
Araştırma Makalesi / Research Article

Fındık Kabuklarından Elde Edilmiş Odun Sirkesi' nin *In-Vitro* Şartlarında Antifungal Etkisinin Belirlenmesi

İbrahim KOÇ^{1*}, Erdal Necip YARDIM², Ali ÇELİK³, Mehmet MENDEŞ⁴,
Hamit MİRTAĞIOĞLU⁵, Ayten NAMLI⁶

¹Bitlis Eren Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 13000, Bitlis

²Bitlis Eren Üniversitesi Rektörlüğü, 13000, Bitlis

³Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 14000, Bolu

⁴Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü, 17000, Çanakkale

⁵Bitlis Eren Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, İstatistik Bölümü, 13000, Bitlis

⁶Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, 06030, Ankara

Öz

Bu çalışma fındık kabuklarından elde edilen odun sirkesi'nin, *in-vitro* şartlarında *Aspergillus niger* ve *Penicillium digitatum*'a karşı antifungal etkisini saptamak amacıyla yapılmıştır. Odun sirkesi'nin %1, %3, %5, %7 ve %10 mL'lik konsantrasyonlarının dâhil edildiği Patates Dekstroza Agar (PDA)'a, mikrofungusların 5 mm çapındaki miselyum diskleri inoküle edildikten sonra 24±1 °C'de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda mikrofungusların koloni çapları ölçülmüş ve kontrollere göre odun sirkesinin % engelleme oranları hesaplanmıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda dikkate alınan uygulamalar arasında istatistiksel olarak önemli farkların bulunduğu görülmüştür (P=0.000). Varyans analizi sonucunda uygulanan Dunnett testi sonucunda ise kontrol grubu ile %1 mL odun sirkesi hariç, odun sirkesinin diğer dozları arasında istatistiksel olarak önemli farkların bulunduğu görülmüştür. Sonuç olarak; odun sirkesinin küf mantarlarını engellemede kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Antifungal, Mikrofungus, Odun sirkesi, *In-vitro*.

Determination of Antifungal Effect of Wood Vinegar Obtained from Hazelnut Shells in *In-Vitro* Conditions

Abstract

This study was carried out at *in-vitro* conditions to determine the antifungal effect of the wood vinegar obtained from hazelnut shells, on *Aspergillus niger* and *Penicillium digitatum* microfungi. Potato dextrose agar (PDA) containing concentrations of 1%, 3%, 5%, 7% and 10% of the wood vinegar was allowed to incubation for 7 days at 24 ± 1 °C after inoculation of 5 mm diameter mycelium discs of microfungi. At the end of incubation, the colony diameters of the microfungi were measured and the % inhibition rates of the wood vinegar, were calculated according to the controls. Results of One-way ANOVA showed that there were statistically significant differences among the doses (P=0.000). Based on the Dunnett's test results, it was determined that the differences between the control group and the other doses of wood vinegar were statistically significant except for the 1% mL wood vinegar dose. As a result; it is possible to concluded that wood vinegar may be used for the prevention of mold fungi.

Keywords: Antifungal, Microfungi, Wood vinegar, *In-vitro*.

1. Giriş

Buğday, tarım ürünleri içerisinde özel bir öneme sahip olup, yüzyıllardır her toplumda beslenmenin temeli olmuştur [1]. Hasat öncesi ile sonrasında, tarımsal ürünlerde toprak ve yaprak patojenleri, viral

* Sorumlu yazar: ibrahimkoc47@gmail.com

Geliş Tarihi: 22.05.2018, Kabul Tarihi: 05.11.2018

mikroorganizmalar, böcekler ve küflerin etkisinden ötürü ürün kaybı ve bozulmalar oluşmaktadır [2]. Tarla küfleri ürüne bulaşarak üründe çürüme ve toksin oluşumuna sebep olmaktadır [3].

Tarımsal faaliyetlerde, bitkileri toprak kökenli patojenlerden korumak için kullanılan fungusitlerin, toprak ekolojisi üzerindeki yan etkileri hakkında bilgi eksikliği vardır [4]. Sentetik pestisitlerin yoğun kullanımından dolayı ortaya çıkan problemler, alternatif yöntemlerin ve doğal pestisitlerin aranmasını zorunlu hale getirmiştir [5]. Yin [6] çalışmasında Tsuzuki ve ark. (1989)'a atfen odun sirkesi (OS)'nin, uzun zamandan beri doğal organik pestisit olarak kullanıldığını ifade etmiştir. OS, karbonizasyon işlemlerinin bir yan ürünü olarak üretilmekte olup Neanderthal zamanında kullanıldığı bulunmuştur [7]. Kim vd. [8] çalışmalarında Jang'a hitaben, OS'un %80- 90'ı su, %10-20'sinin 200'den fazla organik birleşik ile ana kısmının asetik asit'in oluşturduğunu, son zamanlardaki yıllık üretiminin 14.000 ton civarında olduğunu ifade etmiştir. OS, organik fungusit olarak kullanılmaktadır [9]. OS, su ve topraktaki hedef olmayan organizmalara karşı toksik ya da hafif toksiktir [10]. OS, organik tarım için iyi bir kaynak olup Japonyada tarım ve günlük hayatta geniş bir şekilde kullanılmaktadır [11]. Baimark vd. [12] OS'un güçlü fenolik bileşikler içermesinden dolayı, PDA besiyerindeki fungusun büyümesini engellediğini (*Penicillium griseofulvum*) bulmuşlardır. Namlı vd. [13] *in-vitro* şartlarda yaptıkları çalışmada, *Cercospora beticola* gelişiminin %0.5 mL OS uygulaması haricinde tamamen engellendiğini tespit etmişlerdir. Omulo vd. [14] OS'un karakterizasyonu göz önüne alındığında fungusit potansiyeli gösterdiğini bildirmişlerdir. Koç vd.[15] OS'un, *A. niger* ve *P. digitatum*'un misel gelişimlerini engellediği ve hastalık etmenlerine karşı denenmesinin faydalı olabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmadaki amaç, buğday agro-ekosisteminden izole edilen *Aspergillus niger* ve *Penicillium digitatum* küf etmenlerine karşı fındık kabuklarından elde edilen odun sirkesinin *in-vitro* şartlarında antifungal etkisini tespit etmektir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Denemede *Aspergillus niger* ve *Penicillium digitatum* küf etmenleri kullanılmış olup Muş ili BERCE Alparslan Tarım İşletmesinin buğday agro-ekosistemindeki topraktan izole edilmiştir. Odun sirkesi (OS); TÜBİTAK TEYDEB desteği kapsamında fındık kabuklarından gazlaştırma makinesi ile biyokömür ve OS ürünlerini geliştiren bir firmadan elde edilmiştir [13]. Mikroorganizmaların çoğaltılmasında ve antifungal etkinin belirlenmesinde, Patates Dekstrozu Agar (MERCK) besi ortamı kullanılmıştır.

2.2. Metot

2.1.1. Antifungal aktivite tespiti

OS'un saf su ile seyreltilmiş %1, %3, %5, %7 ve %10 mL'lik konsantrasyonları, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilen ve 45-50 °C'ye kadar soğutulan PDA besi ortamlarına dahil edilmiştir. 39 gr/L oranında hazırlanan PDA besi ortamında 25 °C'de 7-10 gün geliştirilen stok patojen kültürlerinin büyümenin devam ettiği uç kısımlarından 5 mm çaplı mantar delici ile diskler alınarak, oda şartlarında OS ilaveli 90 mm büyüklüğündeki petrielerde yer alan PDA besi ortamına ekimi yapılmıştır.

Mikrofungus kültürleri inokulasyondan sonra 24±1 °C'de 7 gün karanlık koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak ise funguslar sadece PDA içeren petri kaplarına ekimi yapılmıştır. İnokulasyondan sonra petrielerin etrafı parafilm ile kapatılmış ve 7 gün sonra mikrofungusların miselyum çapı ölçülerek kaydedilmiştir [16]. Çalışma, Tesadüf Parselleri Deneme Deseninde 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Miselyum gelişmesi engelleme yüzdesi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır [17].

$$GI (\%) = \frac{dc-dt}{dc} \times 100$$

GI= Miselyum gelişimi engelleme oranı (%); dc= Kontroldeki miselyum gelişimi (mm); dt=Uygulamadaki miselyum gelişimi (mm).

2.2.2. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen veri setinin istatistik analizinde Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) tekniğinden, farklı doz odun sirkesi uygulamalarının kontrol grubu ile olan farklarının istatistiksel olarak önemli olma durumlarının belirlenmesi amacı için Dunnet Farklı Grupları Belirleme Testinden yararlanılmıştır. İstatistik analizlerin yapılmasında Minitab (Ver. 17) istatistik paket programı kullanılmıştır [18].

3. Bulgular ve Tartışma

Aspergillus niger'e yapılan antimikrobiyal madde testinde, misel gelişiminin ortalama olarak en az % 10 mL OS'de (9.33 mm) ve en çok kontrolde (27.92 mm), *P. digitatum* 'a ise misel gelişiminin ortalama olarak en az % 10 mL OS'de (7.17 mm) ve en çok kontrolde (34.17 mm) olduğu görülmüştür (Tablo 1). Gerek *A. niger* ve gerekse *P. digitatum* 'un büyüme parametreleri bakımından yapılan Varyans analizleri sonucunda dikkate alınan söz konusu parametreler bakımından dikkate alınan dozlar arasında istatistiksel olarak önemli farkların bulunduğu (P=0.000) görülmüştür. Hangi dozların kontrol grubu ile olan farklarının istatistiksel olarak önemli olduklarının belirlenmesi amacıyla yapılan Dunnett testi sonucunda her iki türde de %1 mL OS dozu hariç, kontrol grubu ile dozlar arasında istatistiksel olarak önemli farkların bulunduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Koloni çapı bakımından tanıtıcı istatistikler ve Dunnet Farklı Grupları Belirleme Testi sonuçları

Tür adı	Uygulama	$\bar{X} \mp S_{\bar{X}}$	Koloni çapı (mm) Minimum	Koloni çapı (mm) Maksimum
<i>A. niger</i>	OS %1 mL	25.83±0.51 AB	25.00	26.75
	OS %3 mL	24.75±0.29 B	24.25	25.25
	OS %5 mL	18.92±0.44 C	18.25	19.75
	OS %7 mL	12.92±0.96 D	11.00	14.00
	OS %10 mL	9.33±0.58 E	8.25	10.25
	Kontrol	27.92±0.42 A	27.50	28.75
<i>P. digitatum</i>	OS %1 mL	33.75±0.14 A	33.50	34.00
	OS %3 mL	31.58±0.22 B	31.25	32.00
	OS %5 mL	20.08±0.44 C	19.25	20.75
	OS %7 mL	15.42±0.17 D	15.25	15.75
	OS %10 mL	7.17±0.30 E	6.75	7.75
	Kontrol	34.17±0.22 A	33.75	34.50

*Aynı türde farklı harflerle gösterilen dozlar arasındaki farklar önemlidir (P≤0.05).

Bu çalışmada kullanılan OS'un, antifungal etkisinin olduğu ve artan dozlarda bu etkinin paralel olarak arttığı bulunmuştur. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla örtüşen çalışmalardan; Chalermisan ve Peerapan [19] elde ettikleri OS'un organik tarımda fungusit ve bakterisit olarak kullanabileceğini dile getirmişlerdir. Ayrıca Baimark vd. [12], Baimark ve Niamsa [20] *Penicillium griseofulvum*'a karşı gerek kullandıkları ham OS'un ve gerekse fındık kabuklarından elde ettikleri OS'un en etkili antifungal maddeler olduğunu bulmuşlardır. Bir başka çalışmada; Oramahi vd. [21] *Aspergillus niger*'in büyümesinin artan dozlardaki sirkeye karşı azaldığını ve bu durumun fenol ve asetik asit bileşiklerden kaynaklanabileceğini ifade etmektedirler. Velmurugan [22] *Ophiostoma polonicum*, *O. ips*, *O. flexuosum*, *O. narcissi* ve *O. tetropii* mantarlarına karşı kullandıkları nötrale edilmiş OS'un %2.5 mL'den fazlasının güçlü antifungal etki gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca yapılan başka çalışmalarda da OS'un antifungal etki gösterdikleri yönünde bulgular vardır [13, 15, 23, 24, 25]. Bu çalışmaların yanı sıra, Rabbi vd. [26] deneylerinde kullandıkları OS'un iki çeşidinin *A. niger*, *A. flavus* ve *Fusarium* spp.'e karşı etkili olduğu belirtmişler ve elde edilen bulgularla örtüştüğü ancak *Trichoderma* spp.'nin her iki OS'a karşı direnç gösterdiğini ifade etmişlerdir [26]. Bu çalışmada elde edilen sonucun, Baimark ve Niamsa [20] ile Oramahi vd. [21]'nin bildirdiği üzere OS'un içerdiği fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ancak ulaşılan sonuçtan farklı olarak Lee vd. [27]

Tyromyces palustris ve *Coriolus versicolor*'a karşı yaptıkları çalışmada; OS'un fungusların büyümesini inhibe etmediğini ifade etmişlerdir.

4. Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak; fındık kabuklarından elde edilen odun sirkesinin, *A. niger* ve *P. digitatum*'un misel gelişimlerini engellediği tespit edilmiş olup, bu sirkenin küf etmenlerine karşı denenmesinin faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- [1] Arısoy H., Oğuz C. 2005. Tarımsal Araştırma Enstitüleri Tarafından Yeni Geliştirilen Buğday Çeşitlerinin Tarım İşletmelerinde Kullanım Düzeyi ve Geleneksel Çeşitler ile Karşılaştırmalı Ekonomik Analizi - Konya İli Örneği. <http://www.tepge.gov.tr/dosyalar/yayinlar/83c3938d2e15467289823d9eb23a05b1.pdf>. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü Yayınları, No: 130, Ankara. (Erişim Tarihi: 18.11.2015).
- [2] İmamoğlu Ö. 2011. Biyokontrolde Doğal Ürünlerin Kullanılması; Kitosan, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 68 (4): 215-22.
- [3] Aydoğdu H. 2016. Edirne İlinde Hasat Sonrası Depolanmış Buğdaylar Üzerinde Taşınan Mikrofungusların İzolasyon ve İdentifikasyonu, Akademik Gıda, 14 (4): 362-367.
- [4] Chen S., Edwards C.A., Subler S. 2001. Effects of the Fungicides Benomyl, Captan and Chlorothalonil on Soil Microbial Activity and Nitrogen Dynamics in Laboratory Incubations, Soil Biology and Biochemistry, 33 (14): 1971-1980.
- [5] Erdoğan P., Toros S. 2005. *Melia azaderach* L. (Meliaceae) Ekstraktlarının Patates Böceği [*Leptinotarsa decemlineata* Say (Col.:Chrysomelidae)] Larvalarının Gelişimi Üzerine Etkisi, Bitki Koruma Bülteni, 45 (1-4): 99-118.
- [6] Yin A.L. 2008. Isolation and Characterization of Antioxidant Compounds from Pyrolytic Acid of *Rhizophora Apiculata* (Thesis Doctor of Philosophy). Sains University, Malaysia.
- [7] Tiilikkala K., Fagernäs L., Tiilikkala J. 2010. History and Use of Wood Pyrolysis Liquids as Biocide and Plant Protection Product, The Open Agriculture Journal, 4 (1): 111-118.
- [8] Kim D.H., Seo H.E., Lee S., Lee K. 2008. Effects of Wood Vinegar Mixed with Insecticides on the Mortalities of *Nilaparvata lugens* and *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae), Animal Cells and Systems, 12 (1): 47-52.
- [9] Jothityangkoon D., Koolachart R., Wanapat S., Wongkaew S., Jogloy S. 2008. Using Wood Vinegar in Enhancing Peanut Yield and in Controlling the Contamination of Aflatoxin Producing Fungus, International Crop Science, 4: 253-253.
- [10] Hagner M. 2013. Potential of the Slow Pyrolysis Products Birch Tar Oil, Wood Vinegar and Biochar in Sustainable Plant Protection-Pesticidal Effects. Soil Improvement and Environmental Risks (Thesis), Department of Environmental Sciences Faculty of Biological and Environmental Sciences University of Helsinki, Finland.
- [11] Mu J., Uehara T., Furuno T. 2003. Effect of Bamboo Vinegar on Regulation of Germination and Radicle Growth of Seed Plants, Journal of Wood Science, 49 (3): 262-270.
- [12] Baimark Y., Threeprom J., Dumrongchai N., Srisuwan Y., Kotsaeng N. 2008. Utilization of Wood Vinegars as Sustainable Coagulating and Antifungal Agents in the Production of Naturel Rubber Sheets, Journal of Environmental Science and Technology, 1 (4): 157-163.
- [13] Namlı A., Akça M.O., Turgay E.B., Soba M.R. 2014. Odun Sirkesinin Tarımsal Kullanım Potansiyelinin Araştırılması, Toprak Su Dergisi, 3 (1): 44-52.
- [14] Omulo G., Willett S., Seay J., Banadda N., Kabenge I., Zziwa A., Kiggundu N. 2017. Characterization of Slow Pyrolysis Wood Vinegar and Tar from Banana Wastes Biomass as Potential Organic Pesticides, Journal of Sustainable Development, 10 (3): 81-92.
- [15] Koç İ., Yardım E.N., Yıldız Ş. 2017. In Vitro Şartlarında Küf Etmenlerine Karşı Tavuk Gübresinden Elde Edilmiş Odun Sirkesinin Antifungal Etkisi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 27 (4): 516-520.
- [16] Benjilali B., Tantadui-Elaraki A., Ayadi A., Ihlal M. 1984. Method to Study Antimicrobial Effects

- of Essential Oils: Application to the Antifungal Activity of Six Moroccan Essences, *Journal of Food Protection*, 47: 748-752.
- [17] Daouk K.D., Dagher M.S., Sattout J.E. 1995. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Origanum syriacum* L, *Journal of Food Protection*, 58: 1147-1149.
- [18] Winer B.J., Brown D.R., Michels K.M. 1971. *Statistical Principles in Experimental Design*, Vol. 2, McGraw-Hill, New York.
- [19] Chalermnan Y., Peerapan S. 2009. Wood Vinegar: By-Product from Rural Charcoal Kiln and its Role in Plant Protection, *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 189-195.
- [20] Baimark Y., Niamsa Y. 2009. Study on Wood Vinegars for Use as Coagulating and Antifungal Agents on the Production of Natural Rubber Sheets, *Biomass and Bioenergy*, 33: 994-998.
- [21] Oramahi H.A., Diba F., Wahdina. 2009. Components and Antifungal Efficiency of Wood Vinegar from Wood Wastes and Oil Palm Empty Fruit Bunch, *The First International Symposium of Indonesian Wood Research Society*, 2nd-3rd November, West Kalimantan, Indonesia, 91.
- [22] Velmurugan N., Han S.S., Lee Y.S. 2009. Antifungal Activity of Neutralized Wood Vinegar with Water Extracts of *Pinus densiflora* and *Quercus serrata* Saw Dusts, *International Journal of Environmental Research*, 3 (2): 167-176.
- [23] Ibrahim D., Kassim J., Sheh-Hong L., Rusli W. 2013. Efficacy of Pyroligneous Acid from *Rhizophora apiculata* on Pathogenic *Candida albicans*, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (7): 7-13.
- [24] Oramahi H.A., Yoshimura T. 2013. Antifungal and Antitermitic Activities of Wood Vinegar from *Vitex pubescens* vahl, *Journal of Wood Science*, 59 (4): 344-350.
- [25] Saberi M., Askary H., Sarpeleh A., Hosseini A. 2013. Wood Vinegar as a Biological Product for Managing *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, *Canadian Journal of Plant Protection (CJPP)*, 1 (4).
- [26] Rabbi M.A., Akhter A., Khan M., Kadri H.J., Maitra B., Khatun M.H. 2017. Chemical Composition and Antifungal Activity of Sugarcane Bagasse and Banana Stem Based Wood Vinegar, *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 7 (4): 898-904.
- [27] Lee D.H., Lee T.S., Kang C.H., Kim J.K., Kang H.Y. 1992. Aptitude Of Wood Vinegar As An Alternative Wood Preservative. <http://agris.fao.org/agris-search/searchIndex.do?query=Aptitude+of+Wood+Vinegar+as+an+Alternative+Wood+Preservative>. Res. Rep. For. Res. Inst. No.45, Forestry Research Institute, Seoul, Korea. (Erişim Tarihi: 22.02.2016).