, kil oranı kum oranından daha fazla olan topraklarda entomopatojen fungus yayılımı daha fazla iken, alkali ve kumlu topraklarda entomopatojen fungus daha az bulunabilmektedir [6,54]. Entomopatojen funguslar tarım ve ormanlık alanlarda, meralarda ve çöl gibi farklı habitatlarda bulunabilmektedirler. Entomopatojen fungusların dağılımı türlere göre değişiklik göstermektedir [55]. Örneğin *Paecilomyces fumosoroseus* geniş bir coğrafik yayılım gösterirken, *Paecilomyces antarctica*'nın yayılımı Antarktika ile sınırlıdır [56]. *Beauveria bassiana* geniş bir coğrafik dağılıma sahiptir, Tayland'da tropik yağmur ormanlarında bulunabildiği gibi Kanada'da da bulunabilmektedir [57,58]. Entomophthorales'e ait entomopatojen funguslar

genellikle ılıman iklimde ormanlık alanlarda yaygın olarak görülürken, tropikal ormanlarda da bulunabilmektedir [59]. *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* cislerine ait funguslar toprakta yaygın olarak bulunmaktadır. *B. bassiana* ve *M. anisopliae* tüm ekosistemlerde bulunur ama *B. bassiana* işlenmiş toprakta ve tarımsal alanlarda daha az yaygın iken, doğal habitatlarda daha baskındır [36].

Entomopatojen fungusların virülansı UV-ışığı, sıcaklık, nem, yağış ve rüzgar gibi abiyotik faktörlerden etkilenmektedir. Sıcaklık fungusun konak böcekte büyümesini ve çimlenmesini etkilemektedir. Fungus suşunun bulunduğu bölgeye göre gelişim gösterdiği sıcaklık derecesi farklılık göstermektedir. Fungus eğer sıcak bölgelerde bulunuyorsa yüksek sıcaklıklarda, soğuk bölgelerde bulunuyorsa düşük sıcaklıklarda daha iyi aktivite göstermektedir [44]. Fungus sporları yüksek sıcaklıklarda, böcek ile karşılaşmadan önce inaktive olabilmektedir. Düşük sıcaklıklarda fungus daha yavaş büyüme ve çimlenmekte, bu durum enfeksiyon süresini uzatmaktadır. *B. bassiana*'nın optimal sıcaklık aralığı 23-25°C olmasına rağmen, 5-38°C sıcaklıkları arasında etkin olabilmektedir. *Paecilomyces fumosoroseus*'un gelişim gösterdiği optimal sıcaklık aralığı 19-22.5°C olmasına rağmen, 5-32°C arasında da gelişebilmektedir [10,28]. Nem, entomopatojen fungusların etkisini ve yaşam süresini etkileyen başka önemli bir faktördür. Ortamın nem oranı, fungus sporunun konak böceğin kütikulasında çimlenebilmesi ve ölen böcekten sporun dışarı çıkabilmesi için önemlidir. *B. bassiana*'nın çimlenmesi için ihtiyaç duyulan bağıl nem nem aralığı genellikle %92-100 arasındadır. UV ışınları; konidia sitoplazma membranının bozulmasına, dolaylı ya da dolaysız DNA hasarına, kondianın kütikulaya penetrasyonunun gecikmesine, çimlenme süresinin uzamasına veya konidianın inkaktif olmasına neden olmaktadır. UV-A (330-400 nm) ve UV-B (290-330 nm) ışınları, fungus spor DNA'sında hasara neden olabildiğinden, sporun canlılığını da olumsuz etkilemektedir [44].

#### **2.1.1.1. *Beauveria bassiana***

Agostina Bassi di Lodi 187 yıl önce, beyaz muskardin adını verdiği hastalığa *Bombyx mori* üzerinde *B. bassiana*'nın neden olduğunu göstermiştir. O

zamandan beri *B. bassiana* sporları, biyolojik mücadele ajanı olarak, zararlı böcek popülasyonlarını kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır.

*B. bassiana*, Beauveria cinsine ait olan ve en yaygın dağılım gösteren fungusdur. Genellikle ılıman ve tropikal bölgelerde daha çok bulunmaktadır. *B. bassiana*; Alpin bölgeler, fundalıklar, turba bataklıkları, savan tipi bitki örtüsüne sahip topraklar, ekili topraklar, ormanlık ve çöl alanları gibi birbirinden farklılık gösteren çeşitli habitatlarda bulunabilmektedir [28]. Fungus uygun bir konak bulana kadar ya da bitkilerle endofit olarak etkileşime geçene kadar toprakta saprofit olarak yaşamaktadır [51,55]. Endofitler, sağlıklı bitki dokularında yaşayan mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Endofitler, konak bitki için zararlı olan organizmalara karşı konağın direnç geliştirmesine yardımcı olabilmektedirler. Endofit mikroorganizmalar, bitkilerin iç dokularında, özellikle yaprak, dal, gövde ve köklerde kolonize olabilmektedirler [60]. *B. bassiana*; mısır (*Zea mays*), domates (*Solanum lycopersicum*), kakao (*Theobroma cacao*), hurma (*Phoenix dactylifera*), kahve (*Coffea arabica*), haşhaş (*Papaver somniferum*), kabak (*Cucurbita pepo*), pamuk (*Gossypium hirsutum*), fasülye (*Phaseolus vulgaris*), börülce (*Vigna unguiculata*) ve pirinç (*Oryza sativa*) olmak üzere yaklaşık 25 bitki türü ile endofit olarak yaşayarak, zararlı böceklere karşı bitkiyi koruyabilmektedir [61].

*B. bassiana* geniş konak dağılımına sahiptir. Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Orthoptera, Gastropoda, Homoptera, Acari, Blattaria, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Heteroptera ve Siphonaptera takımlarına ait 700'den fazla böcek türünü enfekte edebilmektedir [62,6]. *B. bassiana*'nın konakları, ekonomik olarak önemli olan tarım, orman zararlıları ve insanda hastalığa neden olan vektör kenelerdir [63].

*B. bassiana*'nın genellikle insanlar ve hedef dışı organizmalar için güvenli olduğu kabul edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Rusya olmak üzere birçok ülkede *B. bassiana* sporlarını içeren yaklaşık 171 fungal preparat üretilmektedir [63]. *B. bassiana* enfeksiyonu sırasında anti-mikrobiyal, insektisidal

ve anti-tümör gibi aktiviteler gösteren sekonder metabolitler sentezlemektedir [64]. Bu metabolitlerden bazıları; beauverisin (BEA), bassiatin, bassianin, bassianolide, beauverolides, tenellin, oosporein oksalik asit ve bassiacridin'dir [28].

*B. bassiana*'nın ürettiği bazı metabolitler için, insan maruziyet risk değerlendirmesi yapılmış ve risk oluşturmadığı bulunmuştur [65,66]. *B. bassiana* ürettiği sekonder metabolitlerin herhangi birinin insan sağlığı ve çevre için olumsuz etki gösterdiği bulunamamıştır. Ancak fungus sporları, bağışıklık sistemi baskılanmış ve alerjik kişilerde bazı durumlarda risk oluşturabilmektedir. *B. bassiana*, çeşitli sekonder metabolitler sentezlemesi, kolay formüle edilmesi, geniş konak dağılımına sahip olması ve sentetik pestisitlere karşı iyi bir alternatif olması gibi özellikleri nedeniyle tarımsal üretimde güvenle kullanılabilinmektedir [43].

#### **2.1.1.2. *Paecilomyces fumosoroseus* (syn. *Isaria fumosorosea*)**

1904 yılında *Isaria fumosorosea* Wize tarafından şeker pancarı kurdu *Cleonus punctiventris* (Coleoptera: Curculionidae) larvalarında tanımlanmıştır. 1947 yılında Samson'un monografik cins çalışmalarında, Isorioidea familyasının *Paecilomyces* grubuna fungusu dahil etmiş ve ismi Brown ve Smith tarafından *Paecilomyces fumosoroseus* olarak değiştirilmiştir. Ancak *Isaria fumosorosea* da sinonim olarak kullanılabilinmektedir [10,11].

*Paecilomyces fumosoroseus* syn. *Isaria fumosorosea* geniş coğrafi dağılıma sahiptir. Fungus topraktan, bitkilerden, havadan ve Lepidoptera takımında yer alan böceklerden izole edilebilmektedir. Danimarka'da yapılan bir çalışmada, organik tarım yapılan alanların çevresinden alınan toprak örneklerinde yaygın olarak *P. fumosoroseus* bulunmuştur. Finlandiya'da yapılan başka bir çalışmada ise, yoğun tarım yapılan arazilerden alınan toprak örneklerinde bu fungus bulunamamıştır [67].



*P. fumosoroseus* geniş konak dağılımına sahip olduğu için biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmaktadır. *P. fumosoroseus*'un hastalık oluşturabildiği konak sayısı *B. bassiana* kadar fazla değildir. Lepidoptera ve Hemiptera takımına ait çok sayıda böcek türü *P. fumosoroseus* ile enfekte olabilmektedir. Ayrıca Acari, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Isoptera, Neuroptera takımlarında yer alan böcekler de *P. fumosoroseus* ile enfekte olabilmektedir [10].

*P. fumosoroseus* bitkide hastalıklara neden olan *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Sphaerotheca fuliginea* gibi fitopatojenik funguslara karşı bitkiyi korumaktadır [68–70].

Yapılan bir çalışmada, *P. fumosoroseus*'un kabakgillerde külleme hastalığı etkeni olan *Sphaerotheca fuliginea* üzerindeki etkisi incelenmiştir. Salatalık bitkisi *Sphaerotheca fuliginea*'ya maruz bırakılmadan 24 saat önce, bitkiye  $1 \times 10^7$  konidia/mL konsantrasyonunda *P. fumosoroseus* sporları püskürtülmüştür. *P. fumosoroseus*'un salatalık küllemesine neden olan *Sphaerotheca fuliginea* zararlısının gelişimini ve yayılmasını önemli ölçüde bastırdığı gözlenmiştir [68].

*P. fumosoroseus*; konağın besin tüketimini azaltarak, üremesini sınırlayarak, sekonder metabolitler sentezleyerek ya da konak içinde çoğalarak, zararlı böcek popülasyonunu kontrol etmektedir. Enfeksiyon sırasında sentezlenen sekonder metabolitler, böcek bağışıklık sisteminin çökmesine ve böceğin ölümüne yol açabilmektedir. *P. fumosoroseus*'un sentezlediği metabolitler; ribozomal olmayan peptitler (beauverisin ve birkaç beauverolid), terpenler (trikokaran ve fumosorinon), lakton birleşikleri (birkaç sefarosporolid) ve asitler (dipikolinik asit ve oksalik asit)'dir [71].

Amerika Birleşik Devletleri, Belçika, Hindistan, Kolombiya, Meksika ve birçok ülkede *P. fumosoroseus* (*syn. I. fumosorosea*) sporları ticari ürün haline getirilmiş ve biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır [10,71]. Bunların mikrobiyal

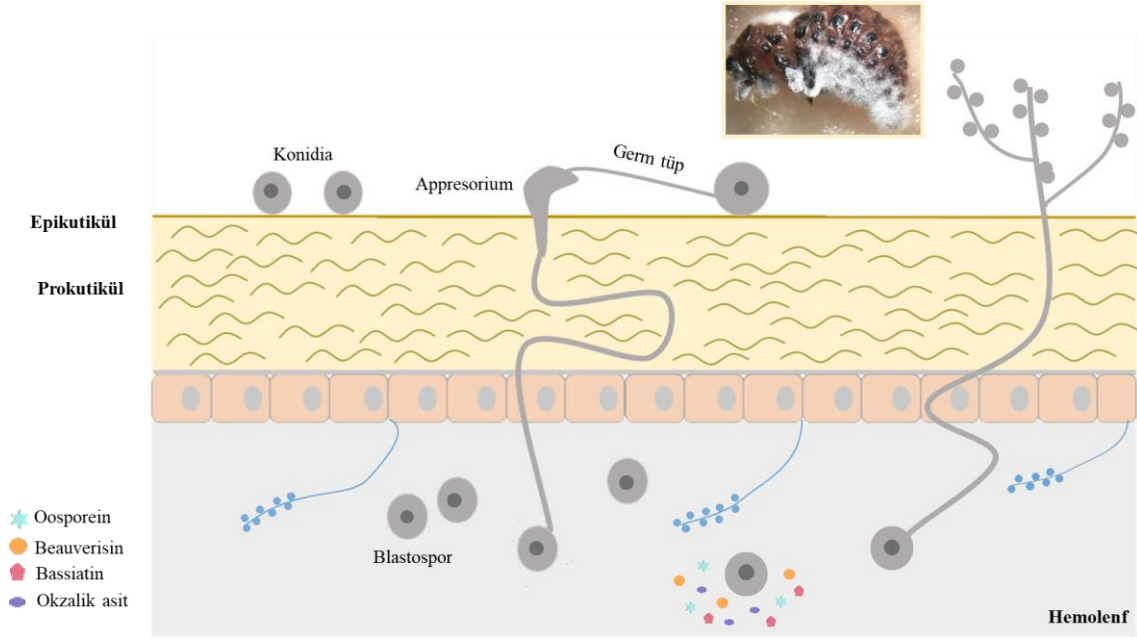
insektisit olarak tarım zararlıları ve vektörlerin kontrolünde kullanılmalarının nedeni, kimyasal pestisitlere göre çevre için düşük risk taşımalarıdır. Yapılan bir çalışmada, *I. fumosorosea*'nın hedef dışı canlılar, kuşlar, amfibiler ve memelilerde toksik bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir [10].

### 2.1.1.3. Entomopatojen fungus enfeksiyonu

Entomopatojen fungus enfeksiyon süreci; konağın gelişim evresi, beslenme durumu gibi konak fizyolojisine, ortam sıcaklığı, nem, ultraviyole ışık gibi birçok fiziksel ve kimyasal faktöre bağlı olarak değişmektedir. Entomopatojen enfeksiyonu; (1) fungus sporunun konak böceğin kütikulasına tutunması, (2) çimlenmesi, (3) kütikuladan içeriye doğru penetrasyonu, (4) hemolenfde fungusun kolonizasyonu ve konak böceğin bağışıklık sisteminin üstesinden gelmesi, (5) fungusun çoğalması, (6) fungusun ölen konaktan dışarı doğru büyümesi, olmak üzere 6 aşamada gerçekleşmektedir.

Entomopatojen fungus enfeksiyonu, fungus konidiasının böcek kütikulasına tutunmasıyla başlamaktadır. Bu durum konidia ile böcek kütikulası arasında hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler ile gerçekleşmektedir. Fungus sporu, konak kütikulasındaki herhangi bir yere tutunabilmektedir. Kütikulanın birleşenleri, böcekte böceğe değiştiği gibi böceğin bulunduğu gelişim evresine bağlı olarak da farklılık göstermektedir [72]. *B. bassiana* konidialarının en dışında protein hydrophobinleri ile kaplı hidrofobik rodletler vardır. *B. bassiana*'da Hyd1 ve Hyd2 olmak üzere bulunan iki hydrophobin, hidrofobik rodletlerden ve konidia hidrofobikliğinden sorumludur [73]. Enfeksiyonun ikinci aşaması, kütikulaya tutunan fungus sporunun çimlenmesidir. Sporum çimlenmesi sıcaklık, pH, nem, oksijen ve besin varlığından etkilenmektedir. Fungus ve fungus suşuna göre değişmekle birlikte çimlenme için gerekli olan optimum sıcaklık 20-30°C arasındadır [74]. Geniş konak dağılımına sahip fungusların çimlenmek için konak kütikulasında spesifik karbon ve azot kaynaklarına gereksinim duymadıkları, konak aralığı dar olan fungusların ise çimlenmek için böcek kütikulasında spesifik birleşiklere ihtiyaç duydukları gözlenmiştir [75].

Enfeksiyonun üçüncü aşaması penetrasyondur. Fungus appresorium denilen bir yapı oluşturarak, kütikula mekanik bir baskı yapmaktadır. Bu yapı ve fungus tarafından sentezlenen kütikula parçalayıcı enzimler, fungusun konağın kutikulasına daha kolay penetre olmasını sağlamaktadır [76,77]. Konak böceğin epikutikulası protein, lipid, sterol ve yağ asitlerinden oluşmaktadır. Kütikula parçalayıcı enzimler; lipaz, proteaz ve kitinaz fungusun konağa girişinde önemli rol oynamaktadır. Fungusun sentezlediği lipaz enzimi, epikutikuladaki lipid ve lipoproteinleri parçalamaktadır [78]. Lipazlar ayrıca, fungus ve konak kütikula yüzeyi arasındaki hidrofobik etkileşimi artırmaktadır [79]. Fungusun sentezlediği proteolitik enzimler, böcek kütikulasındaki proteinleri parçalayarak, kitin fibrillerinin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Kitinaz enzimi böcek kütikulasındaki kitini parçalayarak, fungusun böcek kütikulasında ilerlemesini sağlamaktadır. Hemolenfe geçen fungus burada çoğalarak ve maya benzeri hücreler (blastospor) oluşturmaktadır. Fungusun çoğalması, konak böceğin doku bütünlüğünün bozulmasına yol açmaktadır. Fungus bu arada böceğin bağışıklık sistemini zayıflatan sekonder metabolitler sentezlemektedir. Ayrıca fungus böceğin hemolefindeki bulunan önemli bir disakkarit olan trehalozu enerji kaynağı olarak kullanmak için, asit trehalaz enzimi sentezleyerek parçalamaktadır. Böylece böceğin beslenmesi sekteye uğrar [80]. Yapılan bir çalışmada *Metarhizium acridum*'da trehalaz sentezinden sorumlu ATM1 geninin inaktive edilmesi sonucunda, fungusun virülasında önemli bir azalma olduğu gözlenmiştir [81]. Özetle fungus, sentezlediği enzimler ve sekonder metabolitlerle böceğin bağışıklık sistemini zayıflatmakta, çoğalarak böceğin doku bütünlüğünü bozmakta ve böceğin beslenmesini engelleyerek, ölümüne yol açmaktadır. Fungus konağı öldürdükten sonra, uygun koşullarda kadavradan dışarı doğru büyüebilmektedir (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** Entomopatojen fungus enfeksiyon şeması

Başarılı bir enfeksiyon için fungus, olumsuz fiziksel ve kimyasal etmenlerin ve böceğin bağışıklık sisteminin üstesinden gelmelidir. Böcek fungus enfeksiyonuna, anti-fungal bileşiklerin sentezini artırarak, reaktif oksijen türleri (ROS), hümmoral melanizasyon ve fagositoz dahil olmak üzere doğal bağışıklık etkenlerini aktive ederek karşı koymaktadır [82]. Melanin böceğin hümmresel savunma sisteminde (patojen enkapsülasyonu) ve anti-mikrobiyal peptidlerin sentezinde yer almaktadır [83]. Fungus, böceğin bağışık sistemine tepki olarak ROS etkilerini azaltan genlerin aktivasyonunu sağlayarak, superoksit dismutaz gibi enzimlerin sentezini artırarak kendini koruyabilmektedir [84].

*B. bassiana*'nın sentezlediği oosporein metaboliti; profenoloksidazın (PO) polifenol oksidaza (PPO) ayrılmasını engelleyerek, profenoloksidazın aktivasyonunu ve antifungal peptit Gallerimisin (Gal geninden) ekspresyonunu engelleyerek, konak böceğin bağışıklık sistemini baskılamaktadır [85]. *B. bassiana*'nın sentezlediği MCL1 proteini, böceğin hemolenfinde yer alan hemosit hümmrelerinden kaçmasına olanak vermektedir [86,87].

### 2.1.2. Sekonder metabolitler

Birçok mikroorganizma, hayatta kalabilmek için sekonder metabolitler sentezlemektedir. Mikroorganizmalar; UV, kuruluk gibi abiyotik faktörlerden korunmak, diğer mikroorganizmalarla rekabet etmek ve böcekleri enfekte etmek için sekonder metabolitler sentezleyebilmektedir [88]. Funguslar, dünyadaki hemen hemen tüm habitatlara başarılı bir şekilde adapte olmuştur, bunun nedenlerinden biri sentezledikleri farklı özelliklere sahip sekonder metabolitlerdir. Sekonder metabolitler genellikle anti-fungal, anti-mikrobiyal, immünosupresif etkiler göstermektedir. Böylece fungusların besin için başka mikroorganizmalarla rekabet etmeleri, doğal düşmanlarına karşı kendilerini korumaları ve yeni bir ortama yerleşmeleri sağlanmış olur [89].

*B. bassiana*'nın sentezlediği sekonder metabolitlerin; BEA, bassianin, bassianolide, beauverolides, tenellin, oosporein, okzalik asittir. Bu metabolitlerin birçoğu insektisidal, anti-mikrobiyal, anti-helmintisit etkiler göstermektedir. *P. fumosoroseus* (syn. *I. fumosorosea*) farklı biyolojik aktiviteler gösteren, BEA, bassianolide, bassiatin, okzalik asit, dipikolinik asit ve fumosorinone gibi birçok metaboliti sentezleyebilmektedir.

**Çizelge 2.1.** *Beauveria bassiana* ve *Paecilomyces fumosoroseus* sentezlediği bazı sekonder metabolitler

Sekonder metabolitler	Fungus	Etkileri
Beauverisin	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> <i>Paecilomyces tenuipes</i> <i>Fusarium</i> spp.	Anti-bakteriyal, anti-fungal, anti-viral, insektisidal, anti-timör, iyonoforik [13]
Oosporein	<i>Beauveria caledonica</i> <i>Beauveria bassiana</i>	Anti-bakteriyal, anti-fungal, anti-oomycotic, anti-timör, insektisidal aktivite [90,91].

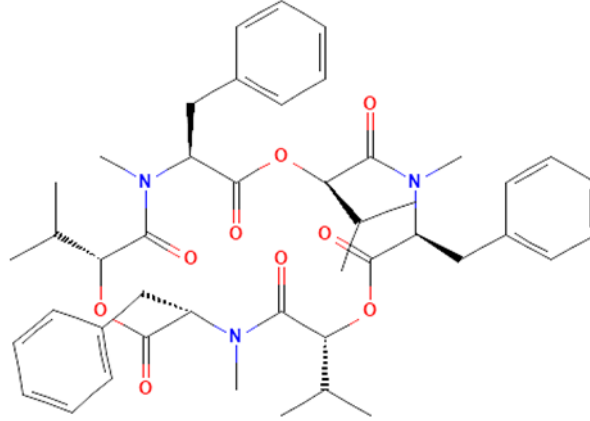
	<i>Beauveria brogniarti</i>	
Bassianin ve Tennelin	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Beauveria brogniarti</i>	Eritrosit membranındaki ATPaz' ları inhibe eder [28].
Bassiatin	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> <i>Fusarium spp.</i>	Anti-bakteriyal, anti-fungal, antitümör [28].
Bassianolides	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Beauveria brogniarti</i>	Anti-bakteriyal, iyonoforik, insektisidal [28].
Okzalik asit	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	İnsektisidal aktivite [92]
Bassiacridin	<i>Beauveria bassiana</i>	Özellikle çekirgelerde kitin bağlayıcı toksik bir protein [93]
Pyridovericin	<i>Beauveria bassiana</i>	Anti-fungal, insektisidal, sitotoksik [94]
Dipikolinik asit	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> <i>Verticillium lecanii</i> <i>Paecilomyces farinosus</i>	İnsektisidal [92,95]
Fumosorinone	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Anti-tümör [96]
Siklosporin A	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Verticillium spp.</i> <i>Fusarium spp.</i>	İnsektisidal [28]

### 2.1.2.1. Beauverisin (BEA)

Beauverisin, üç D-hidroksiisovalerik asit ve üç N-metilfenilalanil moleküllerinden oluşan, siklik heksadepsipeptiddir (Şekil 2.2). Moleküler ağırlığı 783.9 g/mol ve

moleküler formülü  $C_{45}H_{57}N_3O_9$ 'dur. BEA, D-hidroksiisovalerik asit, L-fenilalanin, S-adenosilmetiyonin ve ATP/Mg<sup>2+</sup> varlığında, beauverisin sentetaz enzimi ile sentezlenmektedir [97].

BEA enniatins antibiyotik ailesinde yer almaktadır ama yapısında bulunan N-metilamino asidin'den dolayı enniatinslerden farklılık göstermektedir. Döngüsel heksadepsipepetid yapısından dolayı hidrofobik özellik göstermektedir [98,99].



**Şekil 2.2.** Beauverisin moleküler yapısı

BEA molekülünde bulunan oksijen karbonil ve tersiyer amino grublarında bulunan serbest elektron çiftlerinden dolayı, BEA nükleofil gibi davranmakta ve elektrofil birleşikleriyle iyon-dipol etkileşimlerini yapabilmektedir. BEA nükleofillik özelliğinden dolayı yağda çözünür (liposolubility). BEA molekülünün stabilize edici intra-bağlarının olmaması ve esnek olması, bu molekülün metalik katyonlarla (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> vb.) ve başka küçük moleküller ile kompleks oluşturmasını sağlamaktadır. Böylece, BEA molekülü dimeric yapıda olan iyon seçici kanallar ile hücre zarından geçebilmektedir [100].

BEA, *B. bassiana*, *I. fumosorosea* ve *Fusarium* spp. fungus türleri tarafından sentezlenen sekonder bir metabolittir. BEA insektisidal, anti-bakteriyal, anti-fungal, anti-viral, anti-helmisit ve anti-tümör aktiviteleri göstermektedir.

BEA, insan bitki ve hayvanlarda hastalık oluşturan patojen Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere anti-bakteriyel etki göstermektedir. Antibiyotiklerin mikroorganizmalar üzerinde değişik etki mekanizmaları bulunmaktadır, örneğin bir kısmı bakteri hücre duvarının sentezini inhibe ederken diğer bir kısmı hücre membranı ya da protein sentezini veya nükleik asit sentezini etkileyebilmektedir. BEA, bakterilerin enzim sistemlerini etkileyerek anti-bakteriyel etki göstermektedir [101]. BEA; *Clostridium perfringens*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* ve *Shigella dysenteriae* gibi bazı Gram pozitif ve Gram negatif patojen bakterilerin üremesini engellemektedir [102–104]. BEA'nın anti-fungal etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada, BEA ve anti-fungal ilaç olan ketokonazol ayrı ayrı *Candida parapsilosis* üzerinde test edilmiş ve *C. parapsilosis* üzerinde etkili olmadıkları bulunmuştur. Ancak BEA ile ketokonazol birlikte kullanıldığında, *C. parapsilosis* üzerinde etkili oldukları bulunmuştur [105]. Beauverisinin ATP -bağlayıcı kaset taşıyıcılarını (ATP-binding cassette transporters: ABC taşıyıcıları) bloke ederek, çoklu ilaca direnç gösteren *C. albicans* üzerinde etkili olduğu bulunmuştur [106]. BEA anti-viral aktiviteye de sahiptir, HIV-1 integrasına karşı inhibitör etki göstermektedir [107]. Kanseri hücrelerinde, beauverisin mitokondriyal yolla hücre apoptozu uyararak anti-tümör aktivite göstermektedir. BEA, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini azaltarak ve mitokondriyal zar potansiyelini değiştirerek, mitokondriden sitokrom c salınmasını sağlamaktadır. Böylece Caspase 3 ve Caspase 9 aktive olmakta ve hücrede apoptoz başlamaktadır [108]. Ayrıca beauverisin hücre içindeki  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu artırarak, kanser hücrelerinde apoptozu uyarabilmektedir [109]. BEA; insan meme kanser hücre (MCF-7), insan monositik hücre (U937), insan kolon epidermal adenokarsinom hücre (CaCo-2), insan hepatoselüler karsinom hücre (HepG2), insan lösemi hücre (CCRF-CEM) ve insan promyelositik lösemi hücre (HL-60) hattı gibi birçok kanser hücre hattı üzerinde anti-tümör etki göstermektedir [110–115]. BEA hücredeki iyonik homeostazisi etkileyecek katyonlar ( $Ca^{+2}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ ) ile kompleks oluşturarak, hücre membranında iyon geçirgenliğini artırabilmektedir [13]. Beauverisinin metastatik prostat kanser hücre (PC-3M) ve meme kanser hücre (MDA-MB-231) hatlarında etkili olduğu, insan umbilikal ven endotel hücre hattında (HUVEC) ise anti-anjiyogenik aktivite gösterdiği bulunmuştur [120]. Yapılan in vivo çalışmada BEA'nın anti-tümör etkisini incelemek için murin kolon tümörü



(CT-26) ve insan servik tümörü (KB-3-1) taşıyan farelere BEA verilmiştir. Farelerde herhangi bir yan etki görülmemiş ve tümör hacminde azalma gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada, BEA verilen farelerde tümörün olduğu bölgelerde nekrotik alanların arttığı gözlenmiştir [116].

Beauverisinin genotoksisitesi üzerinde yapılan in vivo çalışmada, 3 gün boyunca 50-200mg/kg arasında değişen BEA dozları farelere oral yol ile uygulanmıştır. Farelerde BEA kaynaklı; klinik toksisite belirtisi, kilo kaybı ve ölüm gözlenmemiştir. Çalışmada kullanılan farelerin karaciğer, böbrek, duodenum, kolon, dalak ve kemik iliği dokularında yapılan Comet assay analizi ile bu dokulara ait hücrelerde DNA hasarı olup olmadığı araştırılmıştır. BEA uygulanan farelerde <%1 oranında DNA göçü gözlenmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu oranın istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır [117].

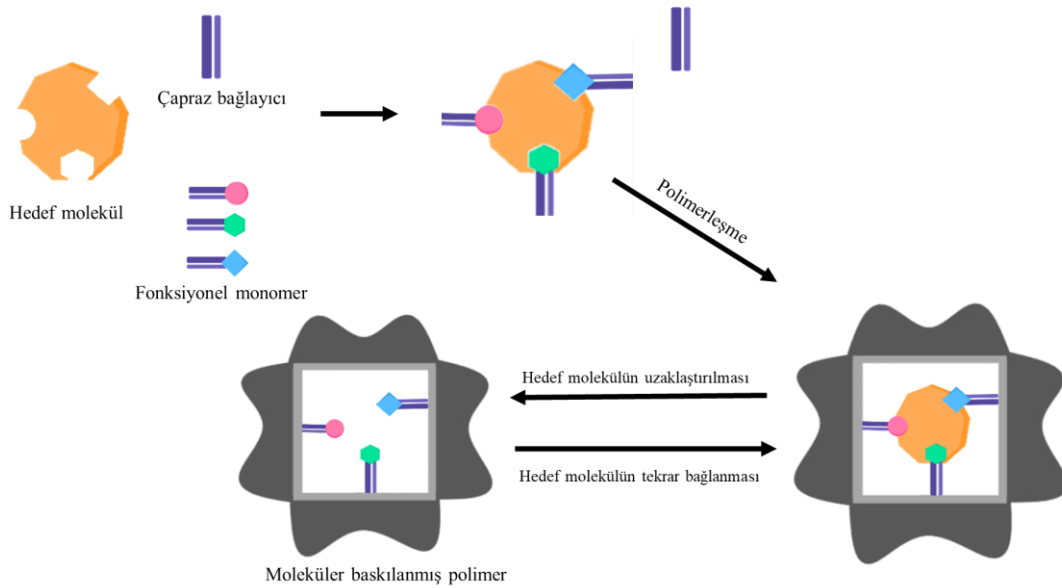
İlk kez 1969 yılında R. L. Hamill, beauverisini *Artemia salina* üzerinde denemiş ve BEA'nın insektisidal etkisi olduğunu bulmuştur [118]. Yapılan çalışmalarda BEA'nın, *Aedes aegypti*, *Spodoptera frugiperda*, *Schizaphis graminum*, *Calliphora erythrocephala* ve *Lygus spp.* üzerinde insektisidal etki gösterdiği saptanmıştır [118–121].

## 2.2. Moleküler baskılama

Moleküler baskılama tekniği, istenilen moleküle ait spesifik tanıma yeteneğine sahip yüksek çapraz bağlı polimerleri sentezleyen bir tekniktir. Bu teknik, istenen hedef molekülü tamamlayıcı geometrik ve kimyasal spesifik bağlanma bölgelerinin oluşturulmasıyla elde edilmektedir.

Moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP) en önemli avantajı, istenilen moleküle karşı yüksek seçicilik göstermeleridir. Ayrıca moleküler baskılanmış polimerler; yüksek sıcaklıklara, basınca, pH değişimlerine karşı dirençlidirler. MIP'ler düşük maliyetli olup, depolama ömürleri uzundur. MIP'ler yüksek tanıma özgüllüğü,

öngörülebilirliği ve uygulama evrenselliği gibi özelliklerinden dolayı, birçok farklı alanda kullanılmaktadırlar. MIP'lerin kimyasal sensörler, ilaç salınımı, saflaştırma, biyolojik antikolar gibi farklı uygulama alanları bulunmaktadır [122]. Moleküler baskılanmış polimerler üç aşamada sentezlenir. İlk aşamada, atom, iyon, molekül, mikroorganizma gibi hedef moleküller ile etkileşime girebilen, fonksiyonel gruplara sahip monomer ile hedef molekül arasında meydana gelen etkileşim sonucunda ön-kompleks oluşmaktadır. Bu aşama, hedef molekülün kimyasal özellikleri ve üç-boyutlu yapısı için önemlidir. İkinci aşamada, hedef molekül ve fonksiyonel monomerden oluşan ön-komplekse uygun çapraz bağlayıcılar ve başlatıcı eklenerek polimerizasyon gerçekleşmektedir. Son aşamada ise, hedef molekül uygun çözücü kullanılarak, yapıdan uzaklaştırılmaktadır (Şekil 2.3). Böylece, hedef molekülün boyut, uzaysal yönelimi ve şeklini tamamlayan tanıma boşlukları, çapraz bağlı polimer matrisinde oluşturulmaktadır [123].



**Şekil 2.3.** Moleküler baskılama

Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezinde, hedef molekül ile fonksiyonel monomer/monomerlerin arasında kovalent veya non-kovalent etkileşimler gerçekleşmektedir. Kovalent baskılamada, polimerizasyondan sonra kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kovalent bağların kırılmasıyla, kalıp molekül ortamdan uzaklaştırılır. Kovalent bağın tekrar kurulmasıyla hedef

molekül polimere bağlanır. Kovalent bağların daha kararlı olması nedeniyle, kovalent baskılama uygulandığında, daha homojen bağlanma bölgesi dağılımına sahip bir moleküler baskılanmış polimer elde edilir. Kalıp molekül ve fonksiyonel monomerin kovalent bağ ile oluşturduğu ön-kompleksin kararlı olması, polimer matrikse önemli bir avantaj sağlarken, aynı zamanda hedef molekülü matriksten uzaklaştırmak zor olduğu için dezavantaj da sağlar. Adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemlerinde hedef molekülün polimer matriksteki spesifik boşluklara bağlanmasının ve ayrılmasının yavaş olması kovalent baskılamanın kullanımını sınırlamaktadır. Bu baskılamada sınırlı sayıda birleşikler [aldehitler, alkoller (dioller), aminler, ketonlar ve karboksilik asitler] kullanılmaktadır. Kovalent olmayan baskılamada, hedef molekül ile fonksiyonel monomer arasında, Van der Waals, hidrojen bağları iyonik etkileşimler ve hidrofobik etkileşimler gözlenir. Uygun bir çözücü ile hedef molekül polimer matriksten uzaklaştırılır ve molekülün spesifik boşluklara yeniden bağlanması kovalent olmayan etkileşimlerle gerçekleşir. Böylece baskılamada kullanılacak hedef moleküllerin çeşitliliği artar. Kovalent olmayan baskılama daha kolaydır ve hedef molekülün bağlanma bölgelerine olan afinitesi daha yüksektir. Bu baskılamanın dezavantajı, kalıp molekül ile monomer arasında zayıf etkileşimler olduğu için kovalent baskılamaya göre daha kararsız yapıda olmasıdır [122].

### **2.2.1. Temel bileşenler**

Moleküler baskılama, istenilen molekül ve fonksiyonel monomerin etrafındaki çapraz bağlayıcının polimerizasyonunu içerir. Moleküler baskılanmış polimer sentezinde kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, polimerizasyon başlatıcısı ve çözücü içermektedir. MIP'lerin hazırlanmasında; polimerizasyon reaksiyonu, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcılar, çözücü miktarı, reaksiyon sıcaklığı ve süresi gibi birçok faktör etkili olmaktadır.

#### **2.2.1.1. Kalıp molekül**

Moleküler baskılamada; aminler, amino asitler, proteinler, hormonlar karbohidratlar, ilaçlar, vitaminler, metal iyonları ve hücreler, kalıp olarak

kullanılabilmektedir. Kalıp olarak kullanılacak molekül bazı özelliklere sahip olmalıdır. Bunlar; polimerizasyonu engelleyen fonksiyonel gruba sahip olmamalı, polimerleşme sırasında kararlı yapıda olmalı ve fonksiyonel monomer ile kompleks oluşturabilecek fonksiyonel grup içermelidir [124]. Kalıp molekül, polimerleşme sırasında uygulanan sıcaklık ve basınç gibi faktörlere karşı mekanik ve fiziksel kararlılığa sahip olmalıdır.

### **2.2.1.2. Fonsiyonel monomer**

Fonksiyonel monomerin rolü, içerdiği fonksiyonel gruplarla kovalent olmayan ya da kovalent etkileşimlerle kalıp molekülle bir ön-kompleks oluşturmaktır. Bu yüzden polimerizasyondan önce, istenilen molekül ile güçlü bir şekilde etkileşime girebilecek uygun fonksiyonel monomerin seçilmesi önemlidir [125]. Fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin gücü, MIP'lerin afinitesini etkileyerek tanıma bölgelerinin seçiciliğini ve doğruluğunu belirlemektedir. Hedef molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimin güçlü olması, ön-kompleksin daha kararlı olmasını sağlamaktadır. Bu da moleküler baskılanmış polimerlerin, yüksek bağlanma kapasitesine sahip olmasına neden olmaktadır.

### **2.2.1.3. Çapraz bağlayıcılar**

Polimerizasyonda, kalıp molekülün etrafındaki fonksiyonel monomeri sabitlemek için çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır. Bu şekilde hedef molekül çıkarıldığında bile, yüksek düzeyde çapraz bağlı sert bir polimer oluşturulmakta ve moleküle özgün olan bağlanma bölgeleri korunmaktadır. Çapraz bağlayıcı miktarı ve türü, MIP'lerin seçiciliğinde ve bağlama kapasitelerinde önemli etkilere sahiptir [126]. Çapraz bağlayıcıların miktarının düşük olması, çapraz bağlanma derecesini azaltır, bu da karasız mekanik özelliklere sahip polimer oluşmasına neden olmaktadır. Fazla miktarda çapraz bağlayıcıların kullanılması ise, birim kütledeki monomer sayısını azaltarak, tanıma bölgelerinin sayısının azalmasına neden olmaktadır.

#### **2.2.1.4. Başlatıcılar**

Polimerizasyonda kullanılan başlatıcı miktarı (%1 mol oranlarında), polimerizasyonda kullanılan monomer oranlarına göre oldukça düşüktür. Başlatıcının kimyasal yapısına göre oluşan radikal oranı ve miktarları, sıcaklık ve ışık gibi faktörler tarafından tetiklenmektedir.

#### **2.2.1.5. Çözücüler**

Çözücüler, polimerleşme sürecinde hedef molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcılar ve başlatıcıları bir faza getirmekten ve gözenekli polimerlerde gözenekleri oluşturmakta yer almaktadır. Çözücü hacminin artırılması; moleküler baskılanmış polimerdeki gözeneklerin büyümesi ve gözenek hacminin artması, polimerde iyi bir akışın olmasına olanak vermektedir.

#### **2.2.2. Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulanma alanları**

Moleküler baskılanmış polimerler kendilerine özgü özelliklerinden dolayı; saflaştırma, sensörler, biyosensörler, kataliz ve ilaç dağıtımı olmak üzere farklı alanlar için oldukça ilginç araçlar haline gelmiştir.

MIP'lerin en yaygın kullanım alanlarından biri kromatografik ayırma işlemidir. Burada istenilen moleküle seçicilik gösteren ve yüksek affiniteye sahip spesifik olarak tasarlanmış destek polimer hazırlanarak kromatografik ayırma işlemi gerçekleştirilmektedir. Moleküler baskılama kromatografisinin kullanım nedenleri; istenilen moleküle karşı yüksek seçicilik göstermesi, maliyetinin düşük olması ve depolama ömrünün uzunluğudur [125].

Kimyasal veya biyosensörün görevi; bir tanıma elemanının, bir dönüştürücü ile birleşmesi sonucunda meydana gelen değişimi, ölçülebilir bir sinyale dönüştürmektir. Sensörlerdeki biyomoleküllerin çoğu zayıf kimyasal ve fiziksel kararlılık gösterir, bu nedenle yapay reseptörlere karşı duyulan ilgi giderek artmaktadır. Moleküler baskılayıcı polimerler, yüksek sıcaklık, basınç, pH

değişimlerine karşı dirençli ve seçicilikte yüksek tanıma bölgelerine sahip olmaları nedeniyle tercih edilmektedir [127,128].

Moleküler baskılanmış polimerler, ilaç (antibiyotik) molekülleri ile etkileşim için oldukça fazla bölgeye sahip olduklarından çokça bellek oluşturma yeteneğine sahiptirler. MIPnp'ler, hedef molekülleri uzun süre tutabilme kapasitelerinden dolayı ilacın salınımını yavaşlatıp, vücuttaki yarılanma süresini artırabilirler ve ilacın zararlı yan etkilerini olabildiğince azaltabilirler. Bu yüzden kontrollü ilaç salım sistemlerinde bu malzemeler önemli avantajlar sağlamaktadırlar [129].

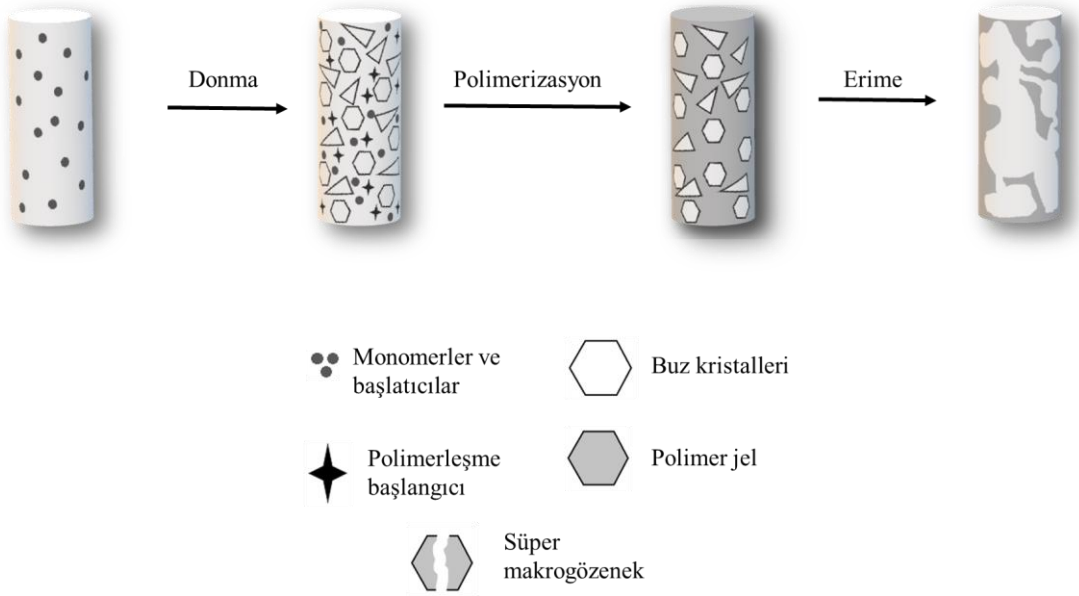
Enzimler, substratlarına karşı özgül ve uygun koşullarda tepkimelerin hızını artırmaktadırlar. Enzimler ortamdaki organik çözücüler, pH ve sıcaklık gibi faktörlerden etkilenmektedir. Enzim benzeri moleküler baskılanmış polimerler, yüksek sıcaklık, basınç, pH değişikliklerine karşı kararlı olmaları ve birçok organik çözeltilinin bulunduğu ortamda kullanılmaları ayrıca hedef moleküle (substrat) seçicilik göstermeleri ve tepkimeleri hızlandırmaları gibi özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir [130].

### **2.3. Kriyojeller**

Kriyojeller, donma sıcaklığının altındaki derecelerde süper makrogözenekler oluşturan üç boyutlu hidrojel matrisleridir. Kriyojel terimi ilk defa Vladimir I. Lozinsky tarafından 1980'lerin başında, dondurulmuş ortamda oluşan polimerik jelleri tanımlamak için kullanılmıştır. Kriyojel kelimesindeki kriyo, Yunancada don/buz anlamına gelmekte olup, sonuna eklenen jel kelimesiyle polimerik jellerin nasıl oluşturulduğu ifade edilmektedir [131].

Kriyojeller genellikle -5 ile -20°C arasındaki sıcaklıklarda hazırlanmaktadır. Monomer çapraz bağlayıcılar ve başlatıcılar, yani jel öncülleri içeren çözelti dondurulur. Reaksiyon karışımı donarken iki ana kısımdan oluşur; buz kristalleri ve buz kristalleri arasında donmamış mikrofaz sıvı kısım. Kimyasal reaksiyon bu donmamış sıvı mikrofazda gerçekleşmektedir. Buz kristalleri donma sırasında

büyümeye devam eder ve birbirine bağlı buz kristallerinden oluşan donmuş tam bir çerçeve oluşturur. Uygun jelleşme süresi sonunda, oda sıcaklığına getirilen kriyojeldeki buz kristalleri erir ve birbirine bağlı makro gözenekli polimer ağ içeren bir matris elde edilir [15] (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Kriyojel şeması

Makro gözeneklerin, şeklinin ve boyutunun buz kristalleri belirlediği için ekstra bir gözenek yapıcı maddeye ihtiyaç duyulmamaktadır [132]. Buz kristallerinin boyutu, kriyolleşme için seçilen sıcaklığa ve ısının aktarım hızına bağlıdır. Yavaş soğutma ile az sayıda büyük gözenekli kriyojeller elde edilirken, hızlı soğutma ile çok sayıda küçük gözenekli kriyojeller elde edilir [133]. Kriyojeller geniş gözenek özellikleri sayesinde, hücre artıkları ve kan hücreleri gibi büyük parçaların tıkanmaya neden olmadan, kriyojelden geçmesine izin vermektedir. Ancak geniş gözenek boyutuna sahip olan matrislerin düşük yüzey alanı olur ve bu da düşük miktarda ligand immobilizasyonu yapılmasına yol açar [134]. Makro gözenekli yapıları ile kriyojeller çok düşük bir akış direnci sergiler, bu nedenle geleneksel afinite bazlı ortamlara iyi bir alternatiftirler. Kriyojel oluşumunun sıfırın altındaki sıcaklıklarda gerçekleşmesi, biyomoleküllerin konformasyonel değişimlerini engeller ve yüksek seçicilikle kaviteler oluşmasına olanak sağlar [135] Kriyojeller ile diğer makro gözenekli malzemeler arasındaki en önemli fark, kriyojellerin genellikle ciddi deformasyonlarda (basınç, sıcaklık, pH) bile, çok güçlü ve oldukça

elastik malzemeler olmalarıdır. Bu malzemeler, gözenekli yapıya ciddi bir zarar vermeden, hacminin en az %50'si kadarını sıkıştırılabilirler [136].

Kriyojeller, elastik gözenek duvarları sayesinde gözenek yapısında herhangi bir hasar olmadan çok hızlı bir şekilde kurutulabilirler. Kriyojeller sulu çözeltilere maruz kaldıklarında, sıvı ortamla temas ettikten birkaç saniye sonra yeniden şişebilirler. Bu sayede bu malzemeler, performanslarında herhangi bir değişiklik olmaksızın uzun süre saklanabilmektedir. Kriyojellerin genel yapısının oluşumunda birçok parametre yer almaktadır. Kriyojellerin gözenek boyutu, gözenek duvarı kalınlığı ve gözenek dağılımı; polimer öncülleri, monomer, çözücü miktarı, çapraz-bağlayıcı, iyonik şiddet ve pH'sı, ortamı soğutma oranı ve hızı, gibi faktörlerden etkilenmektedir [137].

### **2.3.1. Kriyojellerin uygulanma alanları**

Kriyojellerin belli başlı uygulama alanları; enzimler, polisakkaritler, proteinler, antikolar gibi biyomoleküllerin immobilizasyonu, virüs, mikroorganizma ve memeli hücrelerinin kromatografik olarak ayrılması; karmaşık ortamlardan hedef moleküllerin yakalanması ve çevresel süreçler için ayrılmasıdır.

Kriyojellerin elastik yapıda ve yüksek mekanik baskılara karşı kararlı olmaları yanı sıra gözenekli yapıları, hücre immobilizasyonu için matris olarak kullanılmasına olanak vermektedir. Kriyojellerin, gözenek boyutuna ve immobilize hücre biyokatalizörlerinin potansiyel uygulamalarına bağlı olarak, hücre immobilizasyonu için iki ana yaklaşım vardır; kriyojellerde mekanik tutulma yoluyla immobilizasyon ve spesifik etkileşimler veya adsorpsiyon yoluyla kriyojeller içindeki gözenek yüzeylerine immobilizasyondur [138].

Kriyojellerin birbiriyle bağlantılı makro gözenekleri olması, sıvı akışında düşük direnç sağlamaktadır. Bu özellikleri kriyojellerin bazı biyomoleküllerin kromatografik ayrımında kolon olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Kriyojellerin, biyomoleküllerin spesifik adsorpsiyonuna dayalı olarak,



mitokondrilerin, virüslerin, mikroorganizmaların ve memeli hücrelerinin kromatografik olarak ayrılmasında etkili bir destek sağladığı gösterilmiştir [139–141].

Kriyojellerin süngerimsi morfolojileri, elastikiyetleri ve makro gözenekleri etkin difüzyon akışına ve hızlı tepki verebilmelerine imkan sağlamaktadır. Kriyojeller bu özellikleriyle, ortamdan ağır metallerin ve bazı toksik maddelerin uzaklaştırılması gibi çevre uygulamalarında da kullanılmaktadır [15].

#### **2.4. Moleküler baskılanmış kriyojel**

Makro gözenekli yapıya sahip olan moleküler baskılanmış kriyojeller ile, istenen molekülün tamamlayıcısı olan geometrik ve kimyasal spesifik bağlanma bölgeleri oluşturulabilir. İstenilen molekül ile fonksiyonel monomer arasında, genellikle kovalent olmayan etkileşimler yoluyla ön-kompleks oluşmaktadır. Uygun bir çapraz bağlayıcı varlığında ön-kompleks polimerize edilir ve daha sonra istenen molekül ortamdan uzaklaştırılır. Böylece istenen moleküle özgül boşluklara sahip birbirine bağlı bir makro gözenekli ağ elde edilir [122].

Moleküler baskılanmış polimerler, moleküler tanıma yeteneğine sahip olmaları, kolay hazırlanmaları, kararlı yapıları ve tekrarlanabilir olmalarından dolayı, ayırma ve saflaştırma alanında uygulanabilirler. MIP'ler, istenen moleküllere karşı yüksek seçicilik ve özgüllük sergiler. Bu nedenle, istenen moleküllerin ayrılması ve saflaştırılmasında analitik biyolojik ayırmalarda yaygın olarak kullanılırlar.

Moleküler baskılamada düşük molekül ağırlığına sahip hedef moleküler ortamdan uzaklaştırıldığında oluşan boşlukların korunması için yüksek oranda çapraz bağlayıcılar kullanılır. Büyük moleküler ağırlığına sahip hedef moleküllerin, polimerden zor uzaklaştırılması ve bağlanma bölgelerinin kısıtlı erişimi nedeniyle, moleküler baskılanmış polimerlerde kullanımları sınırlıdır [142]. Bu sorunlar kriyojellerin moleküler baskılama teknolojisi için uygun destek malzeme olarak kullanımı ile giderilebilmektedir. Geleneksel protein bağlama matrislerine karşı,

süper makro gözenekli kriyojellerin, büyük gözeneklere sahip olmaları, kısa difüzyon yolu, adsorpsiyon ve elüsyonda çok kısa kalmaları gibi avantajları vardır. Ayrıca, sıfırın altındaki sıcaklıklarda polimerizasyon, proteinin yüksek seçicilikte boşluklara yeniden bağlanmasına yol açan konformasyonel değişikliklerden korunmasını sağlamaktadır [143].

Kriyojeller, moleküler baskılama teknolojisi için uygun destek malzemeleridir [143]. Polimerik destek malzemesi olarak kriyojellerin kullanıldığı moleküler baskıya dayalı birçok ayırma çalışması vardır [144–146]. Kriyojellerin avantajları, moleküler baskılama tekniği ile birleştirildiğinde, hedef molekülün tek adımda oldukça seçici bir şekilde ayrılması sağlamaktadır.

#### **2.4.1. Moleküler baskılanmış kriyojel karakterizasyonu**

Moleküler baskılanmış polimerlerin yüzey morfolojileri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile araştırılır. Brunauer–Emmett–Teller (BET) analizi yöntemi kullanılarak, polimerlerin spesifik yüzey alanları ve gözenek boyutları ölçülebilir. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), polimer bileşiminin kimyasal yapısı hakkında bilgi verir. FTIR; fonksiyonel grupları değerlendirmek amacıyla, polimere ilave edilmeden önce polimer ile fonksiyonel monomer arasında azalan veya yok olan spektrumların, karşılaştırılmasıyla moleküler baskılanmış polimerlerin karakterizasyonunda kullanılmıştır. Moleküler baskılanmış kriyojel ile molekülü arasında oluşan etkileşimlerin belirlenmesi ve moleküler baskılanmış kolon kromatografisinin özelliklerinin anlaşılması için Langmuir ve Freundlich absorpsiyon modellerinden yararlanmak mümkündür.

### **2.5. Deneyde kullanılan tarım zararlılarının genel özellikleri**

#### **2.5.1. *Galleria mellonella***

*Galleria mellonella* (Büyük Balmumu Güvesi), Lepidoptera takımı, Pyralidae familyasının bir üyesidir. Büyük balmumu güvesi ilk kez Asya'da *Apis cerana* bal arısı kolonilerinde tespit edilmiştir. Büyük balmumu güvesinin coğrafik dağılımı, bal arıları ile paralellik göstermektedir. *G. mellonella* rakımın düşük olduğu, ılıman

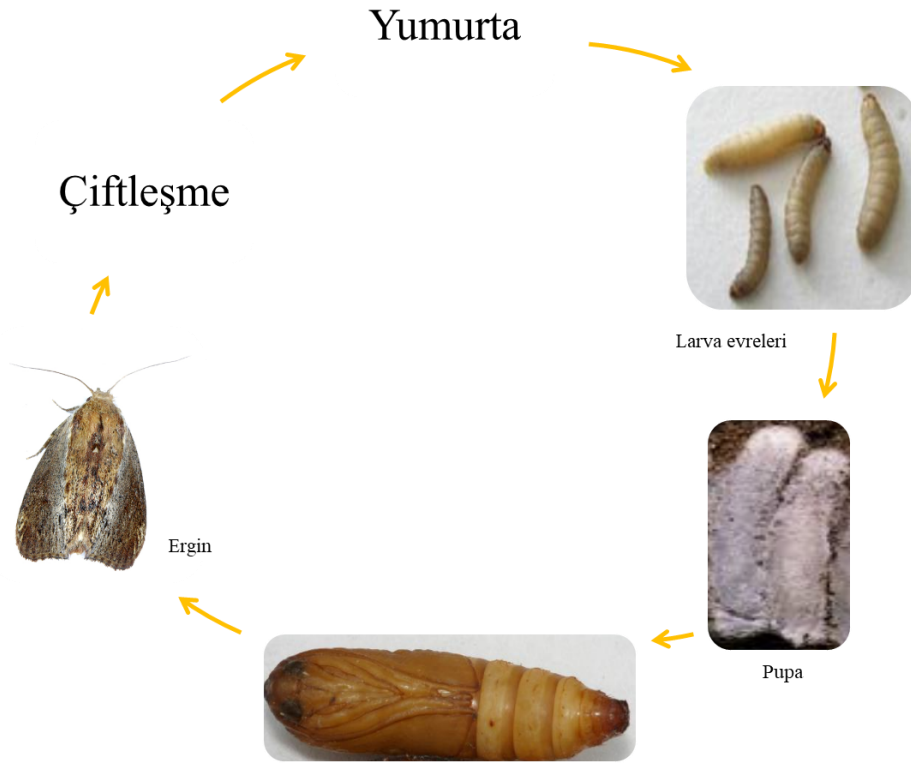
iklim kuşağında yaygın olaral görürürken, soğuk iklim bölgelerinde sınırlı dağılım göstermektedir. Günümüzde *G. mellonella*, Kuzey Afrika, Büyük Britanya, Avrupa'nın bazı bölgeleri, Kuzey Amerika ve Yeni Zelanda'ya kadar yayılım göstermektedir [147].

Büyük balmumu güvesi, tipik bir holometabol böcektir. Yaşam evresini yumurta, larva, pupa ve yetişkin olmak üzere dört farklı şekilde tamamlar. *G. mellonella*'nın yaşam döngüsünü tamamlaması için geçen süre abiyotik ve biyotik faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Biyotik faktörler, güvenin besine ulaşabilmesi ve kannibalizm davranışıdır. Sıcaklık ve bağıl nem gibi abiyotik faktörlerin, güvenin yaşam döngüsü üzerinde önemli etkileri vardır. Güvenin gelişimi için optimum sıcaklık aralığı 29-33°C'dir. Bu sıcaklıkta böcek yaşam döngüsünü 6-8 haftada tamamlamaktadır. Büyük balmumu güvesi yılda 4-6 döl vermektedir. Genç dişi büyük balmumu güvesi yumurtaları 25°C'de, 5 ile 9 gün arasında açılırken, yaşlı güvelerin yumurtaları 8 ile 17 gün arasında açılmaktadır. Yeterli besin varlığında ve 30°C'de yumurtaların açılması, larva gelişimi 3-5 gün sürmektedir [148].

*G. mellonella* noktürnal bir böcek olduğu için en yoğun aktiviteyi 18:00-24:00 saatleri arasında göstermektedir. Dişi ve erkek güveler çiftleşmek için hava kararmaya başladığında kovana yakın ağaçlara yönelmektedirler. Çoğu güveden farklı olarak, *G. mellonella* yetişkinleri farklı bir çiftleşme davranışına sahiptir. Erkek güveler, dişilerini iki bileşenli bir feromonla ve 75 kHz frekansında kısa ses dalgaları yayarak cezbederler. Erkek büyük balmumu güveleri bu akustik sinyali kanatlarını kullanarak vermektedir. Dişi güveler bu sinyali kanatlarını havalandırarak cevaplar. Dişi kanat hareketlerine tepki olarak, erkekler tarafından seks feromonları salgılanır ve çiftleşme gerçekleşmektedir [149,150].

*G. mellonella* dişileri hava karardıktan sonra arı kovanlarına yumurtalarını bırakırlar [151,152]. Dişi güvelerin kovan içindeki küçük çatlaklara veya yarıklara 50-150'lik kümeler halinde yumurta bırakması, yumurtaların fark edilme olasılığını azalmaktadır [153]. *G. mellonella* yumurtaları beyazımsı ya da krem renkte olup,

yaklaşık 0.44 mm uzunluğunda ve 0.35 mm çapındadır [148]. Yumurtaların açılması 5-10 gün sürer, düşük sıcaklıklarda bu süre 30 güne kadar çıkabilmektedir [154]. Birinci evre *G. mellonella* larvaları, beyaz renkte ve yaklaşık 1.27 mm uzunluğundadır. Larva gömlek değiştirdikçe rengi grimsi beyaza doğru değişmektedir [150]. Yumurtadan çıktıktan sonra, çatlak ve yarıklardan kovana giren *G. mellonella* larvaları balmumu, bal, polen ve arı larva deri döküntülerini içeren peteklerle beslenmektedir [155].



**Şekil 2.5.** Büyük balmumu güverisinin yaşam döngüsü (Fotograf: Meltem ULUSOY 2015).

Büyük balmumu güvesinin larvaları, arı kurtçukları ve polen içeren eski peteklerde daha hızlı büyürken, yeni peteklerde daha yavaş büyümektedirler [150]. Büyük balmumu güvesi larvaları büyüme dönemlerinde, ipeğimsi ağ gibi bir salgıyla peteklerin üzerini kapatırken, diğer yandan galeriler açarak bal mumunu kullanılmaz hale getirmektedir. Larvaların açtıkları tüneller ve oyuklardan dışarıya bal sızmaktadır. Son larva aşamasında böcek beslenmeyi bırakarak, bağırsaklarını boşaltmakta prepupa evresine geçmektedir. Daha sonra etrafını bir koza örerek pupa evresine girmektedir. Pupa evresi 1-9 hafta

sürmektedir. Pupanın rengi başta beyaz (pupasyondan hemen sonra) olup, 4 gün sonra sarı ve kahverengiye sonrasında ise kahverengiden koyu kahverengiye doğru değişmektedir. Bal mumu güvesi erginlerinin pupadan çıkışları akşam geç saatlerde gözlenmiştir. Pupadan çıktıktan sonra erginler, kanatları tamamen açılıp sertleşene kadar hareketsiz kalmaktadır. Güvelerin rengi önce kremi beyaz daha sonra griye dönmektedir [156]. Erginler, ağız parçaları dejenere olduğu için beslenemez ve bu yüzden ortam koşullarına bağlı olarak 7-30 gün yaşayabilir [157].

Büyük balmumu güvesi larvaları beslenirken petek taraklarında tüneller oluştururlar. Larvaların, altıgen hücrelerin duvarında ve tarak yüzeyinde tüneller oluşturması ve bu tünellerin iç yüzeyinin sentezledikleri ipeksi ağlarla kaplı olması, kovanda hasara neden olmaktadır [156]. Bal kaybı yanısıra, petekten çıkmaya hazır olan bal arılarının çıkmasını engeller ve bu da arı ölümlerine neden olur [16]. Kovanda büyük ölçekte *G. mellonella* istilası olması genellikle arı kolonisi kayıplarına yol açmaktadır. Ayrıca büyük balmumu güvesinin ergin ve larvaları patojen vektör taşıyabilmektedirler. Larvaların dışkılarında *Paenibacillus* sporları [158], İsrail akut felç virüsü (IAPV) ve kara kraliçe hücre virüsü (BQCV) taşıdıkları tespit edilmiştir [159]. Büyük balmumu güvesi bazı durumlarda bal peteklerine zarar vererek koloniyi küçültüp, arıcılık sektöründe %60-70'e ulaşan ekonomik kayıplara neden olabilmektedir [17].

Lepidoptera larvalarına karşı yapılan kimyasal mücadelenin neden olduğu çevre kirliliği ve ekolojik dengenin bozulması sorunları yanında getirdiği ekonomik yük bu zararlılarla yapılan mücadelede biyolojik mücadele çalışmalarını ön plana çıkarmıştır. Büyük balmumu güvesi ile mücadelede en etkili yöntemlerden biri sanistasyonunu sağlamaktır. Bal arısı kolonisinde kovandaki çatlak ve yarıklar kapatılarak koloni güçlü tutulmalıdır. Büyük balmumu güvesi istilasını belirtileri olan ipeksi ağ yapı ve petekte tüneller görüldüğünde, petekler imha edilmelidir [147]. Bal, polen, balmumu gibi arı ürünleri için uygun bir depolama sistemi kurulmalı ve zararlı ve hastalıklara karşı korunmalıdır. Arı kolonisinin güçlü

olması sağlanarak *G. mellonella* ile mücadele edilebilir, çünkü arılar zararlı güvenin kovana girmesini ve kovanda çoğalmasını engeller.

Arı peteklerini, *G. mellonella*'nın tolerans göstereceği sıcaklığın altında ya da üstündeki sıcaklıklara maruz bırakmak, büyük balmumu güvesinin yaşam döngüsünü kesintiye uğratabilmektedir. *G. mellonella* belirtilerini gösteren taraklar, 1-4 saat 45-80°C sıcaklığa maruz bırakılarak ya da 3-5 saat sıcak suya bekletilerek mücadele edilebilmektedir. Büyük balmumu güvesinin büyümesi ve gelişmesi sıcaklık ve çevresel faktörlere bağlı olduğundan, bu tekniklerin kullanılması avantajlıdır [147]. Ancak büyük balmumu güvesini öldürmek için yüksek sıcaklık (45° ve üstü) uygulanması, arıların zarar görmesine, balmumunun erimesine ve petek gözlerinin deforme olarak tekrar kullanılamaz hale gelmesine neden olmaktadır [160]. *G. mellonella* ile enfekte petekler, -7°C'de 4.5 saat, 12°C'de 3 saat ve -15°C'de 2 saat tutulduğunda, petekler balmumu güvesinden temizlenmektedir [155,160,161].

Büyük balmumu güvesi ile mücadelede, hava geçirmez ortamda saklanan taraklara, gaz halde kimyasal maddeler (fumigant) de verilerek mücadele edilmektedir. Kimyasal fumigant olarak kükürt, asetik asit, etilen bromür, kalsiyum siyanür, metil bromür, fosfin, paradiklorobenzen (PDB) naftalin ve karbon dioksit kullanılabilir. PDB hariç, tüm fumigantlar büyük balmumu güvesinin yaşam evrelerinin tümü üzerinde etkili olmaktadır [162]. Ancak, karbondioksit hariç diğer fumigantlar insan sağlığı için risk oluşturmakta, bal ve diğer arı ürünlerinde kalıntıya neden olarak bu ürünleri tüketilemez hale getirmektedir [147,155]. *G. mellonella* mücadelesinde kullanılan başka bir yöntem ise, feromon tuzaklarıdır. Erkek büyük balmumu güveleri tarafından üretilen ve iki aldehit (nonanal ve undekanal) karışımından meydana gelen seks feromonu dişiler üzerinde çekici özellik yaratmaktadır [163].

Büyük balmumu güvesi ile mücadelede kimyasalların kullanılması, arılarda zarara, balmumu gibi arı ürünlerinde kalıntıya neden olduğu için önerilmez. Bu nedenle biyolojik kontrol ajanları kullanılması önemli alternatif mücadele yöntemidir. *G. mellonella* ile enfekte olmuş taraklar kovandan izole edilir ve

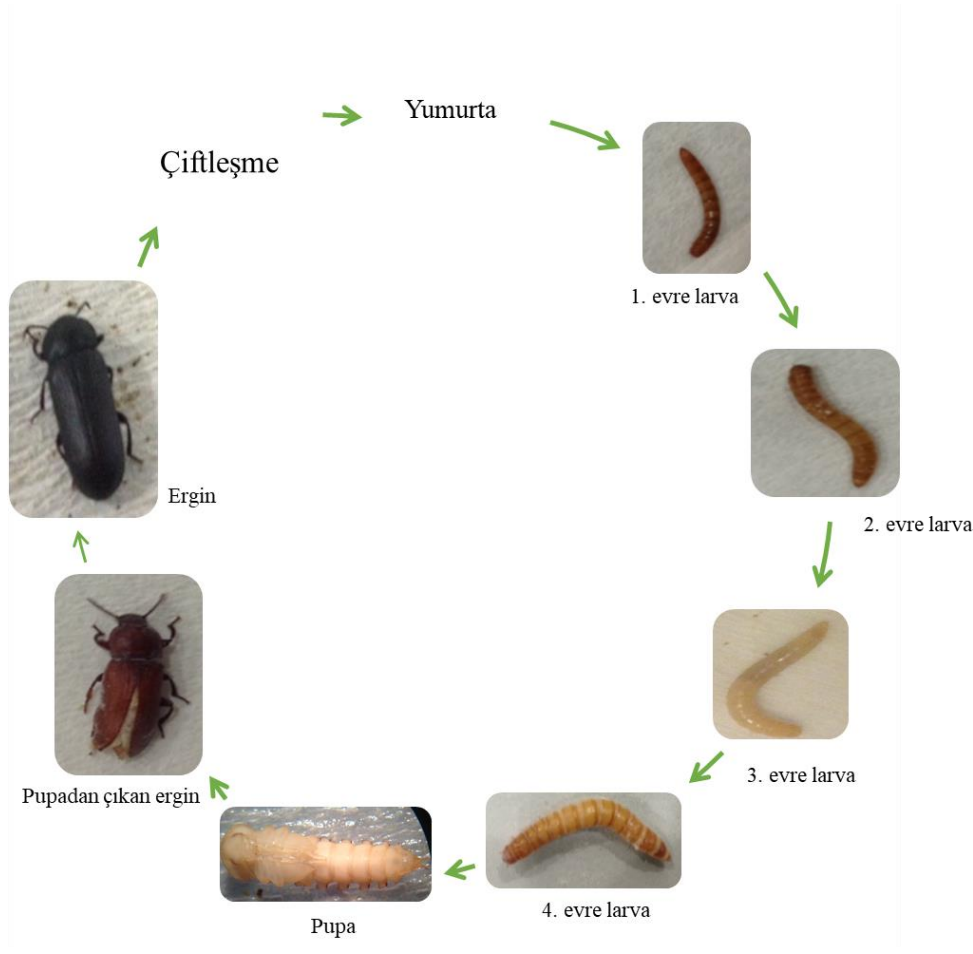
*Bacillus thuringiensis* spor süspansiyonuna daldırılır veya güve kovandayken spor süspansiyonu püskürtülerek biyolojik mücadele yapılabilir [164]. Entomopatojen fungus olan *B. bassiana* ve *M. anisopliae* sporları da *Galleria mellonella* ile mücadelesinde kullanılabilir [165,166].

*Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae), larval gelişimini *G. mellonella* dahil Lepidoptera takımında yer alan böcekler üzerinde tamamlayan, larva ektoparazitoitidir. *B. hebetor* gelişimini hızlı ve kısa süre içinde tamamladığı için depo zararlıları ile mücadelede önemlidir *Bracon hebetor* yumurtalarını bırakmadan önce *G. mellonella* larvalarını kalıcı felç etmesi parazitoitin başarısını arttırmaktadır [167].

### **2.5.2. *Tenebrio molitor***

*Tenebrio molitor* (sarı un kurdu) Coleoptera takımında Tenebrionidae familyasında yer almaktadır. *Tenebrio molitor*, tahıl, un, kepek ve makarna depolarında görülen önemli bir depo zararlısıdır [168]. Un kurdu ayrıca *Triticum aestivum* (L.) (Poales: Poaceae), *Glycine max* (L.) (Fabales: Fabaceae) ve *Zea mays* (L.) (Poales: Poaceae) 'nin kırık tanelerine de bulaşarak zarar verebilmektedir [169–171].

*T. molitor* üründe ağırlık kayıplarına, bıraktığı gömlek kalıntıları ve pisliklerle de nitelik kayıplarına neden olmaktadır [19]. Dişi un kurtları, saklama kaplarının alt kısmına ya da duvarlarına ortalama 250-500 yumurta bırakabilmektedirler. Yumurtalar, 26-30°C sıcaklık aralığında 4 günde, 15°C'de 34 günde açılabilir. Larva süreci optimum koşullarda 112-203 gün arasında değişmektedir [172]. Larvalar koyu sarı renkte olup, kahverengi bantlı segmentli yapıdadır. Un kurdu pupasının baş kısmı geniş, kuyruk kısmı ise sivri ve hareketlidir. Pupa evresi 25°C'de 7 ile 9 gün sürer, sıcaklık düştüğünde bu süre uzamaktadır. Ergin un kurdu 2 ile 3 ay yaşamakta ve başlangıçta kahverengi olan rengi daha sonra siyaha dönüşmektedir [173].



**Şekil 2.6.** Sarı un kurdunun yaşam döngüsü (Fotoğraflar: Meltem ULUSOY, 2015).

Depo zararlısı olan *T. molitor* 'un tahıl ve kepekte bıraktığı gömlek kalıntısı ve pislikler, salgıladıkları maddeler ve sebep oldukları saprofitik mikroorganizma kontaminasyonları, gıdada kalite kaybına neden olabilmektedir [174]. Bu böcek, Dünya çapında tahıl ve un üretiminde %15'e varan kayıplara neden olmaktadır [175]. *T. molitor* ile mücadelede fiziksel mücadele ve fümigasyon ile kimyasal mücadele uygulanmaktadır. Ancak insektisitler, böceğin direnç geliştirmesine neden olmaları ve gıdada kalıntı bırakmaları yüzünden sınırlı olarak uygulanmaktadır [168,176].

Un kurdu ile kimyasal mücadele, kimyasalların kalıntı bırakması, böceklerin direnç geliştirmesi gibi nedenlerden dolayı kısıtlıdır. Böceğin kimyasal mücadelesinde fosfin kullanılabilir, ama un kurdu, birkaç jenerasyon sonrası bu



maddeye karşı direnç geliştirebilmektedir. Fumigantlar ise *T. molitor* yumurtaları üzerinde etkisizdir [174,177].

Bitki esansiyel yağları (EO), insektisidal etki göstermelerinin yanı sıra, insanlar için toksik olmamaları ve çevreyi olumsuz etkilememeleri nedeniyle, depo zararlıları ile mücadelede kullanılabilir. Esansiyel yağlar; alkaloidler, amidler, kalkanlar, fenoller, flavonlar, lignanlar, neolignanlar veya kawapironları içeren bitki sekonder metabolitleridir. Bu yağların zararlı böceklere karşı uzaklaştırıcı, beslenmeyi engelleyici, gelişme ve çoğalmayı önleyici etkileri olduğu bulunmuştur [168,174,178,179]. Yapılan çalışmalarda, *T. molitor'* a karşı *Cymbopogon citratus*, *Citrus limonum*, *Muristica fragrans*, *Litsea cubeba*, [177], *Origanum vulgare* ve *Carum carvi* esansiyel yağları kullanılmış, başarılı oldukları görülmüştür [168,179].

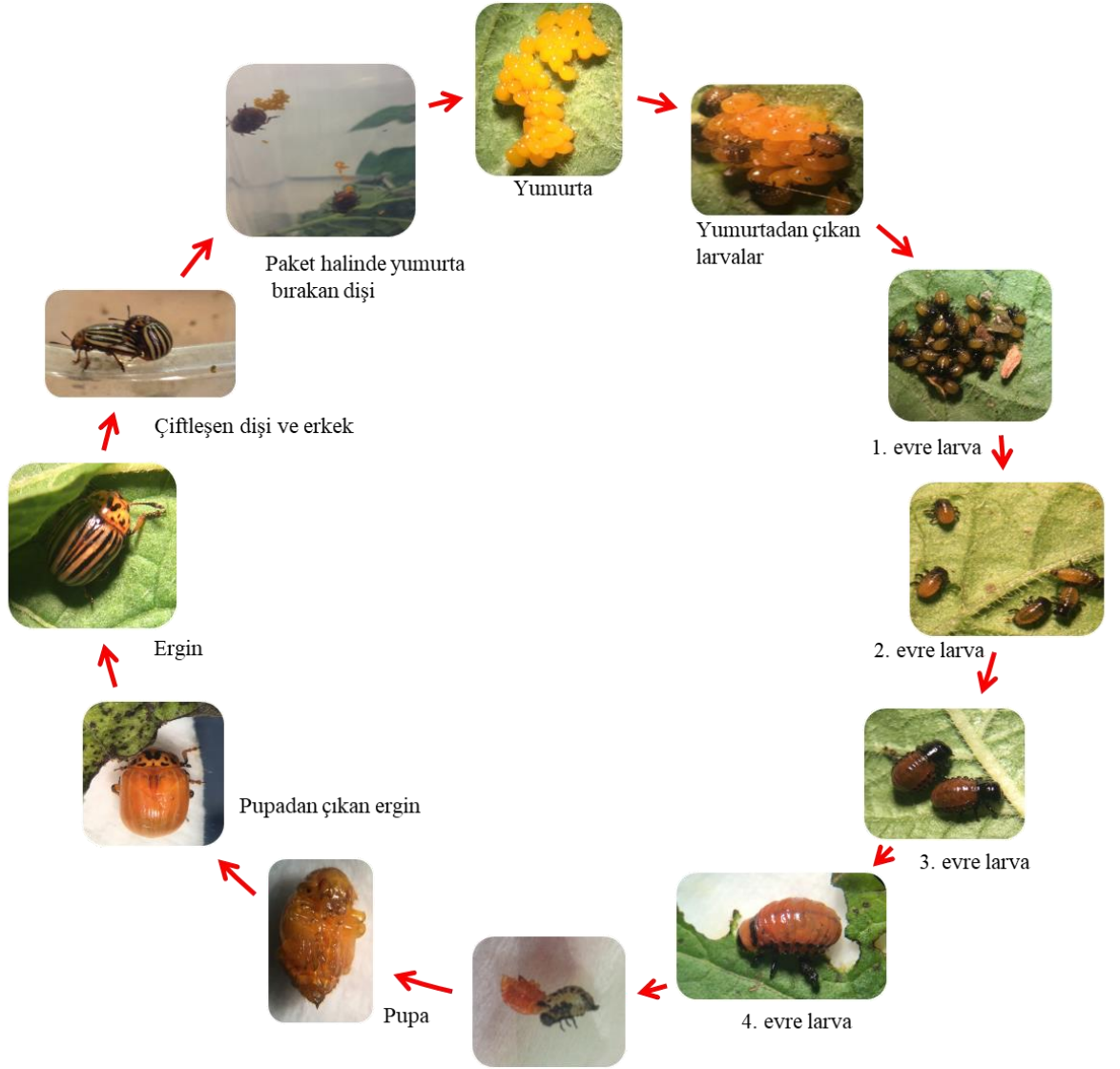
### **2.5.3. *Leptinotarsa decemlineata***

*Leptinotarsa decemlineata* (Colorado Patates Böceği), Chrysomelidae familyasının bir üyesidir. Colorado Patates Böceği (CPB), *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae), Orta Meksika kökenli Kuzey Amerika'ya özgü bir böcektir. Başlarda buffalobur (*Solanum rostratum*) gibi birkaç yabani bitkiyle beslendiği bilinirken, günümüzde patates (*Solanum tuberosum* L.) başta olmak üzere, lahana (*Brassica oleracea* L.), biber (*Piper nigrum* L.), tütün (*Nicotiana tabacum* L.), patlıcan (*Solanum melongena*) ve domates (*Solanum lycopersicum* L.) gibi önemli tarım ürünleriyle de beslenmektedir [180,181]. Ayrıca sığırkuyruğu (*Verbascum thapsus* L.), devedikeni (*Cirsium vulgare* (Savi) Ten.), karahindiba (*Hyoscyamus niger* L.), belladonna (*Atropa belladonna* L.) ve ısırgan otu (*Solanum carolinense* L.) gibi çok çeşitli yabani otlarla da beslenebilmektedir [182].

Colorado patates böceği ilk kez 1811 yılında Thomas Nuttal tarafından *Solanum rostratum* bitkisi üzerinden toplanmış ve bilimsel sınıflandırılması yapılmıştır [183]. Tarihteki ilk ciddi *L. decemlineata* salgını 1859 yılında Nebraska' da

görülmüştür [8]. CPB, Avrupa'da ilk kez 1875 yılında İngiltere'de görülmüş, daha sonra Almanya'ya ve buradan da tüm Avrupa kıtasına yayılmıştır. *L. decemlineata* Türkiye'de ilk kez 1963 yılında Edirne'de saptanmıştır [184]. Patates böceği günümüzde Avrupa kıtası, Batı Çin, ve Orta Asya ve İran'a kadar geniş bir coğrafyaya dağılmıştır. Böceğin dağılımında, daha çok insan hareketleri yoluyla olmuştur [183].

Larva tipi kampodeid *L. decemlineata* larvalarının rengi turuncudan kırmızıya kadar değişir. Larvaların her segmentinde, iki sıra halinde siyah noktalar bulunmaktadır [185]. Patates böceğinin dört larva dönemi vardır. 1. ve 2. evre larvaları patates yaprağının epidermisi ile beslenirken, 3. ve 4. evre larvaları ise yaprağın tamamıyla beslenmektedir. Besinin az olduğu durumlarda larvalar kanabalizim davranışı göstermektedir. Optimum sıcaklıklarda larva gelişimi 7.1 günde tamamlanabilir [186]. 4. evre larva toprağa yönelir ve toprağı 1-14 cm kazarak burada pupa evresine geçer ve pupa 5-10 gün sonra ergine dönüşür. Ergin böcekler pupadan çıktıktan sonra, uçuş kaslarının gelişiminin tamamlanması için 5-10 gün beslenmelidir. *L. decemlineata* ergininin, boyu yaklaşık 10 mm eni 7 mm'dir. Kanadının üstünde beş adet siyah ve sarı çizgi bulunmaktadır. Dişi CPB'i yaprağın alt kısmına, genelde 25'li gruplar halinde yumurta bırakmaktadır. Her dişi toplamda 600'e yakın yumurta bırakmaktadır. Başlangıçta sarı renkte olan yumurta daha sonra açılmaya yakın, turuncu renge dönüşmektedir [180].



**Şekil 2.7.** Colorado patates böceğinin yaşam döngüsü (Fotoğraflar: Meltem ULUSOY, 2019).

Colorado patates böceğinin optimum gelişim gösterdiği sıcaklık, böceğin bulunduğu bölgeye göre değişiklik göstermekle birlikte 25–32°C arasındadır. Dişinin yumurta bırakmasını sıcaklık ve beslenme koşulları etkilemektedir. 20°C'nin altındaki sıcaklıklarda dişi yumurta bırakmaz, 32°C'nin üstündeki sıcaklıklarda dişi böceğin doğurganlığı önemli ölçüde azalmaktadır [187]. Sıcaklığa bağlı olarak, yumurtadan ergine kadar olan gelişim süresi 14-56 gün sürmektedir. CPB larvalarında termoregülasyon davranışı görülmektedir. Böcek sıcaklığı artmasıyla, bitkinin alt yapraklarına doğru, sıcaklık azalmasıyla ise üst yapraklarına doğru hareket etmektedir [188].

Diyapoz, CPB'nin çevreye adaptasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Böceğin diyapoza girebilmesi, patates bitkisi için önemli bir zararlı haline gelmesine neden olmaktadır. Diyapoz CPB gelişimini olumsuz etkileyen sıcaklık düşmelerinde böceğin toprak altında kolonize olmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca, diyapoza giren böcekler, insektisit uygulaması gibi olumsuz durumlardan kaçarak, gelişimi için uygun koşulların varlığında tekrar ortaya çıkıp, popülasyonlarını muhafaza edebilirler [188].

Gün uzunluğunun kısalması, sıcaklığın düşmesi ve besinde nitelik kaybının olması böceğin diyapoz girmesini uyarmaktadır. Böceğin diyapoza girebilmesi için, toprağı 10-25 cm derinliğe kadar kazması, hayatta kalma olasılığını yükseltmektedir [189]. Diyapoz sıcaklığın 10°C'nin üstüne çıkmasıyla sonlandırılır. Erkek ve dişi patates böcekleri aynı anda diyapozdan çıkar ve konak bitkileri yeniden kolonize etmeden önce çiftleşmeye başlarlar. Dişi patates böceği çiftleşmek için eşey feromonu salgılaması, erkeğin dişiye yönelmesini sağlamaktadır. Dişi ve erkek böcekler birden fazla farklı partnerle çiftleşebilmektedir [190].

Patates bitkisi yapraklarında böceğin erginlerinin ve larvalarının neden olduğu hasar, genellikle yaprak üzerinde kenarlardan başlayarak, farklı boyutlarda meydana gelen delikler şeklinde olmaktadır. Böcek genellikle yaprak ayalarını yediği için, yaprağın damar ve sapı kalır, bunun sonucunda bitki yapraklarını döker [22]. Patates böceğinin ergini bir günde 10 cm<sup>2</sup> yaprak tüketirken, larvası bir günde 40 cm<sup>2</sup> yaprak tüketmektedir. CPB'nin 4. evre larvası, yaşamı boyunca tüketeceği bitki miktarının %75'ini tüketmektedir [186]. CPB tüm yaprakları tükettikten sonra, bitkinin gövdesini ve topraktan çıkarılmış yumru köklerini de yiyerek beslenmeye devam edebilir. Patates böceğinin çok fazla miktarda patates yaprağı tüketmesiyle bitkinin yumru üretimi önemli ölçüde azalır. Patates böceği ile mücadele edilmediğinde, böceklerin mahsulün tamamını yiyerek yok etmesi alışılmadık bir durum değildir (Şekil 2.8). Bununla birlikte, böceğin bitkiye yumru büyüme sonrasında hasar vermesi durumunda, yumru veriminde herhangi bir azalma olmamakta sadece bitkide önemli miktarda yaprak dökülmesi

gözlenmektedir. Böcek yoğunluğuna ve bitkinin bulunduğu gelişim dönemine bağlı olarak, bitki yapraklarında görülen %40'a varan azalmayı, ürün kaybı olmadan bitki tolere edebilmektedir. Patates bitkisinin yapraklarının %75'inden fazlasının CPB tarafından tahrip edilmesi durumunda patatesteki yumru üretiminde ciddi oranda kayıplar meydana gelmektedir [191]. Ancak yapılan bir çalışmada, sezonun orta dönemindeki 4-6 haftalık kısım hariç, patates bitkisi yapraklarının %70'inin böcek tarafından zarar görmesi durumunda patates veriminde %20 oranında bir azalmaya olurken, bitkinin tüm yapraklarını kaybetmesi durumunda patates veriminde %65 oranında kayıp olduğu gözlenmiştir [192].



**Şekil 2.8.** Colorado patates böceğinin, patates bitkisine verdiği hasar (Fotoğraf: Meltem ULUSOY, 2021)

Colorado patates böceği ile mücadele; kültürel uygulamaları, mekanik, fiziksel ve biyolojik mücadeleyi ve kimyasal pestisit kullanımını içermektedir.

Kültürel mücadele; en az hastalık ve zararlı baskısı sağlamak için uygun yer seçimi, ekim ve dikim zamanının belirlenmesi kültürel bakım yöntemleri, hasat ve depolanma koşullarının iyileştirilmesi şeklinde uygulanır. Patates hasadından sonra tarlanın patates yumrularından tamamen temizlenmesine özen

gösterilmelidir. CPB ile kültürel mücadele, tarlaya farklı tarım ürünlerinin ekilmesiyle ya da patates ekim tarihlerinin değiştirilmesiyle yapılabilmektedir. Patates bitkilerini ikinci nesil larvalardan korumak için ya ekim tarihlerinin değiştirilmesi ya da erken/geç olgunlaşan patates çeşitlerinin kullanılması önerilmektedir. İlkbaharda ekimin geç yapılması durumunda, kışı geçirmiş erginler çiftleşmeye başlamak için besin kaynağı bulamayacaklarından, yaz nesli erginleri daha geç ortaya çıkacaktır. Bu durumdaki yaz nesli erginleri, olgunluğa ulaştıklarında daha kısa bir fotoperiyot yaşayacaklar, böylece tarladaki ikinci nesil larva popülasyonu azalmış olacaktır [193].

Colorado patates böceğinin davranışı ve yaşam döngüsü göz önüne alınarak, böcek popülasyonunu kontrol etmek için çeşitli fiziksel ve mekanik mücadele yöntemleri geliştirilmiştir. Fiziksel mücadele yöntemlerinde, zararlı böceğin yaşadığı ortam koşulları, böceğin tarım ürününe zarar vermesini önleyecek şekilde değiştirilmektedir [194]. CPB ile fiziksel mücadele yöntemi olarak yüksek sıcaklık kullanılabilmektedir. 10 cm ya da daha kısa boya sahip genç patates bitkilerinin 175°C'lik ısı işlemini tolere edebildikleri gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada; patates böcekleri 75°C ile 200°C arasında sıcaklığa maruz bırakılmışlar ve bu sıcaklık aralığında, tüm larva evrelerinde %100 oranında ölüm gözlenmiştir. 150°C'nin üstündeki sıcaklıkta, 2 gün içerisinde CPB erginlerinin %75'inin öldüğü bulunmuştur [195]. Bu işlem, böceğin iki farklı döneminde; genç bitkilerin ısı işleme dayanıklı olduğu topraktan çıktığı dönem ile patates hasatının yakın olduğu dönemde uygulanabilir.

Günümüzde *L. decemlineata* ile mücadelede yoğun miktarda farklı pestisitlerin kullanılmasına rağmen her yıl patates mahsulünün yaklaşık %34'ü bu böcek tarafından tahrip edilmektedir [22]. CPB üzerinde birçok insektisit etkili olmuş ancak böcekler zamanla bu insektisitlere karşı dirençli hale gelmiştir. 1945 yılında sivrisinek ile mücadelede kullanılan DDT (dikloro difenil trikloroetan), *L. decemlineata* ile mücadelede de yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak 1952'de Long Island, New York'ta ticari patates tarlalarında DDT'ye karşı dirençli *L. decemlineata* popülasyonları tespit edilmiştir [196]. CPB karbamatlar,

piretroidler ve neonikotinoidler dahil çoğu insektisite karşı hızla direnç geliştirmiştir [196,197]. Son zamanlarda, *L. decemlineata'* nın yaklaşık 56'dan fazla insektisite karşı direnç geliştirdiği bilinmektedir [198], [199]. CPB'nin insektisitlere karşı direnç geliştirmesi; esteraz, karboksiesterazlar ve monooksijenazlar enzimlerinin olması, hedef bölgenin insektisite karşı özgülüğünün azalması, insektisit penetrasyonunu azaltan ve atılımını artıran mekanizmaların varlığı ile olmaktadır [197,200].

CPB popülasyonlarını kontrol etmek için çeşitli biyolojik ve biyoteknik yöntemler bulunmaktadır. CPB popülasyonlarını etkin bir şekilde kontrol edebilen entomopatojen organizmalar mevcuttur. Gram pozitif bakteri olan *Bacillus thuringiensis*; Lepidoptera, Diptera, Coleoptera sınıfına ait birçok böcek türüne karşı biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmaktadır. Bakterilerin sporlanması sırasında oluşan parasporal cisimciklerin içindeki bulunan insektisidal kristal proteinler (ICP), birçok tarım ve orman zararlısı için toksiktir [22,201,202]. *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* tarafından sentezlenen Cry3Aa proteini *L. decemlineata* üzerinde etkilidir. Bu maddenin zararlılığının özellikle erken larva döneminde, düzenli olarak uygulanması böcek popülasyonunu önemli oranda azaltmaktadır [203]. Biyolojik mücadelede kullanılan iki cins entomopatojen nematod (EPN) vardır; Steinernema ve Heterorhabditis. Entomopatojen nematodların etkinliğinden, mutualistik ilişki yaşadığı Xenorhabdus ve Photorhabdus cinsine ait bakteriler sorumludur. Entomopatojen nematod, patates böceğine girdikten sonra, böceğin ölümüne neden olan simbiyotik bakterileri serbest bırakmaktadır. Bu bakterilerin ürettiği endo ve ekzo toksinler böceğin ölümüne yol açmaktadır [204]. Çeşitli saha ve laboratuvar çalışmaları, EPN'lerin CPB kontrolünde etkili olduğunu göstermiştir [205–207]. *Myiopharus aberrans* (Townsend) ve *Myiopharus doryphorae* (Riley), *L. decemlineata'* ya özgü iki parazitik tachinid türüdür [208]. *Perillus bioculatus* patates böceğinin önemli bir yumurta ve larva predatörü olarak bilinmektedir [209]. Entomopatojen fungus *B. bassiana* ve *Metarhizium anisopliae* sporları, patates böceği tarafından yenilmeye gerek duymadan, böceği kütikula üzerinden enfekte edebilirler. Fungus sporları böceğin tüm gelişme evrelerinde enfeksiyona neden olabilmektedir [22].

RNA interferans (RNAi) patates böceği ile mücadelede kullanılan biyoteknik bir yöntemdir. RNAi; çift zincirli RNA'nın (dsRNA) hücreye girmesiyle, bu RNA'ya tamamlayıcı olan mRNA dizisinin parçalanmasını sağlayan, transkripsiyon sonrası bir gen susturma mekanizmasıdır. Çift zincirli RNA (dsRNA) böcekler tarafından yenildiğinde, hedef böcek geninin transkripti RNAi yoluyla susturulur. Böcekte belirli genlerin susturulması, böceğin büyümesini engeller, gelişimsel kusurlara ve mortaliteye neden olabilmektedir [210]. RNAi teknolojisinin en önemli avantajı, belirli bir geni hedef alması ve belirli bir böcek türü üzerinde etkili olmasıdır. Böceklerde bazı genlerin baskılanmasında RNA interferans (RNAi) için üç yolak vardır. Bunlar; small interfering RNA (siRNA), mikro RNA (miRNA) ve piwi-interacting RNA (piRNA)'dır [211]. Yapılan bir çalışmada, in vitro sentezlenen veya bakterilere eksprese edilen dsRNA ile *L. decemlineata* beslenmesinin böcek popülasyonuna etkisi araştırılmıştır. Colorado patates böceğine ait beş genin (aktin, vATPase A, B, E, Sec23 ve COP) susturulmasında RNAi yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada seçilen genler böceğin hücresel fizyolojik süreçleriyle ilgili olup bu genleri susturmak büyümeyi engelleyebilir ve ölüme neden olabilmektedir. Çalışmanın sonucunda CPB'lerin RNAi ile beş hedef geni başarılı bir şekilde susturulmuş, patates böceklerinin ağırlıklarında azalma ve ölüm gözlemlenmiştir [212].



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Deneysel kullanılan böceklerin laboratuvarında üretilmesi

##### 3.1.1. *Galleria mellonella* üretimi

Deneysel *G. mellonella* larva ve erginlerinin gelişimleri, üremeleri için yapay besiyeri içeren cam kavanozlarda, 27°C'de karanlık ortam sağlanmıştır. Belli aralıklarla cam kavanoz içinde bulunan besiyerleri değiştirilmiştir [23].

##### 3.1.2. *Tenebrio molitor* üretimi

*Tenebrio molitor* ergin ve larvaları buğday unu ve kepeği içeren 10x15x10cm ebatlarındaki plastik kapta üretilmiştir. Böcek popülasyonu için fotoperiyodunun 12 saat gündüz ve 12 saat gece (12:12) olarak sağlandığı 24°C sıcaklıktaki iklim dolabı kullanılmıştır. Besiyeri içine konulan su ile ıslatılmış pamuklar kullanılarak böceğin su ihtiyacı sağlanmış ve 2 günde bir pamuklar değiştirilmiştir [23].

##### 3.1.3. *Leptinotarsa decemlineata* üretimi

*Leptinotarsa decemlineata* larva ve erginleri 2019-2021 yıllarında Temmuz ayı içerisinde Ankara ili Ayaş ilçesine bağlı Feruz köyü patates tarlalarına yapılan arazi çalışması sırasında toplanmıştır. Ergin ve larvalar, 20 cm çapında, 14 cm yüksekliğinde hava sirkülasyonu için kapağı üzerine delikler açılmış plastik kaplara ayrı ayrı konulmuştur. Böcekler bu kaplarda, 16 saat gündüz ve 8 saat gece (16:8) fotoperiyodunun sağlandığı 24°C'deki iklim dolaplarına konulmuş, her gün yeni patates yaprağı verilerek beslenmiştir [213].

#### 3.2. Kullanılan kimyasallar ve besiyerleri

##### 3.2.1. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)

Fungusların üretimi için kullanılan genel bir besiyeridir.

### **3.2.2. Sabouraud Dekstroz Agar + Yeast Extract (SDAY)**

Fungusların spor üretimi için Sabouraud Dekstroz Agar (Sigma- Aldrich) ve %1 maya ekstraktı (yeast extract), besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri, 120°C'de 1 atm basınç altında 20 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır.

### **3.2.3. Tween 80**

Spor solüsyonlarının hazırlanmasında Tween 80 (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

### **3.2.4. Adamek's sıvı besiyeri**

Literatür araştırılması sonucunda, beauverisin üretiminde Adamek's sıvı besiyeri seçilmiştir. Adamek's besiyerinin 1 litresinde; 40 g glukoz, 40 g corn steep liquor, 30 g maya ekstraktı bulunmaktadır [214].

### **3.2.5. *Galleria mellonella* besiyeri**

*Galleria mellonella*' nın üretilmesi aşağıdaki yapay besiyeri kullanılmıştır.

- 660 g buğday un
- 660 g buğday kepeği
- 525 g bal mumu ya da petek
- 330 g bal
- 330 g süt tozu
- 330 ml gliserin
- 165 g maya

Bu maddeler kullanılarak, 3 kg *G. mellonella* yapay besiyeri hazırlanmıştır [23].

### **3.2.6. Moleküler baskılanmış ve baskılanmamış kriyojel kolon sentezinde kullanılan kimyasallar**

Beauverisin-baskılanmış (BEA-MIP) ve beauverisin baskılanmamış (NIP) kriyojel kolonun sentezinde, N,N-metilen bisakrilamid (MBAAM), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), L-triptofan metil ester, Hidrokinon, Metilen klorür (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), Trietilamin,

Metakriloil klorür, Amonyum persülfat (APS), N,N,N',N'-tetra-metil-etilendiamin (TEMED) ve Beauverisin (BEA) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Fungal örneklerin diyalizi için, SpectroPore diyaliz torbası (6-8 kDa) kullanılmıştır.

### **3.3. Beauverisin baskılanmış ve beauverisin baskılanmamış kriyojel kolon sentezlenmesi**

Fonsiyonel monomer olan N-metakriloil-(L)-triptofan (MATrp) sentezlenmesi için; 0.2 g hidrokinon ve 5 g L-triptofan metil ester 100 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> solüsyonu içinde çözdürülmüş ve çözelti 0°C'de soğutulmuştur. Çözeltiye 12.74 g trietilamin ilave edilmiş, daha sonra 5 mL metakriloil klorür, nitrojen atmosferinde yavaş yavaş eklenmiştir. Çözelti oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Reaksiyona girmeyen metakriloil klorür, %10'luk NaOH ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Sıvı faz rotary evaporatörde buharlaştırılmış ve MATrp etanol içinde kristalleştirilmiştir [215].

Beauverisinin saflaştırılmasında, moleküler baskılanmış kriyojel kolon kullanılmıştır. BEA baskılanmış kriyojel hazırlanmak için, ticari BEA (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. 5 mg BEA ve 20 µl N-metakriloil-L-triptofan metil esterinin (MaTrp) beherde çözdürülüp, bir gece manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Başka bir beherde 433 µl 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA), 94.3 mg N,N'-Metilen bisakrilamit (MBAA) ve 4.567 mL ultra saf su konulup, manyetik karıştırıcı ile çözdürülmüştür. Daha sonra, iki beher birbiri ile karıştırılmıştır. Daha sonra karışıma 8 mg amonyum persülfat (APS) ve son olarak 10 µL N,N,N,N-tetrametil etilendiamin (TEMED) eklenmiştir. Uç kısmı parafin ile kapatılan 2 ml'lik enjektörlere karışım konulmuştur. Enjektörlerin üstü kapatılıp, buz içinde -12°C'ye 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra kriyojel kolonlar -12°C'den çıkartılıp, ultra saf su ile yıkanmıştır. Kolondaki BEA'yı uzaklaştırmak 0.1 M NaOH ve 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi (desorpsiyon ajanı) ile gerçekleştirilmiştir.

BEA baskılanmamış kriyojel kolon hazırlanmıştır. 20 µl N-metakriloil-L-triptofan metil esterinin (MaTrp), 433 µl 2- Hidroksietil metakrilat (HEMA) behere eklenip,

manyetik karıştırıcıda çözelti karıştırılmıştır. 94.3 mg N,N'-Metilen bisakrilamit (MBAA) ve 4.567 mL ultra saf su farklı beherde içinde manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, çözdürülmüştür. Daha sonra, iki beher birbiriyle karıştırılmıştır. Karışıma 8 mg amonyum persülfat (APS) ve son olarak 10 µl N,N,N,N-tetrametil etilendiamin (TEMED) eklenmiştir. Uç kısmı parafin ile kapatılan 2 ml'lik enjektörlere karışım konulmuştur. Enjektörlerin üstü kapatılıp, buz içinde -12°C'ye 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra kriyojel kolonlar -12°C'den çıkartılıp, ultra saf su ile yıkanmıştır [146].

### **3.4. Kriyojel kolon karakterizasyonu**

BEA baskılanmış ve baskılanmamış kriyojel kolonların karakterizasyonu yapılmıştır:

#### **3.4.1. FTIR**

BEA-baskılı ve BEA-baskılanmamış kriyojellerin yapısı FTIR (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) kullanılarak incelenmiştir. Kriyojel kolon örnekleri analiz öncesi vakum etüvünde 24 saat bekletilerek kurutulmuştur. Numune probu için zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) polarizasyon ünitesi kullanılmıştır. Kuru kriyojel kolon örnekleri, numune plakasına yerleştirildikten sonra spektrumları 4000-400 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında ölçülmüştür [216].

#### **3.4.2. Yüzey alanı ölçümü**

BEA baskılı ve BEA baskılanmamış kriyojellerin yüzey alanının belirlemek için, Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Quantochrome SI, Automated Surface Area and Pore Size Analyzer, Quantochrome, ABD) cihazı kullanılmıştır. Kriyojel kolon numune koyma yerine konulmuştur. Örneklerin azot atmosferinde 150°C'de 1 saat gazı alınmıştır. Gaz adsorpsiyonu -210°C'de, gaz desorpsiyonu ise oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Kriyojel örneklerinin analizi nitrojen atmosferinde çok noktalı ölçüm ile yapılmıştır [217].

### 3.4.3. Yüzey morfolojisi

BEA baskılanmış ve BEA baskılanmamış kriyojel kolonların yığın yapısı ve yüzeyi yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (SEM) (QUANTA 400F Field Emission SEM, Hollanda) kullanılarak incelenmiştir. Kriyojel kolonlar iletken bir yapıştırıcı kullanılarak SEM örnek plakası üzerine tutturulmuştur. Örnek yüzeyi, vakumda 200 Å kalınlığında metalik altın ile kaplanmış ve yüzey iletken hale getirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan kriyojel kolon örnekleri SEM numune haznesine yerleştirilerek, farklı büyütme oranlarındaki görüntüleri alınmıştır [218].

### 3.4.4. Denge şişme deneyi

BEA baskılanmış ve BEA baskılanmamış kriyojellerin denge şişme oranını belirlemek için önce kolonlar kurutulmuş ve tartılmıştır. Daha sonra kuru kolonlar 24 saat sonra 50 ml saf distile su içeren beherlere konulup, kolonlar su ile doldurulmuştur. Kolonlardaki fazla su uzaklaştırılıp, tartılmıştır. Aşağıdaki yer alan denklem ile BEA baskılanmış ve BEA baskılanmamış kriyojellerin su içeriği hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(W_s - W_0) / W_0] \times 100$$

$W_0$  ve  $W_s$  sırası ile kriyojellerin şişme öncesi ve sonrası ağırlıklarını (g) ifade etmektedir.

BEA baskılanmış ve BEA baskılanmamış kriyojel kolonlarına ait makrogözenek miktarının belirlenmesi için denge şişme oranına ulaşmış olan kriyojel kolonlar tartılmıştır. Kriyojel kolonlardaki suyu uzaklaştırmak için, kolonlar sıkılıp, tartılmıştır.

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)} = [(W_1 - W_2) / W_1] \times 100$$

Bu denklemde  $W_1$  denge şişme oranına ulaşmış kriyojellerin ağırlığını (g) olarak,  $W_2$  denge şişme oranına ulaşmış kriyojellerin sıkıldıktan sonraki ağırlığını (g) olarak gösterilmektedir [146].

### 3.5. Adsorpsiyon çalışmaları

Optimal beauverisin adsorpsiyon koşullarının belirlenmesi için, farklı pH, iyonik şiddet, sıcaklık ve akış hızı parametreleri kullanılarak ve farklı BEA başlangıç derişimleri kullanılarak kolon üzerinde denenmiştir. Hazırlanan 10mL beauverisin çözeltileri 2 saat boyunca kolondan geçirilmiştir. Hazırlanan BEA çözeltileri kolondan geçirilmeden önce çözeltiden alınan 2 mL başlangıç örneği ile 2 saatlik adsorpsiyon işleminden sonra alınan 2 mL sonuç örneği, 230 nm'de UV spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Japonya) kullanılarak ölçülmüş ve BEA derişimleri hesaplanmıştır. BEA adsorpsiyon kapasitesi ise aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

$$\text{Adsorbe BEA (mg/g)} = [(C_0 - C_e)/m] \times V$$

Formülde,  $C_0$  başlangıçtaki beauverisin konsantrasyonu (mg/ml),  $C_e$  denge beauverisin konsantrasyonu (mg/ml),  $m$  kriyojelin ağırlığı ve  $V$  ise solüsyonun hacmidir [146].

#### 3.5.1. pH

Beauverisin-baskılı kriyojel kolonun (MIP-BEA) adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki pH etkisini incelemek için farklı pH değerlerinde (5.5, 5.75, 6.0, 6.5, 6.75, 7.4, 8.0, 8.5) adsorpsiyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun için organik tampon olan 20 mM MES (pH5.5-6.75) ve organik tampon olan 20 mM Tris-HCl (7.4-8.5) tamponları kullanılmıştır. Belirlenen tamponlarda 0.5 mg/mL BEA çözeltilerinden 10 mL hazırlanıp, 2 saat boyunca kolondan geçirilmiştir. Kolondan BEA ayırmak için sonra kolon desorpsiyon ajanıyla (0.1 M NaOH ve 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 1 saat muamele edilmiştir. Kolonu tekrar kullanmak için kolon, ultra saf su ile 1 saat boyunca yıkanarak +4°C'de saklanmıştır. Elde edilen çözeltiler, 230 nm'de spektrofotometrede ölçülüp, absorbans değerlerine göre optimal pH bulunmuştur. Optimum pH değeri, BEA adsorpsiyon kapasitesi değerlerine bakılarak belirlenmiştir.

### **3.5.2. İyon şiddeti**

İyonik şiddetin BEA adsorpsiyonuna etkisini incelemek için, 0 M, 0.001 M, 0.01 M, 0.1 M, 0.5 M ve 1 M olmak üzere altı farklı NaCl derişimi hazırlanmış ve uygun pH'da hazırlanan 0.5 mg/mL BEA çözeltisi içerisinde homojen hale gelmesi için manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Farklı NaCl konsantrasyonlarında hazırlanan BEA çözeltileri 2 saat boyunca kolondan geçirilmiştir. Daha sonra kolon desorpsiyon ajanıyla 1 saat muamele edilmiştir. Kolonu tekrar kullanmak için kolon, ultra saf su ile 1 saat boyunca yıkanarak, +4°C'de saklanmıştır. Optimum iyonik şiddet değeri BEA adsorpsiyon kapasitesi değerlerine bakılarak belirlenmiştir.

### **3.5.3. Sıcaklık**

Sıcaklığın adsorpsiyon kapasitesine etkisini incelemek için 4°C, 25°C, 35°C ve 45°C olmak üzere dört farklı sıcaklıklarda beauverisin, 2 saat boyunca MIP-BEA kriyojel kolondan geçirilmiştir. Kolondan BEA ayırmak için, sonra kolon desorpsiyon ajanıyla 1 saat muamele edilmiştir. Kolonun tekrar kullanılması için daha önce anlatılan (Bkz; pH, İyon Şiddeti) işlemler uygulanmıştır. Optimum sıcaklık değeri BEA adsorpsiyon kapasitesi değerlerine bakılarak belirlenmiştir.

### **3.5.4. Akış hızı**

Akış hızının BEA adsorpsiyonuna etkisini incelenmek için peristaltik pompa hızı 1– 2.5 mL/dak olacak şekilde ayarlanmıştır. 0.5mg/mL BEA çözeltisi optimum pH ve NaCl konsantrasyonlarında hazırlanıp, dört farklı akış hızında 2 saat boyunca kolondan geçirilmiştir. Daha sonra kolon desorpsiyon ajanıyla 1 saat muamele edilmiştir. Kolonun tekrar kullanılması için gerekli işlemler uygulanmıştır.

### **3.5.5. Başlangıç derişimi**

Beauverisin-baskılanmış (MIP-BEA) ve beauverisin-baskılanmamış (NIP-BEA) kriyojel kolonlardan farklı konsantrasyonlarda hazırlanan beauverisin çözeltileri 2 saat boyunca geçirilmiştir. Başlangıçtaki BEA adsorpsiyonuna etkisini incelemek

için, BEA konsantrasyonu 0.3-5 mg/mL aralığında hazırlanmıştır. Daha sonra kolon desorpsiyon ajanıyla (0.1 M NaOH ve 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 1 saat muamele edilmiştir. Kolonun tekrar kullanılması için gerekli işlemler uygulanmıştır [146].

### 3.6. Adsorpsiyon izotermi

Langmuir adsorpsiyon modelinde; moleküllerin her birinin sadece bir molekülü tutabilecek sayıda iyi tanımlanmış bölgeye adsorbe olduğu varsayılmaktadır. Bu bölgelerin, enerji olarak eşdeğer olduğu ve aynı zamanda birbirlerinden uzak olduğu varsayılır, bitişik bölgelerde adsorbe edilen moleküller arasında hiçbir etkileşim bulunmamaktadır. Bu çalışmada, BEA ve BEA-baskılanmış kriyojel arasındaki etkileşimi tanımlamak için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon yöntemi kullanılmıştır. Langmuir modeli homojen ve tek katmanlı etkileşimi ifade eder ve aşağıdaki denklem ile tanımlanır.

$$1/q_e = 1/q_{max} + 1/q_{max} \times b \times C_{eq}$$

Bu denklemde:  $q_e$ , kriyojela bağlı BEA miktarını (mg/g);  $C_{eq}$ , çözeltideki denge BEA konsantrasyonunu (mg/mL);  $b$ , Langmuir sabitini (mL/mg) ve  $q_{max}$ , teorik maksimum adsorpsiyon kapasitesini gösterir (mg/g).

Freundlich izoterm modeli, BEA ve BEA-baskılı kriyojel arasındaki etkileşimlerin heterojen olduğunu belirtir ve aşağıdaki denklem ile tanımlanır.

$$\ln q_e = \ln K_f + 1/n \ln C_{eq}$$

Bu denklemde:  $q_e$ , adsorpsiyon miktarını (mg/g);  $C_{eq}$ , solüsyondaki adsorbans konsantrasyonunu (g/mL) gösterir.  $K_f$  ve  $1/n$ , sırasıyla adsorpsiyon kapasitesini ve adsorpsiyon yoğunluğunu gösteren Freundlich sabitleridir [216].

### 3.7. Seçicilik deneyi

*Beauveria bassiana* ve *Paecilomyces fumosoroseus* tarafından sentezlenen başka bir sekonder metabolit olan bassiatin seçicilik çalışmalarında kullanılmıştır.



Bassiatin HPLC Kromosil 100-5 (4.0 × 100 mm) kolon ile *B. bassiana*' dan saflaştırılmıştır [219]. 1 mg/mL bassiatin, MIP-BEA ve NIP-BEA kriyojel kolonları kullanılarak 2 saat boyunca geçirilen bassiatin miktarı, 230 nm'de UV spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.

Bassiatin molekülü için beauverisine göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki denkleme göre belirlenmiştir.

$$K_d = [(C_i - C_f) / C_f] \times V / m$$

Denklemdaki  $K_d$  dağılma katsayısını (ml/g);  $C_i$  ve  $C_f$  bassiatin başlangıç ve sonuç derişimlerini (mg/ml),  $V$  kullanılan sulu çözelti hacmini (ml) ve  $m$  kriyojelin ağırlığını (g) ifade etmektedir.

Yarışmacı molekül varlığında bir molekülün bağlanması için seçicilik katsayısı aşağıdaki denkleme göre elde edilebilir.

$$K = K_{\text{kalıp molekül}} / K_{\text{yarışmacı molekül}}$$

Baskılanmış adsorbentle diğer molekülün  $k$  değerleri baskılama seçiciliği hakkında yorum yapılmasına olanak vermektedir. Bağlı seçicilik katsayısı ( $k'$ ) aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır;

$$k' = k_{\text{BEA-baskılanmış kriyojel}} / k_{\text{BEA-baskılanmamış kriyojel}}$$

### 3.8. Tekrar kullanılabilirlik

BEA-MIP kriyojel kolondan beauverisin desorpsiyonunun gerçekleşmesi için 0.1 M NaOH ve 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi kullanılmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi, yeniden kullanılabilirliğini belirlemek için aynı kriyojeller kullanılarak 10 kez bu işlem tekrarlanmıştır. Kolondan uzaklaştırılan BEA konsantrasyonu, UV spektrofotometre ile 230 nm'de belirlenmiştir.

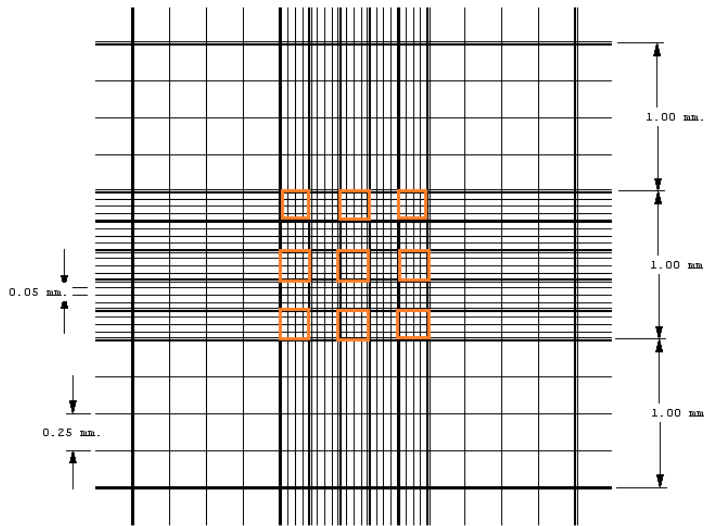
### 3.9. Beauverisin üretimi ve saflaştırılması

#### 3.9.1. Entomopatojen fungus üretimi

Üç farklı *B. bassiana* suşu (Lül1, Ank12, KVL 03129) ve 3 farklı *P. fumosoroseus* suşu (Bey9, BB12 ve 0614) SDA besiyerine ekilip, 28°C'de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

#### 3.9.2. Fungus spor solüsyonunun hazırlanması

Spor solüsyonu hazırlamak için, 3 farklı *B. bassiana* suşu (Lül1, Ank12, KVL 03129) ve 3 farklı *P. fumosoroseus* suşu (Bey9, BB12 ve 0614) SDAY (Sabouraud Dextrose Agara %1 yeast extract) besiyerine ekilmiştir. SDAY besiyerine ekilen *B. bassiana* ve *P. fumosoroseus* suşları 28°C'de 14 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu besiyerlerine içerisinde %0,02 Tween 80 bulunan 10 ml distile su ilave edilmiştir. Ardında her fungus suşu, konidia ve misellerinin birbirinden ayrılması için 1500 rpm' de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Improved Neubauer lamında spor sayımı yapılarak, spor solüsyonlarının konsantrasyonu belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Improved Neubauer lamında bulunan kareler ve sayım yapılan alanlar

Improved Neubauer lamı kullanılarak spor sayımı yapılmıştır. Spor sayımında lamın ortasında yer alan 25 kareden, 0,004 mm<sup>3</sup> hacimli 9 adet kare seçilerek,

sayım yapılmıştır. Aşağıda yer alan denklem ile 1mL'indeki spor sayısı bulunmuştur.

$$1 \text{ mL'deki spor sayısı} = \frac{9 \text{ karedeki spor sayılarının toplamı}}{0.036} \times 1000$$

### 3.9.3. Beauverisin üretimi

Spor solüsyonlarından 4'er ml alınıp, 100 ml Adamek's besiyeri içeren 250 ml'lik erlen-mayerlere eklenmiştir. Erlen-mayerler 28°C'de 100 rpm'de 6 gün inkübasyona bırakılarak, primer kültürler hazırlanmıştır. Daha sonra primer kültürlerden 2 ml alınıp, 250 ml Adamek's besiyeri içeren 1 lt 'lik erlen-mayerlere eklenmiştir. Erlen-mayerler 28°C'de 100 rpm'de 6 gün inkübasyona bırakılarak, sekonder kültürler hazırlanmıştır [220].

### 3.9.4. Beauverisinin kısmi saflaştırılması

Beauverisinin saflaştırılmasında, fungal kaynaktan elde edilen BEA, BEA-MIP kriyojel kolondan geçirilmeden önce amonyum sülfatla çöktürülüp, diyaliz edilerek kısmi olarak saflaştırılmıştır. Sekonder kültürler Whatman No. 3 filtre kağıdı ile filtre edilmiştir. Daha sonra filtre edilen örnekler 1000 g'de 60 dakika santrifüj edilip, pelet ortamdan uzaklaştırılmıştır. Fungus örnekleri steril 0,45 µm milipor filtre ile filtre edilerek, fungus miselleri ortamdan uzaklaştırılmıştır.

Fungus örneklerine %80 doygunluktaki amonyum sülfat eklenip, buz içinde 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çöktürülmüştür. 50 ml'lik falconlara konulan örnekler, 1000 g'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. santrifüj sonrasında süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Pelet, 0,02 mM Tris HCl tamponu (pH 7.8) ile çözdürülmüştür.

SpectroPore diyaliz torbası (6-8 kDa), 80°C'de %0,3'lük Sodyum sülfat çözeltisinde 1 dakika konulup, 60°C'de distile su içinde 2 dakika bekletilmiştir. Ardından %0,2'lik sülfirik asit çözeltisinde 1 dakika konulup, 60°C'de distile su içinde 2 dakika bekletilmiştir. Diyaliz membrana konulan örnekler, 0,02 mM Tris HCl tamponu (pH 7.8) içeren kaplara konulmuş ve +4°C'de 1 gece

inkübe edilmiştir. Belli aralıklarla kaplar içerisinde bulunan 0,02 mM Tris HCl tamponu (pH 7.8) yenisi ile değiştirilmiştir. Diyalize olmuş örnekler 50 ml'lik falkonlara konulup, moleküler baskılama yapılana kadar +4°C'deki buzdolabında saklanmıştır [221].

### **3.9.5. Fungal kaynaklardan BEA'nın moleküler baskılanmış kriyojel kolondan saflaştırılması**

Fungus örneklerinin her birinden 10 ml alınıp, 2 saat boyunca boş MIP-BEA kolonundan geçirilmiştir. Daha sonra 10 mL desorpsiyon ajanı (0.1 M NaOH ve 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 1 saat boyunca kolondan geçirilmiştir. BEA-MIP kolonunun tekrar kullanımı için deiyonize H<sub>2</sub>O kolondan 1 saat boyunca geçirilmiştir. Kolon +4°C'de saklanmıştır. Bu işlem *B. bassiana* ve *P. fumosoroseus* suşlarının herbiri için ayrı ayrı yapılmıştır.

*B. bassiana* ve *P. fumosoroseus* fungus suşlarından saflaştırılan BEA miktarını öğrenmek için ODTÜ Merkez Laboratuvarı, Moleküler Biyoloji-Biyoteknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi, Kütle Spektroskopisi Laboratuvarı'nda LC-MS/MS cihazından hizmet alımı yapılmıştır. LC-MS/MS analizi, AGILENT 6460 Üçlü Dört Kutuplu Sistem (ESI) ve AGILENT 1200 Serisi HPLC ile gerçekleştirilmiştir. Beauvericin analizi AGILENT 6460 LC/MSMS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. LC sisteminde, AGILENT 1200 HPLC cihazı kullanılmıştır. Ayırma, AGILENT Rapid Resolution (2.2 x 50 mm, 1.8 µm) kolonu kullanılarak 40 °C sıcaklıkta ve 0.4 mL/dk akış hızında 7 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak A çözeltisi: H<sub>2</sub>O + 5 mM Amonyum format + % 0.01 Formik asit, B çözeltisi: Metanol + % 0.01 Formik asit içermektedir. Enjeksiyon hacmi 10 µL'dir. Kütle spektrometrisi analizi, çoklu reaksiyon izleme (MRM) kullanılarak MS/MS modunda gerçekleştirilen bir AGILENT 6460 Üçlü Dört Kutuplu Sistem, pozitif ve negatif iyon modlu elektrosprey iyonizasyon (ESI) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihaz ayarları, veri toplama ve çalıştırma, AGILENT G3793AA MassHunter Optimizer yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İyon kaynağının parametreleri, gaz sıcaklığı 325 °C ve 6 L/dk. akış hızıdır.

### **3.10. Beauverisinin böcekler üzerinde denenmesi**

Üç farklı *B. bassiana* suşundan (Lül1, Ank12, KVL 03129) ve 3 farklı *P. fumosoroseus* suşundan (Bey9, BB12 ve 0614) elde edilen BEA *G. mellonella* ve *T. molitor* larvaları için iki farklı uygulama yöntemi (püskürtme ve enjeksiyon), *L. decemlineata* larvaları için üç farklı uygulama yöntemi (püskürtme, enjeksiyon ve yaprak daldırma) ile denenmiştir.

Daha sonra *B. bassiana* ve *P. fumosoroseus* suşlarından saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.001M, 0.0001M, 0.00001M ve 0.000001M olmak üzere 4 farklı konsantrasyonu böcekler üzerinde denenmiştir. 0.001M, 0.0001M, 0.00001M ve 0.000001M BEA'nın miktarları sırasıyla, 0.7839 µl/mL, 0.07839 µl/mL, 0.007839 µl/mL ve 0.0007839 µl/mL'dir.

#### **3.10.1. Beauverisinin *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki etkisinin incelenmesi**

##### **3.10.1.1. Beauverisinin farklı uygulama yöntemleri ile *Galleria mellonella* larvalarına uygulanması**

Deneyde BEA, 4. evre *G. mellonella* larvalarına uygulanmıştır. *G. mellonella* larvalarının pupaya girmesini engellemek için larvalar, 56°C'deki suda 40 saniye bekletilmiştir.

Enjeksiyon yönteminde; 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisinden ve ticari beauverisinden 8'er µl mikroenjektör ile alınıp, *G. mellonella* larvalarının trake boşluklarına enjekte edilmiştir. Kontrol gruplarında, beauverisin solüsyonu yerine, %0,01'lik Tween 80 içeren steril distile su karışımı kullanılmıştır. Daha sonra *G. mellonella* larvaları, içinde steril filtre kağıdı bulunan steril petrilere konulmuştur. Beşer adet *G. mellonella* larvası her petriye konulmuştur.

Püskürtme yönteminde; 5'er adet inaktive *G. mellonella* larvaları içeren steril petri kaplarına, 6 farklı *B. bassiana* ve *P. fumosoroseus* suşundan elde edilen

beauverisinden ve ticari beauverisinden 1 ml alınıp, *G. mellonella* larvalarına püskürtülmüştür. Kontrol gruplarında, %0,01' lik Tween 80 içeren steril distile su karışımı kullanılmıştır.

Petriler 27°C'de etüvlere kaldırılıp, her gün kontrol edilmiştir. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilip, her fungal kaynaktan elde edilen beauverisin ve ticari beauverisin için 15 adet larva kullanılmıştır.

### **3.10.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki beauverisinin *Galleria mellonella* larvalarına uygulanması**

Deneyde kullanılan 4. evre *G. mellonella* larvalarının pupaya girmesini engellemek için larvalar 56°C'deki suda 40 saniye bekletilmiştir.

6 farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonu (0.001M, 0.0001M, 0.00001M ve 0.000001M) *G. mellonella* larvaları üzerinde denenmiştir. Steril filtre kağıdı içeren steril petri kaplarına 7'şer adet 4. evre *G. mellonella* larvası eklenip, farklı konsantrasyonlardaki BEA uygulanmıştır. Kontrol gruplarına %0,01' lik Tween 80 içeren steril distile su karışımı kullanılmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanmış ve her fungal kaynaktan elde edilen BEA konsantrasyonu için 21 adet larva kullanılmıştır. Petriler 27°C'de etüvlere kaldırılıp, petriler her gün kontrol edilmiştir

### **3.10.2. Beauverisinin *Tenebrio molitor* larvaları üzerindeki etkisinin incelenmesi**

#### **3.10.2.1. Beauverisinin farklı uygulama yöntemleri ile *Tenebrio molitor* larvalarına uygulanması**

Enjeksiyon yönteminde; farklı *B. bassiana* ve *P. fumosoroseus* suşlarından saflaştırılan BEA ve ticari BEA'dan 8'er µl mikroenjektör ile alınıp, *T. molitor* larvalarının trake boşluklarına enjekte edilmiştir. *T. molitor* larvaları, steril filtre kağıdı bulunan steril petri kaplarına konulmuştur. Kontrol gruplarına, %0,01' lik

Tween 80 ve steril distile su karışımı larvanın trake boşluklarına enjekte edilmiştir. Her petriye 5' er adet *T. molitor* larvası konulmuştur.

Püskürtme yönteminde; 5'er adet *T. molitor* larvaları içeren steril filtre kağıdı ve petri kaplarına, 6 farklı *B. bassiana* ve *P. fumosoroseus* suşundan elde edilen BEA ve ticari BEA'dan 1'er ml alınıp, *T. molitor* larvalarına püskürtülmüştür. Kontrol gruplarında, %0,01' lik Tween 80 içeren steril distile su karışımı kullanılmıştır.

Deneyle üç kez tekrarlanmış ve her fungal kaynaktan elde edilen beauverisin ve ticari beauverisin için 15 adet larva kullanılmıştır. Petriler 25°C 12:12 fotoperiyodun sağlandığı iklim dolabına kaldırılmıştır. Petriler her gün kontrol edilmiştir.

### **3.10.2.2. Farklı konsantrasyonlardaki beauverisinin *Tenebrio molitor* larvalarına uygulanması**

Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonu (0.001M, 0.0001M, 0.00001M ve 0.000001M) *T. molitor* larvaları üzerinde denenmiştir. Steril filtre kağıdı içeren steril petri kaplarına 7'şer adet 4. evre *T. molitor* larvaları eklenip, farklı konsantrasyonlardaki beauverisin uygulanmıştır. Kontrol gruplarına %0,01' lik Tween 80 içeren steril distile su karışımı kullanılmıştır. Deneyle üç kez tekrarlanmış ve her fungal kaynaktan elde edilen BEA konsantrasyonu için 21 adet larva kullanılmıştır. Petriler 25°C 12:12 fotoperiyodun sağlandığı iklim dolabına kaldırılmıştır. Petriler her gün kontrol edilmiştir.

### **3.10.3. Beauverisinin *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki etkisinin incelenmesi**

#### **3.10.3.1. Beauverisinin farklı uygulama yöntemleri ile *Leptinotarsa decemlineata* larvalarına uygulanması**

Enjeksiyon yönteminde; farklı *B. bassiana* ve *P. fumosoroseus* suşlarından saflaştırılan BEA ve ticari BEA'dan 8'er µl mikroenjektör ile alınıp,

*L. decemlineata* larvalarının trake boşluklarına enjekte edilmiştir. Kontrol gruplarına, %0,01' lik Tween 80 içeren steril distile su karışımı larvanın trake boşluklarına enjekte edilmiştir. Daha sonra 4. evre *L. decemlineata* larvaları, içinde nemlendirilmiş pamuk ve üzerinde patates yaprağı bulunan steril petrilere konulmuştur. Her petriye 5' er adet *L. decemlineata* larvası konulmuştur.

Püskürtme yönteminde; 5'er adet *L. decemlineata* larvası nemlendirilmiş pamuk ve patates yaprağı bulunan petrilere konulmuştur. 6 farklı *B. bassiana* ve *P. fumosoroseus* suşundan elde edilen BEA ve ticari BEA'dan 1'er ml alınıp, *L. decemlineata* larvalarına püskürtülmüştür. Kontrol gruplarında, %0,01' lik Tween 80 içeren steril distile su karışımı kullanılmıştır.

Yaprak daldırma yönteminde; patates yaprakları 3 cm çapında kesilir, %70'lik etil alkole daldırılır, ardından 2 defa distile su ile yıkanır ve böylece yaprakların yüzey sterilizasyonu sağlanmış olmaktadır. Yapraklar kuruduktan sonra 6 farklı *B. bassiana* ve *P. fumosoroseus* suşundan elde edilen beauverisin ve ticari beauverisin solüsyonlarına daldırılıp, kurutulmuştur. Yapraklar nemlendirilmiş pamuk bulunan steril petrilere konulmuştur. Daha sonra petrilere 1'er adet 1 saat boyunca aç bırakılan *L. decemlineata* larvaları eklenmiştir. Kontrol gruplarında, %0,01' lik Tween 80 içeren steril distile su karışımı kullanılmıştır.

Deneyler üç kez tekrarlanmış ve her fungal kaynaktan elde edilen beauverisin ve ticari beauverisin için 15 adet larva kullanılmıştır. Petrilere 25°C'de 16:8 fotoperiyodunun olduğu iklim dolabına kaldırılmış ve her gün kontrolleri yapılmıştır.

### **3.10.3.2. Farklı konsantrasyonlardaki beauverisinin *Leptinotarsa decemlineata* larvalarına uygulanması**

6 farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonu (0.001M, 0.0001M, 0.00001M ve 0.000001M) *L. decemlineata* larvaları üzerinde denenmiştir. Nemlendirilmiş pamuk ve patates yaprağı bulunan



petrilere 7'şer adet 4. evre *L. decemlineata* larvası eklenip, farklı konsantrasyonlardaki beauverisin uygulanmıştır. Kontrol gruplarına %0,01' lik Tween 80 içeren steril distile su karışımı kullanılmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanmış ve her fungal kaynaktan elde edilen BEA konsantrasyonu için 21 adet larva kullanılmıştır. Petriler 25°C'de 16:8 fotoperiyodunun olduğu iklim dolabına kaldırılmış ve her gün kontrolleri yapılmıştır.

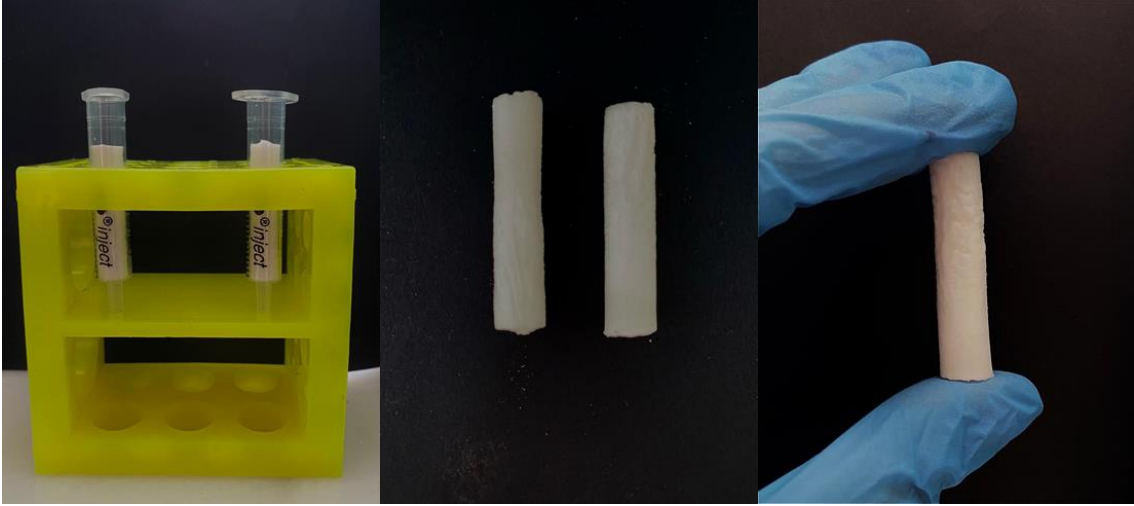
### **3.11. İstatistiksel Çalışmalar**

3 farklı *B. bassiana* ve 3 farklı *P. fumosoroseus* suşlarından sentezlenen beauverisin moleküler baskılanmış kriyojel kolon ile saflaştırılmıştır. Fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA farklı uygulama yöntemleri ile *G. mellonella*, *T. molitor* ve *L. decemlineata* larvaları üzerinde denenmiştir. Daha sonra farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonu *G. mellonella*, *T. molitor* ve *L. decemlineata* larvaları üzerindeki etkileri test edilmiştir. Çalışmada elde edilen verilerin IBM SPSS 20.0 programı kullanılarak istatistiksel analizi yapılmıştır. Deneyde elde edilen veriler, normal dağılım göstermediğinden non-parametrik testler olan Kruskal-Wallis ve Manny Whitney U testleri kullanılarak, BEA'nın böcekler üzerindeki etkisi analiz edilmiştir. Lethal time (LT<sub>50</sub>) ve Lethal konsantrasyon (LC<sub>50</sub>) değerleri IBM SPSS 20.0 programıyla hesaplanmıştır.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Beauverisin baskılanmış ve beauverisin baskılanmamış kriyojel kolon sentezlenmesi

Sigma-Aldrich firmasından alınan BEA kullanılarak beauverisin-baskılanmış kriyojel kolon hazırlanmıştır. Kolon sentezlenmesinde fonksiyonel monomer olarak MATrp, monomer olarak HEMA, çapraz bağlayıcı olarak MBAA kullanılmıştır. Beauverisin-baskılanmamış kriyojel kolon sentezi ticari BEA kullanılmadan yapılmıştır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Sentezlenen kriyojel kolonlar

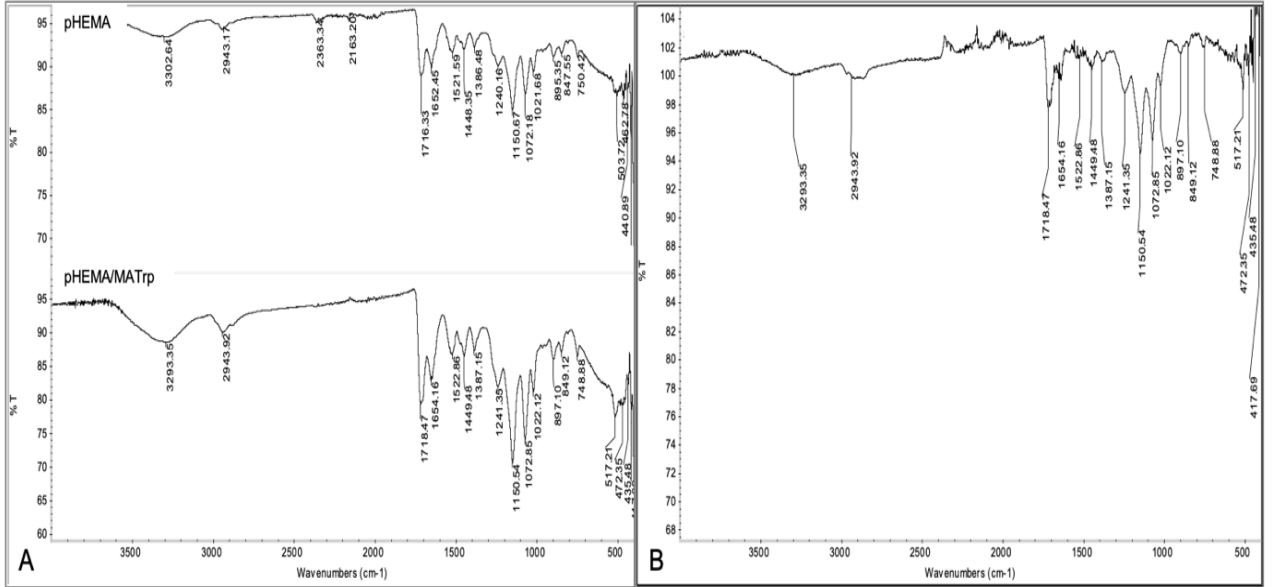
#### 4.1.1. Kriyojel kolon karakterizasyonu

Beauverisin-baskılanmış kriyojel kolon, kriyopolimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Sentezlenen kriyojel kolon FTIR, SEM, yüzey alanı ölçümleri, denge şişme özellikleri ile karakterize edilmiştir.

##### 4.1.1.1. FTIR

Şekil 4.1'deki Poli(HEMA) ait FTIR spektrum sonuçlarına bakıldığında; 2943  $\text{cm}^{-1}$ 'deki bant CH bükülmesine, 1718  $\text{cm}^{-1}$ 'deki bant C=O grubuna ve 1652

$\text{cm}^{-1}$ 'deki bant C=C grubuna aittir. Fonksiyonel monomer olan MATrp'nin aromatik halkasına bakıldığında;  $1652 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bant C=C gerilmesine,  $1521 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bant NH bükülmesine,  $1448-1386 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bant C-N aromatik gerilmesine aittir.  $1241-1150 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bükülme bandının C=O bükülmesine ait olduğu bulunmuştur. BEA baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kolonuna ait FTIR spektrumunu daha iyi incelemek için; BEA baskılanmış kriyojel kolondan, MATrp monomer içermeyen p(HEMA) kolonuna ait FTIR spektrumu çıkartılmıştır. Spektrum incelendiğinde;  $1552 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bant NH bükülmesine,  $1449-1387 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bant CN aromatik ve  $1654 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bant C=O amid bantlarına aittir (Şekil 4.2).



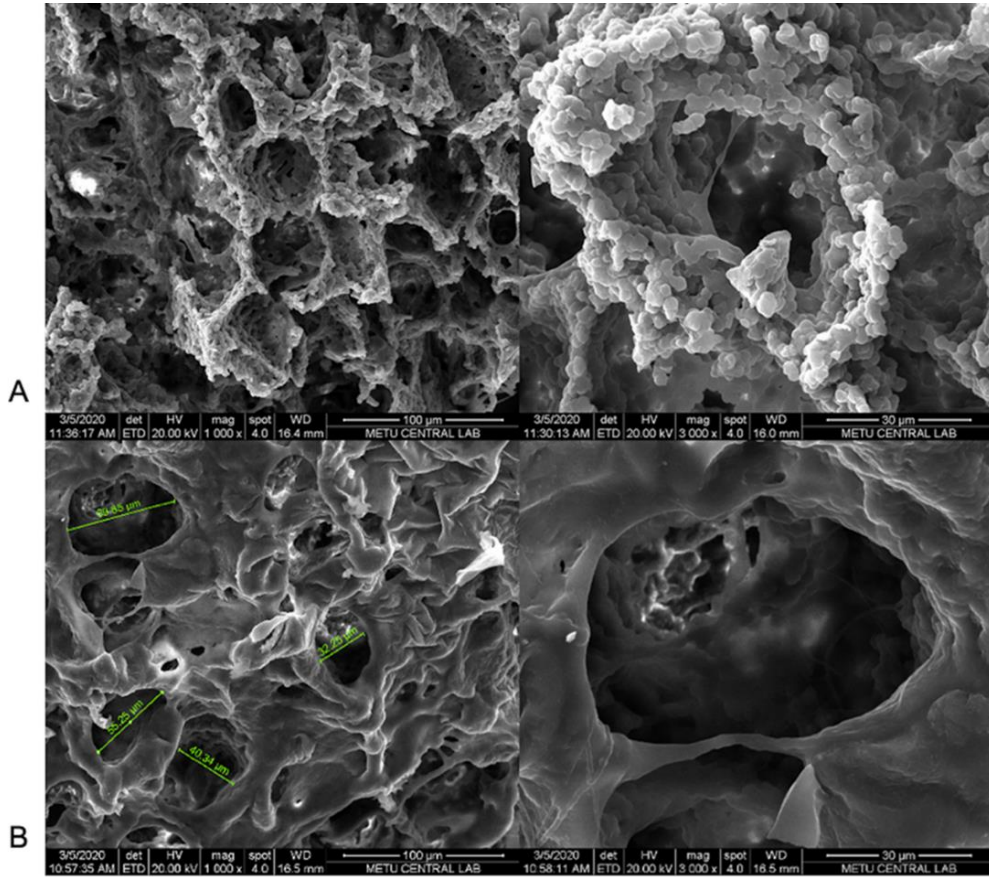
**Şekil 4.2.** Poli(HEMA), MATrp ait FTIR spektrum (A) ve MIP-BEA ait FTIR spektrum (B).

#### 4.1.1.2. Yüzey alanı ölçümü

Nitrojen ortamında yapılan çok noktalı BET analizi sonuçlarına göre, BEA-baskılı kriyojel kolonun (MIP-BEA) yüzey alanı  $16.24 \text{ m}^2/\text{g}$ , BEA-baskılanmamış kriyojel kolonun (NIP-BEA) yüzey alanı  $12.18 \text{ m}^2/\text{g}$  olarak bulunmuştur.

#### 4.1.1.3. Yüzey morfolojisi

BEA baskılanmış (MIP-BEA) ve beauverisin baskılanmamış (NIP-BEA) kriyojel kolonlarının yüzey morfolojisi ve iç yapısı taramalı elektron mikroskop kullanılarak incelenmiştir. SEM görüntülerinde gözeneklerin 30-70 µm boyutunda olduğu gözlenmiştir. Her iki kriyojel kolonda gözeneklerin birbiriyle bağlantılı olduğu ve makro gözenekli akış kanalına sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3).

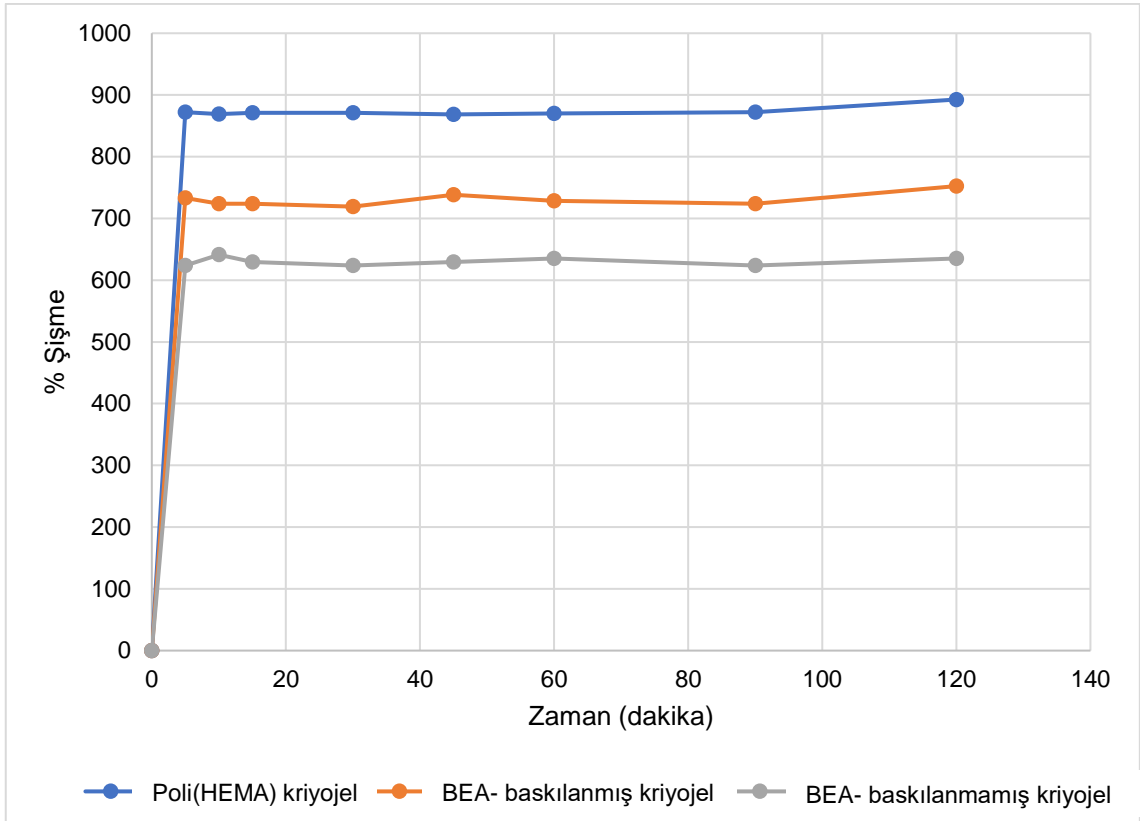


**Şekil 4.3.** Beauverisin baskılanmış (MIP-BEA) poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin SEM görüntüleri (A), Beauverisin baskılanmamış (NIP-BEA) poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin SEM görüntüleri (B).

#### 4.1.1.4. Denge şişme deneyi

Poli(HEMA) kriyojel hidrofilik yapıya sahip iken, BEA baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kolon triptofan aminoasitinden dolayı hidrofobik yapıya sahiptir. BEA-baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kolon da BEA ve triptofan aminoasitinden dolayı hidrofobik yapıdadır. Poli(HEMA), BEA baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) (NIP-BEA) ve BEA baskılanmış poli(HEMA-MATrp) (MIP-

BEA) kriyojel kolonların denge şişme oranları sırasıyla %892, %635 ve %752'dir. Kriyojel kolon yapısına MATrp girdiğinde kolonun denge şişme oranının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.4). BEA-baskılanmış kriyojel kolon ile BEA-baskılanmamış kriyojel kolonun denge şişme oranları karşılaştırıldığında, BEA'nın kolona baskılanmasıyla kriyojel kolonun denge şişme oranının arttığı gözlenmiştir. Kriyojel kolonların makro gözenek oranı; poli(HEMA), BEA baskılanmamış poli(HEMA) ve BEA baskılı poli(HEMA) sırasıyla, %72, %69 ve %70'dir.



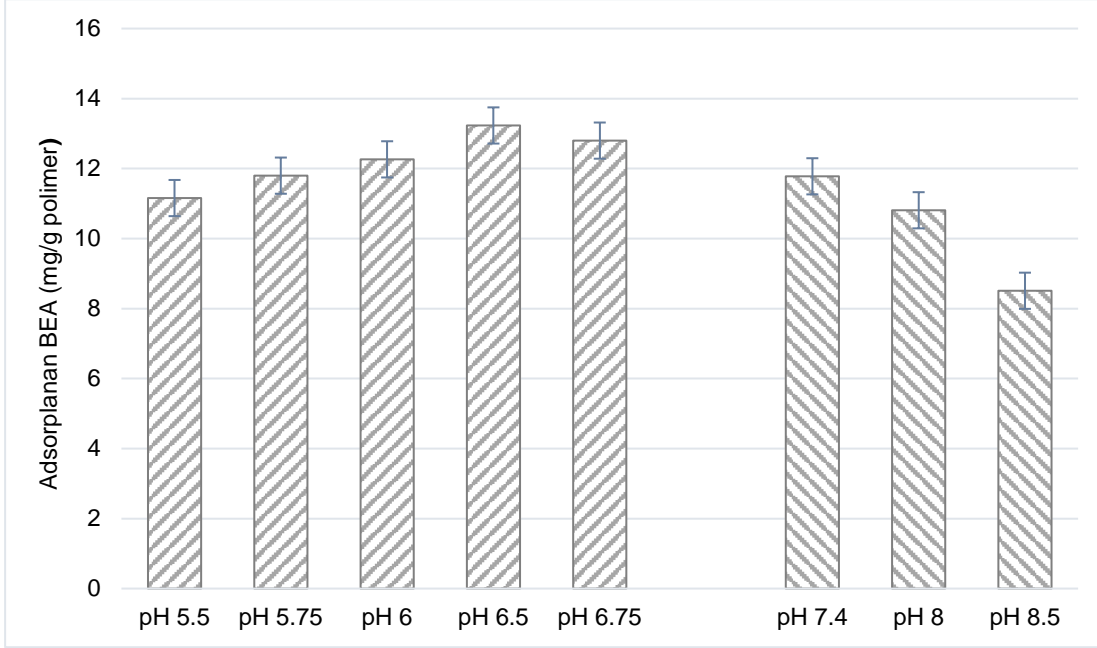
**Şekil 4.4.** Poli(HEMA), BEA baskılanmış poli(HEMA-MATrp) (MIP-BEA) ve BEA baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) (NIP-BEA) kriyojellerin denge şişme oranları

#### 4.1.2. Adsorpsiyon çalışmaları

##### 4.1.2.1. pH

BEA adsorpsiyonuna pH etkisini araştırmak için; farklı pH aralıklarında 20 mM MES tamponu (5.5-6.75) ve 20 mM Tris-HCl tamponu (7.4-8.5) kullanılmıştır. pH'ın adsorpsiyona etkisini incelemek için ticari BEA 0.5 mg/mL

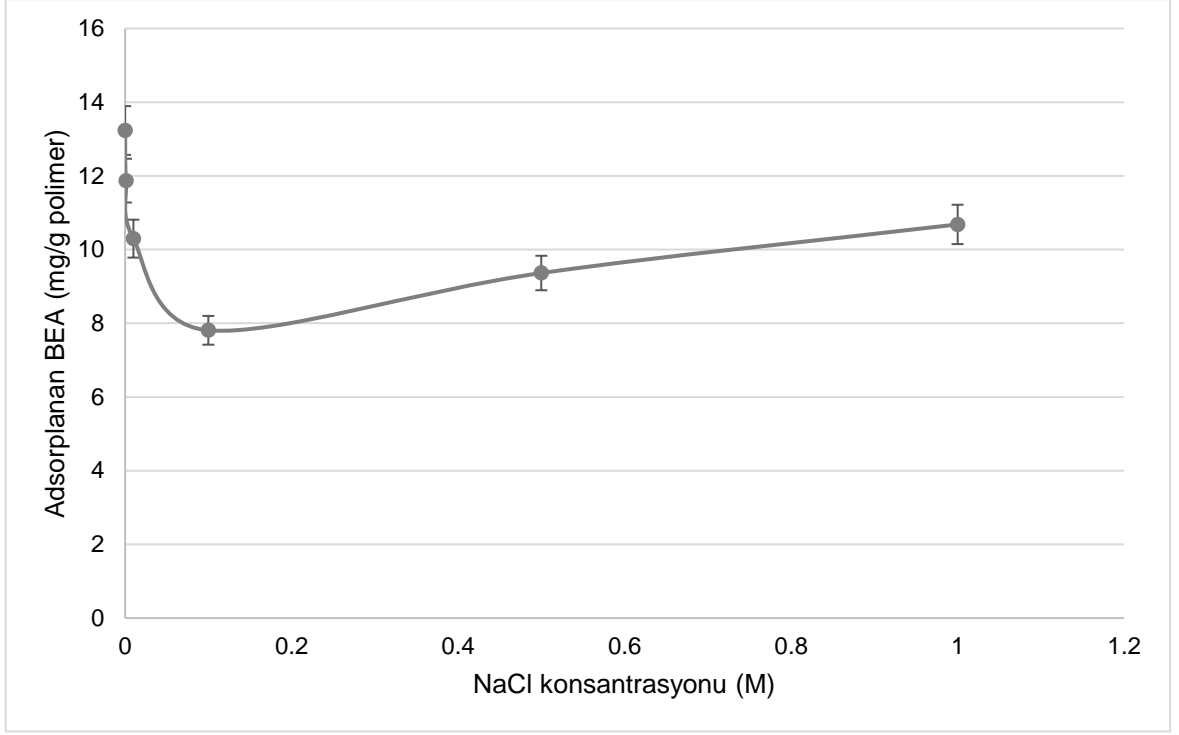
konsantrasyonunda 8 farklı pH aralığında hazırlanmış ve 2 saat boyunca boş MIP-BEA kolonundan geçirilmiştir. pH 5.5 MES tamponunda BEA adsorpsiyon kapasitesi 11.15 mg/polimer, pH 6.5 MES tamponunda BEA adsorpsiyon kapasitesi maksimum miktar olan 13.5 mg/polimer olduğu bulunmuştur. Bu yüzden çalışma ortamı olarak pH 6.5 MES tamponu seçilmiştir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** BEA adsorpsiyonuna pH etkisi (BEA: 0.5 mg/mL; T: 25°C; zaman: 120 dk).

#### 4.1.2.2. İyon şiddeti

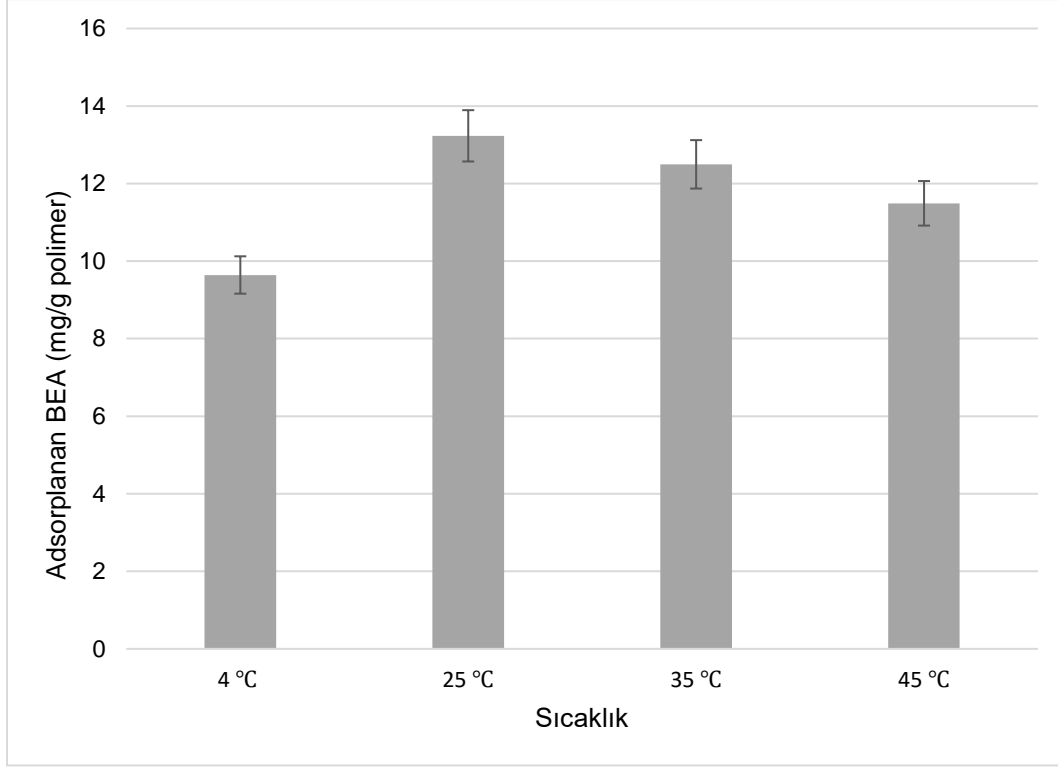
MIP-BEA kriyojel kolonunda iyonik şiddetin BEA adsorpsiyonuna etkisinin ölçülmesi için; BEA çözeltisi 0.0 – 1.0 M aralığında olan NaCl tuzu kullanılmıştır. pH 6.5 MES tamponunda 0.5 mg/mL BEA içeren beauverisin çözeltisine farklı miktarlarda tuz eklenerek 0 M, 0.001 M, 0.01 M, 0.1 M, 0.5 M ve 1 M NaCl konsantrasyonları hazırlanmıştır. Ortamın tuzsuzdan 0.001 M NaCl değerine çıkartılmasıyla, BEA adsorpsiyon kapasitesinin 13.5 mg/g değerinden 11.87 mg/g değerine düştüğü bulunmuştur. Maksimum BEA adsorpsiyonu tuzun bulunmadığı ortamda gözlenmiştir (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** BEA adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi (BEA derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 6.5; T: 25°C; zaman: 120 dk).

#### 4.1.2.3. Sıcaklık

Sıcaklığın adsorpsiyona etkisini incelemek için, beauverisin farklı sıcaklıklarda (4°C, 25°C, 35°C ve 45°C) MIP-BEA kriyojel kolondan geçirilmiştir. pH 6.5 MES tamponunda ve 0.5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan BEA çözeltileri MIP-BEA kolonundan 4 farklı sıcaklıklarda 2 saat boyunca geçirilmiştir. En yüksek adsorpsiyon kapasitesi 25°C'de 13.45 mg/g polimer olarak gözlenmiştir. Sıcaklık 25°C'den 35°C'ye çıktığında BEA adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma gözlenmezken, 45°C'de BEA adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma gözlenmiştir. 45°C'de adsorbe olan BEA 11.45 mg/g polimer olduğu bulunmuştur (Şekil 4.7).

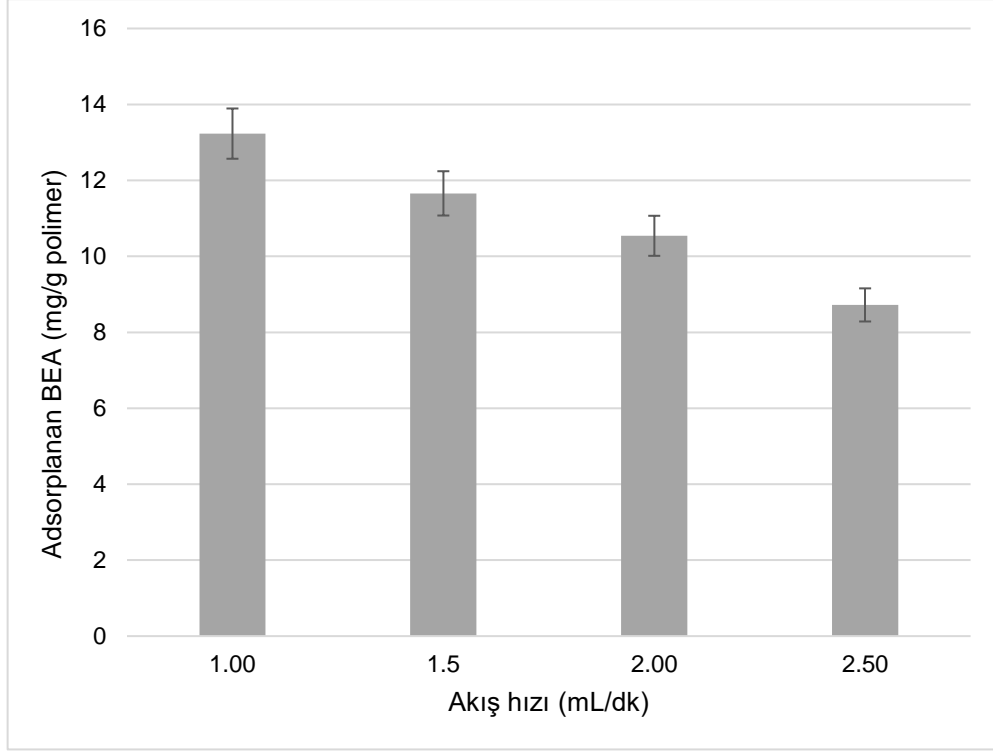


**Şekil 4.7.** BEA adsorpsiyon kapasitesine sıcaklığın etkisi (BEA derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 6.5; zaman: 120 dk.).

#### 4.1.2.4. Akış hızı

MIP-BEA kriyojel kolonda akış hızının, BEA adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Peristaltik pompa kullanılarak 1.0 mL/dk – 2.5 mL/dk aralığında dört farklı akış hızında BEA, MIP-BEA kolondan geçirilmiştir. Akış hızı artıkça adsorpsiyon kapasitesi azaldığı gözlenmiştir. 1.0 mL/dk'lık akış hızında BEA adsorpsiyonu 13.45 mg/g polimer iken akış hızı 2.5 mL/dk çıkartıldığında BEA adsorpsiyonu 8.72 mg/g polimer olarak bulunmuştur (Şekil 4.8).

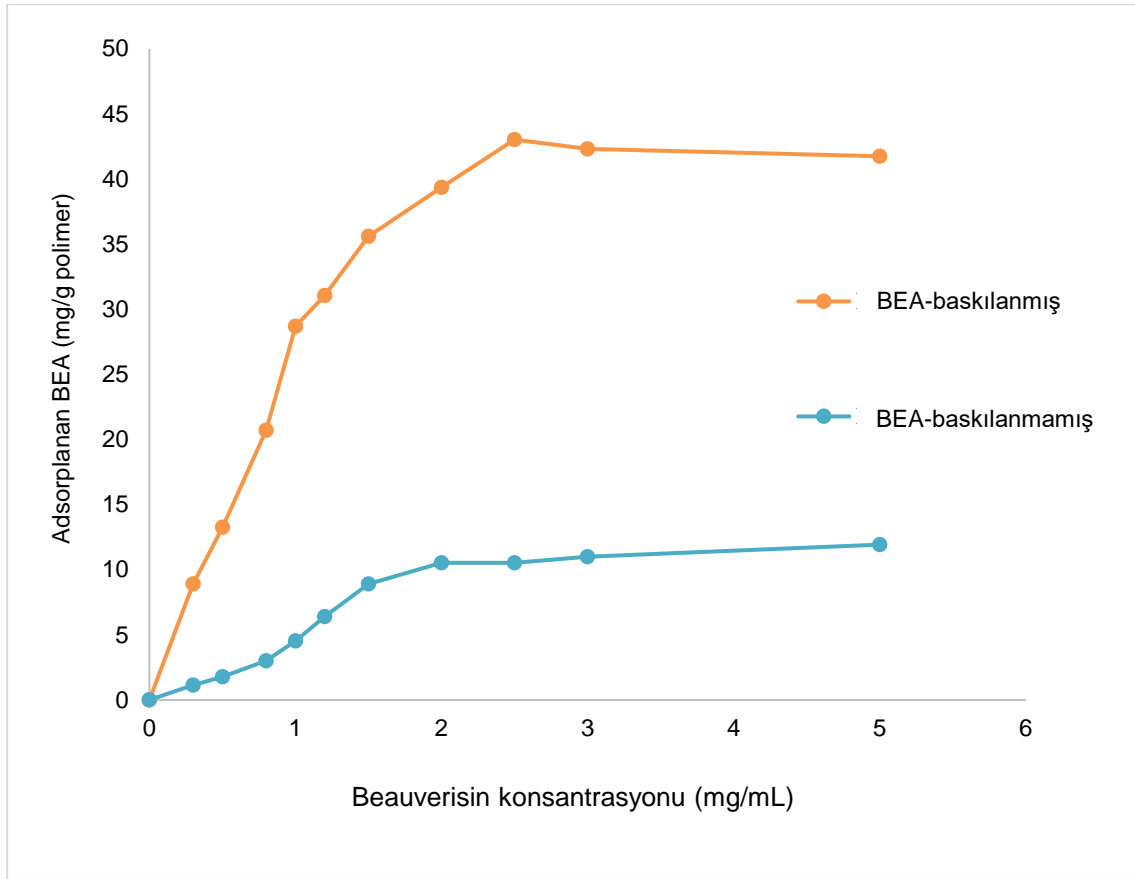




**Şekil 4.8.** Adsorpsiyon kapasitesine akış hızının etkisi. (BEA derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 6.5; T: 25°C; zaman: 120 dk).

#### 4.1.2.5. Başlangıç derişimi

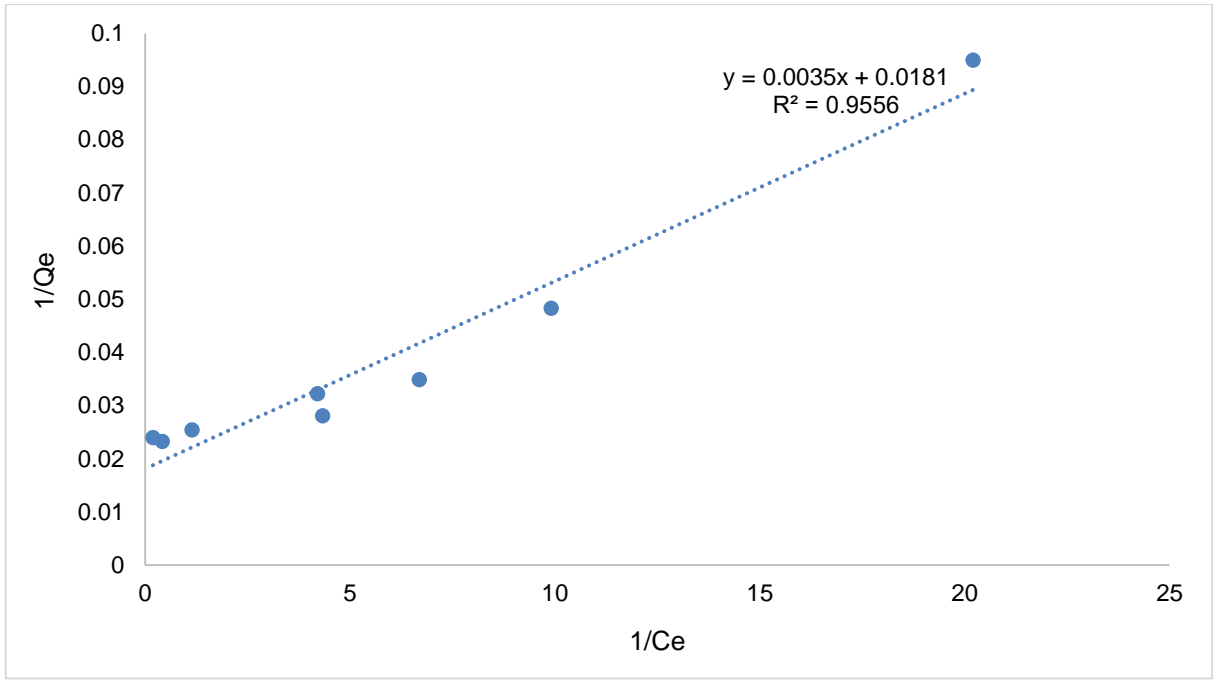
BEA başlangıç konsantrasyonunun, BEA-baskılanmış ve BEA-baskılanmamış kriyojel kolonları üzerindeki etkisi incelenmiştir. 0.3 mg/mL-5 mg/mL arasında farklı BEA konsantrasyonları pH 6.5 MES tamponunda hazırlanıp, 25°C'de ve 1 mL/dak akış hızında BEA-baskılanmış ve BEA-baskılanmamış kriyojel kolonlarından 2 saat boyunca geçirilmiştir. Başlangıçta BEA konsantrasyonu artıkça birim kriyojel başına adsorplanan BEA miktarı arttığı gözlenmiştir. 2 mg/mL BEA konsantrasyonundan sonra başlangıç BEA derişimi artsa da adsorplanan BEA miktarı aynı kalmıştır (Şekil 4.9). BEA-baskılı ve BEA-baskılanmamış kriyojellerin en yüksek adsorpsiyon miktarları sırasıyla 43 mg/g ve 11 mg/mL olarak bulunmuştur.



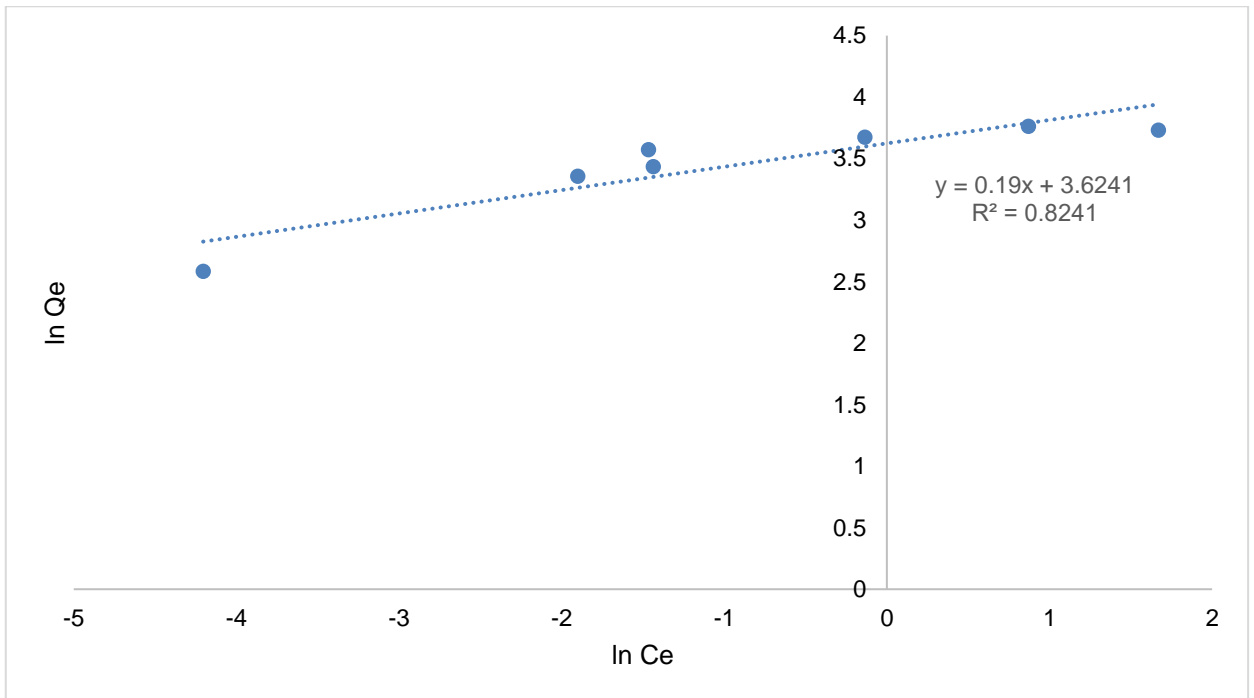
**Şekil 4.9.** BEA konsantrasyonunun adsorpsiyon kapasitesine etkisi (pH: 6.5; T: 25°C; zaman: 120 dk).

#### 4.1.3. Adsorpsiyon izotermi

Adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyon sürecinde her bir hedef molekülün adsorban ile etkileşimini karakterize etmek için kullanılmaktadır. BEA molekülünün MIP-BEA kriyojel kolon ile etkileşimini incelemek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri kullanılmıştır (Şekil 4.10) (Şekil 4.11). Regresyon katsayılarına göre (Langmuir için  $R^2 = 0.9556$ , Freundlich için  $R^2 = 0.8241$ ) BEA adsorpsiyon modelinin Langmuir modeline daha yakın olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1). Elde edilen sonuçlar BEA molekülünün ile MIP-BEA kriyojel kolon arasındaki etkileşimin homojen ve tek katmanlı olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.10.** Langmuir adsorpsiyon izotermi



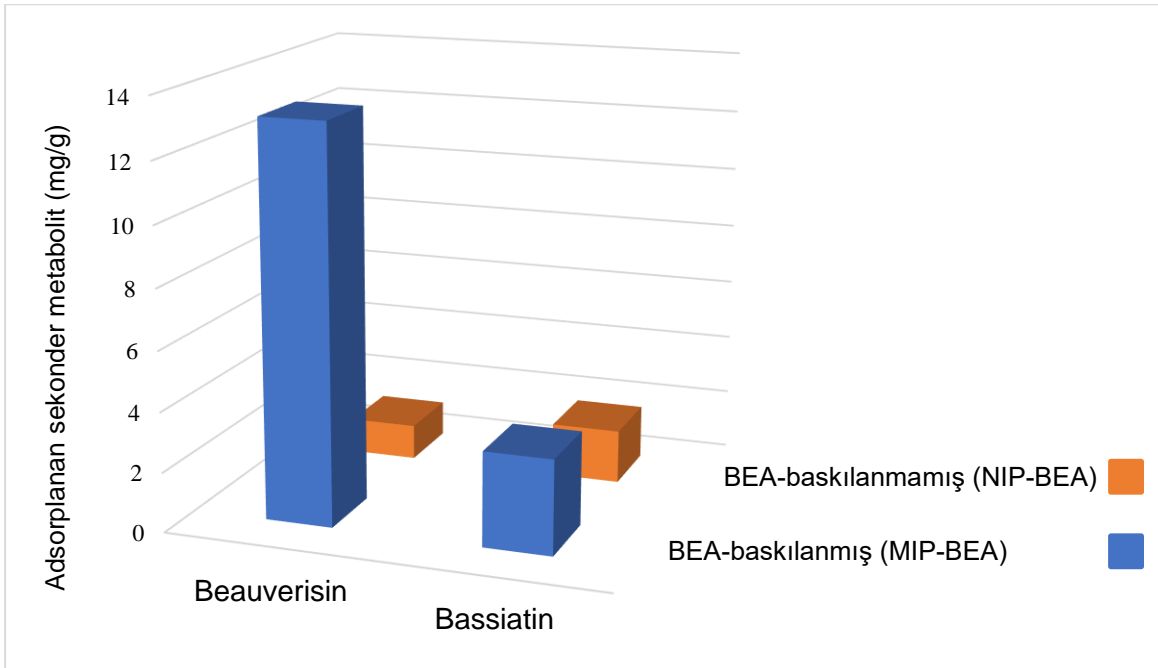
**Şekil 4.11.** Freundlich adsorpsiyon izotermi

**Çizelge 4.1.** BEA baskılı kriyojel kolonu için Langmuir ve Freundlich izotermi

	Deneysel	Langmuir			Freundlich		
	Q (mg/g)	Q <sub>max</sub> (mg/g)	b (mL/mg)	R <sup>2</sup>	K <sub>F</sub>	1/n	R <sup>2</sup>
<b>BEA- MIP kriyojel kolon</b>	43,5	285,7	0,193	0,9556	4,04	0,19	0,8241

#### 4.1.4. Seçicilik deneyi

BEA-baskılanmış ve BEA-baskılanmamış kriyojel kolonlar ile seçicilik deneyinde *B. bassiana* ve *P. fumosoroseus* tarafından sentezlenen başka bir sekonder metabolit olan bassiatin kullanılmıştır. 1 mg/mL bassiatin pH 6.5 MES tamponunda içerisinde 25°C'de 1 mL/dk akış hızında MIP-BEA ve NIP-BEA kolonlarından 2 saat boyunca geçirilmiştir. MIP-BEA kriyojelin, BEA molekülleri için bassiatin moleküllerinden 9,5 kat daha seçici olduğunu göstermektedir (Şekil 4.12) (Çizelge 4.2). Seçicilik deneyinin sonucunda, MIP-BEA kolonunda yer alan boşlukların beauverisine özgü kaviteleer olduğu bulunmuştur.



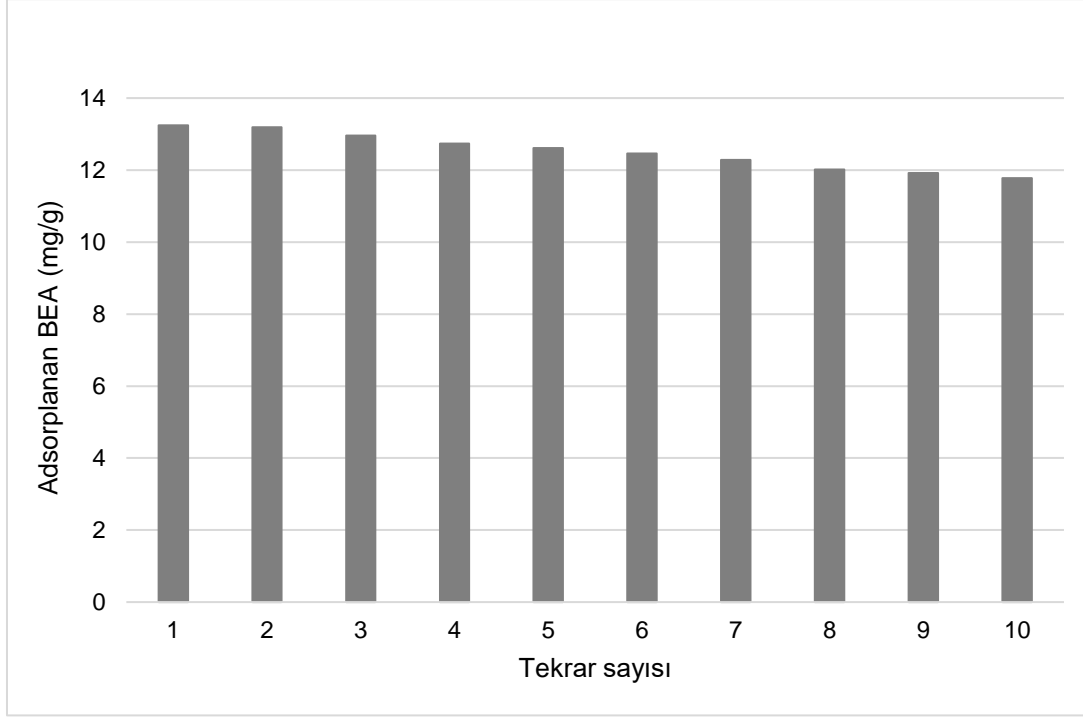
**Şekil 4.12.** MIP-BEA ve NIP-BEA kriyojel kolonlar ile seçicilik deneyi (Bassiatin: 1.0 mg/mL; akış hızı: 1.0 mL/dak; pH: 6.5; T:25°C; zaman: 120 dk)

**Çizelge 4.2.** Sekonder metabolitlerin dağılıma (Kd), seçicilik (k) ve bağıl seçicilik katsayı (k') değerleri

	NIP-BEA		BEA-MIP		
	Kd (mL/g)	k	Kd (mL/g)	k	k'
<b>Beauverisin (BEA)</b>	7,09	-	45,03	-	-
<b>Bassiatin</b>	5,33	1,32	3,53	12,75	9,59

#### 4.1.5. Tekrar kullanılabilirlik

Afinite kolonlarının en önemli özelliklerinden biri, yeniden kullanılabilir olmalarıdır. 1 mL/dk akış hızı ile pH 6.5 MES tamponunda 25°C'de, 0.5 mg/mL BEA çözeltisi MIP-BEA kriyojel kolonundan geçirilmiştir. BEA desorpsiyon işlemi için 0.1 M NaOH ve 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi 1 saat boyunca MIP-BEA kolonundan geçirilmiştir. Bu adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 10 kez art arda tekrarlanmıştır. MIP-BEA kriyojel kolonun BEA adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir azalma gözlenmemiştir (Şekil 4.13). 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrasında BEA-baskılanmış kriyojel kolon başlangıçtaki bağlama kapasitesinin yaklaşık %89'unu koruduğu bulunmuştur.



**Şekil 4.13.** BEA-baskılanmış kriyojel kolonun tekrar kullanılabilirliği (BEA: 0.5 mg/mL; pH: 6.5; T: 25°C, desorpsiyon ajanı: 0.1 M NaOH ve 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).

## 4.2. Beauverisin üretimi ve saflaştırılması

### 4.2.1. Fungus spor solüsyonları

Üç farklı *B. bassiana* suşu (Lül1, Ank12, KVL 03129) ve 3 farklı *P. fumosoroseus* suşu (Bey9, BB12 ve 0614), Sabouraud dekstrozu agar ve %1 maya ekstraktı (SDAY) içeren besiyerlerine ekilmiş ve 27°C'de 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. Bu besiyerlerine içerisinde %0,02 Tween 80 içeren 10 ml distile su eklenerek spor solüsyonları hazırlanmıştır. Improved Neubauer lamında spor sayımı yapılmış ve spor solüsyon konsantrasyonları  $1 \times 10^8$  konidia/mL olarak ayarlanmıştır (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** *Beauveria bassiana* ve *Paecilomyces fumosoroseus* suşlarının spor konsantrasyonları

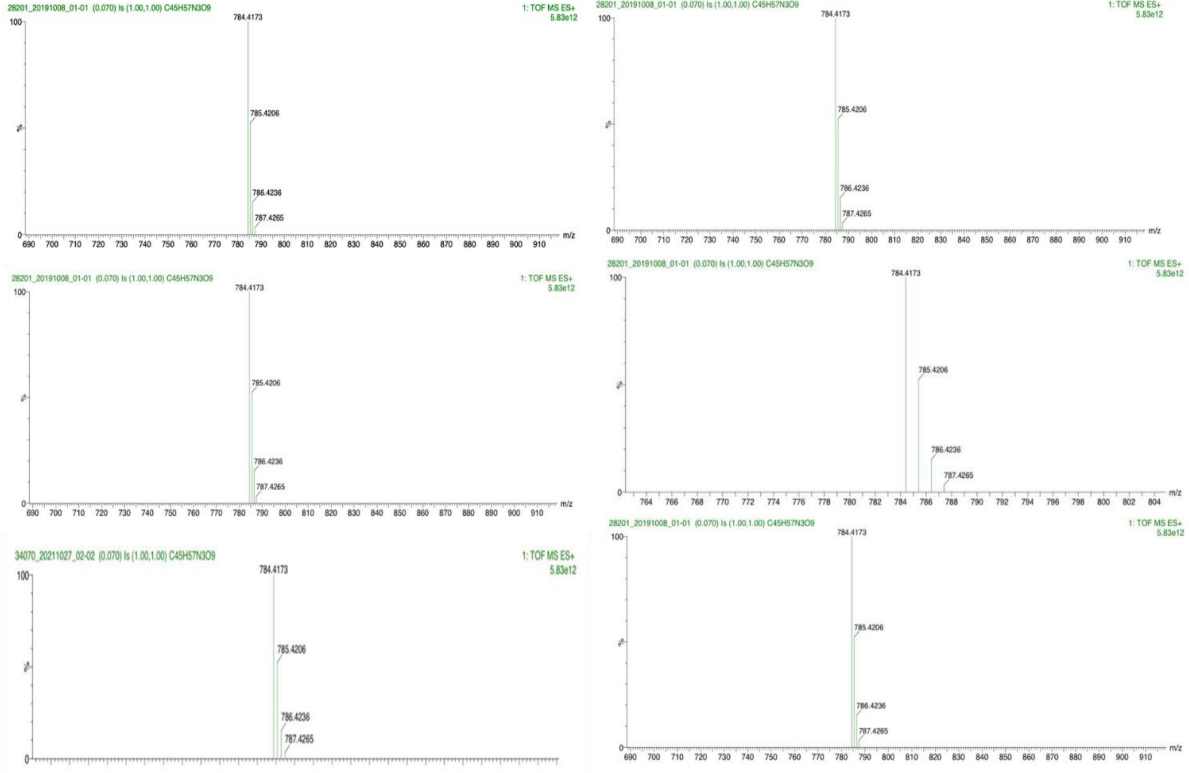
Entomopatojen Fungus	Fungusun elde edildiği lokasyon	Fungus suşunun adı	Spor konsantrasyonu (konidia/mL)
<i>Beauveria bassiana</i>	Lüleburgaz (Kırklareli)	Lül1	1,5 x 10 <sup>8</sup>
	Standart suş	KVL 03129	2,3 x 10 <sup>8</sup>
	Çalış köyü (Ankara)	Ank12	1,9 x 10 <sup>8</sup>
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Beytepe (Ankara)	Bey9	1,7 x 10 <sup>8</sup>
	Aydın-Akbük	0614	1,3 x 10 <sup>8</sup>
	Bolu- Gerece	Bb12	1,6 x 10 <sup>8</sup>

#### 4.2.2. Fungal kaynaktan beauverisin saflaştırılması

Üç farklı *B. bassiana* suşu (Lül1, KVL 03129, Ank12) ve 3 farklı *P. fumosoroseus* suşu (Bey9, 0614, Bb12) tarafından sentezlenen beauverisinin saflaştırılmasında BEA-baskılanmış kriyojel kolon kullanılmıştır. Fungal kaynaktaki beauverisinin maksimum adsorpsiyonu için, fungus örnekleri, denemeler sonucunda en uygun olarak bulunmuş olan; pH 6.5 MES tamponunu içerisinde ve 25°C'de 1 mL/dk akış hızında BEA-MIP kriyojel kolondan kolondan 2 saat boyunca geçirilmiştir. BEA desorpsiyon işlemi için 0.1 M NaOH ve 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi 1 saat boyunca MIP-BEA kolonundan geçirilmiştir.

3 farklı *B. bassiana* suşundan (Lül1, Ank12, KVL 03129) ve 3 farklı *P. fumosoroseus* suşundan (Bey9, 0614, Bb12) saflaştırılan BEA'nın tam kütle analizi ODTÜ Merkez laboratuvarı yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi laboratuvarından hizmet alımıyla yapılmıştır. 50-1000 kDa aralığında pozitif modda (ES +) Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi (HRMS) ile desorbe edilmiş numune üzerinde tam kütle analizi (ESI-TOF-MS) yapılmıştır. MS sistemi

olarak Waters SYNAPT G1 MS kullanıldı. Şekil 4.14'de görülebileceği gibi, BEA moleküler ağırlık zirveleri (784-786 g/mol) elde edilmiştir.



**Şekil 4.14.** Üç farklı *Beauveria bassiana* suşundan (Lül1, Ank12, KVL 03129) ve üç farklı *Paecilomyces fumosoroseus* suşundan (Bey9, 0614, Bb12) saflaştırılan beauverisinin yüksek çözünürlüklü kütle spektrofotometre analizi.

Üç farklı *B. bassiana* suşu ve üç farklı *P. fumosoroseus* suşundan saflaştırılan BEA miktarını belirlemek ODTÜ Merkez laboratuvarı moleküler biyoloji ve biyoteknoloji ARGE merkezi, Kütle Spektroskopi Laboratuvarından, LC-MS-MS analizi için hizmet alımı yapılmıştır. Fungal kaynaklardaki beauverisin miktarını bulmak için  $[M^+NH_4]^+$  iyonları kullanıldı. *P. fumosoroseus* (Bey9, 0614 ve Bb12) suşlarının *B. bassiana* (Lül1, KVL 03129 ve Ank12) suşlarından daha fazla miktarda BEA ürettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4).



**Çizelge 4.4.** *Beauveria bassiana* ve *Paecilomyces fumosoroseus* suşları tarafından sentezlenen beauverisin miktarları

Entomopatojen fungus	Suşlar	Beauverisin (ppm)
<i>Beauveria bassiana</i>	Lül1	1325,54 ± 20,74
	KVL 03129	26870,7 ± 255,0
	Ank12	530,73 ± 3,18
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Bey9	26434,4 ± 1407,1
	0614	5447,51 ± 135,94
	Bb12	8315,42 ± 166,49

#### 4.3. Saflaştırılan beauverisinin böcekler üzerinde denenmesi

Üç farklı *B. bassiana* suşu (Lül1, KVL 03129, Ank12) ve üç farklı *P. fumosoroseus* suşu (Bey9, 0614, Bb12) olmak üzere 6 farklı entomopatojen fungus suşundan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın üç farklı zararlı böcek üzerindeki patojen etkileri incelenerek Kruskal-Wallis ve Manny-Whitney U istatistik yöntemleri ile analiz edilmiştir. Daha sonra 6 farklı entomopatojen fungus suşundan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonu (0.001 M, 0.0001 M, 0.00001M, 0.000001M BEA) üç farklı zararlı böcek üzerinde incelenmiş Kruskal-Wallis ve Manny-Whitney U istatistik yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. Letal time (LT<sub>50</sub>) değerleri ve letal konsantrasyon (LC<sub>50</sub>) hesaplanmasında SPSS 16.0 probit analiz programı kullanılmıştır.

### 4.3.1. Beauverisinin *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki etkisinin incelenmesi

#### 4.3.1.1. Beauverisinin farklı uygulama yöntemleri ile *Galleria mellonella* larvalarına uygulanması

*Galleria mellonella* larvaları üzerinde; Lül1, KVL 03129, Ank12, Bey9, 0614 ve Bb12 olarak adlandırılan 6 farklı fungus suşundan elde edilen BEA ve ticari BEA, enjeksiyon ve püskürtme olmak üzere iki farklı yöntem ile denenmiştir. 27 gün süren deneme sonucunda ve ölü larva sayıları kaydedilmiştir. Her deney 5'er adet *G. mellonella* larvası kullanılarak 3 kez tekrarlanmıştır. Her altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA her uygulama yöntemi için toplam 15 adet *G. mellonella* larvası denenmiştir. Çalışmada iki farklı yöntem ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA, *G. mellonella* larvaları üzerinde başarılı olduğu bulunmuştur (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** Beauverisin ile inoküle edilen *Galleria mellonella* larvaları (Fotoğraf: Meltem ULUSOY, 2019)

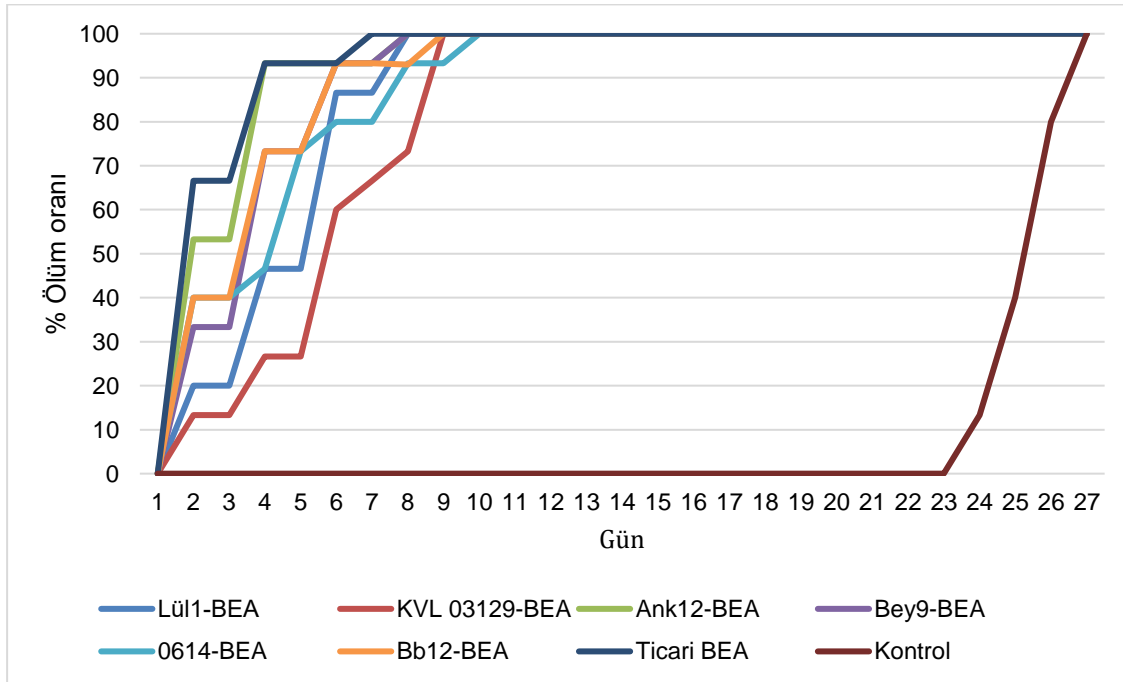
Enjeksiyon yöntemi ile 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA *G. mellonella* larvaları üzerinde denenmiştir. Kruskal-Wallis istatistik yöntemi ile 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA arasında fark olup olmadığı test edilmiş, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın Manny-Whitney U testi kullanılarak kendi aralarında ikili karşılaştırmaları yapılmıştır. KVL 03129 standart suşundan elde edilen beauverisin (KVL03129-BEA) ile Ank12 elde edilen beauverisin (Ank12-BEA) ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Ticari BEA ile KVL 03129-BEA ve 0614-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.5).  $LT_{50}$  değerlerine bakıldığında; Ank12-BEA uygulandığında böcek popülasyonunun %50'sini yaklaşık 2.370 günde öldüğü, ticari BEA uygulandığında ise böcek popülasyonunun yarısını 2.104 günde öldüğü bulunmuştur (Çizelge 4.7). Farklı fungal kaynaklardan saflaştırılan BEA ve ticari BEA ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p: 0.00$ ) ( $p < 0,05$ ).

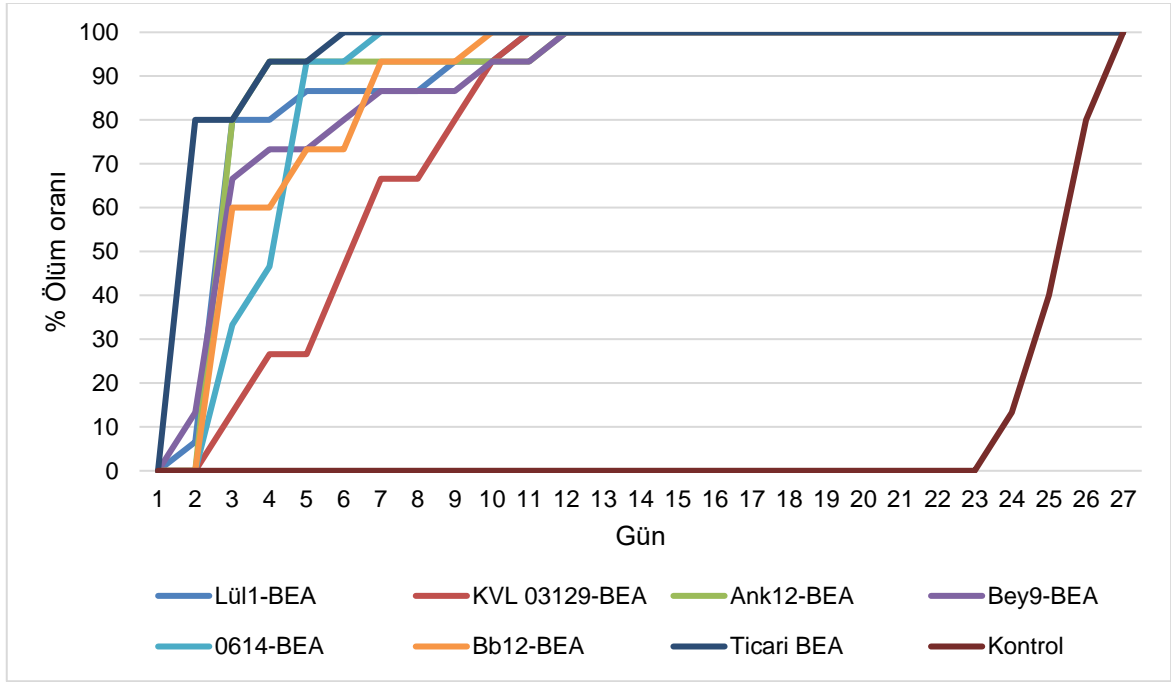
Püskürtme yöntemi ile 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA *G. mellonella* larvaları üzerinde denenmiştir. Kruskal-Wallis istatistik yöntemi ile 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ile ticari BEA arasında fark olup, olmadığı test edilmiş aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın Manny-Whitney U testi kullanılarak kendi aralarında ikili karşılaştırmaları yapılmıştır. Lül1-BEA ile KVL03129-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuşken ( $p < 0,05$ ), diğer fungus suşlarından elde edilen BEA (Ank12, Bey9, 0614, Bb12) ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). KVL03129-BEA ile Lül1-BEA ve Ank12-BEA istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Ank12 suşundan elde edilen BEA ile KVL03129-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanırken ( $p < 0,05$ ), diğer fungus suşlarından elde edilen BEA (Lül1, Bey9, 0614, Bb12) ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ). Bey-9 suşundan elde edilen BEA ile ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Bb12-BEA ile ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Ticari BEA ile KVL03129, Bey9 ve Bb12 suşlarından elde edilen BEA arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.6).  $LT_{50}$  değerine bakıldığında, Ank12-BEA uygulandığında böcek popülasyonunun %50'sini yaklaşık 2.819 gün içerisinde öldüğü bulunmuştur (Çizelge 4.7). Farklı

fungal kaynaklardan saflaştırılan BEA ve ticari BEA ile kontrol grupları arasında fark olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p: 0.00) (p<0,05).

Püskürtme ve enjeksiyon metotları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p: 0.904) (p>0.05). Enjeksiyon yöntemi, püskürtme yöntemine göre daha kısa süre içinde etkili olduğu bulunmuştur. Püskürtme yöntemi ile BEA çözeltileri *G. mellonella* larvaları üzerinde uygulandıktan sonra 8 gün sonra böcek popülasyonunda %89.52 oranında azalma gözlenirken, enjeksiyon yöntemi ile BEA çözeltileri *G. mellonella* larvaları üzerinde uygulandıktan sonra 8 gün sonra böcek popülasyonunda %94.28 oranında azalma gözlenmiştir (Şekil 4.16) (Şekil 4.17). *G. mellonella* larvaları üzerinde uygulanan iki yöntemin LT<sub>50</sub> değerlerine bakıldığında; püskürtme yöntemi ile uygulandığında böcek popülasyonunun yarısının ölmesi için gereken süre 3.307 gün, enjeksiyon yöntemi uygulandığında ise böcek popülasyonunun yarısı ölmesi için gereken süre 3.115 gün olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8).



**Şekil 4. 16.** *Galleria mellonella* larvaları üzerine enjeksiyon tekniği ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisin, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı.



**Şekil 4.17.** *Galleria mellonella* larvaları üzerine püskürtme tekniği ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisin, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı.

**Çizelge 4.5.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan beauverisin ve ticari beauverisinin enjeksiyon yöntemi ile *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1-BEA	KVL 03129-BEA	Ank12-BEA	Bey9-BEA	0614-BEA	Bb12-BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,354	,191	,612	,926	,702	,121	,00*
KVL 03129-BEA	,354	X	,026*	,151	,370	,177	,014*	,00*
Ank12-BEA	,191	,026*	X	,420	,142	,339	,790	,00*
Bey9-BEA	,612	,151	,420	X	,513	,889	,283	,00*
0614-BEA	,926	,370	,142	,513	X	,604	,080	,00*
Bb12-BEA	,702	,177	,339	,889	,604	X	,220	,00*
Ticari BEA	,121	,014*	,790	,283	,080	,220	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	X

\*p< 0.05

**Çizelge 4.6.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan beauverisin ve ticari beauverisinin püskürtme yöntemi ile *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi p<0.05).

	Lül1- BEA	KVL 03129- BEA	Ank12- BEA	Bey9- BEA	0614- BEA	Bb12- BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,040*	,915	,570	,764	,408	,118	,00*
KVL 03129- BEA	,040*	X	,032*	,119	,087	,190	,00*	,00*
Ank12-BEA	,915	,032*	X	,501	,714	,336	,136	,00*
Bey9-BEA	,570	,119	,501	X	,805	,801	,034*	,00*
0614-BEA	,764	,087	,714	,805	X	,604	,071	,00*
Bb12-BEA	,408	,190	,336	,801	,604	X	,016*	,00*
Ticari BEA	,118	,00*	,136	,034*	,071	,016*	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*

\*p< 0.05

**Çizelge 4.7.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın *Galleria mellonella* larvalarındaki LT<sub>50</sub> değerleri

Beauverisin	Enjeksiyon		Püskürtme	
	LT <sub>50</sub> (Gün)	%95 Güven Aralığı	LT <sub>50</sub> (Gün)	%95 Güven Aralığı
Lül1-BEA	3.999	3.401-4.606	2.973	2.347-3.533
KVL 03129- BEA	5.288	4.557-6.154	5.819	5.148-6.497
Ank12-BEA	2.370	1.867-2.819	2.819	1.683-3.756
Bey9-BEA	3.088	2.538-3.594	3.244	2.559-3.862
0614-BEA	3.342	2.683-3.953	3.932	3.437-4.390
Bb12-BEA	2.946	2.372-3.467	3.613	3.010-4.151
Ticari BEA	2.104	1.629-2.521	1.862	1.430-2.235
Kontrol	25,208	24.716-26.440	25,831	24.716-26.440

**Çizelge 4.8.** Enjeksiyon ve püskürtme yöntemleriyle uygulanan altı farklı kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın *Galleria mellonella* larvalarındaki LT<sub>50</sub> değerleri

Uygulama yöntemi	LT 50 değerleri (Gün)	% 95 Güven Aralığı
Enjeksiyon yöntemi	3.115	1.447-4.390
Püskürtme yöntemi	3.307	2.533-4.031

#### 4.3.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki beauverisinin *Galleria mellonella* larvalarına uygulanması

*Galleria mellonella* larvaları üzerinde; Lül1, Ank12, KVL 03129, Bey9, 0614 ve Bb12 olarak adlandırılan 6 fungus suşundan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonu (0.001M, 0.0001M, 0.00001M ve 0.000001M) püskürtme yöntem ile denenmiştir. 27 gün süren deneme sonucunda ve ölü larva sayıları kaydedilmiştir. Her deneyde 7'şer adet *G. mellonella* larvası kullanılmış olup deney 3 defa tekrarlanmıştır. Her altı farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA her konsantrasyonu için toplam 21 *G. mellonella* larvası denenmiştir. Altı farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA'nın ve ticari BEA'nın tüm konsantrasyonları *G. mellonella* üzerinde etkili olduğu bulunmuştur.

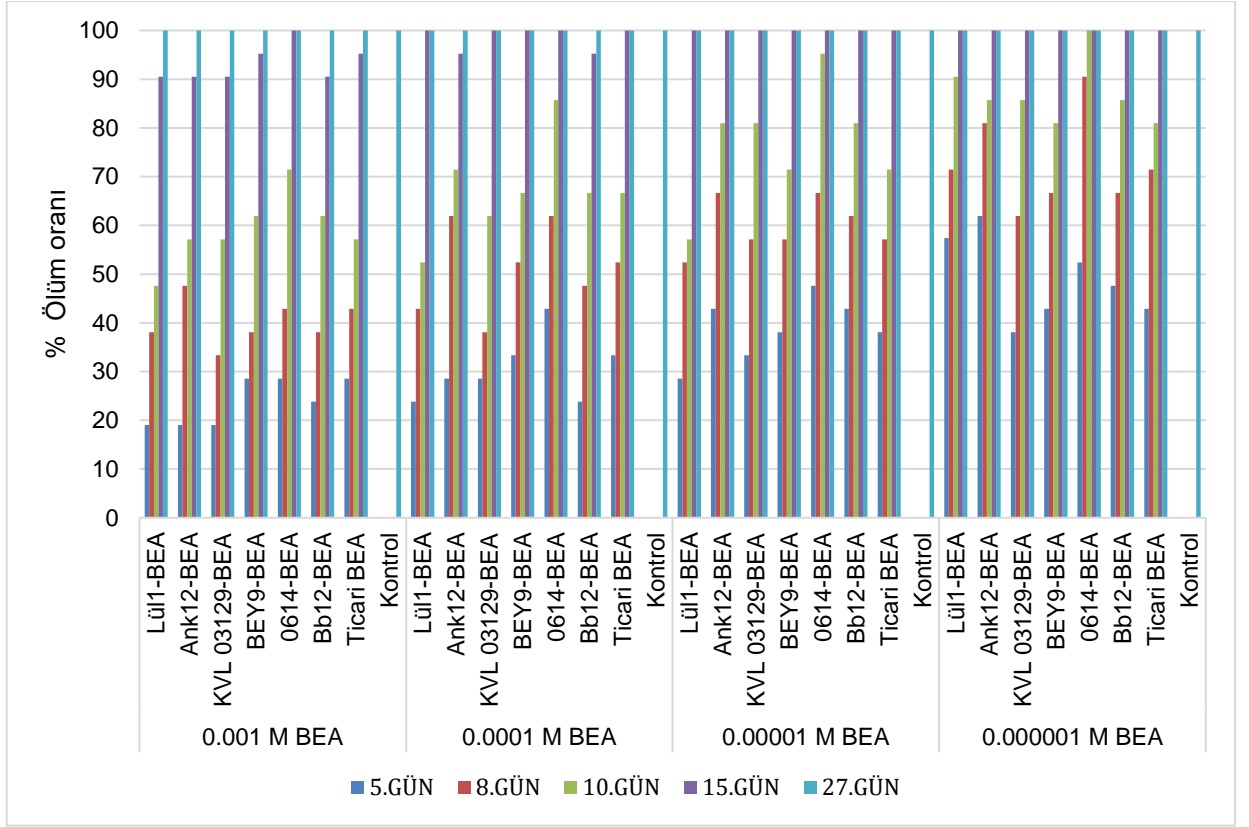
Lül1, Ank12, KVL 03129, Bey9, 0614 ve Bb12 suşlarından saflaştırılan BEA ve ticari BEA arasındaki fark Kruskal-Wallis istatistik yöntemi ile analiz edilmiş, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur ( $p: 0.682$ ) ( $p>0,05$ ). Farklı fungal kaynaklardan saflaştırılan BEA ve ticari BEA ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p: 0.00$ ) ( $p<0,05$ ).

BEA konsantrasyonu artıkça, böcek popülasyonunun tamamının ölmesi için gereken sürenin azaldığı bulunmuştur. (Şekil 4.18) (Çizelge 4.11). 6 farklı fungus kaynağından elde edilen BEA ve ticari beauverisinin 0.000001 M konsantrasyonu *G. mellonella* larvaları üzerinde uygulandıktan 12 gün sonra böcek popülasyonunun %73.46'sı öldüğü, 0.001M konsantrasyonu, *G. mellonella* larvaları üzerinde uygulandıktan 12 gün sonra böcek popülasyonunun %97.95'inin öldüğü gözlenmiştir. BEA konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak  $LT_{50}$  değerinde azalma saptanmıştır. 0.000001 M Ank12-BEA uygulandığında böcek popülasyonunun %50'isini öldürmesi için gereken süre 8.741 gün iken, 0.001 M Ank12-BEA'nın böcek popülasyonunun %50'isini öldürmesi için gereken sürenin 4.184 gün olduğu saptanmıştır.  $LT_{50}$  değerlerine bakıldığında; 0614 suşundan elde edilen BEA'nın 3 farklı konsantrasyonu (0.000001 M, 0.00001 M, 0.0001 M), ticari BEA'nın 3 farklı konsantrasyonuna göre daha kısa süre içinde böcek popülasyonunun yarısını öldürdüğü bulunmuştur (Çizelge 4.9).

$LC_{50}$  (Letal konsantrasyon) değerlerinin hesaplanması için 5., 8. ve 10. gün verileri kullanılmıştır. Ank12 suşundan elde edilen BEA'nın 5., 8. ve 10. günlerde böcek popülasyonunun %50'sini öldürmek için gerekli olan konsantrasyonlar sırasıyla  $5,3 \times 10^{-4}$  M,  $2,1 \times 10^{-5}$  M ve  $1,8 \times 10^{-7}$  M BEA olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.10). Tüm fungus suşlarından elde edilen BEA ve ticari BEA'nın, 10. günde elde edilen  $LC_{50}$  değerlerinin, 5. ve 8. gündeki  $LC_{50}$  değerlerinden daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.18).

Dört farklı BEA konsantrasyonu (0.001 M, 0.0001 M, 0.00001 M ve 0.000001 M) arasındaki fark Kruskal-Wallis testi kullanılarak analiz edilmiş ve tüm konsantrasyon grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). *G. mellonella* larvaları üzerinde uygulanan en yüksek BEA konsantrasyonunun, kısa sürede en yüksek ölüm oranını gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.11) (Şekil 4.18).





**Şekil 4.18.** *Galleria mellonella* larvaları üzerinde test edilen 6 farklı fungusdan elde edilen beauverisin ve ticari BEA'nın dört farklı konsantrasyonunun BEA'nın 5., 8., 10., 15. ve 27. günlere göre ölüm oranı.

**Çizelge 4.9.** Altı farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisin ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonunun uygulandığı *Galleria mellonella* larvalarının LT<sub>50</sub> değerleri

Beauverisin	0.000001 M BEA (0.007839 µl/mL)		0.00001 M BEA (0.007839 µl/mL)		0.0001 M BEA (0.07839 µl/mL)		0.001 M BEA (0.7839 µl/mL)	
	LT <sub>50</sub> (Gün)	%95 Güven Aralığı	LT <sub>50</sub> (Gün)	%95 Güven Aralığı	LT <sub>50</sub> (Gün)	%95 Güven Aralığı	LT <sub>50</sub> (Gün)	%95 Güven Aralığı
Lül1-BEA	9.136	7.417-10.265	8.927	6.792-10.278	8.305	6i886-9.256	4.812	3.559-5.749
KVL 03129-BEA	8.707	7.553-9.675	8.343	5.307-9.824	6.766	5.317-7.288	6.417	4.928-7.328
Ank12-BEA	8.741	7.412-9.678	6.811	5.703-7.715	6.710	5.444-7.799	4.184	2.949-5.131
Bey9-BEA	8.236	6.586-9.302	6.772	4.509-7.891	6.370	5.003-7.288	5.864	4.116-7.072
0614-BEA	7.437	5.359-8.613	5.742	4.060-6.842	5.414	3.872-6.284	5.065	3.817-5.798
Bb12-BEA	8.619	7.262-9.618	7.662	2.025-9.285	5.830	4.397-6.814	5.451	2.482-6.836
Ticari BEA	7.502	5.050-8.917	7.091	4.904-8.377	6.850	5.673-7.710	5.455	4.071-6.350
Kontrol	25.8	24.716-26.440	25.8	24.716-26.440	25.8	24.716-26.440	25.8	24.716-26.440

**Çizelge 4.10.** *Galleria mellonella* larvaları üzerinde denenen altı farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisinin ve ticari BEA'nın 5., 8. ve 10. günlerdeki LC<sub>50</sub> değerleri

Beauverisin	5.gündeki LC <sub>50</sub> (Molar)	8.gündeki LC <sub>50</sub> (Molar)	10.gündeki LC <sub>50</sub> (Molar)
Lül1-BEA	1,2 x 10 <sup>-3</sup>	7,5 x 10 <sup>-4</sup>	3,5 x 10 <sup>-4</sup>
KVL 03129-BEA	1,4 x 10 <sup>-2</sup>	1,2 x 10 <sup>-4</sup>	3,3 x 10 <sup>-5</sup>
Ank12-BEA	5,3 x 10 <sup>-4</sup>	2,1 x 10 <sup>-5</sup>	1,8 x 10 <sup>-7</sup>
Bey9-BEA	7,2 x 10 <sup>-2</sup>	8,7 x 10 <sup>-4</sup>	1,2 x 10 <sup>-5</sup>
0614-BEA	3,5 x 10 <sup>-4</sup>	2,7 x 10 <sup>-4</sup>	8,5 x 10 <sup>-6</sup>

<b>Bb12-BEA</b>	$2,7 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-5}$
<b>Ticari BEA</b>	$7,2 \times 10^{-2}$	$7,2 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-5}$

**Çizelge 4.11.** Dört farklı BEA konsantrasyonunun *Galleria mellonella* larvalarındaki  $LT_{50}$  değerleri

<b>Beauverisin konsantrasyonu</b>	<b><math>LT_{50}</math> (Gün)</b>	<b>%95 Güven Aralığı</b>
0.000001 M BEA (0.007839 $\mu$ l/mL)	8.535	7.404-9.378
0.00001 M BEA (0.007839 $\mu$ l/mL)	7.363	6.445-8.108
0.0001 M BEA (0.07839 $\mu$ l/mL)	6.766	5.905-7.434
0.001 M BEA (0.7839 $\mu$ l/mL)	5.313	4.550-5.831

#### 4.3.2. Beauverisinin *Tenebrio molitor* larvaları üzerindeki etkisinin incelenmesi

##### 4.3.2.1. Beauverisinin farklı uygulama yöntemleri ile *Tenebrio molitor* larvalarına uygulanması

*Tenebrio molitor* larvaları üzerinde; Lül1, KVL 03129, Ank12, Bey9, 0614 ve Bb12 olarak adlandırılan 6 fungus suşundan elde edilen BEA ve ticari ürün olan BEA, püskürtme ve enjeksiyon olmak üzere iki farklı yöntem ile denenmiştir. 28 gün süren deneme sonucunda ve ölü larva sayıları kaydedilmiştir. Her deney 5'er adet *T. molitor* larvası kullanılarak 3 kez tekrarlanmıştır. Her altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA her uygulama yöntemi için toplam 15 adet *T. molitor* larvası denenmiştir. Çalışmada iki farklı yöntem ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın *T. molitor* larvaları üzerinde başarılı olduğu bulunmuştur (Şekil 4.18).



**Şekil 4.19.** Beauverisin ile inoküle edilen *Tenebrio molitor* larvaları (Fotoğraf: Meltem ULUSOY, 2019).

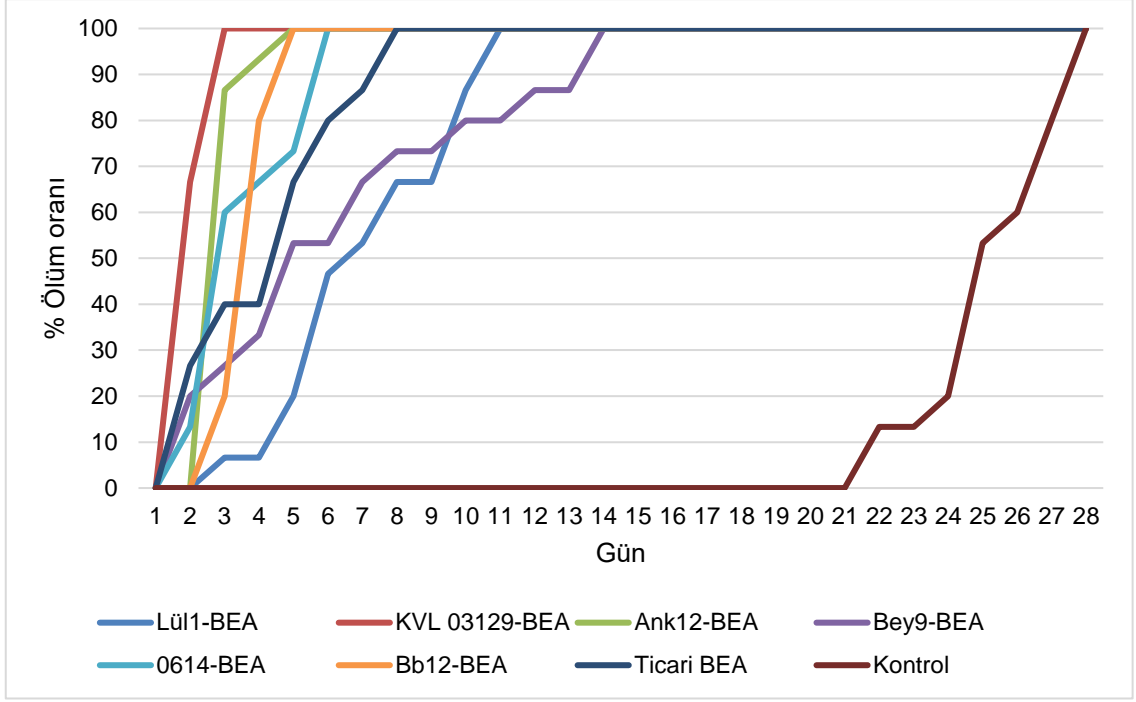
Enjeksiyon yöntemi ile 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA *T. molitor* larvaları üzerinde uygulanmıştır. Kruskal-Wallis istatistik yöntemi ile 6 farklı fungal kaynaklardan elden BEA, ticari BEA arasında fark olup, olmadığı test edilmiş aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0.00$ ) ( $p<0,05$ ). Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın Manny-Whitney U testi kullanılarak kendi aralarında ikili karşılaştırmaları yapılmıştır. Lül1-BEA ile Bey-9 suşundan elde edilen BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p<0,05$ ). KVL 03129 standart suşundan elde edilen BEA ile Bb12-BEA ve Ank12-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamış ( $p>0,05$ ) iken, diğer fungal kaynaklardan (Lül1, Bey9 ve 0614) elde edilen BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ank12-BEA ile Lül1-BEA ve Bey9-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bey9 suşundan elde edilen BEA ile diğer fungal kaynaklardan elde edilen BEA (Lül1, Ank12, KVL 03129, 0614 ve Bb12) ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>,05$ ). 0614 suşundan elde edilen BEA ile; Lül1-BEA, KVL 03129-BEA ve Bey9-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğu saptanmıştır ( $p<0,05$ ). Bb12 suşundan elde edilen BEA ile Bey9-BEA ve Lül1-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ticari BEA ile standart suş olan KVL 03129 suşundan elde edilen BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

bulunmuş ( $p < 0,05$ ) iken, diğer fungal kaynaklardan elde edilen beauverisin (Lül1, Ank12, Bey9, 0614 ve Bb12) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ) (Çizelge 4.12). Altı farklı fungal kaynaklardan saflaştırılan BEA ve ticari BEA ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Farklı fungal kaynaklardan saflaştırılan BEA ve ticari BEA ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.  $LT_{50}$  değerlerine bakıldığında; KVL 03129, Ank12, 0614 ve Bb12 suşlarından elde edilen BEA uygulamalarında böcek popülasyonunun yarısını öldürmesi için gereken süre, ticari BEA uygulanmasına göre daha az olduğu saptanmıştır. KVL 03129-BEA'nın *T. molitor* popülasyonunun yarısını öldürmesi için gereken süre 1.924 gün iken ticari BEA ürününü böcek popülasyonunun yarısını öldürmesi için gereken süre 3.451 olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.14).

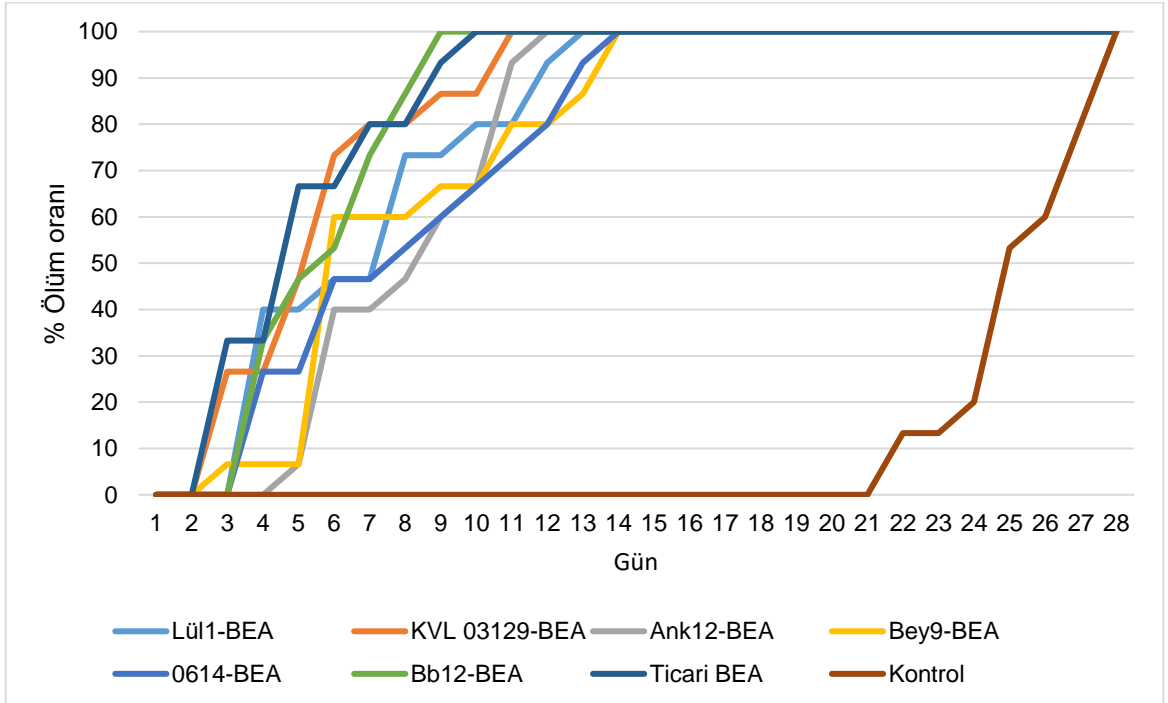
Püskürtme yöntemi ile 6 farklı fungal kaynaktan saflaştırılan ve ticari BEA *T. molitor* larvası üzerinde uygulanmıştır. Kruskal-Wallis istatistik yöntemi ile 6 farklı fungal kaynaklardan edilen BEA, ticari BEA arasında fark olup, olmadığı test edilmiş aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p: 0.00$ ) ( $p < 0,05$ ). Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın Manny-Whitney U testi kullanılarak kendi aralarında ikili karşılaştırmaları yapılmıştır. Lül1 suşundan elde edilen BEA ile diğer fungal kaynaklardan elde edilen BEA (KVL 03129, Ank12, Bey9, 0614 ve Bb12) ve ticari BEA arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). Standart suş olan KVL 03129 suşundan elde edilen BEA ile diğer fungus suşlarından elde edilen BEA (Ank-12, KVL03129, Bey-9, 06-14, Bb-12) ve ticari BEA arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). Standart suş olan KVL 03129'dan elde edilen BEA ile diğer fungal kaynaklardan elde edilen BEA (Lül1, Ank12, Bey9, 0614, Bb12) ve ticari BEA arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). Ank12-BEA ile diğer fungal kaynaklardan elde edilen BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ). Bey-9 suşundan elde edilen BEA ile diğer fungal kaynaklardan elde edilen BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ). 0614 suşundan elde edilen BEA ile ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Bb12 suşundan elde edilen BEA ile diğer fungal kaynaklardan elde

edilen BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ). Ticari BEA ile 0614 suşundan elde edilen BEA arasında olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Farklı fungal kaynaklardan saflaştırılan BEA ve ticari BEA ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.13.).  $LT_{50}$  değerlerine bakıldığında; KVL0312-BEA uygulandığında BEA böcek popülasyonunun %50'sini yaklaşık 4.918 günde öldüğü, ticari BEA'nın ise böcek popülasyonunun yarısını 5.380 günde öldüğü bulunmuştur (Çizelge 4.14).

Püskürtme ve enjeksiyon metotları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p: 0.00$ ) ( $p<0.05$ ). Enjeksiyon yönteminin, püskürtme yöntemine göre daha kısa süre içinde etkili olduğu gözlenmiştir. Püskürtme yöntemi ile BEA solüsyonları *T. molitor* larvaları üzerinde uygulandıktan sonra 11 gün sonra böcek popülasyonunda %90.47 oranında azalma gözlenirken, enjeksiyon yöntemi ile beauverisin çözeltileri *T. molitor* larvaları üzerinde uygulandıktan sonra 11 gün sonra böcek popülasyonunda %97.14 oranında azalma gözlenmiştir (Şekil 4.20) (Şekil 4.21). *T. molitor* larvaları üzerinde uygulanan iki yöntemin  $LT_{50}$  değerlerine bakıldığında; püskürtme yöntemi uygulandığında böcek popülasyonunun yarısının ölmesi için gereken süre 5.948 gün, enjeksiyon yöntemi uygulandığında ise böcek popülasyonunun yarısı ölmesi için gereken süre 3.431 gün olarak bulunmuştur (Çizelge 4.15).



**Şekil 4.20.** *Tenebrio molitor* larvaları üzerine enjeksiyon tekniği ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisin, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı.



**Şekil 4.21.** *Tenebrio molitor* larvaları üzerine püskürtme tekniği ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı.

**Çizelge 4.12.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın enjeksiyon yöntemi ile *Tenebrio molitor* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1- BEA	KVL 03129- BEA	Ank12- BEA	Bey9- BEA	0614- BEA	Bb12- BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,00*	,001*	,942	,031*	,004*	,097	,00*
KVL 03129- BEA	,00*	X	,413	,00*	,026*	,269	,006*	,00*
Ank12-BEA	,001*	,413	X	,00*	,153	,782	,052	,00*
Bey9-BEA	,942	,00*	,00*	X	,013*	,001*	,058	,00*
0614-BEA	,031*	,026*	,153	,013*	X	,290	,443	,00*
Bb12-BEA	,004*	,269	,782	,001*	,290	X	,120	,00*
Ticari BEA	,097	,006*	,052	,058	,443	,120	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*

\* $p < 0.05$

**Çizelge 4.13.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın püskürtme yöntemi ile *Tenebrio molitor* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1- BEA	KVL 03129- BEA	Ank12- BEA	Bey9- BEA	0614- BEA	Bb12- BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,211	,752	,764	,523	,212	,146	,00*
KVL 03129- BEA	,211	X	,142	,126	,058	,981	,844	,00*
Ank12-BEA	,752	,142	X	,996	,767	,153	,097	,00*
Bey9-BEA	,764	,126	,996	X	,736	,130	,086	,00*
0614-BEA	,523	,058	,767	,736	X	,061	,038*	,00*
Bb12-BEA	,212	,981	,153	,130	,061	X	,875	,00*
Ticari BEA	,146	,884	,097	,086	,038*	,875	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*

\* $p < 0.05$



**Çizelge 4.14.** . Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın *Tenebrio molitor* larvalarındaki LT<sub>50</sub> değerleri.

Beauverisin	Enjeksiyon		Püskürtme	
	LT <sub>50</sub> (Gün)	%95 Güven Aralığı	LT <sub>50</sub> (Gün)	%95 Güven Aralığı
Lül1-BEA	6.137	5.385-6.867	6.600	5.936-7.297
KVL 03129-BEA	1.924	1.532-2.260	4.918	4.252-5.550
Ank12-BEA	2.700	2.365-2.981	7.677	7.041-8.333
Bey9-BEA	5.008	4.129-5.857	7.094	6.313-7.867
0614-BEA	3.120	2.597-3.611	7.080	6.263-7.908
Bb12-BEA	3.451	3.131-3.756	5.380	4.823-5.932
Ticari BEA	3.602	2.976-4.219	4.507	3.870-5.105
Kontrol	26,768	25.874- 28.412	24,249	22.563-25.986

**Çizelge 4.15.** Enjeksiyon ve püskürtme yöntemleriyle uygulanan altı farklı kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın *Tenebrio molitor* larvalarındaki LT50 değerleri.

Uygulama yöntemi	LT <sub>50</sub> değerleri (Gün)	%95 Güven Aralığı
Enjeksiyon yöntemi	3.431	2.996-3.871
Püskürtme yöntemi	5.948	5.381-6.437

#### 4.3.2.2. Farklı konsantrasyonlardaki beauverisinin *Tenebrio molitor* larvalarına uygulanması

*Tenebrio molitor* larvaları üzerinde; Lül1, Ank12, KVL 03129, Bey9, 0614 ve Bb12 olarak adlandırılan 6 fungus suşundan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonu (0.001M, 0.0001M, 0.00001M ve 0.000001M) püskürtme yöntem ile denenmiştir. Her deneyde 7'şer adet *T. molitor* larvası kullanılmış olup deney 3 defa tekrarlanmıştır. Her altı farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA her konsantrasyonu için toplam 21 adet *T. molitor* larvası denenmiştir. Altı farklı

fungus kaynaktan elde edilen BEA'nın ve ticari BEA'nın tüm konsantrasyonlarının *T. molitor* üzerinde etkili olduğu bulunmuştur.

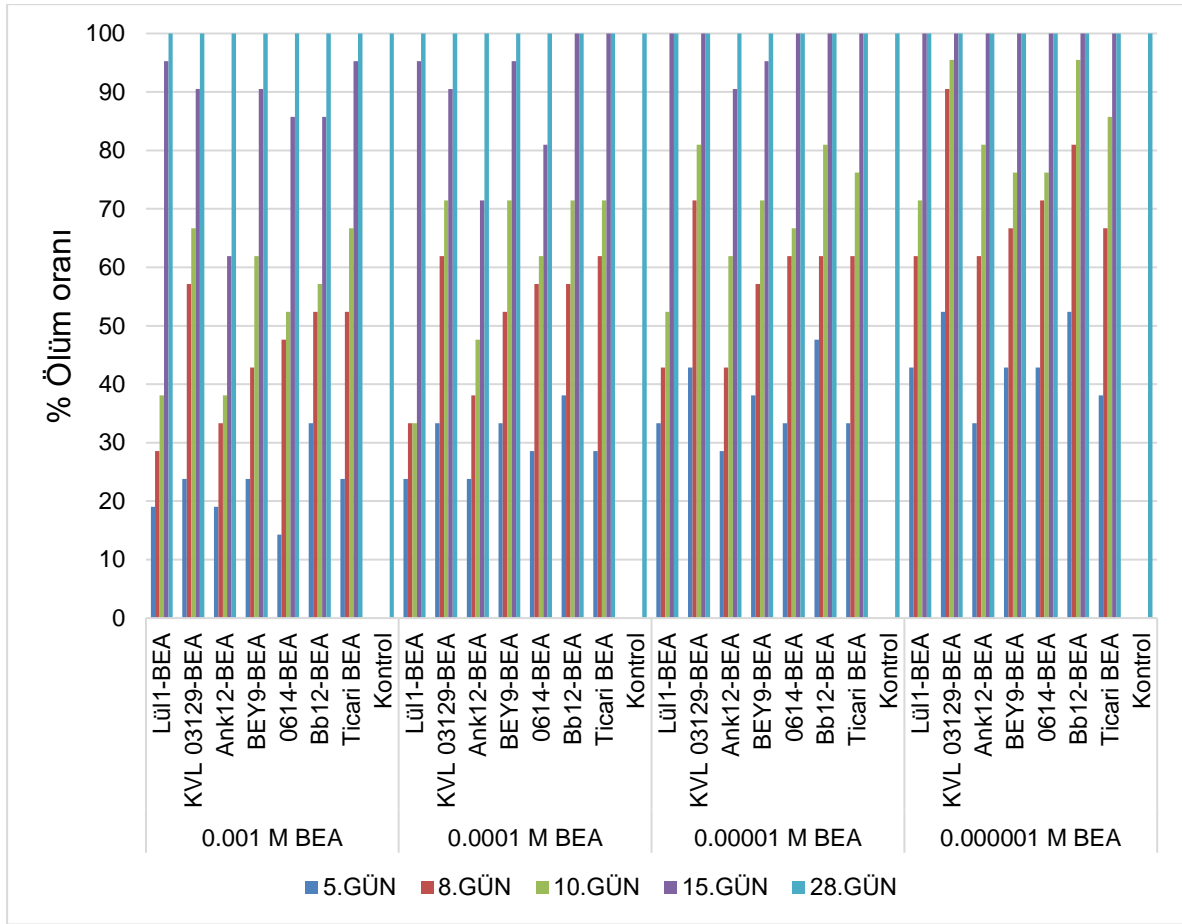
Altı farklı fungus kaynaktan (Lül1, Ank12, KVL 03129, Bey9, 0614 ve Bb12) saflaştırılan BEA ve ticari BEA arasında fark olup olmadığı Kruskal-Wallis istatistik yöntemi ile analiz edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ( $p: 0.00$ ) ( $p < 0,05$ ). Altı farklı fungus kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın Manny-Whitney U testi kullanılarak kendi aralarında ikili karşılaştırmaları yapılmıştır. 0.000001M beauverisin konsantrasyonunda; KVL 03129 suşundan saflaştırılan BEA ile Ank12-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuş iken ( $p < 0.05$ ) diğer fungus suşlarından (Lül1, Bey9, 0614, Bb12) elde edilen BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Ank-BEA ile KVL03129, Bey9, Bb12 suşlarından elde edilen BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). (Çizelge 4.16). 0.00001M BEA konsantrasyonunda; fungus kaynaklardan (Lül1, KVL03129, Ank12, Bey9, 0614, Bb12) elde edilen BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ) (Çizelge 4.17). 0.0001 M BEA konsantrasyonunda; KVL03129-BEA ile Ank12-BEA arasında istatistiksel olarak fark bulunmuş iken ( $p < 0.05$ ), diğer fungus (Lül1, Bey9, 0614, Bb12) kaynaklardan saflaştırılan ve ticari BEA arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ) (Çizelge 4.18). 0.001M BEA konsantrasyonunda; fungus kaynaklardan (Lül1, KVL03129, Ank12, Bey9, 0614, Bb12) elde edilen BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ) (Çizelge 4.19). Altı farklı fungus kaynaklardan saflaştırılan BEA ve ticari BEA ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Uygulanan BEA konsantrasyonu artıkça, böcek popülasyonunun tamamının ölmesi için gereken sürenin azaldığı gözlenmiştir. 6 farklı fungus kaynağından elde edilen BEA ve ticari BEA'nın 0.000001 M konsantrasyonu *T. molitor* larvaları üzerinde uygulandıktan 13 gün sonra böcek popülasyonunun %78.23'ünün öldüğü, 0.001M konsantrasyonu, *T. molitor* larvaları üzerinde uygulandıktan 13 gün sonra böcek popülasyonunun %96.59'unun öldüğü gözlenmiştir.  $LT_{50}$

değerlerine bakıldığında; Bb12 suşundan elde edilen BEA'nın uygulandığı 2 farklı konsantrasyonunun (0.00001 M, 0.0001 M, 0.001 M), ticari BEA'nın uygulandığı 2 farklı konsantrasyonuna göre daha kısa süre içinde böcek popülasyonunun yarısını öldürdüğü bulunmuştur. 0.000001 M KVL 03129-BEA uygulandığında böcek popülasyonunun %50'sini öldürmesi için gereken süre 7.924 gün iken, 0.001 M KVL 03129-BEA uygulandığında böcek popülasyonunun %50'sini öldürmesi için gereken süre, 4.803 gün olarak bulunmuştur (Çizelge 4.20).

LC<sub>50</sub> değerlerinin hesaplanması için 5., 8. ve 10. gündeki veriler kullanılmıştır. Bb12 suşundan elde edilen BEA'nın 5., 8. ve 10. günlerde böcek popülasyonunun %50'sini öldürmek için gerekli olan konsantrasyonlar sırasıyla  $6,3 \times 10^{-4}$  M,  $5,3 \times 10^{-4}$  M ve  $3,3 \times 10^{-5}$  M BEA olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.21). Tüm fungus suşlarından elde edilen BEA ve ticari BEA'nın, 10. günde elde edilen LC<sub>50</sub> değerlerinin, 5. ve 8. gündeki LC<sub>50</sub> değerlerinden daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.22).

Dört farklı BEA konsantrasyonu (0.001 M, 0.0001 M, 0.00001 M ve 0.000001 M) arasındaki fark Kruskal-Wallis ile test edilmiş ve tüm konsantrasyon grupları arasında anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). *T. molitor* larvaları üzerinde uygulanan en yüksek BEA konsantrasyonunun, kısa sürede en yüksek ölüm oranını gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.22) (Şekil 4.22).



**Şekil 4.22.** *Tenebrio molitor* larvaları üzerinde test edilen 6 farklı fungusdan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın dört farklı konsantrasyonunun BEA'nın 5., 8., 10., 15. ve 28. günlere göre ölüm oranı.

**Çizelge 4.16.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.000001M konsantrasyonunun *Tenebrio molitor* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1- BEA	KVL 03129- BEA	Ank12- BEA	Bey9- BEA	0614- BEA	Bb12- BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,767	,104	,829	,833	,447	,511	,00*
KVL 03129- BEA	,767	X	,020*	,883	,396	,788	,670	,00*
Ank12-BEA	,104	,020*	X	,029*	,090	,005*	,008*	,00*
Bey9-BEA	,829	,883	,029*	X	,322	,788	,670	,00*
0614-BEA	,833	,396	,090	,322	X	,305	,265	,00*
Bb12-BEA	,447	,788	,005*	,788	,305	X	,989	,00*
Ticari BEA	,511	,670	,008*	,670	,265	,989	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*

\* $p < 0.05$

**Çizelge 4.17.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.000001M konsantrasyonunun *Tenebrio molitor* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1- BEA	KVL 03129- BEA	Ank12- BEA	Bey9- BEA	0614- BEA	Bb12- BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,396	,965	,187	,899	,130	,232	,00*
KVL 03129- BEA	,396	X	,252	,742	,421	,475	,608	,00*
Ank12-BEA	,965	,252	X	,116	,691	,065	,108	,00*
Bey9-BEA	,187	,742	,116	X	,292	,696	,825	,00*
0614-BEA	,899	,421	,691	,292	X	,147	,215	,00*
Bb12-BEA	,130	,475	,065	,695	,147	X	,860	,00*
Ticari BEA	,232	,608	,108	,825	,215	,860	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*

\* $p < 0.05$

**Çizelge 4.18.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.0001M konsantrasyonunun *Tenebrio molitor* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1- BEA	KVL 03129- BEA	Ank12- BEA	Bey9- BEA	0614- BEA	Bb12- BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,070	,631	,473	,273	,198	,445	,00*
KVL 03129- BEA	,070	X	,022*	,230	,462	,671	,278	,00*
Ank12-BEA	,631	,022*	X	,237	,105	,077	,228	,00*
Bey9-BEA	,473	,230	,237	X	,661	,482	,942	,00*
0614-BEA	,273	,462	,105	,661	X	,800	,734	,00*
Bb12-BEA	,198	,671	,077	,482	,800	X	,539	,00*
Ticari BEA	,445	,278	,228	,942	,734	,539	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*

\* $p < 0.05$

**Çizelge 4.19.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.001M konsantrasyonunun *Tenebrio molitor* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1- BEA	KVL 03129- BEA	Ank12- BEA	Bey9- BEA	0614- BEA	Bb12- BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,358	,857	,360	,690	,341	,786	,00*
KVL 03129- BEA	,358	X	,493	,073	,218	,910	,560	,00*
Ank12-BEA	,857	,493	X	,285	,592	,432	,923	,00*
Bey9-BEA	,360	,073	,285	X	,618	,065	,252	,00*
0614-BEA	,690	,218	,592	,618	X	,252	,186	,00*
Bb12-BEA	,341	,910	,432	,065	,252	X	,516	,00*
Ticari BEA	,786	,560	,923	,252	,186	,516	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*

\* $p < 0.05$

**Çizelge 4.20.** Altı farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisin ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonunun uygulandığı *Tenebrio molitor* larvalarının LT50 değerleri

Beauverisin	0.000001 M BEA (0.007839 µl/mL)		0.00001 M BEA (0.007839 µl/mL)		0.0001 M BEA (0.07839 µl/mL)		0.001 M BEA (0.7839 µl/mL)	
	LT <sub>50</sub> (Gün)	95% Güven Aralığı	LT <sub>50</sub> (Gün)	95% Güven Aralığı	LT <sub>50</sub> (Gün)	95% Güven Aralığı	LT <sub>50</sub> (Gün)	95% Güven Aralığı
Lül1-BEA	8.563	7.310- 9.925	8.023	4.689- 9.820	7.747	2.391- 10.695	6.311	3.880- 7.670
KVL 03129- BEA	7.924	6.583- 8.924	6.949	3.513- 8.831	5.962	4.143- 7.052	4.803	3.308- 5.782
Ank12-BEA	12.366	7.576- 14.073	9.621	3.551- 11.652	8.994	5.733- 10.618	6.565	5.337- 7.415
Bey9-BEA	8.552	6.760- 9.732	8.363	4.630- 9.969	7.035	5.061- 8.311	6.052	3.595- 7.643
0614-BEA	8.806	7.331- 9.909	7.627	5.484- 9.077	6.615	4.201- 8.040	6.121	4.120- 7.362
Bb12-BEA	7.327	5.439- 8.982	6.488	4.545- 7.971	5.649	3.387- 7.038	5.147	4.215- 5.850
Ticari BEA	7.119	6.055- 8.108	6.631	5.377- 7.728	6.405	4.729- 7.534	5.927	4.652- 6.774
Kontrol	22.1	20,979- 22,770	22.1	20,979- 22,770	22.1	20,979- 22,770	22.1	20,979- 22,770

**Çizelge 4.21.** *Tenebrio molitor* larvaları üzerinde denenen altı farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisinin ve ticari BEA'nın 5., 8. ve 10. günlerdeki LC<sub>50</sub> değerleri

<b>Beauverisin</b>	<b>5.gündeki LC<sub>50</sub> (Molar)</b>	<b>8.gündeki LC<sub>50</sub> (Molar)</b>	<b>10.gündeki LC<sub>50</sub> (Molar)</b>
Lül1-BEA	1,1 x 10 <sup>-3</sup>	6,3 x 10 <sup>-4</sup>	1,2 x 10 <sup>-4</sup>
KVL 03129-BEA	5,3 x 10 <sup>-4</sup>	3,3 x 10 <sup>-4</sup>	1,3 x 10 <sup>-4</sup>
Ank12-BEA	7,4 x 10 <sup>-3</sup>	1,8 x 10 <sup>-4</sup>	1,7 x 10 <sup>-4</sup>
Bey9-BEA	7,5 x 10 <sup>-3</sup>	1,4 x 10 <sup>-4</sup>	4,8 x 10 <sup>-5</sup>
0614-BEA	3,5 x 10 <sup>-3</sup>	3,4 x 10 <sup>-5</sup>	2,3 x 10 <sup>-5</sup>
Bb12-BEA	6,3 x 10 <sup>-4</sup>	5,3 x 10 <sup>-4</sup>	3,3 x 10 <sup>-5</sup>
Ticari BEA	1,4 x 10 <sup>-2</sup>	2,2 x 10 <sup>-4</sup>	4,9 x 10 <sup>-5</sup>

**Çizelge 4.22.** Dört farklı BEA konsantrasyonunun *Tenebrio molitor* larvalarındaki LT<sub>50</sub> değerleri

<b>Beauverisin konsantrasyonu</b>	<b>LT<sub>50</sub> (Gün)</b>	<b>%95 Güven Aralığı</b>
0.000001 M BEA (0.007839 µl/mL)	8.863	7.478-9.886
0.00001 M BEA (0.007839 µl/mL)	7.959	6.432-9.054
0.0001 M BEA (0.07839 µl/mL)	7.228	5.960-8.162
0.001 M BEA (0.7839 µl/mL)	6.181	5.181-6.793



### 4.3.3. Beauverisinin *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki etkisinin incelenmesi

#### 4.3.3.1. Beauverisinin farklı uygulama yöntemleri ile *Leptinotarsa decemlineata* larvalarına uygulanması

Üç farklı *B. bassiana* suşu (Lül1, KVL 03129, Ank12) ve üç farklı *P. fumosoroseus* (Bey9, 0614 ve Bb12) suşlarından saflaştırılan BEA ve ticari BEA enjeksiyon, püskürtme ve yaprak daldırma yöntemleriyle ile *L. decemlineata* larvaları üzerinde denenmiştir. 31 gün süren deneme sonucunda ve ölü larva sayıları kaydedilmiştir. Her deney 5'er adet *L. decemlineata* kullanılarak 3 kez tekrarlanmıştır. Her altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA her uygulama yöntemi için toplam 15 adet *L. decemlineata* larvası denenmiştir. Çalışmada üç farklı yöntem ile uygulanan BEA'nın *L. decemlineata* larvaları üzerinde başarılı olduğu bulunmuştur. Çalışmada iki farklı yöntem ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın *L. decemlineata* larvaları üzerinde başarılı olduğu bulunmuştur. BEA'ya maruz kaldıktan birkaç gün sonra, deneyde kullanılan böceklerin çoğunun karnında kahverengi-siyah noktalar görülmüştür (Şekil 4.22). Bununla birlikte, böceğin karnındaki kahverengi-siyah lekelerin boyut ve sayısının her böcek için farklılık gösterdiği gözlenmiştir.



**Şekil 4.23.** Beauverisin ile inoküle edilen *Leptinotarsa decemlineata* larvaları (Fotoğraf: Meltem ULUSOY, 2019)

Altı farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA, enjeksiyon yöntemi ile *L. decemlineata* larvaları üzerinde denenmiştir. Kruskal-Wallis istatistik yöntemi ile suşlar arasında fark olup, olmadığı test edilmiş aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın Manny-Whitney U testi kullanılarak kendi aralarında ikili karşılaştırmaları yapılmıştır. Lül1 suşundan elde edilen BEA ile diğer fungal kaynaklardan (KVL 03129, Ank12, Bey9, 0614, Bb12) elde edilen ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ). KVL 03129 standart suşundan elde edilen BEA ile diğer fungal kaynaklardan saflaştırılan ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ). Ank12 suşundan elde edilen BEA ile ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bey9-BEA ile ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). 0614-BEA ile diğer fungal kaynaklardan elde edilen BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ). Bb12 suşundan elde edilen BEA ile diğer fungal kaynaklardan saflaştırılan ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). Ticari BEA ile Ank12-BEA ve Bey9-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.23). Farklı fungal kaynaklardan saflaştırılan BEA ve ticari BEA ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p: 0.00$ ) ( $p < 0,05$ ).  $LT_{50}$  değerlerine bakıldığında, Bb12 suşundan elde edilen BEA uygulandığında böcek popülasyonunun %50'sini yaklaşık 6.459 günde öldüğü gözlenmiştir. Ticari BEA uygulandığında ise böcek popülasyonunun yarısını 5.984 günde öldüğü bulunmuştur (Çizelge 4.26).

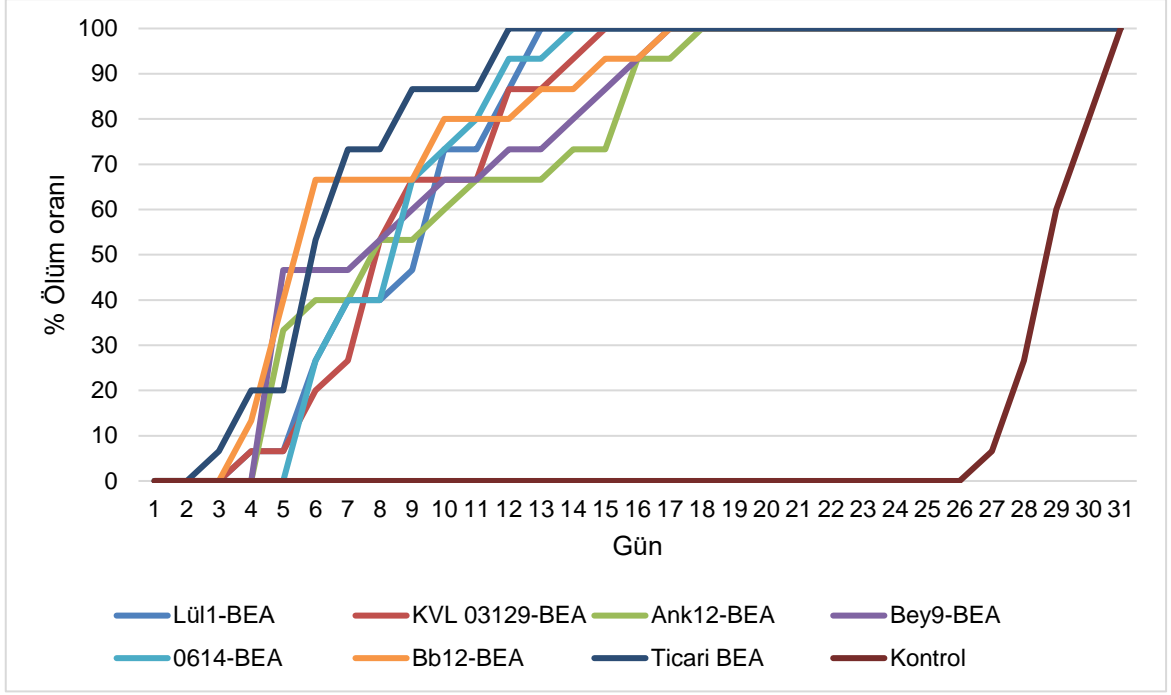
Püskürtme yöntemi ile 6 farklı fungus suşundan saflaştırılan BEA ve ticari BEA *L. decemlineata* larvaları üzerinde denemiştir. Kruskal-Wallis istatistik yöntemi ile fungal kaynaklardan saflaştırılan BEA ve ticari BEA arasında fark olup, olmadığı test edilmiş aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın Manny-Whitney U testi kullanılarak kendi aralarında ikili karşılaştırmaları yapılmıştır. Lül1 suşundan elde edilen BEA ile Bb12-BEA arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmuşken ( $p < 0,05$ ), diğer fungal kaynaklardan elde edilen BEA (KVL 03129, Ank12, Bey9,

0614) ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). KVL 03129 suşundan elde edilen BEA ile Bey9-BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuşken ( $p<0,05$ ), diğer fungal kaynaklardan elde edilen BEA (Lül1, Ank12, 0614, Bb12) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Ank12 suşundan elde edilen BEA ile Bey9-BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p<0,05$ ). Bey-9 suşundan elde edilen BEA ile Ank12-BEA, KVL 03129-BEA ve Bb12-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p<0,05$ ). 0614 suşundan elde edilen BEA ile ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bb12 suşundan elde edilen BEA ile Lül1-BEA, Bey9-BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ticari BEA ile Lül1-BEA ve Bey9-BEA arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.24). Farklı fungal kaynaklardan saflaştırılan BEA ve ticari BEA ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p: 0.00$ ) ( $p<0,05$ ).  $LT_{50}$  değerlerine bakıldığında, Bey9 suşundan elde edilen BEA uygulandığında böcek popülasyonunun %50'sini yaklaşık 6.639 günde öldüğü gözlenmiştir. Ticari BEA uygulandığında ise böcek popülasyonunun yarısını 6.076 günde öldüğü bulunmuştur (Çizelge 4.26).

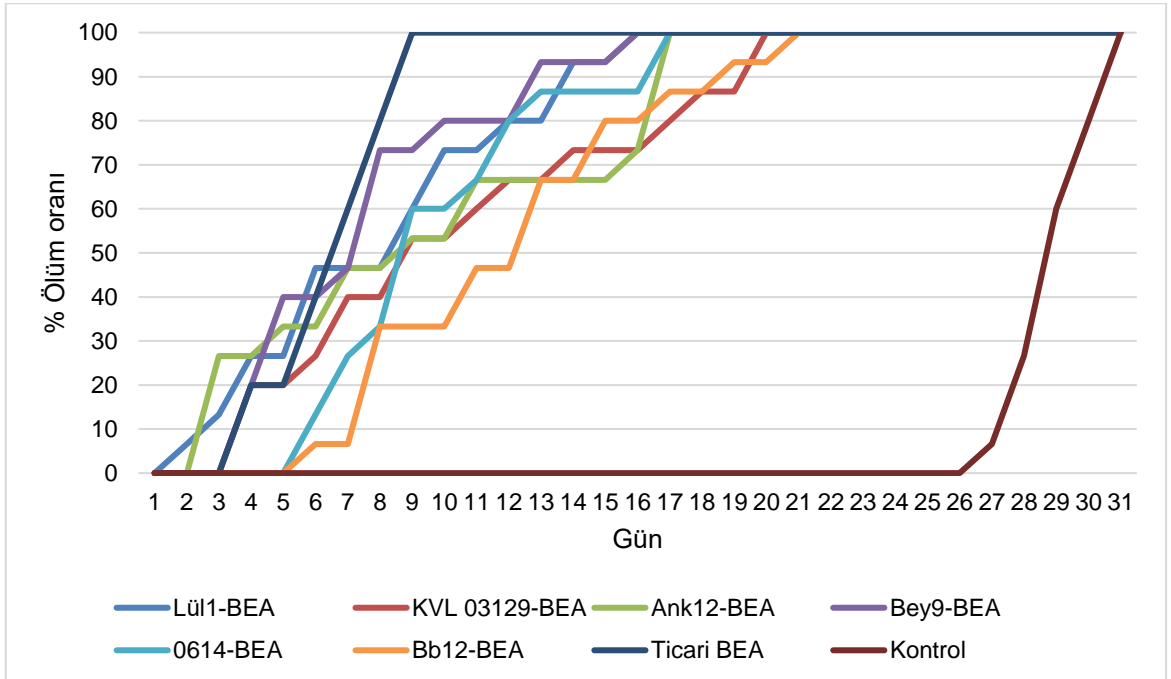
Yaprak daldırma yöntemi ile 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari ürün olan BEA *L. decemlineata* larvaları üzerinde denenmiştir. Kruskal-Wallis istatistik yöntemi ile fungal kaynaklardan saflaştırılan BEA ve ticari BEA arasında fark olup, olmadığı test edilmiş aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın Manny-Whitney U testi kullanılarak kendi aralarında ikili karşılaştırmaları yapılmıştır. Lül1 suşundan elde edilen BEA ile Ank12-BEA ve 0614-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Standart suş olan KVL 03129'dan elde edilen BEA ile Ank12-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ank12 suşundan elde edilen BEA ile Bey9-BEA ve 0614-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamışken ( $p>0,05$ ), diğer fungal kaynaklardan saflaştırılan (Lül1, KVL 03129 ve Bb12) suşlarında elde edilen BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bey9 suşundan elde edilen BEA ile ticari BEA

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). 0614 suşundan elde edilen BEA ile Lül1-BEA, Bb12-BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Bb12 suşundan elde edilen BEA ile 0614-BEA, Ank12-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Ticari BEA ile Ank12-BEA, Bey9-BEA, 0614-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.25). Farklı fungal kaynaklardan saflaştırılan BEA ve ticari BEA ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p: 0.00$ ) ( $p < 0,05$ ).  $LT_{50}$  değerlerine bakıldığında, Lül1 suşundan elde edilen BEA uygulandığında böcek popülasyonunun %50'sini yaklaşık 7.970 günde öldüğü gözlenmiştir. Ticari BEA uygulandığında ise böcek popülasyonunun yarısını 8.530 günde öldüğü bulunmuştur (Çizelge 4.26).

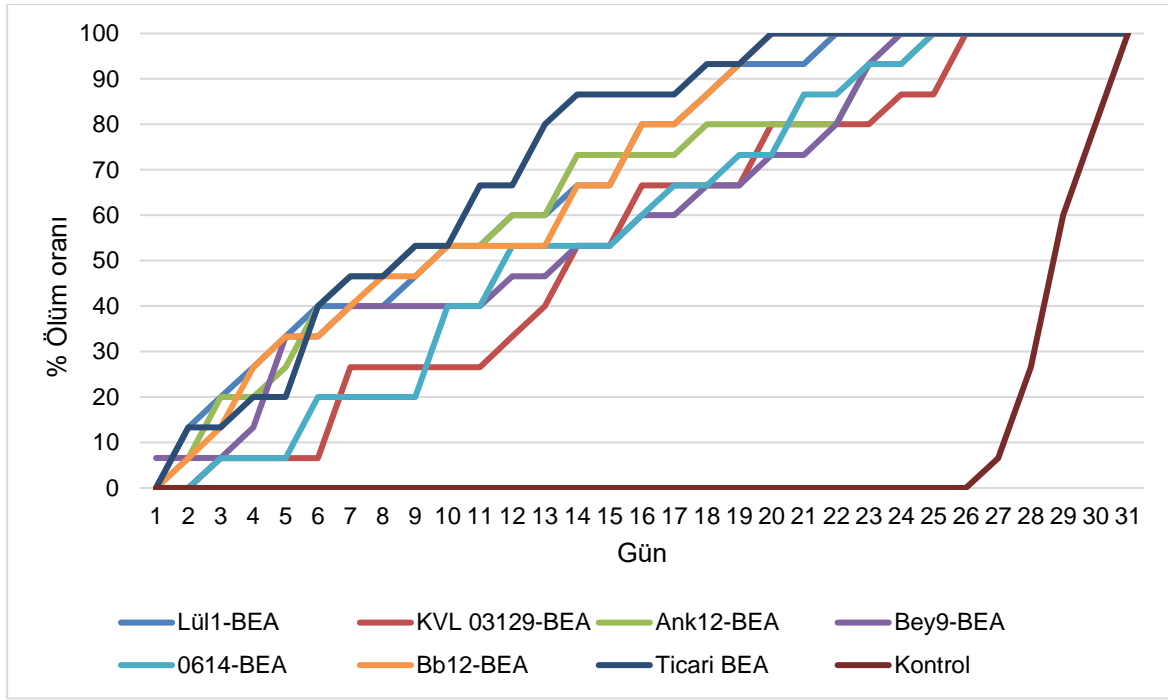
Enjeksiyon yöntemi ile püskürtme yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p: 0.127$ ) ( $p > 0,05$ ). Püskürtme yönteminin diğer iki yöntemden istatistiksel olarak anlamlı bir farkı olmadığı saptanmıştır ( $p: 0.128$ ) ( $p > 0,05$ ). Yaprak daldırma yöntemiyle enjeksiyon yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p: 0.00$ ) ( $p < 0,05$ ). Enjeksiyon yöntemi ve püskürtme yönteminin, yaprak daldırma yöntemine göre daha kısa süre içinde etkili olduğu gözlenmiştir. *L. decemlineata* larvaları üzerinde uygulanan enjeksiyon, püskürtme ve yaprak daldırma yöntemlerinin 16.gündeki yüzde ölüm oranları sırasıyla %97.14, %87.61 ve %72.38'dir (Şekil 4.24) (Şekil 4.25) (Şekil 4.26). Enjeksiyon, püskürtme ve yaprak daldırma yöntemlerinin uygulandığı *L. decemlineata* larvalarının  $LT_{50}$  değerleri sırasıyla 7.387, 7.831 ve 10.791'dir (Çizelge 4.27). BEA çözeltilerinin enjeksiyon yöntemi ile uygulandığında, diğer iki yöntemle göre, daha kısa süre içinde etkili olduğu gözlenmiştir.



**Şekil 4.24.** *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerine enjeksiyon tekniği ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı.



**Şekil 4.25.** *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerine püskürtme ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı.



**Şekil 4.26.** *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerine püskürtme ile uygulanan 6 farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA, ticari BEA ve kontrol grubuna göre ölüm oranı.

**Çizelge 4.23.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın enjeksiyon yöntemi ile *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1-BEA	KVL 03129-BEA	Ank12-BEA	Bey9-BEA	0614-BEA	Bb12-BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,922	,238	,408	,851	,986	,314	,00*
KVL 03129-BEA	,922	X	,244	,409	,929	,955	,378	,00*
Ank12-BEA	,238	,244	X	,617	,170	,152	,017*	,00*
Bey9-BEA	,408	,409	,617	X	,303	,334	,043*	,00*
0614-BEA	,851	,929	,170	,303	X	,817	,429	,00*
Bb12-BEA	,986	,955	,152	,334	,817	X	,247	,00*
Ticari BEA	,314	,378	0,17*	,043*	,429	,247	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	X

\* $p < 0.05$

**Çizelge 4.24.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın püskürtme yöntemi ile *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1- BEA	KVL 03129- BEA	Ank12- BEA	Bey9- BEA	0614- BEA	Bb12- BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,052	,126	,748	,232	,014*	,113	,00*
KVL 03129- BEA	,052	X	,780	,020*	,408	,512	,00*	,00*
Ank12- BEA	,113	,780	X	,042*	,618	,300	,001*	,00*
Bey9-BEA	,748	,020*	,042*	X	,147	,006*	,117	,00*
0614-BEA	,232	,408	,618	,147	X	,328	,006*	,00*
Bb12-BEA	,014*	,512	,300	,006*	,328	X	,00*	,00*
Ticari BEA	,113	,00*	,001*	,117	,006*	,00*	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*

\* $p < 0.05$

**Çizelge 4.25.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın yaprak daldırma yöntemi ile *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1- BEA	KVL 03129- BEA	Ank12- BEA	Bey9- BEA	0614- BEA	Bb12- BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,578	,009*	,072	,036*	,960	,337	,00*
KVL 03129- BEA	,578	X	,031*	,221	,121	,581	,134	,00*
Ank12-BEA	,009*	,031*	X	,261	,640	,009*	,001*	,00*
Bey9-BEA	,072	,221	,261	X	,697	,987	,008*	,00*
0614-BEA	,036*	,121	,640	,697	X	,037	,003*	,00*
Bb12-BEA	,960	,581	,009*	,987	,037*	X	,424	,00*
Ticari BEA	,337	,134	,001*	,008*	,003*	,424	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*

\* $p < 0.05$

**Çizelge 4.26.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın *Leptinotarsa decemlineata* larvalarındaki LT<sub>50</sub> değerleri

Beauverisin	Enjeksiyon		Püskürtme		Yaprak Daldırma	
	LT <sub>50</sub> (Gün)	%95 Güven Aralığı	LT <sub>50</sub> (Gün)	%95 Güven Aralığı	LT <sub>50</sub> (Gün)	%95 Güven Aralığı
Lül1-BEA	8.116	7.402-8.877	6.742	5.851-7.630	7.970	6.799-9.144
KVL 03129-BEA	8.210	7.495-8.917	9.047	7.998-10.107	8.261	7.034-9.457
Ank12-BEA	8.403	7.467-9.328	8.024	6.800-9.343	13.012	11.783-14.315
Bey9-BEA	7.654	6.757-9.526	6.639	5.869-7.364	10.984	9.495-12.636
0614-BEA	8.053	7.424-8.659	9.160	8.412-9.882	10.831	9.404-12.360
Bb12-BEA	6.459	5.636-7.224	11.210	10.371-12.037	12.089	10.932-13.293
Ticari BEA	5.984	5.328-6.617	6.076	5.521-6.682	8.530	7.328-9.792
Kontrol	30,32	29.856 - 31.451	29,48	28.750-30.412	31,80	30.259-32.451

**Çizelge 4.27.** Enjeksiyon ve püskürtme yöntemleriyle uygulanan altı farklı kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın *Leptinotarsa decemlineata* larvalarındaki LT<sub>50</sub> değerleri

Uygulama yöntemi	LT <sub>50</sub> değerleri (Gün)	%95 Güven Aralığı
Enjeksiyon yöntemi	7.387	6.657-8.039
Püskürtme yöntemi	7.831	7.427-8.211
Yaprak daldırma	10.791	9.173-12.067



#### 4.3.3.2. Farklı konsantrasyonlardaki Beauverisinin *Leptinotarsa decemlineata* larvalarına uygulanması

*L. decemlineata* larvaları üzerinde; Lül1, Ank12, KVL 03129, Bey9, 0614 ve Bb12 olarak adlandırılan 6 fungus suşundan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonu (0.001M, 0.0001M, 0.00001M ve 0.000001M) püskürtme yöntem ile denenmiştir. 31 gün süren deneme sonucunda ve ölü larva sayıları kaydedilmiştir. Her deney düzeneğinde 7'şer adet *L. decemlineata* larvası kullanılmış olup deney 3 defa tekrarlanmıştır. Her altı farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA her konsantrasyonu için toplam 21 adet *L. decemlineata* larvası denenmiştir. Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA'nın ve ticari BEA'nın tüm konsantrasyonları *L. decemlineata* üzerinde etkili olduğu bulunmuştur.

Üç farklı *B. bassiana* suşu (Lül1, Ank12 ve KVL 03129) ve üç farklı *P. fumosoroseus* suşundan (Bey9, 0614 ve Bb12) saflaştırılan BEA ve ticari BEA arasında fark olup olmadığı Kruskal-Wallis istatistik yöntemi ile analiz edilmiş ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ( $p: 0.00$ ) ( $p<0,05$ ). Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın Manny-Whitney U testi kullanılarak kendi aralarında ikili karşılaştırmaları yapılmıştır.

0.000001 M BEA konsantrasyonunda; altı farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA arasından sadece KVL 03129 suşundan saflaştırılan BEA istatistiksel olarak farklılık gösterdiği bulunmuştur. KVL03129-BEA ile Lül1-BEA, Ank12-BEA, Bb12-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuş iken ( $p<0.05$ ), diğer fungal kaynaklardan (Bey9, 0614) elde edilen BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.28).

0.00001 M BEA konsantrasyonunda; altı farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA arasından, sadece KVL 03129 suşundan saflaştırılan BEA'nın istatistiksel olarak farklılık gösterdiği bulunmuştur. KVL03129-BEA ve Lül1-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.29).

0.0001 M BEA konsantrasyonunda; Lül1 suşundan elde edilen BEA ile Ank12-BEA ve KVL 03129-BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). KVL 03129-BEA ile Lül1-BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Ank12-BEA ile Lül1-BEA ve ticari BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Ticari BEA ile Ank12 ve KVL 03129 suşlarından saflaştırılan BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Çizelge 4.30).

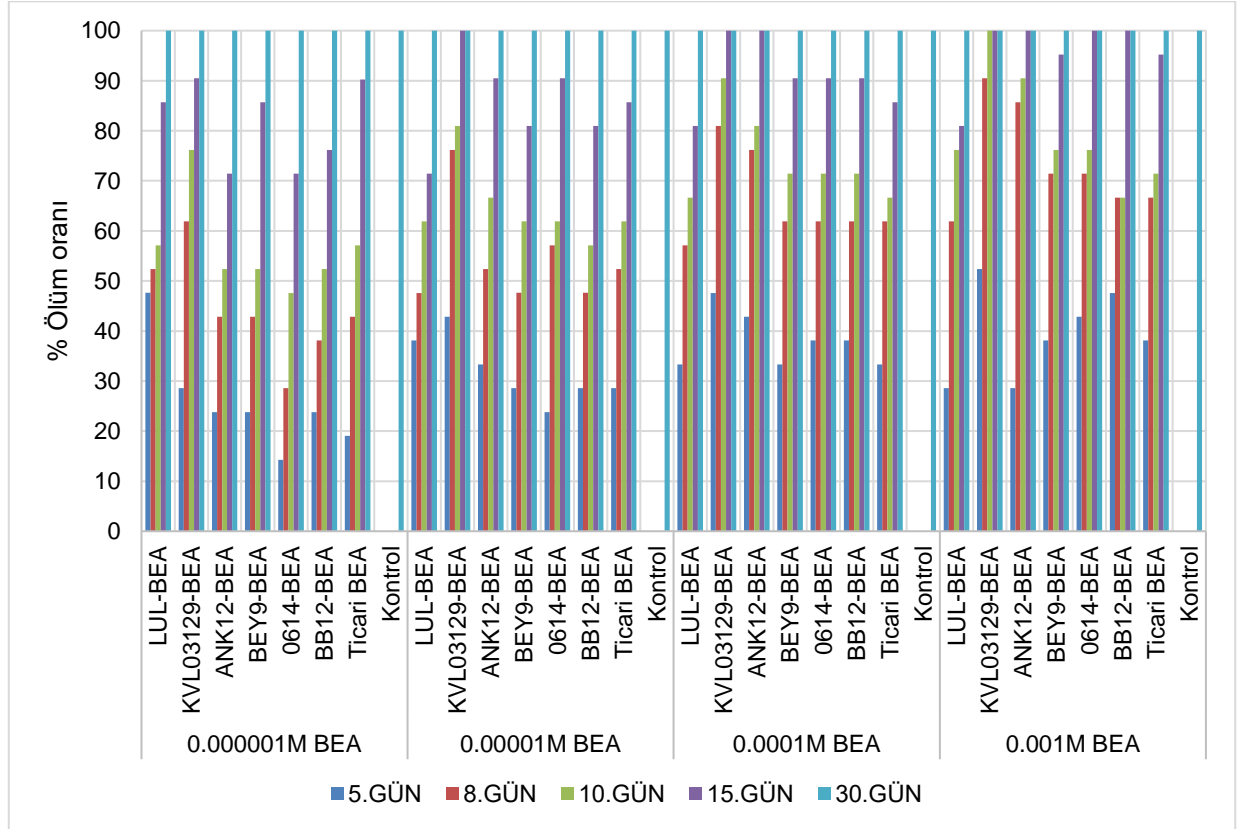
0.001 M BEA konsantrasyonunda; altı farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA arasından sadece KVL 03129 suşundan saflaştırılan BEA'nın istatistiksel olarak farklılık gösterdiği bulunmuştur. KVL03129-BEA ve Lül1 ve Bey9 suşlarından saflaştırılan BEA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.31). Farklı fungal kaynaklardan saflaştırılan BEA ve ticari BEA ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Uygulanan BEA konsantrasyonu artıka, böcek popülasyonunun tamamının ölmesi için gereken süre azalmıştır. 6 farklı fungus kaynağından elde edilen BEA ve ticari BEA'nın 0.000001 M konsantrasyonunun, *L. decemlineata* larvaları üzerinde uygulandıktan 13 gün sonra böcek popülasyonunun %78.23'ünün öldürdüğü, 0.001M konsantrasyonunun, *L. decemlineata* larvaları üzerinde uygulandıktan 13 gün sonra böcek popülasyonunun %94.55 'ini öldürdüğü gözlenmiştir.  $LT_{50}$  değerlerine bakıldığında; KVL 03129 suşundan elde edilen BEA'nın 4 farklı konsantrasyonunun (0.000001 M, 0.00001 M, 0.0001 M ve 0.001M), ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonuna göre daha kısa süre içinde böcek popülasyonunun yarısını öldürdüğü bulunmuştur 0.000001 M KVL 03129-BEA uygulandığında böcek popülasyonunun %50'sini öldürmesi için gereken süre 7.034 gün iken, 0.001 M Ank12-BEA uygulandığında böcek popülasyonunun %50'sini öldürmesi için gereken süre 4.794 gündür. (Çizelge 4.32).

$LC_{50}$  değerlerinin hesaplanması için; 5., 8. ve 10. gündeki veriler kullanılmıştır. KVL 03129 suşundan elde edilen BEA'nın 5., 8. ve 10. günlerde böcek popülasyonunun %50'sini öldürmek için gerekli olan konsantrasyonlar sırasıyla

$2,7 \times 10^{-4}$  M,  $9,1 \times 10^{-5}$  M ve  $4,1 \times 10^{-7}$  M BEA olduğu bulunmuştur (Çizelge 32). Tüm suşlardan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın, 10. günde elde edilen LC<sub>50</sub> değerlerinin, 5. ve 8. gündeki LC<sub>50</sub> değerlerinden daha düşük olduğu saptanmıştır.

Dört farklı BEA konsantrasyonu (0.001 M, 0.0001 M, 0.00001 M ve 0.000001 M) arasındaki fark Kruskal-Wallis testi ile test edilmiş ve tüm konsantrasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). *L. decemlineata* larvaları üzerinde uygulanan en yüksek BEA konsantrasyonunun, kısa sürede en yüksek ölüm oranını gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.27) (Çizelge 4.34).



**Şekil 4.27.** *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerinde test edilen 6 farklı fungusdan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın dört farklı konsantrasyonunun BEA'nın 5., 8., 10., 15. ve 30. günlere göre ölüm oranı.

**Çizelge 4.28.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.00001M konsantrasyonunun *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1- BEA	KVL 03129- BEA	Ank12 -BEA	Bey9- BEA	0614- BEA	Bb12- BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,041*	,324	,339	,388	,665	,245	,00*
KVL 03129- BEA	,041*	X	,007*	,397	,382	,031*	,445	,00*
Ank12-BEA	,324	,007*	X	,085	,109	,657	,056	,00
Bey9-BEA	,339	,397	,085	X	,953	,198	,985	,00*
0614-BEA	,388	,397	,109	,953	X	,206	,918	,00*
Bb12-BEA	,665	,031*	,657	,198	,206	X	,166	,00*
Ticari BEA	,245	,445	,056	,985	,918	,641	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*

\* $p < 0.05$

**Çizelge 4.29.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.00001M konsantrasyonunun *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1- BEA	KVL 03129- BEA	Ank12- BEA	Bey9- BEA	0614- BEA	Bb12- BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,004*	,062	,538	,110	,323	,219	,00*
KVL 03129-BEA	,004*	X	,581	,55	,216	,130	,163	,00*
Ank12- BEA	,062	,581	X	,268	,635	,450	,453	,00*
Bey9-BEA	,538	,055	,268	X	,415	,721	,650	,00*
0614-BEA	,110	,216	,635	,415	X	,658	,782	,00*
Bb12-BEA	,323	,130	,450	,415	,658	X	,955	,00*
Ticari BEA	,219	,163	,453	,650	,782	,955	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*

\* $p < 0.05$

**Çizelge 4.30.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.0001M konsantrasyonunun *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1- BEA	KVL 03129- BEA	Ank12- BEA	Bey9- BEA	0614- BEA	Bb12- BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,028*	,038*	,791	,715	,291	,533	,00*
KVL 03129- BEA	,028*	X	,773	,060	,075	,308	,012*	,00*
Ank12-BEA	,038*	,773	X	,0855	,098	,401	,016*	,00*
Bey9-BEA	,791	,060	,098	X	,901	,343	,475	,00*
0614-BEA	,715	,075	,098	,901	X	,394	,324	,00*
Bb12-BEA	,219	,308	,401	,343	,394	X	,080	,00*
Ticari BEA	,553	,012*	,016*	,475	,324	,080	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*

\* $p < 0.05$

**Çizelge 4.31.** Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 0.001M konsantrasyonunun *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki etkisinin ikili karşılaştırılmaları (Mann-Whitney U testi  $p < 0.05$ ).

	Lül1- BEA	KVL 03129- BEA	Ank12- BEA	Bey9- BEA	0614- BEA	Bb12- BEA	Ticari BEA	Kontrol
Lül1-BEA	X	,007*	,058	,902	,481	,184	,374	,00*
KVL 03129- BEA	,007*	X	,487	,007*	,078	,174	,069	,00*
Ank12-BEA	,058	,487	X	,056	,291	,562	,287	,00*
Bey9-BEA	,902	,007*	,056	X	,470	,171	,326	,00*
0614-BEA	,481	,078	,291	,470	X	,598	,919	,00*
Bb12-BEA	,184	,174	,562	,171	,598	X	,641	,00*
Ticari BEA	,374	,069	,287	,326	,919	,641	X	,00*
Kontrol	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*	,00*

\* $p < 0.05$

**Çizelge 4.32.** Altı farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisin ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonunun uygulandığı *Leptinotarsa decemlineata* larvalarının LT<sub>50</sub> değerleri

Beauverisin	0.000001 M BEA (0.007839 µl/mL)		0.00001 M BEA (0.007839 µl/mL)		0.0001 M BEA (0.07839 µl/mL)		0.001 M BEA (0.7839 µl/mL)	
	LT <sub>50</sub> (Gün)	% 95 Güven Aralığı	LT <sub>50</sub> (Gün)	% 95 Güven Aralığı	LT <sub>50</sub> (Gün)	% 95 Güven Aralığı	LT <sub>50</sub> (Gün)	% 95 Güven Aralığı
Lül1-BEA	7.994	4,985- 8,698	6.922	5,697- 9,775	6.416	3.261- 7.969	5.702	4.012-8.556
KVL 03129- BEA	7.034	5,916- 7,880	6.445	3.443- 6.795	5.462	5.017- 7.221	4.794	3.398-5.575
Ank12-BEA	9.025	6,844- 10,590	7.348	5,712- 8,510	6.185	3.693- 7.253	6.016	4.361-7.423
Bey9-BEA	8.169	4,995- 9,645	7.907	3.374- 10.513	7.088	4.907- 8.590	6.957	4.210-9.134
0614-BEA	10.834	9,057- 12,096	7.235	5.359- 8.655	6.718	4.545- 8.334	6.641	4.737-8.112
Bb12-BEA	9.447	7,304- 10,876	8.344	7.477- 10.619	5.752	2.130- 7.385	5.125	2.408-7.034
Ticari BEA	9.556	7,535- 10,091	8.595	7.280- 9.605	7.556	7.145- 10.978	6.490	5.382-7.304
Kontrol	27,12	26,675- 27,538	27,12	26,675- 27,538	27,12	26,675- 27,538	27,12	26,675- 27,538

**Çizelge 4.33.** *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerinde denenen altı farklı fungal kaynaktan elde edilen beauverisinin ve ticari BEA'nın 5., 8. ve 10. günlerdeki LC<sub>50</sub> değerleri.

Beauverisin	5.gündeki LC <sub>50</sub> (Molar)	8.gündeki LC <sub>50</sub> (Molar)	10.gündeki LC <sub>50</sub> (Molar)
Lül1-BEA	1,9 x 10 <sup>-3</sup>	1,5 x 10 <sup>-3</sup>	3,8 x 10 <sup>-7</sup>
KVL 03129-BEA	2,7 x 10 <sup>-4</sup>	9,1 x 10 <sup>-5</sup>	4,1 x 10 <sup>-7</sup>
Ank12-BEA	4,9 x 10 <sup>-2</sup>	3,5 x 10 <sup>-5</sup>	0,5 x 10 <sup>-5</sup>
Bey9-BEA	0,21 x 10 <sup>-2</sup>	4,3 x 10 <sup>-4</sup>	4,4 x 10 <sup>-7</sup>
0614-BEA	2,3 x 10 <sup>-3</sup>	1,4 x 10 <sup>-5</sup>	1,1 x 10 <sup>-6</sup>
Bb12-BEA	8,1 x 10 <sup>-3</sup>	1,3 x 10 <sup>-5</sup>	5,7 x 10 <sup>-6</sup>
Ticari BEA	3 x 10 <sup>-2</sup>	1,1 x 10 <sup>-4</sup>	8,1 x 10 <sup>-5</sup>

**Çizelge 4.34.** Dört farklı BEA konsantrasyonunun *L. decemlineata* larvalarındaki LT<sub>50</sub> değerleri.

Beauverisin konsantrasyonu	LT <sub>50</sub> (Gün)	%95 Güven Aralığı
0.000001 M BEA (0.007839 µl/mL)	8.156	7.303-8.895
0.00001 M BEA (0.007839 µl/mL)	7.796	6.847-8.596
0.0001 M BEA (0.07839 µl/mL)	6.802	5.298-7.931
0.001 M BEA (0.7839 µl/mL)	5.957	5.280-6.561

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden daha önce toplanmış olan toprak örneklerinden izole edilen; *Beauveria bassiana* (Lül1, Ank12), *Paecilomyces fumosoroseus* (Bey9, 0614, Bb12) suşları [23–25] ve standart *Beauveria bassiana* KVL 03129 (ARSEF 8032) suşu beauverisin (BEA) üretimi için kullanılmıştır. KVL 03129 suşu ARS entomopatojenik fungus koleksiyonundan bir suş olup, 18 Eylül 2002 tarihinde Nicolai V. Meyling tarafından izole edilmiştir [24]. BEA saflaştırılması için, BEA-baskılanmış kriyojel kolon kullanılmıştır. Saflaştırılan BEA, farklı uygulama yöntemleri ve konsantrasyonlarıyla tarım zararlısı olan *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor* ve *Leptinotarsa decemlineata* larvalarında denenmiştir.

Kriyojel kolon polimerinin kimyasal yapısı için FTIR analizi, kriyojel kolonun yüzey alanı ölçümü için BET analizi, kriyojel kolonun morfolojik yapısını incelemek için SEM analizi ve denge şişme deneyi yapılmıştır.

BEA-baskılanmış (MIP-BEA) kriyojel kolonun FTIR spektrum sonuçlarını daha iyi incelemek için; MATrp monomeri içeren MIP-BEA kolonunun FTIR spektrumundan, MATrp monomeri içermeyen Poli(HEMA) FTIR spektrumu çıkarılmıştır. Elde edilen FTIR spektrumundaki band değişimlerine bakılarak, BEA baskılı kriyojel kolonun başarılı şekilde sentezlendiğini söylemek mümkündür (Şekil 4.2). BEA baskılanmış kriyojel kolonun yüzey alanı 16.24 m<sup>2</sup>/g, BEA baskılanmamış kriyojel kolonun yüzey alanı 12.18 m<sup>2</sup>/g olarak bulunmuştur. MIP-BEA kriyojel kolonu ile NIP-BEA kriyojel kolonu arasındaki yüzey alanlarının farklı olmasının nedeni, MIP-BEA kriyojel kolonunda BEA'ya ait spesifik boşlukların oluşmasıyla yüzey/gözenek alanının artmasıdır. BEA'nın kriyojel kolona baskılamasından dolayı MIP-BEA kriyojel kolonunun yüzey alanı artmıştır. Aslıyüce ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, Protein A saflaştırılması için Protein A baskılanmış süper makrogözenekli kriyojeller sentezlemişlerdir. Protein A bazı immunglobulinlerin Fc reseptörleri (IgG1, IgG2, IgG4) ile birleşebilmekte, böylelikle anti-fagositer ve anti-komplementer etki gösterebilmektedir. Protein A-baskılanmış kriyojelin yüzey alanı 9.91 m<sup>2</sup>/g, Protein A-baskılanmamış kriyojelin



yüzey alanı 6.18 m<sup>2</sup>/g olarak bulmuşlardır [222]. Çulha ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, L-Lizin baskılanmış kriyojeller sentezlenmiş ve İmmunoglobulin G saflaştırılmasında kullanmışlardır. L-lizin baskılanmış kriyojelin yüzey alanı 34.2 m<sup>2</sup>/g, L-Lizin baskılanmamış kriyojelin yüzey alanı 21.3 m<sup>2</sup>/g olarak bulunmuştur [223]. Bu çalışmalarda olduğu gibi bu araştırmada da moleküler baskılanmış kriyojelin yüzey alanının, moleküler baskılanmamış kriyojele göre daha fazla olduğu bulunmuştur.

SEM görüntülerine bakıldığında, kriyojel kolonlarda birbirleriyle bağlantılı gözenekler gözlenmiştir. MIP-BEA kriyojel kolonundaki bu gözenekli yapı, BEA'nın kriyojel içerisine difüzyonunun kolay olmasını sağlamaktadır. MIP-BEA kriyojel kolon yüzeyinin, NIP-BEA kriyojel kolon yüzeyine göre daha pürüzlü olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni; MIP-BEA kriyojel kolonun yapısına katılan BEA'nın hidrofobikliği artırması olduğu düşünülmektedir. MIP-BEA kriyojel kolon polimerizasyonu sırasında, hidrofobikliğe bağlı olarak itme kuvveti ile polimerin yüzeyinde küresel kümeler oluşmuştur (Şekil 4.3).

Poli(HEMA), BEA baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) (NIP-BEA) ve BEA baskılanmış poli(HEMA-MATrp) (MIP-BEA) kriyojel kolonların denge şişme oranları sırasıyla %892, %635 ve %752'dir. NIP-BEA kriyojel kolonun denge şişme oranının en düşük olmasının nedeni, MATrp'nin yapısında hidrofobik özelliğe sahip olan triptofan aminoasitinin bulunmasıdır. MIP-BEA ve NIP-BEA kriyojel kolonlar hidrofobik özellikte olmalarına rağmen, MIP-BEA kriyojel kolonun denge şişme oranı daha yüksektir (Şekil 4.4). Bunun nedeni; BEA'nın kolona baskılanmasıyla kolonda BEA'ya özgü boşlukların oluşması ve bu böylece kolonun daha fazla miktarda suyu adsorbe edebilmesidir. BEA'nın baskılanmasıyla kolonda oluşan spesifik boşluklar, su tutma kapasitesinde ve dolayısıyla şişme oranında artışa neden olmuştur. Birlik ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, sulardan kromu uzaklaştırmak amacıyla krom baskılanmış kriyojel disk sentezlemişlerdir. Krom-baskılı kriyojel ve krom-baskılanmamış kriyojel disklerin denge şişme oranı sırasıyla, %59 ve %39 olarak bulmuşlardır [224]. Bu sonuç, bu tez çalışmasıyla paralellik göstermektedir. Kriyojellerin makro gözenek

oranlarının birbirine yakın olması kriyojel kolonların aynı sentez koşullarında sentezlendiğini göstermektedir.

İstenilen moleküle özgü sentezlenen moleküler baskılanmış kriyojel kolonun adsorpsiyon kapasitesi pH, sıcaklık, iyon şiddeti, akış hızı ve başlangıç derişimi gibi faktörlerden etkilenmektedir. Maksimum BEA adsorpsiyonu, pH 6.5 MES tamponunda gerçekleşmiş ve 13.5 mg/polimer olarak bulunmuştur (Şekil 4.5). İyon derişiminin BEA adsorpsiyonuna olan etkisi incelenmiş ve maksimum BEA adsorpsiyonu, tuz derişiminin olmadığı ortamda gerçekleşmiştir (Şekil 4.6). BEA-baskılı kriyojel kolon sentezlenirken, fonksiyonel monomer MATrp fenilalanin grubu ile BEA fenilalanin grubu arasında hidrofobik etkileşimlerin baskın olacağı varsayılmıştır. BEA adsorpsiyonunda iyonik şiddet parametresi incelendiğinde, BEA ile MATrp arasında hidrofobik etkileşimler dışında başka etkileşimlerin de olabileceği görülmüştür. pH 6.5'te fonksiyonel monomer MATrp'in -COOH grubu negatif yüklenmesinden (pl: 5.89) dolayı karboksil grubu -COO- şeklinde iyonlaşmaktadır. Ortamda tuz miktarı artıkça su molekülleri NaCl moleküllerini çözer ve MATrp'nin yapısında yer alan -COOH grubunun iyonlaşması protonasyon ile baskılanır. Aslında beklenen durum; ortamdaki NaCl konsantrasyonunun artmasıyla BEA molekülünün fenil grubu ile MATrp molekülünün fenil grubu arasındaki hidrofobik etkileşimin artmasıdır. Ancak ortamdaki su molekülleri NaCl moleküllerini çözdüğü için -COOH grubu iyonlaşmaz ve BEA ile MATrp arasındaki hidrojen bağlarının artması nedeniyle hidrofobik etkileşim azalmaktadır. Odabaşı ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, sulu çözeltilerden ve yumurta akından lizozimi saflaştırmak için lizozim baskılanmış polimer sentezlemişlerdir. Altı farklı tuz derişiminin (0.0 M, 0.02 M, 0.04 M, 0.06 M, 0.08 M, 0.1 M NaCl) lizozim adsorpsiyonuna olan etkisini incelemişler ve ortamdaki tuz konsantrasyonunun artıkça, adsorplanan lizozim miktarında azalma olduğunu bulmuşlardır. Çalışmada tuzun olmadığı ortamda lizozim adsorpsiyonu 8.1 mg/g polimer olmuş, ortamda 0.1 M NaCl olduğunda ise adsorpsiyon miktarının 4.8 mg/g polimere düştüğünü gözlemlemişlerdir [225].

Sıcaklığın, BEA adsorpsiyonuna olan etkisi incelenmiş ve maksimum BEA adsorpsiyonu 25°C'de 13.45 mg/polimer olarak bulunmuştur. 35°C MIP-BEA kriyojel kolonun, BEA adsorpsiyon kapasitesi 12.49 mg/polimer iken, 45°C MIP-BEA kriyojel kolonun BEA adsorpsiyon kapasitesinin 11.45 mg/polimer olduğu bulunmuştur (Şekil 4.7). Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimlerde, hidrojen bağları ve iyonik etkileşimlerin baskın olduğunda sıcaklık arttıkça adsorpsiyon kapasitesinde azalma, hidrofobik ve Van der Waals etkileşimlerinin baskın olduğu durumlarda ise sıcaklık arttıkça adsorpsiyon kapasitesinin yükseldiği görülmektedir. Sıcaklığın BEA adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisine bakıldığında; BEA-MATrp arasındaki etkileşimin, sadece hidrofobik etkileşimlerden oluşmadığı, hidrojen bağlarının da etkileşimde yer aldığı söylenebilmektedir. Çünkü BEA ve MATrp arasındaki etkileşim sadece hidrofobik etkileşimlerden oluşsaydı, sıcaklık arttıkça adsorpsiyon kapasitesi artardı. Bu etkileşim sadece hidrojen bağlarından oluşsaydı sıcaklık arttıkça adsorpsiyon kapasitesi azalır. 35°C'de adsorpsiyon kapasitesindeki düşüşün az olması, BEA ile MATrp arasındaki etkileşimin hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerden kaynaklandığını göstermektedir (Şekil 4.7). BEA adsorpsiyonunu etkileyen faktörlere bakıldığında, sıcaklık ve iyon şiddeti parametrelerinden elde edilen sonuçların birbirini desteklediği görülmektedir. Demirci ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, pıhtılaşma sisteminin önemli bir inhibitörü olan protein C'yi saflaştırmak için protein C-baskılı kriyojel sentezlemişlerdir. Çalışmada, sıcaklığın protein C adsorpsiyonuna olan etkisini incelemek için üç farklı sıcaklık derecesi seçilmiştir. 4°C, 25°C ve 45°C sıcaklıklarda adsorplanan Protein C miktarı sırasıyla, 10.72 mg/g, 7.74 mg/g ve 6.05 mg/g olarak bulunmuştur. Sıcaklık arttıkça adsorplanan Protein C miktarında azalma gözlemlendiği için, Protein C ile kolon arasındaki baskın etkileşim türünün hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler olduğu bulunmuştur [226]. Bakhshpour ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, akciğer kanserinin belirteci olarak tirozin baskılı kriyojel sentezlemişlerdir. Sıcaklığın tirozin adsorpsiyonuna olan etkisi incelendiğinde, sıcaklık arttıkça adsorplanan tirozin miktarının arttığı bulunmuştur. Bu da tirozin adsorpsiyonda hidrofobik etkileşimlerin daha baskın olduğunu göstermektedir [227]. Bu çalışmada olduğu gibi, ortam sıcaklığındaki değişimler hedef molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimi değiştirmektedir. Hedef molekül ile fonksiyonel monomer arasında hidrofobik ve Van der Waals etkileşimleri varsa

sıcaklık artıkça adsorpsiyon kapasitesi artmaktadır. Eğer hedef molekül ile fonksiyonel monomer arasında hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler varsa sıcaklık artıkça adsorpsiyon kapasitesi azalmaktadır. Bu çalışmada, BEA-baskılanmış kriyojel kolondan saflaştırılan BEA miktarında, 45°C'ye kadar önemli bir azalma gözlenmemiştir. Bu yüzden BEA ile fonksiyonel monomer olan MATrp arasındaki etkileşimlerin, hem hidrofobik etkileşimlerden hem de hidrojen bağlarından oluştuğu düşünülmektedir.

Akış hızının BEA adsorpsiyonuna olan etkisine bakıldığında, akış hızı artıkça BEA adsorpsiyonu azalmaktadır. Tamahkar ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, sitokrom c-baskılı kriyojel sentezlemişlerdir. Kriyojel kolondaki akış hızı artıkça, adsorplanan sitokrom c miktarının azaldığını bulmuşlardır. Akış hızı 0.5 mL/dk' dan 3.0 mL/dk'ya çıkartıldığında adsorplanan sitokrom c miktarı 35 mg/g polimerden 7 mg/g polimere düştüğünü saptamışlardır [228]. Benzer sonuç bu çalışmada BEA- baskılanmış kriyojel kolonda geçirilen BEA'da gözlenmiştir. MIP-BEA kriyojel kolondan geçirilen BEA solüsyonunun hızı 1.0 mL/dk'dan 2.5 mL/dk çıkartıldığında, adsorplanan BEA miktarının 13.45 mg/g polimerden 8.72 mg/g polimere düştüğü bulunmuştur (Şekil 4.8). Bunun nedeni, BEA'nın MIP-BEA kriyojel kolon yapısında bulunan BEA özgü boşluklarda kalma ve etkileşime girme süresinin kısılmasıdır.

Başlangıçtaki BEA derişiminin, MIP-BEA ve NIP-BEA kriyojel kolonlarında BEA adsorpsiyonuna olan etkisi incelenmiştir. Maksimum BEA adsorpsiyonu; 2 mg/mL BEA konsantrasyonunda, MIP-BEA ve NIP-BEA kriyojel kolonlarında sırasıyla, 43 mg/g ve 11 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Başlangıçtaki BEA konsantrasyonu 2 mg/mL üstüne çıksa da adsorplanan BEA miktarında bir değişiklik gözlenmemiştir. Bunun nedeni 2 mg/mL BEA konsantrasyonunda, kriyojel kolonlarda beauverisinin bağlanabileceği spesifik bölgelerin dolması nedeniyle denge değerine ulaşılmasıdır (Şekil 4.9). Bu çalışmadaki sonuçlara paralel olarak, Kartal ve arkadaşları da yaptıkları bir çalışmada; süttten kolesterol uzaklaştırılması için kolesterol baskılanmış kriyojel küreler sentezlemişlerdir. Başlangıçta sütteki kolesterol miktarı artıkça, kolesterol-baskılanmış kriyojel

kürelerden adsorplanan kolesterol miktarının arttığını bulmuşlardır. Kolondan geçirilen kolesterol konsantrasyonu 3.0 mg/mL olduğunda, kolonda kolesterolün bağlanabileceği bölgelerinin dolmasına bağlı olarak denge değerine ulaşılmış ve adsorplanan kolesterol miktarı 288.7 mg/g polimer olarak bulunmuştur [216].

Adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyon sürecinde her bir hedef molekülün adsorban ile etkileşimini karakterize etmek için kullanılmaktadır. BEA molekülünün MIP-BEA kriyojel kolon ile etkileşimini incelemek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri kullanılmıştır. Aslıyüce ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, Protein A saflaştırılması için Protein A baskılanmış süper makrogözenekli kriyojeller sentezlemişlerdir. Protein A ile kriyojel arasındaki etkileşimi incelemek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modellerini kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda Langmuir adsorpsiyon modelinin bu sistem için uygun olduğunu bulmuşlardır [222]. Demirci ve arkadaşları ise yaptıkları başka bir çalışmada, protein C baskılanmış kriyojel sentezlemişlerdir. Protein C ile sentezlenen kriyojel arasındaki etkileşimi belirlemek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modellerini kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda, Protein C ile kriyojel arasındaki etkileşimin Langmuir adsorpsiyon modeline yakın olduğunu gözlemlermişlerdir. [226]. MIP-BEA kriyojel kolonu arasındaki etkileşimin Langmuir adsorpsiyon modeline yakın olduğu bulunmuştur. Regresyon katsayılarına bakıldığında, BEA molekülü ile MIP-BEA kriyojel kolon arasındaki etkileşimin homojen ve tek katmanlı olduğu söylenebilmektedir (Çizelge 4.1).

Moleküler baskılanmış polimerlerin saflaştırma açısından en büyük avantajları, baskılanmış moleküle karşı yüksek seçicilik göstermeleridir. Hazırlanan kriyojelin seçiciliğini test etmek için gerekli deneylerden biri de benzer moleküller ile yapılan adsorpsiyon çalışmasıdır. Bu çalışmada BEA'ya, yarışmacı ajan olarak bassiatin seçilmiştir. Bassiatin aynı funguslar tarafından üretilen bir sekonder metabolittir. (Şekil 4.12). MIP-BEA kriyojel kolonun, beauverisin molekülüne bassiatin molekülüne göre 9,5 kat daha fazla seçici olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2). Moleküler baskılanmış kolonun tekrar kullanılabilir olması saflaştırma işleminin

maliyetini azaltmaktadır. BEA-MIP kriyojel kolonun tekrar kullanılması üzerine yapılan çalışmada, kolonun birden fazla kez BEA adsorpsiyonunda kullanılabileceği görülmüştür (Şekil 4.13).

BEA baskılanmış kriyojel kolonun adsorpsiyon çalışmalarına göre; pH 6.5 MES tamponu içerisinde, 25°C'de 1 mL/dk akış hızında, maksimum BEA adsorpsiyonunun gerçekleştiği bulunmuştur. Song ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; *Fusarium oxysporum*'dan BEA ve enniatinler saflaştırmak için, Gromsil pack ODS (1.0x25 cm) ve Shideido pack C18 (0.5x30 cm) kolonları kullanmışlardır [229]. Xu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada; endofit fungus olan *Fusarium redolens*'i, *Dioscorea zingiberensis* bitkisinden izole etmişlerdir. *Fusarium redolens*'in sentezlediği beauverisini saflaştırmak için Sephadex LH-20 ve RP-18 (250 × 10 mm, 5 µm) kolonlarını kullanmışlardır [104]. Shi ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada; *Dendrobium officinale* bitkisinden *Fusarium* sp. izole etmişler ve fungusun sentezlediği BEA dahil birçok metaboliti, Sephadex LH-20 kolonu ve YMC-Pack ODS-A kolonu kullanarak saflaştırmışlardır [230]. Yapılan bu çalışmada *B. bassiana* ve *P. fumosoroseus* entomopatojen fungus suşlarından sentezlenen BEA, BEA-baskılanmış kriyojel kolon kullanılarak tek basamakta saflaştırılmıştır. Literatüre bakıldığında BEA saflaştırılmasında yaygın olarak *Fusarium* spp. ait funguslar kullanılmış, bu çalışmada ise *B. bassiana* ve *P. fumosoroseus*'a ait fungus suşları kullanılmıştır.

Fungus örneklerinden saflaştırılan BEA varlığını tespit etmek için, sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-MS) kullanıldı. Analiz sonucunda, fungus örneklerinde BEA moleküler ağırlığında pik görülmüş ve fungal örneklerden BEA başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır (Şekil 4.3). Fungal örneklerden saflaştırılan BEA miktarını belirlemek için LC-MS-MS analizi yapıldı, *P. fumosoroseus* (Bey9, 0614, Bb12) suşlarının, *B. bassiana* fungus (Lül1, Ank12, KVL 03129) suşlarına göre daha fazla miktarda beauverisin ürettiği bulunmuştur (Çizelge 4.4). Ayrıca *B. bassiana* ve *P. fumosoroseus* funguslarına ait farklı suşların ürettiği BEA miktarında da farklılık saptanmıştır. Suşlar arasında görülen BEA üretim miktarındaki farklılık; fungusun izole edildiği bölgenin

özelliklerinden, optimum aktivite gösterdiği koşulların (sıcaklık, nem vb) değişik olmasından kaynaklanabildiği söylenebilir.

Bu çalışmada, 3 farklı *B. bassiana* suşunun (Lül1, KVL 03129 ve Ank12) ve 3 farklı *P. fumureusea* suşunun (Bb12, 0614 ve Bey9) sentezlediği BEA, moleküler baskılanmış kriyojel kolon kullanılarak tek basamakta saflaştırılmıştır. Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA, *G. mellonella* ve *T. molitor* larvaları üzerinde enjeksiyon ve püskürtme olmak üzere farklı iki yöntem kullanılarak uygulanmıştır. *L. decemlineata* larvaları üzerinde ise enjeksiyon, püskürtme ve yaprak daldırmak olmak üzere üç farklı yöntem kullanılarak uygulanmıştır. Lül1-BEA, KVL 03129-BEA, Ank12-BEA, Bb12-BEA, 0614-BEA ve Bey9-BEA 'nın ve ticari BEA'nın 0.001 M, 0.0001 M, 0.00001 M, 0.000001 M (0.7839 µl/mL BEA, 0.07839 µl/mL BEA, 0.007839 µl/mL BEA ve 0.0007839 µl/mL BEA) konsantrasyonları *G. mellonella*, *T. molitor* ve *L. decemlineata* larvaları üzerinde denenmiştir.

*G. mellonella* larvaları üzerinde fungal kaynaklı BEA ve ticari BEA, püskürtme ve enjeksiyon yöntemi ile denenmiştir. Enjeksiyon yöntemi kullanılarak böcek üzerinde uygulanmış Ank12 suşundan elde edilen BEA'nın, böcek popülasyonunun yarısını 2.370 günde öldürdüğü bulunmuştur. Püskürtme yöntemi ile *G. mellonella* larvaları üzerinde uygulanan, Ank12-BEA, böcek popülasyonunun yarısını 2.819 günde öldürmüştür. KVL 03129-BEA hariç, diğer fungal kaynaklardan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın her iki yöntemde de yaklaşık 4 gün içinde *G. mellonella* popülasyonunun yarısını öldürdüğü bulunmuştur (Çizelge 4.7). Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA, enjeksiyon yöntemi ile *G. mellonella* larvaları üzerinde uygulanmış, 8. günde böcek popülasyonunun yaklaşık %94,22'sinin öldüğü, püskürtme yöntemi ile BEA solüsyonları uygulandığında 8. günde böcek popülasyonunun yaklaşık %89,4'ünün öldüğü saptanmıştır (Şekil 4.16) (Şekil 4.17). Uygulama yöntemlerinin LT<sub>50</sub> değerlerine bakıldığında; püskürtme yönteminin 3,307 günde, enjeksiyon yönteminin 3,115 günde *G. mellonella* popülasyonunun yarısını öldürdüğü bulunmuştur (Çizelge 4.8). Grove ve arkadaşları yaptıkları bir

çalışmada, *Fusarium lateritium*'dan elde ettikleri beauverisini, *Calliphora erythrocephola* (Diptera: Calliphoridae) üzerinde denemişlerdir. Enjeksiyon yöntemi ile *Calliphora erythrocephola* üzerinde uygulanan 5 µg/mL BEA, 1. günde böcek popülasyonununun %8'ini, 2. günde ise böcek popülasyonununun %15'ini öldürmüştür [121]. Yapılan bu çalışmada, enjeksiyon yöntemi ile *G. mellonella* larvaları üzerinde uygulanan Bb12-BEA, 5. günde böcek popülasyonununun %73,3'ünü, 8. günde böcek popülasyonununun %93,3'ünü öldürmüştür. Böceğin, BEA'ya maruz kaldığı süre arttıkça, BEA'nın etkisi artmaktadır.

Altı farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonu (0.001 M, 0.0001 M, 0.00001 M, 0.000001 M) *G. mellonella* larvaları üzerinde denenmiştir. *G. mellonella* larvaları üzerinde uygulanan 0.001 M BEA'nın, 10. günde böcek popülasyonununun %87,07'sini, 0.000001 M BEA'nın ise 10. günde böcek popülasyonununun %59,18'ini öldürdüğü bulunmuştur (Şekil 4. 18). Ank12 suşundan saflaştırılan BEA'nın, 5., 8., ve 10. günlerde *G. mellonella* larva popülasyonlarının yarısını öldürmesi için gereken konsantrasyonlar sırasıyla,  $5,3 \times 10^{-4}$  M,  $2,1 \times 10^{-5}$  M ve  $1,8 \times 10^{-7}$  M BEA olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10). Khoury ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, Sigma-Aldrich firmasından satın alınan BEA'nın, üç farklı konsantrasyonu 10 µg/g, 100 µg/g ve 1000 µg/g olarak *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) larvaları ve nimfleri üzerinde denenmiş, 10 µg/g, 100 µg/g ve 1000 µg/g BEA konsantrasyonlarının uygulandıktan 6 saat sonra, *Tetranychus urticae* popülasyonunda üzerindeki ölüm oranlarının sırasıyla, %62, %98 ve %100 olduğunu bulunmuştur [231]. Yapılan bu çalışmada, 0.000001 M, 0.00001 M, 0.0001 M ve 0.001 M konsantrasyonlarda uygulanan BEA solüsyonlarının LT<sub>50</sub> değerlerine bakıldığında sırasıyla, 8.535, 7.363, 6.766 ve 5.313 günde böcek popülasyonununun %50'sini öldürdükleri bulunmuştur (Çizelge 4.11). Uygulanan BEA konsantrasyonu arttıkça, BEA'nın etki süresi daha da kısalmıştır.

Altı farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA, püskürtme ve enjeksiyon yöntemi ile *Tenebrio molitor* larvaları üzerinde denenmiştir. Enjeksiyon yöntemi ile uygulanan, KVL 03129 suşundan elde edilen BEA, böcek



popülasyonunun %50'sini 1.904 günde öldürürken, ticari BEA *Tenebrio molitor*, popülasyonunun yarısını 2.7 günde öldürmüştür. Püskürtme yöntemi ile uygulanan KVL 03129 suşundan elde edilen BEA, *T. molitor* popülasyonunun yarısını 4.918 günde öldürürken, ticari BEA'nın, böcek popülasyonunun yarısını 4.507 günde öldürdüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.14). Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA, enjeksiyon yöntemi kullanılarak *T. molitor* larvaları üzerinde uygulandığında, 8. günde böcek popülasyonunun yaklaşık %91,41'inin öldüğü, püskürtme yöntemi kullanıldığında ise 8. günde böcek popülasyonunun yaklaşık %68,54'ünün öldüğü saptanmıştır (Şekil 4.20) (Şekil 4.21). Uygulama yöntemlerinin LT<sub>50</sub> değerlerine bakıldığında, püskürtme yönteminin 5,948 günde, enjeksiyon yönteminin ise 3,431 günde *T. molitor* popülasyonunun yarısını öldürdüğü bulunmuştur (Çizelge 4.15). Ganassi ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, Sigma-Aldrich firmasından alınan BEA, daldırma ve besin yolu kullanılarak iki farklı yöntemle *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) üzerinde test edilmiştir. BEA kullanılarak yapılan daldırma yöntemiyle, 15-saatlik larvalar ve 5-günlük *Schizaphis graminum*, 500 µg/mL konsantrasyonundaki BEA çözeltisine 10 saniye daldırılıp çıkartılmıştır. 18-24 saat sonra 15-saatlik larva popülasyonunda %77 oranında azalma gözlenirken, 5-günlük afid popülasyonunda herhangi bir azalma saptanmamıştır. Üç nesil boyunca, 25 µg/mL BEA, besin yoluyla *Schizaphis graminum* üzerinde uygulanmış, 2. ve 3. nesil dişi *Schizaphis graminum*'un çok sayıda abortif embriyo oluşturduğu gözlemlenmiştir [232]. Bu çalışmada, enjeksiyon yöntemi ile *T. molitor* larvaları üzerinde uygulanan Lül1-BEA'nın 5. günde böcek popülasyonunun %20'sini, 8. günde ise böcek popülasyonunun %66,6'sını öldürdüğü bulunmuştur.

Altı farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın 0.001 M, 0.0001 M, 0.00001 M, 0.000001 M olarak hazırlanan 4 farklı konsantrasyonu, *T. molitor* larvaları üzerinde denenmiştir. *T. molitor* larvaları üzerinde uygulanan 0.001 M BEA 10. günde böcek popülasyonunun %78,90'nını, 0.000001 M BEA ise böcek popülasyonunun %55,77'ini öldürmüştür (Şekil 4.22). Bb12 suşundan saflaştırılan BEA 0.000001 M, 0.00001 M, 0.0001M ve 0.001 M konsantrasyonlarının, *T. molitor* larva popülasyonunun yarısını, sırasıyla 7.327, 6.488, 5.649 ve 5.147 günlerde öldürdüğü saptanmıştır (Çizelge 4.20). Khoury

ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, Sigma-Aldrich firmasından alınan BEA'nın 0.5 µM ve 5 µM olmak üzere iki farklı konsantrasyonunu, *Sarcoptes scabiei*'nin (Acarina: Sarcoptidae) dişileri ve larva/nimf evreleri üzerinde denemişlerdir. 0.5 µM BEA, dişi popülasyonunun yarısının yaklaşık 3.4 saatte, larva/nimf popülasyonunun yarısının ise 4.7 saatte öldüğü saptanmıştır. 5 µM BEA'nın, dişi ve larva/nimf popülasyonlarının %50'sini öldürmesi için gereken süre sırasıyla, 1.9 ve 4.1 saat olarak bulunmuştur. BEA uygulamasından 2 ve 3 saat sonra dişi *S. scabiei* LC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 7.8 µM ve 2 µM olarak saptanmıştır. *S. scabiei* larva/nimflerin, BEA uygulamasından 2 saat ve 3 saat sonraki LC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 39.5 µM ve 28.4 µM olarak gözlenmiştir [233]. Yapılan bu çalışmada; Bb12 suşundan saflaştırılan BEA'nın, 5., 8., ve 10. günlerde *T. molitor* larva popülasyonlarının yarısını öldürmesi için gereken konsantrasyonlar sırasıyla 6,3 x 10<sup>-4</sup> M, 5,3 x 10<sup>-4</sup> M ve 3,3 x 10<sup>-5</sup> M BEA olarak bulunmuştur (Çizelge 4.21). 0.000001 M, 0.00001 M, 0.0001 M ve 0.001 M konsantrasyonlarda uygulanan BEA çözeltilerinin LT<sub>50</sub> değerlerine bakıldığında sırasıyla, 8.863, 7.959, 7.228 ve 6.181 günde böcek popülasyonunun %50'sini öldürdüğü bulunmuştur (Çizelge 4.22). BEA'nın, zamana bağlı olarak böcek popülasyonunun %50'sini öldürmesi için gereken miktar, BEA konsantrasyonunun artmasıyla azalmaktadır.

Altı farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA, püskürtme, enjeksiyon ve yaprak daldırma yöntemleri kullanılarak *L. decemlineata* larvaları üzerinde denenmiştir. Bey9 suşundan elde edilen BEA, enjeksiyon yöntemi kullanılarak uygulandığında, böcek popülasyonunun %50'sini 6.639 günde öldürürken, ticari BEA'nın, *L. decemlineata* popülasyonunun yarısını 6.076 günde öldürdüğü bulunmuştur. Bb12 suşundan elde edilen BEA, püskürtme yöntemi uygulanarak, *L. decemlineata* popülasyonunun yarısını 6.459 günde öldürürken, ticari BEA'nın böcek popülasyonunun yarısını 5.584 günde öldürdüğü bulunmuştur (Çizelge 4.25). Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA *L. decemlineata* larvaları üzerinde enjeksiyon yöntemi ile uygulandığında 10. günde böcek popülasyonunun yaklaşık %72,34'ünün, püskürtme yöntemi uygulandığında 10. günde böcek popülasyonunun yaklaşık %64,74'ünün ve yaprak daldırma yöntemi uygulandığında ise 10.günde böcek popülasyonunun %45,68'inin öldüğü

saptanmıştır (Şekil 4.24) (Şekil 4.25) (Şekil 4.26). Gupta ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *Fusarium semitectum* ve *Fusarium moniliforme* var. *Subglutinans*'ın sentezlediği BEA, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) üzerinde denenmiştir. Aseton:su:Triton-X (50:50:0.05) içeren BEA çözeltisine, 2,5 cm çapında kesilen patates yaprakları daldırılmış ve 48 saat sonra larva ölümleri gözlemlenmiştir. 300 ppm BEA *L. decemlineata*'ya uygulandığında, böcek popülasyonunun %10'nun, 1000 ppm BEA uygulandığında ise böcek popülasyonunun %90'ının öldüğü gözlenmiştir. *L. decemlineata* popülasyonunun yarısının ölmesi için gereken BEA miktarı 633 ppm olarak bulunmuştur [234]. Yapılan bu çalışmada; uygulanan yöntemlerin LT<sub>50</sub> değerlerine bakıldığında, püskürtme yönteminin 7,831 günde, enjeksiyon yönteminin 7,387 günde, yaprak daldırma yönteminin ise 10,791 günde *L. decemlineata* popülasyonunun yarısını öldürdüğü saptanmıştır (Çizelge 4.26). Ganassi ve arkadaşları *Schizaphis graminum* üzerinde BEA uyguladıkları çalışmada, 6 saat sonra, 5-günlük afidlerin abdomen kısımlarında kahverengi-siyah lekeler görmüşlerdir [232]. Yapılan bu çalışmada da, BEA uygulandıktan birkaç gün sonra, bazı patates böceği larvalarının abdomen bölgesinde farklı boyutlarda siyah-kahverengi lekeler gözlenmiştir (Şekil 4.23).

Altı farklı fungal kaynaktan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın 0.001 M, 0.0001 M, 0.00001 M, 0.000001 M olarak hazırlanan 4 farklı konsantrasyonu, *L. decemlineata* larvaları üzerinde denenmiştir. Uygulanan BEA konsantrasyonu arttıkça, BEA'nın etki süresi kısalmıştır. *L. decemlineata* larvaları üzerinde uygulanan 0.001 M BEA'nın 15. günde böcek popülasyonunun %94,55'ini, 0.000001 M BEA'nın 15. günde böcek popülasyonunun %81,59'unu öldürdüğü bulunmuştur (Şekil 4.27). KVL 03129 suşundan saflaştırılan BEA 0.000001 M, 0.00001 M, 0.0001M, 0.001 M olarak uygulanan farklı konsantrasyonlarının, *L. decemlineata* larva popülasyonunun yarısını, sırasıyla 7.034, 6.445, 5.462, 4.794 günde öldürdükleri saptanmıştır (Çizelge 4.31). 0.000001 M, 0.00001 M, 0.0001 M ve 0.001 M konsantrasyonlarda uygulanan BEA solüsyonlarının LT<sub>50</sub> değerlerine bakıldığında sırasıyla, 8.156, 7.796, 6.802 ve 5.957 günde böcek popülasyonunun %50'sini öldürdüğü bulunmuştur (Çizelge 4.33). Daniel ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, *Beauveria bassiana* CG71 ve UNI40

suşlarından elde edilen metanol ve etil asetat ekstraktlarını Sephadex LH-20 kolondan geçirmişler, daha sonra CG71 ve UNI40 suşlarından elde edilen ekstraktlarda, BEA analizini, tandem modunda ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (UHPLC-HRMS/MS) kullanarak yapmışlardır. 25 µl, 50 µl, 100 µl, 150 µl ve 200 µl BEA 3. evre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvaları üzerinde denemişlerdir. *B. bassiana* CG71 suşunun etil asetat ekstraktından elde edilen BEA'yı, *A. aegypti* larvalarına uygulamış, larvaların %50'ini öldürmesi için gereken miktarı 24. saatte 29.177 ppm, 48. saatte 1.2309 ppm olarak bulmuşlardır. *B. bassiana* CG71 suşunun metanol ekstraktından elde edilen BEA, *A. aegypti* larvalarında denemiş, larvaların %50'ini öldürmesi için gereken BEA miktarını 24. saatte 0.9887 ppm, 48. saatte ise 0.4653 ppm olarak saptamışlardır. *B. bassiana* UNI40 suşunun metanol ve etil asetat ekstraktlarından elde edilen BEA'nın, 24 saatte *A. aegypti* larvaları üzerinde bir etki göstermediğini, 48. saatte ise LC50 değerlerini sırasıyla 1.8149 ppm ve 0.7834 ppm olarak bulmuşlardır [119]. Bu çalışmada KVL 03129 suşundan saflaştırılan BEA'nın, *L. decemlineata*'nın 5., 8., ve 10. günlerdeki larva popülasyonlarının yarısını öldürmesi için gereken konsantrasyonları sırasıyla  $2,7 \times 10^{-4}$  M,  $9,1 \times 10^{-5}$  M ve  $4,1 \times 10^{-7}$  M BEA olarak bulunmuştur (Çizelge 4.32). Tüm suşlardan elde edilen BEA ve ticari BEA'nın, 10. günde elde edilen LC<sub>50</sub> değerlerinin, 5. ve 8. gündeki LC<sub>50</sub> değerlerinden daha düşük olduğu saptanmıştır. Böcek ölüm oranı ile uygulanan BEA miktarı arasında pozitif bir ilişki vardır. BEA konsantrasyonu artıkça, ölümün daha kısa süre içinde gerçekleştiği gözlenmiştir.

Altı farklı fungal kaynaktan saflaştırılan BEA ve ticari BEA'nın 4 farklı konsantrasyonu *G. mellonella*, *T. molitor* ve *L. decemlineata* larvalar üzerinde denenmiştir. Lül1-BEA, KVL 03129-BEA, Ank12-BEA, Bey9-BEA, 0614-BEA ve Bb12-BEA ve ticari BEA böcekler üzerinde aynı konsantrasyon oranlarında denenmiş ancak böcekler üzerinde farklı sürelerde etki gösterdikleri bulunmuştur. Bu durumun böcekten böceğe değişen, böcek bağışıklık sisteminden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tez kapsamında 3 farklı *B. bassiana* suşu (Lül1, KVL 03129 ve Ank12) ve 3 farklı *P. fumureusea* suşundan (Bb12, 0614 ve Bey9) saflaştırılan BEA ve ticari BEA, *G. mellonella*, *T. molitor* ve *L. decemlineata* üzerinde denenmiş ve BEA'nın mikrobiyal biyolojik ürün olarak, bitki korumada kullanılabilineceği gösterilmiştir. Beauverisinin böcekler üzerindeki etki mekanizmasının belirlenmesi ve çevre koşullarının beauverisinin patojenitesine olan etkisinin araştırılmasının önemli olacağı düşünülmektedir. Ayrıca beauverisinin, birçok farklı tarım zararlısı üzerindeki etkilerinin araştırılmasının, biyolojik mücadele çalışmaları için faydalı olacağı düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] M. Um, D. Zakaria, I. B. Galadima, and F. M. Gambo, A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops, *Journal of Entomology and Zoology Studies*, vol. 6, no. 1, pp. 27–32, **2018**.
- [2] K. R. Hakeem, Crop production and global environmental issues, *Crop Production and Global Environmental Issues*, pp. 1–598, **2015**.
- [3] W. Islam., Akutse, K. S., Qasim, M., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Idrees, A., and Latif, S, *Bemisia tabaci*-mediated facilitation in diversity of begomoviruses: Evidence from recent molecular studies, *Microbial Pathogenesis*, vol. 123, pp. 162–168, **2018**.
- [4] T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü Bitki Sağlığı ve Karantina Daire Başkanlığı, Gıda, *Patates Hastalıkları ve zararlıları ile mücadele*. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, **2016**. [Online]. Available: [www.tarim.gov.tr](http://www.tarim.gov.tr)
- [5] J, Eilenberg., A, Hajek., and C, Lomer, Suggestions for unifying the terminology, no. 1, pp. 387–400, **2001**.
- [6] W. A. Elkhateeb, K. M. Mousa, M. O. ELnahas, and G. M. Daba, Fungi against insects and contrariwise as biological control models, *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, vol. 31, no. 1, pp. 1–9, **2021**.
- [7] S. S. Sandhu, Sharma, A. K., Beniwal, V., Goel, G., Batra, P., Kumar, A., and Malhotra, S, Myco-Biocontrol of Insect Pests: Factors Involved, Mechanism, and Regulation, *Journal of Pathogens*, vol. 2012, pp. 1–10, **2012**.
- [8] A. Alyokhin, M. Udalov, and G. Benkovskaya, *The Colorado potato beetle*, no. 1988. Elsevier Inc., **2013**.
- [9] K. Uma Devi, J. Padmavathi, C. Uma Maheswara Rao, A. A. P. Khan, and M. C. Mohan, A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae), *Biocontrol Science and Technology*, vol. 18, no. 10, pp. 975–989, **2008**.
- [10] G. Zimmermann, The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): Biology, ecology and use in biological control, *Biocontrol Science and Technology*, vol. 18, no. 9, pp. 865–901, **2008**.
- [11] H. M. Hussein, R. Zemek, S. O. Habuštová, E. Prenerová, and M. M. Adel, Laboratory evaluation of a new strain CCM 8367 of *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) on *Spodoptera littoralis* (Boisd.), <http://dx.doi.org/10.1080/03235408.2013.765677>, vol. 46, no. 11, pp. 1307–1319, **2013**.

- [12] S. Kidanu, Research and Application of Entomopathogenic Fungi as Pest Management Option: A Review, *Journal of Environment and Earth Science*, vol. 10, no. 3, pp. 31–39, **2020**.
- [13] Q. Wang, L. Xu, Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: A short review, *Molecules*, vol. 17, no. 3, pp. 2367–2377, **2012**.
- [14] L. Ye and K. Mosbach, Molecular imprinting: Synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors, *Chemistry of Materials*, vol. 20, no. 3, pp. 859–868, **2008**.
- [15] G. Ertürk, B. Mattiasson, Cryogels-versatile tools in bioseparation, *Journal of Chromatography A*, vol. 1357, pp. 24–35, **2014**.
- [16] L. Panwar, Y. Kumar, and S. Yadav, Seasonal incidence of Greater wax moth, *Galleria mellonella* Linnaeus in *Apis mellifera* colonies in ecological condition of Hisar, *Journal of Entomology and Zoology Studies*, vol. 6, no. 1, pp. 790–795, **2018**.
- [17] B. C. Hanumanthaswamy and D. Rajagopal, Natural enemies of Greater Wax Moth *Galleria mellonella* Linnaeus in Honey Bee Colonies, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, vol. 6, no. 8, pp. 3418–3421, **2017**.
- [18] C. B. Singh, D. S. Jayas, J. Paliwal, and N. D. G. White, Detection of insect-damaged wheat kernels using near-infrared hyperspectral imaging, *Journal of Stored Products Research*, vol. 45, no. 3, pp. 151–158, **2009**.
- [19] N. Uygun, M. R. Ulusoy, S. Satar, Biyolojik mücadele, *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, vol. 1, no. 1, pp. 1–14, **2010**.
- [20] C. James, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011., *The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA)*, vol. 43, **2011**.
- [21] E. C. Oerke, “Crop losses to pests,” *The Journal of Agricultural Science*, vol. 144, no. 1, pp. 31–43, Feb. **2006**.
- [22] M. K. Balaško, K. M. Mikac, R. Bažok, D. Lemic, Modern Techniques in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) Control and Resistance Management: History Review and Future Perspectives,” *Insects Vol. 11, Page 581*, vol. 11, no. 9, p. 581, **2020**.
- [23] M. Ulusoy, Entomopatojen Fungus *Beauveria Bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill Sporlarının Bazı Zararlı Böcekler Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi , Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2016.
- [24] Y. Doğan and N. E. Keskin, Isolation of Entomopathogenic Fungi From Turkey Soil And Testing of Different Doses on *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Commun.Fac.Sci.Univ.Ank.Ser. C Biology*, vol. 29, no. 2, pp. 213–242, **2020**.

- [25] N. Keskin, A. H. Uztan, O. Abaci Gunyar, and A. Yoltas, Isolation And Identification Of Entomopathogenic Fungi *Beauveria Bassiana* from Turkey. *Fresenius Environ. Bull*, 25, 5180-5185 **2016**.
- [26] J. Eilenberg, A. Hajek, C. Lomer, Suggestions for unifying the terminology in biological control, *BioControl* 2001 46:4, vol. 46, no. 4, pp. 387–400, **2001**.
- [27] A. E. Hajek, J. Eilenber, *Natural Enemies: An Introduction to Biological Control*, Second Edition. United Kingdom: Cambridge University Press, **2022**.
- [28] G. Zimmermann, Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*, *Biocontrol Science and Technology*, vol. 17, no. 6, pp. 553–596, **2007**.
- [29] F. E. Vega, M. S. Goettel, M. Blackwell, D. Chandler, M. A. Jackson, S. Keller, and H. E. Roy, Fungal entomopathogens: new insights on their ecology, *Fungal Ecology*, vol. 2, no. 4, pp. 149–159, **2009**.
- [30] P. Kumar, M. Kamle, R. Borah, D. K. Mahato, and B. Sharma, *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture, *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, vol. 31, no. 1, pp. 1–7, **2021**.
- [31] J. C. Lord, From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control, *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 89, no. 1, pp. 19–29, **2005**.
- [32] C. S. Kalha, P. P. Singh, S. S. Kang, M. S. Hunjan, V. Gupta, and R. Sharma, Entomopathogenic Viruses and Bacteria for Insect-Pest Control, *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective*, pp. 225–244, **2014**.
- [33] A. E. Hajek, R. A. Humber, J. S. Elkinton, Mysterious Origin of Entomopaga malmalga in North America, *American Entomologist*, vol. 41, no. 1, pp. 31–43, **1995**.
- [34] P. A. Shah, J. K. Pell, Entomopathogenic fungi as biological control agents, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 61, no. 5–6, pp. 413–423, **2003**.
- [35] A. A. Shahid, A. Q. Rao, A. Bakhsh, T. Husnain, Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity, *Archives of Biological Sciences*, vol. 64, no. 1, pp. 21–42, **2012**.
- [36] W. Islam, M. Adnan, A. Shabbir. H, Naveed, Y. S. Abubakar, M. Qasim, and H. Ali, Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests, *Microbial Pathogenesis*, vol. 159, p. 105122, Oct. **2021**.



- [37] V. Herzig, N. S. Bende, M. S. Alam, H. W. Tedford, R. M. Kennedy, and G. F. King, Methods for Deployment of Spider Venom Peptides as Bioinsecticides, *Advances in Insect Physiology*, vol. 47, pp. 389–411, **2014**.
- [38] M. Goettel, A. E. Hajek, J. P. Siegel, H.C. Evans, Safety of fungal biocontrol agents, In *Fungi As Biocontrol Agents: Progress Problems and Potential*, (Butt T M, Jackson C, and Magan N, Eds.) CABI Publishing, pp. 347–377, England, **2001**.
- [39] J. George, S. Blanford, M. J. Domingue, M. B. Thomas, A. F. Read, and T. C. Baker, Reduction in host-finding behaviour in fungus-infected mosquitoes is correlated with reduction in olfactory receptor neuron responsiveness, *Malaria Journal*, vol. 10, no. 1, pp. 1–13, **2011**.
- [40] J. M. Darbro, P. H. Johnson, M. B. Thomas, S. A. Ritchie, B. H. Kay, and P. A. Ryan, Effects of *Beauveria bassiana* on Survival, Blood-Feeding Success, and Fecundity of *Aedes aegypti* in Laboratory and Semi-Field Conditions, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 86, no. 4, p. 656, **2012**.
- [41] A. Pereira, P. Casals, A. M. Salazar, M. Gerding, Virulence and pre-lethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* on *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae),” *Chil J Agric Res*, vol. 71, no. 4, pp. 554–559, **2011**.
- [42] M. Senthil kumar, R. Anandham, and R. Krishnamoorthy Paecilomyces, In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*, (N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, and A. Sankaranarayanan Eds.). Academic Press, United States, **2020**.
- [43] L. A. Mwamburi, Beauveria, In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*, (N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, and A. Sankaranarayanan Eds.). Academic Press. United States **2020**.
- [44] M. A. Qayyum, H. Bilal, U. N. Ullah, H. Ali, H. Raza, and M. Wajid, Factors Affecting the Epizootics of Entomopathogenic Fungi-A Review, *Journal of Bioresource Management*, vol. 8, no. 4, p. 5, Oct. **2021**.
- [45] S. Khan, L. Guo, Y. Maimaiti, M. Mijit, D. Qiu, Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent, *Molecular Plant Breeding*, vol. 3, no. 7, pp. 63–79, **2012**.
- [46] Tkaczuk C, Majchrowska-Safaryan A, Panasiuk T, Tipping C, Effect of selected heavy metal ions on the growth of entomopathogenic fungi from the genus *Isaria*, *Appl Ecol Environ Res*, vol. 17, no. 2, pp. 2571–2582, **2019**.
- [47] P. Jaihan, K. Sangdee, A. Sangdee, Selection of entomopathogenic fungus for biological control of chili anthracnose disease caused by *Colletotrichum*

- spp., *European Journal of Plant Pathology*, vol. 146, no. 3, pp. 551–564, **2016**.
- [48] G. M. Mascarin, S. T. Jaronski, The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* vol. 32, no. 11, pp. 1–26, **2016**
- [49] L. R. Jaber, J. Enkerli, Fungal entomopathogens as endophytes: Can they promote plant growth?, *Biocontrol Science and Technology*, vol. 27, no. 1, pp. 28–41, **2017**
- [50] T. Ramakuwela, J. Hatting, C. Bock, F. E. Vega, L. Wells, G. N. Mbata and D. Shapiro-Ilan, Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in pecan (*Carya illinoensis*) seedlings and its virulence against pecan insect pests, *Biological Control*, vol. 140, p. 104102, **2020**.
- [51] B. H. Ownley, K. D. Gwinn, F. E. Vega, Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution, *BioControl*, vol. 55, no. 1, pp. 113–128, Jan. **2010**.
- [52] B. Ramanujam, R. Rangeshwaran, G. Sivakmar, M. Mohan, M. S. Yandigeri, Management of Insect Pests by Microorganisms, *Proc Indian Natn Sci Acad*, vol. 80, pp. 445–471, **2014**.
- [53] M. S. Goettel, J. Eilenberg, T. Glare, Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect population, In *Insect Control: Biological and Synthetic Agents*, (L. I. Gilbert, S. S. Gill, Eds.), Academic Press, pp. 387–432, United States, **2010**.
- [54] E. Quesada-Moraga, J. A. Navas-Cortés, E. A. A. Maranhao, A. Ortiz-Urquiza, and C. Santiago-Álvarez, Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils, *Mycological Research*, vol. 111, no. 8, pp. 947–966, **2007**.
- [55] S. W. Behie, S. J. Jones, M. J. Bidochka, Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*, *Fungal Ecology*, vol. 13, pp. 112–119, **2015**.
- [56] P. D. Bridge, M. S. Clark, and D. A. Pearce, A new species of *Paecilomyces* isolated from the Antarctic springtail *Cryptopygus antarcticus* British Antarctic Survey, *Mycotaxon*, vol. 95, p. 248, **2015**.
- [57] O. M. Aung, K. Soyong, K. D. Hyde, Diversity of entomopathogenic fungi in rainforests of Chiang Mai province, Thailand, *Fungal Divers*, vol. 30, pp. 15–22, **2008**.
- [58] P. Widden, D. Parkinson, Populations of fungi in a high arctic ecosystem, *Canadian Journal of Botany*, vol. 57, no. 21, pp. 2408–2417, **2011**.
- [59] J. A. Blanco, Y. H. Lo, *Forest Ecosystems: More than Just Trees*. BoD-Books on Demand, Germany, **2012**.

- [60] S. Gómez-Vidal, L. v. Lopez-Llorca, H. B. Jansson, J. Salinas, Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi, *Micron*, vol. 37, no. 7, pp. 624–632, **2006**.
- [61] F. E. Vega, The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review, *Mycologia*, vol. 110, no. 1, pp. 4–30, **2018**..
- [62] M. S. Goettel, J. Eilenberg, T. Glare, *Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations*, vol. 6–6, no. **2005**.
- [63] A. Imoulan, M. Hussain, P. M. Kirk, A. el Meziane, Y. J. Yao, Entomopathogenic fungus Beauveria: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, vol. 20, no. 4, pp. 1204–1212, **2017**.
- [64] M. D. Lozano-Tovar, I. Garrido-Jurado, E. Quesada-Moraga, M. C. Raya-Ortega, and A. Trapero-Casas, *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens, *Crop Protection*, vol. 100, pp. 186–195, **2017**.
- [65] A. Amobonye, P. Bhagwat, A. Pandey, S. Singh, S. Pillai, Biotechnological potential of Beauveria bassiana as a source of novel biocatalysts and metabolite, *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 40, no. 7, pp. 1019–1034, **2020**.
- [66] Q. Wu, J. Patocka, and K. Kuca, Beauvericin, A Fusarium Mycotoxin: Anticancer Activity, Mechanisms, and Human Exposure Risk Assessment, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 19, no. 3, pp. 206–214, **2018**.
- [67] N. v. Meyling, J. Eilenberg, Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem,” *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 113, pp. 336–341, **2006**.
- [68] M. Kavková and V. Čurn, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales), *Mycopathologia* vol. 159, no. 1, pp. 53–63, **2005**.
- [69] Z. Perveen, S. Shahzad, A comparative study of the efficacy of Paecilomyces species against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* Macrofungi from Gilgit-Baltistan Pakistan View project Studies on post harvest rots of banana in Karachi View project, *Pakistan Journal of Nematology*, vol. 31, no. 2, pp. 125–131, **2013**.
- [70] A. Moreno-Gavira, V. Huertas, F. Diáñez, M. Santos, B. Sánchez-Montesinos, Paecilomyces and Its Importance in the Biological Control of Agricultural Pests and Diseases, *Plants Vol. 9, Page 1746*, vol. 9, no. 12, p. 1746, **2020**.

- [71] Q. Weng, X. Zhang, W. Chen, Q. Hu, Secondary Metabolites and the Risks of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*, *Molecules* Vol. 24, Page 664, vol. 24, no. 4, p. 664, **2019**.
- [72] C. Ye, Z. Song, T. Wu, W. Zhang, N. U. Saba, L. Xing, and X. Su, Endocuticle is involved in caste differentiation of the lower termite, *Current Zoology*, vol. 67, no. 5, pp. 489–499, **2021**.
- [73] E. M. Cho, B. H. Kirkland, D. J. Holder, N. O. Keyhani, Phage display cDNA cloning and expression analysis of hydrophobins from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Cordyceps), *Microbiology* vol. 153, no. 10, pp. 3438–3447, **2007**.
- [74] M. Skinner, B. L. Parker, J. S. Kim, Role of Entomopathogenic Fungi in Integrated Pest Management, *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective*, pp. 169–191, **2014**.
- [75] A. Ortiz-Urquiza, N. O. Keyhani, E. Quesada-Moraga, Culture conditions affect virulence and production of insect toxic proteins in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, *Biocontrol Science and Technology*, vol. 23, no. 10, pp. 1199–1212, **2013**.
- [76] N. A. Soliman, Toxicological and Biochemical Effects of *Beauveria bassiana* (Bals.) on Peach Fruit Fly, *Bactrocera zonata* (Saunders) Immature Stages, *Journal of Plant Protection and Pathology*, vol. 11, no. 11, pp. 579–585, **2020**.
- [77] A. Ortiz-Urquiza, N. O. Keyhani, Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle, *Insects*, vol. 4, no. 3, pp. 357–374, **2013**.
- [78] N. Pedrini, R. Crespo, M. P. Juárez, Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 146, no. 1–2, pp. 124–137, **2007**.
- [79] L. Santi, W. O. Beys da Silva, M. Berger, J. A. Guimarães, A. Schrank, and M. H. Vainstein, Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis, *Toxicon*, vol. 55, no. 4, pp. 874–880, **2010**.
- [80] A. Litwin, M. Nowak, S. Różalska, Entomopathogenic fungi: unconventional applications, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2020 19:1, vol. 19, no. 1, pp. 23–42, **2020**.
- [81] K. Jin, G. Peng, Y. Liu, Y. Xia, The acid trehalase, ATM1, contributes to the in vivo growth and virulence of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*,” *Fungal Genetics and Biology*, vol. 77, pp. 61–67, **2015**.
- [82] A. Zibae and D. Malagoli, Immune response of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) larvae to different entomopathogenic fungi, *Bulletin of Entomological Research*, vol. 104, no. 2, pp. 155–163, **2014**.

- [83] K. Langfelder, M. Streibel, B. Jahn, G. Haase, A. A. Brakhage, Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi, *Fungal Genetics and Biology*, vol. 38, no. 2, pp. 143–158, **2003**.
- [84] X. Q. Xie, J. Wang, B. F. Huang, S. H. Ying, M. G. Feng, A new manganese superoxide dismutase identified from *Beauveria bassiana* enhances virulence and stress tolerance when overexpressed in the fungal pathogen, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 86, no. 5, pp. 1543–1553, **2010**.
- [85] P. Feng, Y. Shang, K. Cen, and C. Wang, Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 112, no. 36, pp. 11365–11370, **2015**.
- [86] C. Wang, R. J. Leger, A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no. 17, pp. 6647–6652, **2006**.
- [87] H. Wang, H. Peng, W. Li, P. Cheng, M. Gong, The Toxins of *Beauveria bassiana* and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects, *Frontiers in Microbiology*, vol. 12, **2021**.
- [88] N. P. Keller, Translating biosynthetic gene clusters into fungal armor and weaponry, *Nature Chemical Biology* 2015 11:9, vol. 11, no. 9, pp. 671–677, **2015**.
- [89] M. B. Quin, C. M. Flynn, and C. Schmidt-Dannert, Traversing the fungal terpenome, *Natural Product Reports*, vol. 31, no. 10, pp. 1449–1473, **2014**.
- [90] Z. Luo, Y. Li, J. Mousa, S. Bruner, Y. Zhang, Y. Pei, N. O. Keyhani, Bbmsn2 acts as a pH-dependent negative regulator of secondary metabolite production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, *Environmental Microbiology*, vol. 17, no. 4, pp. 1189–1202, **2015**.
- [91] L. Mc Namara, S. K. Dolan, J. M. Walsh, J. C. Stephens, T. R. Glare, K. Kavanagh, C. T. Griffin, Oosporein, an abundant metabolite in *Beauveria caledonica*, with a feedback induction mechanism and a role in insect virulence, *Fungal Biology*, vol. 123, no. 8, pp. 601–610, **2019**.
- [92] A. Asaff, C. M. Cerda-García-Rojas, G. Viniegra-González, M. de la Torre, Carbon distribution and redirection of metabolism in *Paecilomyces fumosoroseus* during solid-state and liquid fermentations, *Process Biochemistry*, vol. 41, no. 6, pp. 1303–1310, **2006**.
- [93] E. Quesada-Moraga, A. Vey, Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, *Mycological Research*, vol. 108, no. 4, pp. 441–452, **2004**.
- [94] M. de Souza Santos, W. Jonis Andrioli, M. P. Freire De Moraes Del Lama, J. Kenupp Bastos, N. P. D. Nanayakkara, and R. M. Zumstein Georgetto

- Naal, In vitro anti-allergic activity of the fungal metabolite pyridovericin, *International Immunopharmacology*, vol. 15, no. 3, pp. 532–538, **2013**.
- [95] A. Asaff, C. Cerda-García-Rojas, M. de La Torre, Isolation of dipicolinic acid as an insecticidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 68, no. 4, pp. 542–547, **2005**.
- [96] Z. Q. Liu, T. Liu, C. Chen, M. Y. Li, Z. Y. Wang, R. S. Chen, D. Q. Luo, Fumosorinone, a novel PTP1B inhibitor, activates insulin signaling in insulin-resistance HepG2 cells and shows anti-diabetic effect in diabetic KKAY mice, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 285, no. 1, pp. 61–70, **2015**.
- [97] S. Zobel, S. Boecker, D. Kulke, D. Heimbach, V. Meyer, and R. D. Süßmuth | Reprogramming the Biosynthesis of Cyclodepsipeptide Synthetases to Obtain New Enniatins and Beauvericins, *Chem BioChem*, vol. 17, no. 4, pp. 283–287, **2016**.
- [98] A. Logrieco, A. Moretti, A. Ritieni, M. F. Caiaffa, and L. Macchia, Beauvericin: Chemistry, Biology and Significance, *Advances in Microbial Toxin Research and Its Biotechnological Exploitation*, pp. 23–30, **2002**.
- [99] F. Caloni, P. Fossati, A. Anadón, A. Bertero, Beauvericin: The beauty and the beast, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 75, p. 103349, **2020**.
- [100] C. Luz, F. Saladino, F. B. Luciano, J. Mañes, and G. Meca, Occurrence, toxicity, bioaccessibility and mitigation strategies of beauvericin, a minor *Fusarium* mycotoxin, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 107, pp. 430–439, **2017**.
- [101] Q. Wu, J. Patocka, E. Nepovimova, K. Kuca, A review on the synthesis and a review on the synthesis and bioactivity aspects of beauvericin, a *Fusarium* mycotoxin, *Frontiers in Pharmacology*, vol. 9, p. **1338**, **2018**.
- [102] G. Meca, I. Sospedra, J. M. Soriano, A. Ritieni, A. Moretti, J. Mañes, Antibacterial effect of the bioactive compound beauvericin produced by *Fusarium proliferatum* on solid medium of wheat, *Toxicon*, vol. 56, no. 3, pp. 349–354, **2010**.
- [103] J. P. Dzoyem, R. Melong, A. T. Tsamo, T. Maffo, D. G. Kapche, B. T. Ngadjui, J. N. Eloff, Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica*, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 27, no. 2, pp. 251–253, **2017**.
- [104] L. Xu, J. Wang, J. Zhao, P. Li, T. Shan, J. Wang, L. Zhou, Beauvericin from the Endophytic Fungus, *Fusarium redolens*, Isolated from *Dioscorea zingiberensis* and Its Antibacterial Activity, *Natural Product Communications*, vol. 5, no. 5, pp. 811–814, **2010**.

- [105] T. Fukada, M. Arai, H. Tomoda, and S. Ōmura, New beauvericins, potentiators of antifungal miconazole activity, produced by *Beauveria* sp. FKI-1366. II. Structure elucidation, *Journal of Antibiotics*, vol. 57, no. 2, pp. 117–124, **2004**.
- [106] Y. Tong, M. Liu, Y. Zhang, X. Liu, R. Huang, F. Song, L. Zhang, Beauvericin counteracted multi-drug resistant *Candida albicans* by blocking ABC transporters, *Synthetic and Systems Biotechnology*, vol. 1, no. 3, pp. 158–168, **2016**.
- [107] C. G. Shin, D. G. An, H. H. Song, C. Lee, Beauvericin and enniatins H, I and MK1688 are new potent inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase, *The Journal of Antibiotics* vol. 62, no. 12, pp. 687–690, **2009**.
- [108] Y. W. Tao, Y. C. Lin, Z. G. She, M. T. Lin, P. X. Chen, J. Y. Zhang, Anticancer activity and mechanism investigation of beauvericin isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 15, no. 2, pp. 258–266, **2015**.
- [109] C. L. Lu, H. I. Lin, B. F. Chen, G. M. Jow, Beauvericin-induced cell apoptosis through the mitogen-activated protein kinase pathway in human nonsmall cell lung cancer A549 cells, *The Journal of Toxicological Sciences*, vol. 41, no. 3, pp. 429–437, **2016**.
- [110] L. Zhang, K. Yan, Y. Zhang, R. Huang, J. Bian, C. Zheng, X. Chen, High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 11, pp. 4606–4611, **2007**.
- [111] L. Calò, F. Fornelli, R. Ramires, S. Nenna, A. Tursi, M. F. Caiaffa, L. Macchia, Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin, *Pharmacological Research*, vol. 49, no. 1, pp. 73–77, **2004**.
- [112] A. Prosperini, A. Juan-García, G. Font, and M. J. Ruiz, Beauvericin-induced cytotoxicity via ROS production and mitochondrial damage in Caco-2 cells, *Toxicology Letters*, vol. 222, no. 2, pp. 204–211, **2013**.
- [113] A. Juan-García, M. J. Ruiz, G. Font, and L. Manyes, Enniatin A1, enniatin B1 and beauvericin on HepG2: Evaluation of toxic effects, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 84, pp. 188–196, **2015**.
- [114] B. F. Chen, M. C. Tsai, and G. M. Jow, Induction of calcium influx from extracellular fluid by beauvericin in human leukemia cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 340, no. 1, pp. 134–139, **2006**.
- [115] R. Dornetshuber, P. Heffeter, M. Sulyok, R. Schumacher, P. Chiba, S. Kopp, W. Berger, Interactions between ABC-transport proteins and the

- secondary Fusarium metabolites enniatin and beauvericin, *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 53, no. 7, pp. 904–920, **2009**.
- [116] D. Heilos, Y. Rodríguez-Carrasco, B. Englinger, G. Timelthaler, S. Van Schoonhoven, M. Sulyok, W. Berger, The Natural Fungal Metabolite Beauvericin Exerts Anticancer Activity In Vivo: A Pre-Clinical Pilot Study, *Toxins* 2017, Vol. 9, Page 258, vol. 9, no. 9, p. 258, Aug. **2017**.
- [117] F. Maranghi, R. Tassinari, L. Narciso, S. Tait, C. L. Rocca, G. D. Felice, O. Reale, In vivo toxicity and genotoxicity of beauvericin and enniatins. Combined approach to study in vivo toxicity and genotoxicity of mycotoxins beauvericin (BEA) and enniatin B (ENNB), *EFSA Supporting Publications*, vol. 15, no. 5, p. 1406E, **2018**.
- [118] R. L. Hamill, C. E. Higgins, I. E. Boaa, M. Gorn, The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*, *Tetrahedron Letters*, no. 45, pp. 4255–4258, **1969**.
- [119] J. F. Daniel, A. A. Silva, D. H. Nakagawa, L. S. D. Medeiros, M. G. Carvalho, L. J. Tavares, E. Rodrigues-Filho, Larvicidal activity of Beauveria bassiana extracts against *Aedes aegypti* and identification of beauvericins, *J Braz Chem Soc*, vol. 28, no. 6, pp. 1003–1013, **2017**.
- [120] F. Fornelli, F. Minervini, A. Logrieco, Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9), *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 85, no. 2, pp. 74–79, **2004**.
- [121] J. F. Grove, M. Pople, The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex, *Mycopathologia*, vol. 70, pp. 103–105, **1980**.
- [122] M. Andaç, I. Y. Galaev, and A. Denizli, Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 1021, pp. 69–80, **2016**.
- [123] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li, Molecular imprinting: Perspectives and applications, *Chemical Society Reviews*, vol. 45, no. 8, pp. 2137–2211, **2016**.
- [124] L. Chen, S. Xu, J. Li, Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications, *Chemical Society Reviews*, vol. 40, no. 5, pp. 2922–2942, **2011**.
- [125] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li, Molecular imprinting: Perspectives and applications, *Chemical Society Reviews*, vol. 45, no. 8. Royal Society of Chemistry, pp. 2137–2211, **2016**.
- [126] H. Yan, K. H. Row, Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 7, pp. 155–178, **2006**.



- [127] E. Hedborg, F. Winquist, I. Lundström, L. I. Andersson, K. Mosbach, Some studies of molecularly-imprinted polymer membranes in combination with field-effect devices, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 37–38, no. C, pp. 796–799, **1993**.
- [128] F. Priem, H. Althaus, M. Birnbaum, P. Sinha, H. S. Conradt, and K. Jung,  $\beta$ -Trace Protein in Serum: A New Marker of Glomerular Filtration Rate in the Creatinine-Blind Range, *Clinical Chemistry*, vol. 45, no. 4, pp. 567–568, **1999**.
- [129] M. Foroutan Koudehi, R. Zibaseresht, Synthesis of molecularly imprinted polymer nanoparticles containing gentamicin drug as wound dressing based polyvinyl alcohol/gelatin nanofiber, *Materials Technology*, vol. 35, no. 1, pp. 21–30, **2019**.
- [130] G. Vasapollo, R. D. Sole, L. Mergola, M. R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, no. 9, pp. 5908–5945, **2011**.
- [131] L. Kang, R. C. Camacho, W. Li, K. D’Aquino, S. You, V. Chuo, W. Jian, Simultaneous Catabolite Identification and Quantitation of Large Therapeutic Protein at the Intact Level by Immunoaffinity Capture Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, vol. 89, no. 11, pp. 6065–6075, **2017**.
- [132] J. Wang, Q. M. Wang, L. L. Tian, C. Yang, S. H. Yu, C. Yang, Research Progress of the Molecularly Imprinted Cryogel, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 43, no. 11, pp. 1777–1784, **2015**
- [133] O. Okay, V. I. Lozinsky, Synthesis and Structure–Property Relationships of Cryogels, *Advances in Polymer Science*, vol. 263, pp. 103–157, **2014**.
- [134] K. K. R. Tetala, T. A. van Beek, Bioaffinity chromatography on monolithic supports, *Journal of Separation Science*, vol. 33, no. 3, pp. 422–438, **2010**.
- [135] M. Andaç, G. Baydemir, A. Denizli, Molecularly imprinted polymers as a tool for biomolecule separation, *Nanoscale Fabrication, Optimization, Scale-up and Biological Aspects of Pharmaceutical Nanotechnology*, pp. 511–545, **2018**.
- [136] I. Y. Galaev, M. B. Dainiak, F. Plieva, B. Mattiasson, Effect of matrix elasticity on affinity binding and release of bioparticles. Elution of bound cells by temperature-induced shrinkage of the smart macroporous hydrogel, *Langmuir*, vol. 23, no. 1, pp. 35–40, **2007**.
- [137] H. Kirsebom, D. Topgaard, I. Y. Galaev, B. Mattiasson, Modulating the porosity of cryogels by influencing the nonfrozen liquid phase through the addition of inert solutes, *Langmuir*, vol. 26, no. 20, pp. 16129–16133, **2010**.

- [138] F. M. Plieva, I. Y. Galaev, W. Noppe, B. Mattiasson, Cryogel applications in microbiology, *Trends Microbiol*, vol. 16, no. 11, pp. 543–551, **2008**.
- [139] T. D. James, S. Shinkai, Artificial Receptors as Chemosensors for Carbohydrates, *Host-guest chemistry*, pp. 159–200, **2002**.
- [140] M. B. Dainiak, I. Y. Galaev, B. Mattiasson, Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells, *Journal of Chromatography A*, vol. 1123, no. 2, pp. 145–150, **2006**.
- [141] M. B. Dainiak, F. M. Plieva, I. Y. Galaev, R. Hatti-Kaul, B. Mattiasson, Cell Chromatography: Separation of Different Microbial Cells Using IMAC Supermacroporous Monolithic Columns, *Biotechnology Progress*, vol. 21, no. 2, pp. 644–649, **2005**.
- [142] E. Verheyen, J. P. Schillemans, M. van Wijk, M. A. Demeniex, W. E. Hennink, C. F. van Nostrum, Challenges for the effective molecular imprinting of proteins, *Biomaterials*, vol. 32, no. 11, pp. 3008–3020, **2011**.
- [143] I. A. Nicholls, J. P. Rosengren, Molecular imprinting of surfaces, *Bioseparation* vol. 10, no. 6, pp. 301–305, **2001**.
- [144] G. Ertürk, N. Bereli, M. A. Tümer, R. Say, A. Denizli, Molecularly imprinted cryogels for human interferon-alpha purification from human gingival fibroblast culture, *Journal of Molecular Recognition*, vol. 26, no. 12, pp. 633–642, **2013**.
- [145] S. Asliyuce, L. Uzun, A. Yousefi Rad, S. Unal, R. Say, A. Denizli, Molecular imprinting based composite cryogel membranes for purification of anti-hepatitis B surface antibody by fast protein liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, vol. 889–890, pp. 95–102, **2012**.
- [146] M. Ulusoy, S. Asliyüce, N. Keskin, and A. Denizli, Beauvericin purification from fungal strain using molecularly imprinted cryogels, *Process Biochemistry*, vol. 113, pp. 185–193, **2022**.
- [147] R. Gulati, H. D. Kaushik, Enemies of Honeybees And Their Management- A Review, *Agric. Rev*, vol. 25, no. 3, pp. 189–200, **2004**.
- [148] R. A. Morse, R. Nowogrodzki, *Honey bee pests, predators, and diseases*. USA: Comstock Publishing Associates, **1990**.
- [149] G. Jones, A. Barabas, W. Elliott, S. Parsons, Female greater wax moths reduce sexual display behavior in relation to the potential risk of predation by echolocating bats, *Behavioral Ecology*, vol. 13, no. 3, pp. 375–380, **2002**.
- [150] I. Wojda, B. Staniec, M. Sułek, and J. Kordaczuk, The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies, *Pathogens and Disease*, vol. 78, no. 9, p. 57, **2020**.

- [151] R. A. Nielsen, D. Brister, The Greater Wax Moth: Adult Behavior, *Ann Entomol Soc Am*, vol. 70, no. 1, pp. 101–103, **1977**.
- [152] H. G. Spangler, Sound and the Moths That Infest Beehives, *The Florida Entomologist*, vol. 71, no. 4, p. 467, **1988**.
- [153] J. D. Ellis, J. R. Graham, A. Mortensen, Standard methods for wax moth research, *Journal of Apicultural Research*, vol. 52, no. 1, pp. 1–17, **2015**.
- [154] G. Kumar, M. Khan, C. Gourav Kumar, Study of the life cycle of greater wax moth (***Galleria mellonella***) under storage conditions in relation to different weather conditions, *Journal of Entomology and Zoology Studies*, vol. 6, no. 3, pp. 444–447, **2018**.
- [155] C. A. Kwadha, G. O. Ong'Amo, P. N. Ndegwa, S. K. Raina, A. T. Fombong, The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, *Insects*, vol. 8, no. 2, pp. 1–17, **2017**.
- [156] A. Desai and M. R. Siddhapara, Biology of greater wax moth, *Galleria mellonella*. On artificial diet, *Journal of Experimental Zoology*, vol. 22, no. 2, pp. 1267–1272, **2019**.
- [157] V. Hosamani, B. C. Hanumantha Swamy, K. N. Kattimani, C. M. Kalibavi, “Studies on Biology of Greater Wax Moth (*Galleria mellonella* L.),” *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, vol. 6, no. 11, pp. 3811–3815, **2017**.
- [158] W. M. Hood, P. M. Horton, and J. W. Mccreadie, Field evaluation of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) for the control of wax moths (Lepidoptera: Pyralidae) in stored honey bee comb, *J. Agric. Urban Entomol*, vol. 20, no. 2, pp. 93–103, **2003**.
- [159] P. Traiyasut, W. Mookhploy, K. Kimura, M. Yoshiyama, K. Khongphinitbunjong, P. Chantawannakul, First Detection of Honey Bee Viruses in Wax Moth, *Chiang Mai J. Sci*, vol. 43, no. 4, **2016**.
- [160] E. Akyol, H. Yeninar, N. Şahinler, A. Ceylan, Büyük Balmumu Güvesi *Galleria mellonella* L.'nin (Lepidoptera: Pyralidae) Kontrolünde Karbondioksitin (CO<sub>2</sub>) Kullanımı, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, vol. 9, no. 1, pp. 26–31, **2009**.
- [161] E. Akyol, A. Korkmaz, Peteklerin Büyük Mum Güvesi (*Galleria mellonella* L.)'ne Karşı Korunmasında –5°C Soğuk Uygulamasının Etkisi, *Uludag Bee Journal*, vol. 8, no. 1, **2008**.
- [162] W. Ritter, P. Akranakul, Honey Bee Diseases and Pests: A Practical Guide, *FAO*, vol. 4, **2006**.
- [163] K. v Lebedeva, N. v Vendilo, V. L. Ponomarev, V. A. Pletnev, D. B. Mitroshin, Identification of pheromone of the greater wax moth *Galleria mellonella* from the different regions of Russia, *IOBC wprs Bulletin*, vol. 25, no. 9, pp. 229–232, **2002**.

- [164] F. Benzina, H. Oulebsir-Mohandkaci, H. Belaid, M. Irnatene, S. Mammeri, Isolation of entomopathogenic bacteria from larvae of a Lepidopteran specie; *Galleria mellonella* and study of their insecticidal effect, *Agriculture & Forestry/Poljoprivreda i Sumarstvo*, vol. 63, no. 4, **2017**.
- [165] K. A. Hussein, M. A. A. Abdel-Rahman, A. Y. Abdel-Mallek, S. S. El-Maraghy, and J. H. Joo, Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Galleria mellonella*, *Phytoparasitica*, vol. 40, no. 2, pp. 117–126, **2012**.
- [166] Oreste M, Bubici G, Poliseno M, Triggiani O, and Tarasco E, Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin against *Galleria mellonella* L. and *Tenebrio molitor* L. in laboratory assays, *Redia Journal of Zoology*, vol. 95, pp. 43–48, **2012**.
- [167] M. N. Ghimire, T. W. Phillips, Suitability of Different Lepidopteran Host Species for Development of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae), *Environmental Entomology*, vol. 39, no. 2, pp. 449–458, **2010**.
- [168] A. Plata-Rueda, J. C. Zanuncio, J. E. Serrão, L. C. Martínez, Origanum vulgare Essential Oil against *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae): Composition, Insecticidal Activity, and Behavioral Response, *Plants* vol. 10, no. 11, p. 2513, **2021**.
- [169] F. Punzo and J. A. Mutchmor, Effects of Temperature, Relative Humidity and Period of Exposure on the Survival Capacity of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) on JSTOR, *Journal of the Kansas of Entomological Society*, vol. 53, no. 2, pp. 260–270, **1980**.
- [170] S. Cosimi, E. Rossi, P. L. Cioni, and A. Canale, Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.), *Journal of Stored Products Research*, vol. 45, no. 2, pp. 125–132, **2009**.
- [171] M. Fazolin, J. L. V. Estrela, V. Catani, M.R. Alécio, M. S. D. Insecticidal properties of essential oils of *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. and *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum against *Tenebrio molitor* L., 1758. *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 31, no. 1, pp. 113–120, **2007**.
- [172] E. Siemianowska, A. Kosewska, M. Aljewicz, K. A. Skibniewska, L. Polak-Juszczak, A. Jarocki, M. Jedras, Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food,” *Agricultural Sciences*, vol. 2013, no. 06, pp. 287–291, **2013**.

- [173] S. J. Lee, S. H. Kim, Y.-S. Nai, Y. H. Je, B. L. Parker, and J. S. Kim, Management of entomopathogenic fungi in cultures of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Entomological Research*, vol.44 no.6, **2014**.
- [174] L. C. Martínez, A. Plata-Rueda, H. C. Colares, J. M. Campos, M. H. Dos Santos, F. L. Fernandes, J. C. Zanuncio, Toxic effects of two essential oils and their constituents on the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*, *Bulletin of Entomological Research*, vol. 108, no. 6, pp. 716–725, **2018**.
- [175] S. Neethirajan, C. Karunakaran, D. S. Jayas, N. D. G. White, Detection techniques for stored-product insects in grain, *Food Control*, vol. 18, no. 2, pp. 157–162, **2007**.
- [176] X. Wang, Q. Hao, Y. Chen, S. Jiang, Q. Yang, Q. Li, The Effect of Chemical Composition and Bioactivity of Several Essential Oils on *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Journal of Insect Science*, vol. 15, no. 1, p. 116, **2015**.
- [177] M. B. Isman, Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world, *Annual Review of Entomology*, vol. 51, pp. 45–66, **2006**.
- [178] A. Plata-Rueda, G. D. S. Rolim, C. F. Wilcken, J. C. Zanuncio, J. E. Serrão, and L. C. Martínez, Acute Toxicity and Sublethal Effects of Lemongrass Essential Oil and Their Components against the Granary Weevil, *Sitophilus granarius*, *Insects*, vol. 11, no. 6, p. 379, **2020**.
- [179] M. Petrović, A. Popović, D. Kojić, J. Šučur, V. Bursić, M. Acimović, G. Vuković, Assessment of Toxicity and Biochemical Response of *Tenebrio molitor* and *Tribolium confusum* Exposed to *Carum carvi* essential oil, *Entomologia Generalis*, vol. 38, no. 4, pp. 333–348, **2019**.
- [180] B. Gödel, D. Lemic, and R. Bažok, Alternatives to synthetic insecticides in the control of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* say) and their environmental benefits,” *Agriculture (Switzerland)*, vol. 10, no. 12. MDPI AG, pp. 1–27, **2020**.
- [181] A. Gökçe, M. E. Whalon, H. Çam, Y. Yanar, I. Demirtaş, and N. Goren, Contact and residual toxicities of 30 plant extracts to Colorado potato beetle larvae, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, vol. 40, no. 6, pp. 441–450, **2007**.
- [182] S. Almady, M. Khelifi, M. P. Beaudoin, Control of the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), Using Predator Insects Released by a Mechanical Prototype, *Mexico Article in Indian Journal of Environmental Health*, vol.11, no. 11A **2012**.
- [183] D. C. Weber, Colorado beetle: pest on the move, *Pesticide Outlook*, vol. 14, no. 6, pp. 256–259, **2003**.

- [184] A. Kekillioğlu, M. Yılmaz, "Patates Böceği [*Leptinotarsa decemlineata* Say.(Coleoptera: Chrysomelidae)]'nin Nevşehir İlinde Yaşamsal Etkileşim ve Çeşitliliği Üzerine Bir Ön Çalışma," *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, vol. 28, no. 1, pp. 100–107, **2018**
- [185] Andrei. Alyokhin, C. Vincent, and Philippe. Giordanengo, "Insect Pests of Potato: Global Perspectives on Biology and Management," p. 598, **2013**.
- [186] D. Vreugdenhil, J. Bradshaw, C. Gebhardt, F. Grovers, M. Taylor, D. Mackerron, H. Ross, *Potato Biology and Biotechnology*, 1st Edition. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier B.V., **2007**.
- [187] W. Guo, C. Li, T. Ahemaiti, W. Jiang, G. Li, J. Wu, K. Fu, Colorado Potato Beetle (Say), *Biological Invasions and Its Management in China*, pp. 195–217, **2017**.
- [188] A. Alyokhin, G. Benkovskaya, M. Udalov, Colorado potato beetle, *Insect Pests of Potato*, pp. 29–43, **2022**.
- [189] C. A. D. de Kort, Thirty-five years of diapause research with the Colorado potato beetle, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 56, no. 1, pp. 1–13, **1990**.
- [190] D. N. Ferro, A. v. Alyokhin, D. B. Tobin, Reproductive status and flight activity of the overwintered Colorado potato beetle, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 91, no. 3, pp. 443–448, **1999**.
- [191] I. Molnar and E. Rakosy-Tican, Difficulties in potato pest control: The case of pyrethroids on colorado potato beetle, *Agronomy*, vol. 11, no. 10, **2021**.
- [192] D. J. Hare, Impact of Defoliation by the Colorado Potato Beetle on Potato Yields, *Journal of Economic Entomology*, vol. 73, no. 3, pp. 369–373, **1980**.
- [193] A. Alyokhin, Colorado Potato Beetle Management on Potatoes: Current Challenges and Future Prospects, *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, vol. 3, no. 1, pp. 10-19, **2009**.
- [194] C. Vincent, G. Hallman, B. Panneton, F. Fleurat-Lessard, "Management of Agricultural Insects With Physical Control Methods, *Annual review of entomology*, vol. 48, pp. 261–281, **2003**.
- [195] R.M. Duchesne, C. Laguë, M. Khelifi, J. Gill, Thermal Control of Colorado Potato Beetle, *Physical Control Methods in Plant Protection*, pp. 61–73, **2001**.
- [196] P. Yang, M. Crossley, B. Charlton, S. I. Rondon, Baseline Susceptibility of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) to Commonly Used Insecticides in the Columbia Basin, *Journal of Economic Entomology*, vol. 114, no. 5, pp. 2214–2219, **2021**.

- [197] A. Alyokhin, M. Baker, D. Mota-Sanchez, G. Dively, E. Grafius, Colorado Potato Beetle Resistance to Insecticides, *American Journal of Potato Research*, vol. 85, no. 6, **2008**.
- [198] J. Clements, S. Schoville, A. Clements, D. Amezian, T. Davis, B. Sanchez-Sedillo, R. L. Groves, Agricultural fungicides inadvertently influence the fitness of Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata*, and their susceptibility to insecticides, *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, **2018**.
- [199] Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), Arthropod Pesticide Resistance Database, *Michigan State University*, Apr. 28, 2022. <https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=141> (accessed Apr. 19, 2022).
- [200] O. K. Jamie, The value of ecologically acceptable insecticide combinations for Colorado Potato Beetle control, Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Agriculture. Hirvatistan, **2019**.
- [201] K. van Frankenhuyzen, Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins, *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 101, no. 1, pp. 1–16, **2009**.
- [202] A. Bravo, S. Likitvivatanavong, S. S. Gill, M. Soberón, *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 41, no. 7, pp. 423–431, **2011**.
- [203] Alyokhin A, Udalov M, and Benkovskaya G, In the Colorado Potato Beetle,” in *Insect Pests of Potato: Global Perspectives on Biology and Management*, (A. Alyokhin, C. Vincent, P. Giordanengo, Eds.) Academic Press, United States, **2013**.
- [204] E. Özdemir, E. İnak, E. Evlice, E. Yüksel, R. A. Delialioğlu, and I. A. Susurluk, Effects of insecticides and synergistic chemicals on the efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) against *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Crop Protection*, vol. 144, p. 105605, **2021**.
- [205] İ. Kepenekci, T. Atay, M. Alkan, Biological control potential of Turkish entomopathogenic nematodes against the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, *Biocontrol Science and Technology*, vol. 26, no. 1, pp. 141–144, **2015**.
- [206] S. Trdan, M. Vidrih, L. Andjus, Ž. Laznik, Activity of four entomopathogenic nematode species against different developmental stages of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae),” *Helminthologia*, vol. 46, no. 1, pp. 14–20, **2009**.
- [207] I. M. Scott, H. Jensen, J. G. Scott, M. B. Isman, J. T. Arnason, and B. J. R. Philogène, Botanical insecticides for controlling agricultural pests: Piperamides and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*

- say (Coleoptera: Chrysomelidae), *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, vol. 54, no. 4, pp. 212–225, **2003**.
- [208] D. C. Weber, Biological Control of Potato Insect Pests, Insect pests of potato: global perspectives on biology and management, Elsevier Inc., pp. 399-437, **2013**.
- [209] K. Mújgan, A. Tolga, Laboratuvar koşullarında *Perillus bioculatus* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) un gelişme süresi ve ölüm oranı üzerinde ön çalışmalar, *Turkish Journal of Biological Control*, vol. 5, no. 1, pp. 23–29, **2016**.
- [210] W. W. He, S. J. Xu, L. T. Xu, J. Zhang, RNA interference in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*): A potential strategy for pest control, *Journal of Integrative Agriculture*, vol. 19, no. 2, pp. 428–437, **2020**.
- [211] D. P. Dowling, Z. D. Miles, C. Köhrer, S. J. Maiocco, S. J. Elliott, V. Bandarian, C. L. Drennan, Molecular basis of cobalamin-dependent RNA modification, *Nucleic Acids Research*, vol. 44, no. 20, pp. 9965–9976, **2016**.
- [212] U. Schepers, *RNA Interference in Practice: Principles, Basics, and Methods for Gene Silencing in C. elegans, Drosophila, and mammals*. John Wiley & Sons, United States, **2006**.
- [213] Ö. Güven, D. Çayir, R. Baydar, and Ğ. Karaca, “Entomopatojen fungus *Beauveria bassiana* ( Bals.) Vull . izolatlarının patates böceği [ *Leptinotarsa decemlineata* Say . ( Coleoptera : Chrysomelidae ) ] üzerindeki etkisi,” vol. 6, no. 2, pp. 105–113, **2015**.
- [214] S. Khan, S. Nadir, G. Lihua, J. Xu, K. A. Holmes, Q. Dwen, Identification and characterization of an insect toxin protein, Bb70p, from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, using *Galleria mellonella* as a model system, *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 133, pp. 87–94, **2016**.
- [215] F. Yilmaz, N. Bereli, H. Yavuz, A. Denizli, Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 43, no. 3, pp. 272–279, **2009**.
- [216] F. Kartal, A. Denizli, Molecularly imprinted cryogel beads for cholesterol removal from milk samples, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 190, p. 110860, **2020**.
- [217] S. Asliyüce, N. Bereli, L. Uzun, M. A. Onur, R. Say, A. Denizli, Ion-imprinted supermacroporous cryogel, for in vitro removal of iron out of human plasma with beta thalassemia, *Separation and Purification Technology*, vol. 73, no. 2, pp. 243–249, **2010**.
- [218] S. Asliyuce, L. Uzun, R. Say, A. Denizli, Immunoglobulin G recognition with Fab fragments imprinted monolithic cryogels: Evaluation of the effects of



- metal-ion assisted-coordination of template molecule, *Reactive and Functional Polymers*, vol. 73, no. 6, pp. 813–820, **2013**.
- [219] E. Özgör, N. Keskin, In vitro studies on inhibition capability of fungal-sourced bassiatin versus tamoxifen against ER $\alpha$ , EGFR and VEGFR on breast cancer cells, *Mycoscience*, vol. 62, no. 2, pp. 87–94, **2021**.
- [220] A. Ortiz-Urquiza, L. Riveiro-Miranda, C. Santiago-Álvarez, E. Quesada-Moraga, Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 105, no. 3, pp. 270–278, **2010**.
- [221] R. Fuguet, M. Théraud, A. Vey, Production in vitro of toxic macromolecules by strains of *Beauveria bassiana*, and purification of a chitosanase-like protein secreted by a melanizing isolate, *Toxicology & Pharmacology*, vol. 138, no. 2, pp. 149–161, **2004**.
- [222] S. Aslıyüce, B. Mattiasson, A. Denizli, Combined protein A imprinting and cryogelation for production of spherical affinity material, *Biomedical Chromatography*, vol. 33, no. 10, **2019**.
- [223] S. Çulha, C. Armutcu, L. Uzun, S. Şenel, A. Denizli, Synthesis of l-lysine imprinted cryogels for immunoglobulin G adsorption, *Materials Science and Engineering: C*, vol. 52, pp. 315–324, **2015**.
- [224] E. Birlik, A. Ersöz, E. Açıkkalp, A. Denizli, R. Say, Cr(III)-imprinted polymeric beads: Sorption and preconcentration studies, *Journal of Hazardous Materials*, vol. 140, no. 1–2, pp. 110–116, **2007**.
- [225] M. Odabaşı, R. Say, A. Denizli, Molecular imprinted particles for lysozyme purification, *Materials Science and Engineering: C*, vol. 27, no. 1, pp. 90–99, **2007**.
- [226] B. Demirci, N. Bereli, S. Aslıyüce, G. Baydemir, A. Denizli, Protein C recognition by ion-coordinated imprinted monolithic cryogels, *Journal of Separation Science*, vol. 40, no. 7, pp. 1610–1620, **2017**.
- [227] M. Bakhshpour, I. Göktürk, N. Bereli, A. Denizli, Molecularly imprinted cryogel cartridges for the selective recognition of tyrosine, *Biotechnology Progress*, vol. 36, no. 5, p. e3006, **2020**.
- [228] E. Tamahkar, N. Bereli, R. Say, A. Denizli, Molecularly imprinted supermacroporous cryogels for cytochrome c recognition, *Journal of Separation Science*, vol. 34, no. 23, pp. 3433–3440, **2011**.
- [229] H. H. Song, J. H. Ahn, Y. H. Lim, L. Chan, Analysis of Beauvericin and Unusual Enniatins Co-Produced by *Fusarium oxysporum* FB1501 (KFCC 11363P), *J Microbiol Biotechnol*, vol. 16, no. 7, pp. 1111–1119, **2006**.
- [230] S. Shi, Y. Li, Y. Ming, C. Li, Z. Li, J. Chen, M. Luo, Biological Activity and Chemical Composition of the Endophytic Fungus *Fusarium* sp. TP-G1

Obtained from the Root of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, *Nat. Prod.*, vol. 12, pp. 549–556, **2018**.

- [231] C. al Khoury, J. Guillot, N. Nemer, Lethal activity of beauvericin, a *Beauveria bassiana* mycotoxin, against the two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch, *Journal of Applied Entomology*, vol. 143, no. 9, pp. 974–983, **2020**.
- [232] S. Ganassi, A. Moretti, A. Maria Bonvicini Pagliai, A. Logrieco, and M. Agnese Sabatini, Effects of beauvericin on *Schizaphis graminum* (Aphididae),” *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 80, no. 2, pp. 90–96, **2010**.
- [233] C. al Khoury, N. Nemer, G. Nemer, M. Kurban, C. Bernigaud, K. Fischer, J. Guillot, In vitro Activity of Beauvericin Against All Developmental Stages of *Sarcoptes scabiei*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 64, no. 5, pp. 1–7, **2020**.
- [234] S. Gupta, S. B. Krasnoff, N. L. Underwood, J. A. A. Renwick, and D. W. Roberts, Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Mycopathologia*, vol. 115, no. 3, pp. 185–189, **1991**.

## **EKLER**

### **EK 1 - Tezden Türetilmiş Yayınlar**

M. Ulusoy, S. Aslıyüce, N. Keskin, and A. Denizli, Beauvericin purification from fungal strain using molecularly imprinted cryogels, *Process Biochemistry*, vol. 113, pp. 185–193, 2022.

## **EK 2 - Tezden Türetilmiş Bildiriler**

**Ulusoy M**, Aslıyüce S, Denizli A, Keskin N. Fungal kaynaktan Beauverisinin moleküler baskılanmış kriyojel ile saflaştırılması, Uluslararası Katılımlı Kromatografi XX Hacettepe Üniversitesi, Ankara 24-26 Şubat 2022.

**Ulusoy M**, Aslıyüce S, Denizli A, Keskin N. Purification of secondary metabolite beauvericin and tested on Colorado Potato Beetle, 7th International Entomopathogens and Microbial Control Congress (EMC2019) Erciyes University, Kayseri, 11 -13 September 2019.

