

CEVİZ YAPRAK ÖZÜTLERİ VE JUGLONUN
BAZI MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNE ETKİLERİ

ABBAS ALBAYRAK

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran-2006

CEVİZ YAPRAK ÖZÜTLERİ VE JUGLONUN
BAZI MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNE ETKİLERİ

ABBAS ALBAYRAK

Dumlupınar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Ana Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN
Ortak Danışman: Doç. Dr. Semra İLHAN

Haziran-2006

KABUL VE ONAY SAYFASI

Abbas ALBAYRAK'ın YÜKSEK LİSANS/DOKTORA tezi olarak hazırladığı “CEVİZ YAPRAK ÖZÜTLERİ VE JUGLON’UN BAZI MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNE ETKİLERİ” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

07/06/ 2006

Üye	:	Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN
Üye	:	Doç.Dr. Semra İLHAN
Üye	:	Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU
Üye	:	Yrd. Doç. Dr. Hülya ÖLÇER
Üye	:	Yrd. Doç. Dr. İrfan TERZİ

Fen Bilimleri Enstitüsün Yönetim Kurulu'nun/...../..... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

CEVİZ (*Juglans regia* L.)YAPRAK ÖZÜTLERİ VE JUGLONUN BAZI MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNE ETKİLERİ

Abbas ALBAYRAK

Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2006

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Tez Ortak Danışmanı: Doç Dr. Semra İLHAN

ÖZET

Bu çalışmada, ceviz (*Juglans regia* L.) varyetelerinin (Yalova-2, Yalova-3, Yalova-4, Şebin, 1974-7) yapraklarından hazırlanan özütlerin ve juglon (5-Hidroksi-Naftakinon) allelokimyasalının bazı bakteri ve funguslar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ceviz özütleri ve juglon, kullanılan 11 bakteri türünden 5 bakteri türünde (*Pseudomonas gingeri*, *Pseudomonas phaseolica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*) inhibisyon etkisi göstermiştir. Kullandığımız 9 fungus türü (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *Fusarium solani*, *F. graminearum*, *Geotrichum candidum*, *Botrytis cinerea* ve *Candida albicans*) üzerinde de inhibisyon etkisi görülmüştür. Juglon allelokimyasalının ve *Juglans regia* L. türüne ait Şebin varyetesinden hazırlanan özütün MİK değerleri belirlenmiştir. En düşük MİK değeri *S. aureus* için 3,125 µg/ml olarak bulunmuştur. Yapılan ince tabaka kromatografi (İTK) sonucunda da, çalışmada kullanılan tüm ceviz varyetelerinin yapraklarında juglon varlığına rastlanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyal etki, Antifungal etki, Ceviz, İTK Juglon, MİK,

**ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL EFFECTS OF WALNUT
(*Juglans regia* L.) LEAF EXTRACTS AND JUGLONE**

Abbas ALBAYRAK

Department of Biology. M.S. Thesis, 2006

Supervisor: Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Vice Supervisor: Doç Dr. Semra İLHAN

SUMMARY

In this study, antibacterial and antifungal effects of juglone and walnut (*Juglans regia* L.) cultivars (Yalova-2, Yalova-3, Yalova-4, Sebin, 1974-7) leaf extracts were investigated. Juglone and walnut leaf extracts were found to inhibit five bacteria (*Pseudomonas gingeri*, *Pseudomonas phaseolica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*) among ten bacterial species tested in the study. Nine fungi species (*Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium solani*, *F. graminearum*, *Geotrichum candidum*, *Botrytis cinerea* ve *Candida albicans*) were tested in the study and all of them were inhibited by the treatments. MIC values of juglone and leaf extracts of *J. regia* L. cv. *sebin* were also determined. The lowest MIC value was found as 3,125 µg/ml for *S. aureus* bacterium. As a result of thin layer chromatography (TLC), it has been shown that juglone is exist in all leaves of the walnut varieties used in the study.

Key Words: Antibacterial effect, Antifungal effect, Juglone, MIC, TLC, Walnut.

TEŞEKKÜR

Çalışma süresince her türlü bilgi ve yardımlarından faydalandığım, her zaman ilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın hocalarım Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN ve Doç. Dr. Semra İLHAN'a; Ceviz yapraklarını temin eden ve özütlerin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. İrfan TERZİ'ye; çalışmalarımın yürütülmesinde yardımcı olan Araştırma Görevlileri Dr. Cansu Filik İŞCEN ve Ferdağ ÇOLAK'a, lisans öğrencisi Şeyma ALTUNEL'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Beni yetiştiren ve bu çalışmama maddi-manevi destek sağlayan sabırlı, anlayışlı aileme de saygı ve sonsuz minnetlerimi sunarım.

Abbas Albayrak

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iv
SUMMARY	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Allelopati	1
1.2. Allelokimyasalların Tasnifi ve Fenolik Allelokimyasallar	1
1.3. Ceviz Ağacı ve Juglon.....	2
1.4. Ceviz Bitkisinin Orijini ve Yayılışı.....	3
1.5. Cevizin Sistematiği	4
1.5.1. Başlıca Ceviz Türleri	5
1.5.2. Ulusal Ceviz Çeşitlerimiz	6
1.6. Juglon'un Allelopatik Etkileri	8
1.7. Juglon'un Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri	9
1.8. Araştırmanın Amacı ve Önemi.....	12
2. MATERYAL VE METOT.....	13
2.1. Materyal Temini	13
2.2. Besiyerleri.....	14
2.3. Çözeltiler	15
2.4. Ceviz Yapraklarından Özütleme Hazırlama.....	16
2.5. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	16
2.6. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	17
2.6.1. Bakteriler İçin Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	17
2.6.2. Funguslar İçin Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	18

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

	<u>Sayfa</u>
2.7. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerlerinin Tespit Edilmesi.....	19
3. BULGULAR.....	21
3.1. Ceviz Özütlерinin ve Juglon'un İTK Sonuçları	21
3.2. Ceviz Özütleri ve Juglon'un Bakteriler Üzerine Etkisi	22
3.3. Ceviz Özütleri ve Juglon'un Funguslar Üzerine Etkisi	26
3.4. Ceviz Özütleri ve Juglon'un MİK Değerleri	31
4. TARTIŞMA	32
KAYNAKLAR	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Juglon'un kimyasal yapısı.....	3
3.1. Ceviz özütlerinin ve saf juglonun kromatografi plağındaki genel görüntüsü	19
3.2. Ceviz özütleri ve Juglon'un <i>S. aureus</i> bakterisi üzerine etkisi	22
3.3 Ceviz özütleri ve Juglon'un <i>S. aureus</i> bakterisi üzerine inhibisyon etkisinin genel görünüşü.....	22
3.4. Ceviz özütleri ve Juglon'un <i>P. gingeri</i> bakterisi üzerine etkisi	23
3.5. Ceviz özütleri ve Juglon'un <i>P. gingeri</i> bakterisi üzerine etkisi	23
3.6. Ceviz özütleri ve Juglon'un <i>G.candidum</i> fungusu üzerine etkileri.....	26
3.7. Ceviz özütleri ve Juglon'un <i>G.candidum</i> fungusu üzerine etkisinin genel görünüşü.	26
3.8. Ceviz özütlerinin ve Juglon'un <i>C. albicans</i> fungusu üzerine etkisi.....	27
3.9. Ceviz özütlerinin ve Juglon'un <i>C. albicans</i> fungusu üzerine etkisi.....	27
3.10. Ceviz özütlerinin ve Juglon'un <i>Aspergillus flavus</i> fungusu üzerine etkisi	28
3.11. Ceviz özütlerinin ve Juglon'un <i>Botrytis cinerea</i> fungusu üzerine etkisi.....	28
3.12. Juglon ve Şebın özütünün mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etkisigösterdiği minimum konsantrasyon değerleri (MİK).....	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Cevizin bitkisinin sistematığı.....	6
2.1 Test organizması olarak kullanılan bakteri ve fungus türleri	15
3.1 Ceviz özütleri ve Juglon'un bakteriler üzerine etkisi	23
3.2. Ceviz özütleri ve Juglon'un funguslar üzerine etkisi	27
3.3 Juglon allelokimyasalının ve Şebin özütünün mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği minimum konsantrasyon değerleri	31

1. GİRİŞ

1. 1. Allelopati

Allelopati "Bir bitki tarafından sentezlenen ve salıverilen bazı kimyasal maddelerin bitki türüne bağlı olarak komşu bitkileri olumlu veya olumsuz açıdan etkilemesi" olarak tanımlanmış olup kısaca "bitkiler arasındaki kimyasal etkileşim" olarak da tarif edilebilir. Bu tanıma günümüzde mikroorganizmalar ve böcekler de dahil edilmektedir. Fakat bu konu henüz tartışmalıdır. Allelopatik yönden etkili olan kimyasal maddeye allelokimyasal denir. Allelokimyasallar toksik (inhibitör) iseler veya etki ettikleri bitki türlerini çevre şartlarına duyarlı hale getiriyorlarsa stres ajanıdır. Bir allelokimyasal bitki türüne göre, olumlu veya olumsuz etki gösterebilirler. Bitkilerde görülen bu durum allelokimyasal maddenin çeşidi, konsantrasyonu, etkileme zamanına bağlıdır. Fakat genel olarak allelokimyasal maddelerin etkileri olumsuz olmaktadır. Allelopatik etkinin olumsuz belirtileri; büyüme, fotosentez ve solunum hızında azalma, köklerde iyon alımını engelleme, deformasyon, klorozis, absisyon, kuruma, ölüm olarak sıralanabilir. Allelokimyasal madde bitkinin kök ve yapraklarından salgılanabilir. Şayet köklerden salınmışsa direk olarak toprağa geçer ve daha sonra topraktan başka bitkinin köklerine ulaşır ve kökler tarafından alınır. Allelokimyasallar, taşınma esnasında ortamdaki mikroorganizmalar (bakteri, mantar) tarafından değişikliğe uğratılabilir. Bazı allelokimyasal maddeler ise yapraklardan uçucu madde veya gaz şeklinde havaya verilir ve hava yoluyla başka bitkinin yapraklarından içeri alınabilir [1,2,3].

Allelokimyasal maddelerin sentezlendiği bitkideki fizyolojik rollerinin ne olduğu henüz tam olarak açıklanamamaktadır. Fakat bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerin fazla olması, allelokimyasal maddelerin bitkinin bir savunma silahı olabileceği gibi, az da olsa bazı bitkiler üzerinde olumlu etkilerinin de olması bakımından bunların bitkiler arasındaki komşuluk ilişkilerinin belirlenmesinde rol oynayan maddeler olabileceği düşünülmektedir.

Allelopati ile ilgili gözlemler milattan önceki yıllara kadar dayanmaktadır. Ancak bu sahadaki gerçek ilmi gelişmeler ve allelopatinin bir ihtisas dalı olarak ortaya çıkması 1970'li yıllardan sonra olmuştur.

1.2. Allelokimyasalların Tasnifi ve Fenolik Allelokimyasallar

Allelokimyasalların isimleri Rice [4] tarafından yayınlanmıştır. Bu kimyasalların çoğu sekonder metabolitlerdendir ve primer metabolik yolların yan ürünleridirler. Rice [4] yaptığı yayında, yüksek bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından oluşturulan allelokimyasalları aşağıdaki sınıflara ayırmıştır;

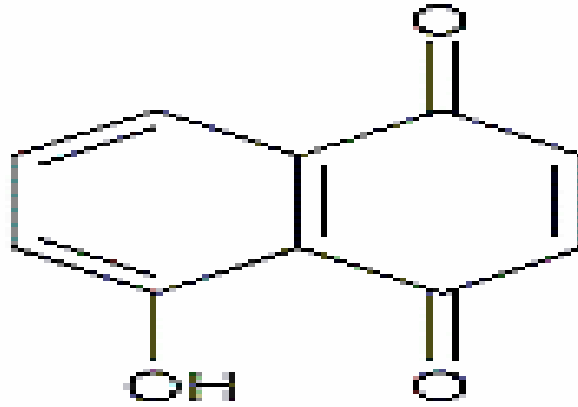
1. Basit suda çözünebilir organik asitler (Düz zincirli alkoller, alifatik aldehitler)
2. Basit doymamış laktonlar
3. Uzun zincirli yağ asitleri ve poliasetilenler.
4. Naftokinonlar, antrokinonlar ve kompleks kinonlar
5. Basit fenoller, benzoik asit ve türevleri
6. Sinnamik asit ve türevleri
7. Flavonoidler
8. Taninler
9. Terpenoidler ve Steroidler
10. Amino asitler ve Polipeptidler
11. Alkoloidler, Siyanohidrinler
12. Sülfidler ve Glikozitler
13. Pürinler ve Nükleotidler

Çalışmamızda kullandığımız juglon, yukarıdakilerden 4. sınıfta bulunan naftokinonlar, antrokinonlar ve kompleks kinonlar grubuna dahildir

1.3. Ceviz Ağacı ve Juglon

Ceviz bitkisi serbest olarak büyümeye bırakıldığı zaman 20-25 m. boylanmakta, 350-400 m² alanı tek başına kaplayabilmektedir. Dalları çevreye ve yukarı doğru aynı hızla gelişme gösterdiği için ağaç genellikle düzgün bir küre görünümü almaktadır.

Bitkiler aleminde mensubu bulunduğu sınıfın karakterlerine uygun olarak kuvvetli bir kazık köke sahiptirler. Bu kuvvetli kök gelişimi daha tohum çimlenirken başlar. İlk yıl toprak üstünde gelişen gövdenin en az 2-3 katı kadar kalınlığa erişir. Kazık kök, kalınlığına rağmen gövdeden daha az sert ve yumuşak dokuludur. Birinci yıl çok az yan kök teşekkül eder. İkinci ve müteakip yıllarda yan kökler de kazık köke uygun olarak hızlı gelişme gösterir, saçak kökler yan köklerin ucunda teşekkül eder .



Şekil 1.1. Juglon kimyasal yapısı.

Amerika’da doğal olarak yayılım gösteren kara ceviz ağaçlarının (*Juglans nigra* L.) dibinde ekilen yonca otlarının yağmurlardan sonra kısa zamanda öldükleri, ceviz yapraklarından damlayan yağmur sularının saksılardaki domateslere verilmesiyle domateslerin öldükleri, ceviz ağaçlarına yakın olan elma ağaçlarının cevizden tarafta olan dal ve köklerinin kurudukları, buna mukabil ceviz dibinde üçgül ve çayır otlarının çok iyi gelişebildikleri tespit edilmiştir [2]. Daha sonra bu etkiye sahip olan madde, cevizin kök ve yaprak özütlerinden izole edilerek bunun 5-Hidroksi-Naftakinon olduğu teşhis edilmiş ve cevizin Latince ismine izafeten "juglon" adı verilmiştir . Şekil 1.1 de juglonun kimyasal yapısı görülmektedir. Daha sonraki çalışmalarda juglon'un sadece kara ceviz ağaçlarından değil diğer ceviz türlerinden de salıverildiği belirlenmiştir [5].

Bunlardan biri de ülkemizde yaygın ceviz türü olan *Juglans regia* L. dır. Bu ceviz türünde juglon miktarının mevsimlik değişimi incelendiğinde kışın en düşük düzeyde iken ilkbahar başlangıcından Nisan sonuna kadar düzenli bir artış, daha sonra Haziran sonuna kadar bir azalma ve Temmuz başından Ağustos ortasına kadar tekrar bir artış gösterdiği belirlenmiştir [6].

Juglon' un köklerde sentezlenip ksilem vasıtasıyla bitkinin yapraklarına taşındığı ve Juglon' un bitkide hidrojuglon şeklinde bulunduğu ancak daha sonra bunun oksitlenmesiyle toksik karakterli juglon'a (5-Hidroksi-1,4-Naftakinon) dönüştüğü belirtilmiştir [7]. Cevizde juglon köklerden toprağa geçebileceği gibi yapraklardan da yağmurla yıkanarak toprağa geçebilir. Ayrıca yaprakların abscisyonu da toprağa karışır [8,9].

1.4. Ceviz Bitkisinin Orijini ve Yayılışı

J. regia, Karpat dağlarından güneyden itibaren Doğu Avrupa ve Türkiye, Irak, İran'ın

doğusundan ve Himalaya dağlarının ötesinde kalan ülkeleri içeren geniş bir alanın tabii bitkisidir. [10].

Ceviz kültürü, İtalya'dan Orta ve Güney Avrupa'ya yayılmış ve ilk kolonilerle de Amerika'ya götürülmüştür. Yaygın İngiliz cevizi ismi, tahminen İngiliz kolonileri tarafından bu cevizin Amerika'ya götürülmesinin bir sonucudur. Dünyada yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan ceviz türü olan *J. regia* 'nın gen merkezleri arasında ülkemizde bulunmaktadır [10].

Ceviz meyve türlerinin en eskilerinden biridir. Jeolojik devirlerde özellikle üçüncü zamanda cevizin kapladığı alan bugünküne göre daha da genişti. Grönland kazılarında ve Sibiry'a'da Obi nehri kıyılarındaki buzulların altında ceviz yaprak ve meyvelerine rastlanmıştır [11].

Ceviz orijininin İran'ın Hazar Denizi kıyısında 35 ° - 40° kuzey enlemleri arasında bulunan Ghilan bölgesi olduğu kanısındandır. Cevizin doğal yayılma alanı ise doğuda Himalaya dağlarından Çin topraklarına, batıda Kafkas Dağları, Anadolu, Balkanlar ve Alp Dağlarına kadar uzanmaktadır [11,12].

Ceviz, M.Ö. 750-500 yıllarında Romalılar tarafından İran'dan Avrupa'ya getirildiğini bildirmektedir. Cevizin meyvelerini Romalılar bolluk sembolü ve konuk armağanı saymışlar, ağacının güzelliği, meyvesinin lezzetli ve besleyici oluşu ve ayrıca kerestesinin yüksek özellikleri dolayısıyla cevize Jüpiter'in meyvesi (*Jovis glans*) veya kral cevizi (*Juglans regia* L.) adını vermişlerdir [11].

Cevizin Avrupa'ya tanıtılmasından çok önce İran'la benzer ekolojik koşullara sahip Anadolu'ya daha kolaylıkla yayılabileceği akla gelmektedir. Bu varsayımdan hareket edildiğinde de Anadolu'da yaşayan insanların en az 3.000 yıldır bu bitkiyi tanıdıkları, bu bitkiden faydalandıkları düşünülebilir [11].

Türkiye'de Polatlı yakınlarındaki Gordiyon'da Kral Midas (I)'la gömülen mobilyaların odun analizlerinde, mobilyaların *Juglans regia* L. ve *Taxus baccata* L., *Cedrus libani* Loud., *Juniperus foetidissima* Willd., *Buxus sempervirens* L. ve *Pinus sylvestris* L.'den yapıldığı saptanmıştır. Juglandaceae familyası üyelerine, Neolitik çağda Konya-Süderde'de rastlanmıştır [10].

Bugün İsviçre Alplerinin 1000-1200 m. yüksekliklerine kadar cevizin yerleşmesinde gene Romalıların milâdın ilk yüz yıllarında kuzeye doğru sürdürdükleri yayılma çabalarının etkileri olmuştur [12].

1.5. Ceviz Bitkisinin Sistematigi

Cevizin sistematikteki yeri Çizelge 1.1 de gösterilmiştir. Başlıca ceviz türleri ve önemli özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

1.5.1. Başlıca Ceviz Türleri

***J. regia* L.**

J. regia, bütün dünyada, ceviz yetiştiriciliği yapılan bölgelerde kolay bulunabilen bir ceviz türüdür. *J. regia*, gümüşü-gri gövde rengi, 5-9 (bazen 13) yaprakçık sayısı, kalın-ince kabuklu ve pürüzlü meyvesi ile tanımlanabilir [10].

***J. hindsii* Jeps.**

J. hindsii 15-19 arasında değişen dar yaprakçıkları ve yuvarlakça kalın kabuklu, 2.5-3.5 cm çapında meyveleri ile tanımlanır. *J. hindsii*, ilk defa Hinds tarafından 1837 yılında, Aşağı Sacramento Irmağında bulunmuştur [10].

***J. nigra* L.**

J. nigra L., Doğu siyah cevizi, Doğu ve Batı ABD'nin Batı New Hampshire -Georgia ve Minnesota, Texas arası bölgenin tabii bitkisidir. *J. nigra* L., 17. YY. başlarında Avrupa'ya hem kerestelik ve hem de süs bitkisi olarak getirilmiş ve Güney İskandinavya'nın daha kuzeylerine kadar dikilmiştir. Uzun boylu ağaçlar, 15-23 yaprakçıktan oluşan yaprakları, büyük düzensiz çizgili 3-4 cm çapındaki meyveleri ile tanınır [10].

Çizelge 1.1. Cevizin sistematığı

Sınıf	Dicotyledoneae
Takım	Juglandales
Familya	<i>Juglandaceae</i>
Cins	<i>Juglans</i>
Tür	<i>Juglans regia</i> L.
	<i>Juglans australis</i> Grisebach
	<i>Juglans boliviana</i> Dode
	<i>Juglans californica</i> S.Wats
	<i>Juglans cathayensis</i> Dode
	<i>Juglans cinerea</i> L.
	<i>Juglans ailantifolia</i> Carr
	<i>Juglans ailantifolia coriformis</i> (Max) Reh.
	<i>Juglans hindsii</i> Jeps
	<i>Juglans jamaicensis</i> C.D.C
	<i>Juglans major</i> (Torr) Heller
	<i>Juglans mandshurica</i> Maxim
	<i>Juglans microcarpa</i> Berlandier
	<i>Juglans mollis</i> Engelm
	<i>Juglans nigra</i> L.
	<i>Juglans olanchana</i> Standley and Williams
	<i>Juglans stenocarpa</i> Maxim

***J. californica* S.Wats**

Güney Kaliforniya siyah cevizi, Santa Ynez ve Santa Ana dağlarından Güney Kaliforniya'ya kadar olan bölgede bulunur. *J. californica*, *J. hindsii*'den daha az sayıda yaprakçıkları (11-15 tane), daha küçük meyveleri, küçük ağaçlar, ilkbaharda erken yapraklanması ve ağustosta erken yaprak dökümü ile ayrılır [10].

***J. cinerae* L.**

Georgia ve Arkansas' tan New Brunswick'e kadar uzanan alanın doğal bitkileri arasındadır. Bu türün en önemli özelliği Amerikan ceviz türleri arasında soğuğa en dayanıklı tür olmasıdır [10].

1.5.2. Ulusal Ceviz Çeşitlerimiz

Ulusal ceviz çeşitlerimiz, *Juglans regia* L. türüne ait kültür varyeteleridir.

Yalova 1

Ortalama meyve ağırlığı 15,5 g, iç ağırlığı 7,5 g, iç oranı % 48 iç ceviz yağ oranı %70, iç ceviz protein oranı % 23 olup taze ve kuru tüketimde kullanılabilen bir çeşittir. Eylül sonlarında hasat edilen çeşidin çiçeklenme tipi protandridir. Çeşit için tavsiye edilen tozlayıcılar, Yalova 4 ve Şebin ceviz çeşitleridir [10]

Yalova 2

Ortalama meyve ağırlığı 16,5 g, iç ağırlığı 7,6 g, iç oranı % 46 iç ceviz yağ oranı 9^68 iç ceviz protein oranı % 18 olup taze tüketimde kullanılabilen bir çeşittir. Eylül sonlarında hasat edilen çeşidin çiçeklenme tipi protogenidir. Bu çeşitte fidan üretimi Tarım Bakanlığı Yetkilileri'nin ifadesine göre durdurulmuştur [10]

Yalova 3

Ortalama meyve ağırlığı 12,1 g, iç ağırlığı 6,4 g, iç oranı % 53 iç ceviz yağ oranı %71, iç ceviz protein oranı % 21 olup kuru tüketimde kullanılabilen bir çeşittir. Eylül sonlarında hasat edilen çeşidin çiçeklenme tipi protandridir. Çeşit için tavsiye edilen tozlayıcı çeşit, Yalova l'dir [10].

Yalova 4

Ortalama meyve ağırlığı 12,9 g, iç ağırlığı 6,8 g, iç oranı % 53 iç ceviz yağ oranı %73 iç ceviz protein oranı % 17 olup kuru tüketimde kullanılabilen bir çeşittir. Eylül sonlarında hasat edilen çeşidin çiçeklenme tipi homogamidir [10].

Şebin

Şebin ceviz çeşidi Şebinkarahisar İlçesi Kırkgöz mahallesi orijinlidir. Çeşidin orijinindeki ortalama meyve ağırlığı 9,40 g, iç ağırlığı 6,60 g, iç randımanı % 63 ve yağ içeriği ise % 69,40 olarak belirlenmiştir . Çeşidin Tokat İli - Niksar İlçesi Ekolojik Şartlarında ortalama meyve ağırlığı 11,36 g iç ağırlığı 7,44 g iç randımanı % 65,14 ve yağ içeriği ise % 67 olarak saptanmıştır. Eylül ortalarında hasat edilen çeşidin çiçeklenme tipi protantridir. Çeşidin ağaçları yaygın bir şekilde gelişimi sunar. Çeşit için tavsiye edilen tozlayıcı çeşit Bilecik ceviz çeşididir. Şebin ceviz çeşidinin kurağa ve güneş yanıklığına hassas olması nedeniyle, özellikle Haziran-Eylül arasında iç ceviz kalitesi üzerine mutlak manada etki eden su sıkıntısı çekilen yerlerde ilave sulamalara önem verilmelidir. Hasat zamanının yeşil kabuğun kavlamaya haşladığı zamana kadar geciktirilmesi iç cevizde önemli kalite kayıplarına neden olan kararmalara neden olmaktadır. Sulama sıkıntısının olmadığı ve güneş yanıklığı durumunun gözlenmediği yerlerde,

Şebin ceviz çeşidinin iç ceviz olarak değerlendirilmesi iyi bir seçenek olacaktır, iç kurdu, sulama ve güneş yanıklığına dikkat etmek şartıyla Şebin cevizi çeşidinin şimdilik iyi özelliklere sahip ve karlı bir çeşit olduğunu söylemek mümkündür [10].

Bilecik

Ortalama meyve ağırlığı 10,4 g, iç ağırlığı 5,2 g, iç oranı % 50 iç ceviz yağ oranı % 62, iç ceviz protein oranı % 12 olup, kuru tüketimde kullanılabilen bir çeşittir. Eylül sonlarında hasat edilen çeşidin çiçeklenme tipi protogenidir. Bilecik ceviz çeşidi ülkemiz ceviz yetiştiriciliğinde daha çok Şebin ceviz çeşidi için tozlayıcı çeşit olarak kullanılmaktadır. Çeşit iç kurduna Şebin ceviz çeşidine göre daha dayanıklıdır. Meyve kalitesi düşüktür [10].

1.6. Juglon'un Allelopatik Etkileri

Juglon'un allelopatik etkilerine dair ilk kayıtlardan yukarıda kısmen bahsedilmişti. Bu raporlar 1920'li yıllara aittir. Bundan sonra bu alandaki çalışmalarda bir yavaşlama olmuş 1970'li yıllardan sonra günümüze kadar tekrar bu alandaki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Juglon'un çeşitli bitkiler üzerindeki allelopatik etkileri daha çok çimlenme ve fide büyümesi üzerinde araştırılmıştır. Terzi ve Kocaçalışkan (2001) tarafından yapılan çalışmada, ceviz yaprak özütlerinin ve juglonun domates, tere, hıyar bitkileri üzerinde olumsuz, kavun üzerinde ise olumlu etkileri tespit edilmiştir. Yine ceviz yaprak özütleri ile juglonun etkileri arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir [13].

Juglon'un kozalaklı bitkilerde fide büyümesi üzerine olan etkisi araştırıldığında bazı türlerde olumsuz bazılarında da olumlu etki yaptığı ve bu etkinin konsantrasyona göre değiştiği belirlenmiştir [14]. Bir başka çalışmada kozalaklı bitkilerden Norveç ladin'i (*Picea abies*) üzerinde Juglon'un etkileri araştırılmış ve juglonun olumsuz etkisinin olduğu ancak bu etkinin çimlenme sonrası fide büyümesinde daha açıkça görüldüğü tespit edilmiştir [15]. Benzer şekilde, 16 bitki türü ile yapılan bir çalışmada, Juglon'un 10^{-3} M konsantrasyonu kuvvetli inhibitör etki göstermiştir. [15] Bu etki bilhassa çimlenme sonrası büyüme üzerine daha kuvvetli olmuştur. Bazı bitki türleri ise Juglon'a karşı çok hassas olup 10^{-6} M gibi düşük bir konsantrasyonda bile zarar görmüşlerdir. Bu türler şunlardır: (*Lonicera maackii*, *Lespedeza cuneata*, *Trifolium incarnatum*, *Alnus glutinosa*, *Elaeagnus umbellata*). Buna mukabil bir kaç tür üzerinde 10^{-6} M juglon büyüme artırıcı etki göstermiştir [5].

Bitki türlerinin Juglon'a olan hassasiyetleri çok farklıdır [16]. Juglon'a en hassas bitkilerin başında; domates, yonca, elma, armut, böğürtlen, kızıl çam ve beyaz çam gelir. Juglon'a toleranslı bitkiler ise; *Trifolium*, *Ranunculus*, *Primula*, *Poa*, *İris*, *Lilium*, *Helleborus*, *Gentiana*, *Vitis*, *Ouercus*, *Juniperus* gibi bitkilerdir [17].

Ceviz ağaçlarının (*Juglans regia* L.) ksilem eksüdatlarındaki juglon'un ceviz aşılama çalışmalarını olumsuz olarak etkilediği ve aşılama bölgesindeki kambiyum dokusunun hücrelerini öldürüp kallus dokusunun oluşumunu engelliyerek bu başarısızlığa sebep olduğu belirlenmiştir [18,19].

Juglon'un büyüme inhibitörü olarak etki mekanizmasının nasıl olduğu çok az araştırılmıştır. Bu hususta bir kaç çalışma mevcuttur. Bu çalışmalara göre Juglon domates ve bakla yaprak diskleri ile kesilmiş mısır köklerinin O₂ alımını ve dolayısıyla solunumu azaltarak büyümeye ket vurmaktadır [20,21]. Bir baklagil bitki olan *Vicia villosa* Roth. üzerinde juglon'un büyüme engelleyici etkisi, bu bitkinin köklerinde nodul oluşumunu azaltarak dolayısıyla azot fiksasyonunu kısıtlayarak olmuştur [22]. Soya fasulyesi ve *Lemna minor* bitkisinin büyümesindeki azalma, bu bitkilerin klorofil miktarı ve net fotosentezlerindeki azalmayla doğru ilişkili bulunmuştur [23].

1.7. Juglon'un Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri

Krajci ve Lynch (1978) yaptıkları çalışmada, juglon ve ceviz özütlерinin (ethanol, hexane, su, DMSO çözücülerі ile hazırlanan) çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon etkilerini araştırmıştır. Araştırmacılar juglonu çeşitli konsantrasyonlarda (1.0-0.5-0.25-0.125-0.0625-0.0313-0.0156 mg/ml) ve ceviz özütlерini de çeşitli çözücüler (ethanol, hexane, su, DMSO) kullanarak mikroorganizmalara uygulamışlardır. Ceviz özütleri kullanılan mikroorganizmaların çoğunda etkili olmuş, fakat juglonun kullanılan bütün test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki göstermiştir [24].

Clark ve arkadaşları (1990) juglonun antimikrobiyal aktivitesini araştırmıştır. İki dermatofit olan *Microsporum gypseum* ve *Trichophyton mentagrophytes* türlerini kullanarak juglonun MİK değerlerini, diğer ticari fungal ajanlar (clotrimazole, triacetin, tolnaftate, griseoflavin, zinc undecylate, selenium sulfide) ve fungal antibiyotikler (liriodenine ve liriodenine methiodide) ile karşılaştırmalı olarak tespit etmiştir. Juglonun MİK değerleri diğer ticari fungusitler (zinc undecylate, selenium sulfide) kadar etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada, juglonun MİK değerleri çeşitli bakteriler, (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*) mayalar (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*) ve funguslar (*Aspergillus flavus* ve *Aspergillus fumigatus*) kullanarak tespit edilmiştir. En düşük MİK değeri *Saccharomyces cerevisiae* 0.39 µg/ml olurken, en yüksek MİK değeri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* türleri için 12.5 µg/ml olmuştur [25].

Didry ve arkadaşları (1994) yaptığı çalışmada, antrakınonik ve naftakinonik materyallerin oral bakteriler üzerine etkilerini araştırmıştır. Juglon, rein, emodin, aloe emodin, sensoide A, sensoide B, chrysophonic asit gibi naftononik ve antrokinonik materyallerinin *Streptococcus mutans*, *St. sabrinus*, *St. rattus*, *St. cricetus*, *St. mitis*, *St. sanguis* 1-2, *S. milleri*, *Peptostreptococcus constellatus*, *Prevotella oris*, *P. bucea*, *P. intermedia* türleri üzerindeki etkilerini ve MİK değerlerini tespit etmiştir. Juglon'un MİK

değerleri 125 µg/ml – 500 µg/ml arasında değişmektedir [26].

Akhtar ve arkadaşları (1997) yaptıkları çalışmada *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* üzerinde 228 bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktivitelerini çalışmıştır. Bitki difüsatlarını çeşitli konsantrasyonlarda (50-20-10-5 mg/ml) *X. campestris* pv. *citri* türü XC-100 üzerinde denemiştir. *Juglans regia*'nın 2 mm gibi inhibisyon zonu ölçülmüştür [27].

Alkhawajah (1997) yaptığı çalışmada, ceviz (*Juglans regia* L.) özütlерinin antimikrobiyal aktivitesini çalışmıştır. Bu çalışmada, cevizden hazırlanan özütleri çeşitli konsantrasyonlarda (10-50-100-200-300 µg/ml) ve çeşitli antibiyotikleri (tobramycin, gentamycin, spectinomycin, erythromycin, doxyecyline, ampicilin ve cholorampicilin) kullanarak *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus aeruginosa*, *Streptococcus mutans* ve *Candida albicans* bakteri ve mayalar üzerinde etkilerini tespit etmiştir. İnhibisyon zonları 0.20-3.1 cm arasında değişmektedir. Sadece uygulanan ceviz özütleri *Salmonella typhimurium* türünde etki göstermemiştir [28].

Stayeh ve Ghadeib (1999) bitki ekstraktlarının dematofitler üzerinde antifungal etkisini inceledikleri çalışmada, cevizin sulu özütlерini kullanmıştır. Dermotofit olan *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. violeceum* fungusları üzerinde ceviz özütlерinin yaklaşık %98 gibi bir inhibitör etkisi tespit edilmiştir. MİK değerleri *M. canis* için 3 µg/ml, *T. mentagrophytes* ve *T. violeceum* için 0.6 µg/ml olarak bulmuştur [29].

Mansouri (1999), yaptığı çalışmada, İran'da yetişen bitkilerden hazırlanan ekstraktların *S. aureus* türleri üzerine inhibitör etkilerini tespit etmeye çalışmıştır. Çalışmanın sonucunda, ceviz özütlерinin (30 mg/ml) *S. aureus* türleri üzerinde antimikrobiyal etkisinin olmadığı tespit edilmiştir [30].

Mehrabian ve arkadaşları (2000), bazı havasal mikroorganizmalar üzerinde üç bitkinin (*Rubia tinctorium*, *Carthamus tinctorius*, *Juglans regia*) antimikrobiyal etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmada, üç bitkiden su, methanol ve kloroform ile hazırladıkları özütlерin antimikrobiyal aktiviteleri *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. Mycoides*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expandasum* ve *Geotrichium candidum* türleri kullanılarak belirlenmiştir. Özütlер 200 µg/ml konsantrasyonda uygulanmış ve kloroform ve sulu özütlер en az antimikrobiyal etkiyi göstermiştir [31].

Hadacek ve Greger (2000), *Botrytis cinerea*, *Cladosporium hebarum*, *Fusarium avaneceum* fungus türleri üzerinde juglon ve faltarindiol (*Peucedanum cervaria* türünden izole edilen madde) antifungal etkilerini araştırmıştır. Değişik yöntemlerle juglon ve faltarindiol'un MİK değerlerini tespit etmiş ve juglonun faltarindiolden daha etkili olduğunu bulmuştur [32].

S. Omar ve arkadaşları (2000), Kuzeydoğu Amerika'da yetişen sert kabuklu ağaçlardan

hazırlanan ekstratların ve geleneksel ilaçların antimikrobiyal aktivitesini araştırmıştır. Ceviz kabuğu (*Juglans cinerea*) ve Kuzeydoğu Amerika’da yetişen 14 adet türden hazırlanan ekstratların, *Candida albicans*, *Saccharomyces ceravisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* ve *Aspergillus fumigatus* türleri üzerindeki antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir. Ceviz kullanılan bu türler üzerinde geniş bir inhibisyon etkisi göstermiştir. Ayrıca, kullanılan ekstratların antimikrobiyal aktivitesi gram pozitif bakterilerinki gram negatiflerden, fungusların ki de mayalarınkinden daha iyidir [33].

Lopez ve arkadaşları (2001) yaptıkları çalışmada, Kolombiya’da yetişen tıbbi bitkilerinin antiviral ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmıştır. Kolombiyada yetişen ceviz (*Juglans neotropica*) ve diğer bitki türlerinden metanolle hazırlanan ekstratları virüs olarak HSV ve RNA polivirüs, gram pozitif bakteriler *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* methiciline dirençli, gram negatif bakteriler *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (wild), *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium phlei* ve maya türü olarak *Candida albicans* üzerindeki etkileri incelemiş, ceviz mayalar ve bakteriler üzerinde geniş bir antimikrobiyal ve antiviral etki göstermiştir. [34].

Mouhajir ve arkadaşları (2001) yaptıkları çalışmada, Fas’ta yaşayan Berberilerin kullandığı endemik tıbbi bitkilerin çok yönlü olarak antiviral etkilerini araştırmıştır. Metanolle hazırlanan 75 adet Fas’a endemik bitki özütünün aydınlık ve karanlık ortamda Sindbis virusu, Herpes simplex virusu ve Polio virusu üzerindeki etkilerini çalışmıştır. Cevizin (*Juglans regia* L.) yaprak ve kabuk kısmından hazırlanan özütlerinin sinüzit, soğuk algınlığı, deri enfeksiyonları kurdeşen ve mide rahatsızlıklarına karşı tedavi edici özelliğinin olduğunu bulmuştur. Ayrıca cevizin; HSV virusu için 1.5 µg/ml karanlık ve aydınlık ortamda; SINV virusu için 1.5 µg/ml aydınlıkta, 12.5 µg/ml karanlıkta, Polio virusu için 25 µg/ml hem karanlık hem de aydınlık ortamdaki MİK değerlerini tespit etmiştir [35].

Arora ve arkadaşları (2003) yaptıkları çalışmada, Hindistan’da yetişen bazı tıbbi bitkilerin antimutajenik aktivitesini bulmak için, *Salmonella typhimurium*’un TA 98 ve TA 100 strainleri üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmada Cevizin kabuk kısmından su, aseton ve kloroform ile ekstratlar hazırlanmış ve konsantrasyonlarda *S. typhimurium* strainlerine uygulamıştır. Cevizin asetondan hazırlanan ekstratların TA 100 strainine karşı %98 lik bir inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmiştir [36].

Shahidi Bonjar ve arkadaşları (2004) yaptıkları çalışmada, İran’ın güneydoğusunda yetişen tıbbi bitkilerin antibakteriyal ve antifungal etkilerini araştırmıştır. Metanolle hazırlanan 93 familyaya ait 225 bitki ekstraktı, 11 bakteri türü ve 3 fungus türü kullanılmıştır. Ceviz (*Juglans regia*) çiçek kısmından hazırlanan ekstratlar *Bacillus pumilis* türünde 10 mm, *Staphylococcus aureus* türünde 9 mm ve *B. cereus* türünde ise 9 mm inhibisyon zonu göstermiştir [37].

1.8. Araştırmanın Amacı ve Önemi

Bu çalışmanın amacı, cevizden salgılanan önemli bir allelokimyasal madde olan juglon'un bazı bakteri ve fungus türleri üzerine olan antibakteriyel ve antifungal aktivitesini ortaya koymaktır. Ceviz ağaçları ülkemizde oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Çalışılan bakteri ve funguslar ise çoğunlukla toprakta yaşıyor ve bakterilerin bir kısmı, fungusların ise tamamı bitkilerde hastalık yapan mikroorganizmalardır. Dolayısıyla bu çalışma, hem doğadaki juglon-mikroorganizma allelopatisini aydınlatacak, hem de fitopatojen mikroorganizmalar için doğal bir ilaç olarak juglon'un kullanımı yolunda bir fikir verecektir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal Temini

Çalışmamızda *Juglans regia* L. türüne ait Şebın, Yalova 2, Yalova 3, Yalova 4, 1974-7 varyeteleri kullanılmıştır. Bu türe ait ağaç yaprakları Ağustos ayında Uludağ Üniversitesi Bahçe Bitkileri Araştırma bahçesinden toplanıp etüv de 70°C de 48 saat kurutularak kuru ve serin bir ortamda, kullanılana kadar muhafaza edilmiştir.

Çalışmada, gram pozitif, gram negatif bakteriler ve ilaveten funguslar kullanılmıştır. Kullanılan bakteri ve funguslar Çizelge 2.1 de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Test organizması olarak kullanılan bakteri ve fungus türleri.

Bakteriler		Funguslar
<i>Escherichia coli</i>	Gram negatif	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gram negatif	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram pozitif	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	Gram pozitif	<i>Aspergillus parasiticus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram pozitif	<i>Geotrichium candidum</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram pozitif	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gram negatif	<i>Fusarium solani</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	Gram negatif	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Streptococcus faecium</i>	Gram pozitif	<i>Candida albicans</i>
<i>Pseudomonas gingeri</i>	Gram negatif	
<i>Pseudomonas syringae pv. phaseolica</i>	Gram negatif	

2.2. Besiyerleri

Besiyeri 1. Nutrient Agar (NA)

Et ekstaktı	3,0 g
Pepton	5,0 g
Agar	12,0 g
Saf su	1000 ml

Otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilmiştir.

Besiyeri 2. Mueller Hinton Agar (MHA) (pH 7.4)

Beef infusion	300,0 g
Casamino asit	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Agar	17,0 g
Saf su	1000 ml

121 °C'de 1.1 atm basınçta 15 dk süre ile steril edilmiştir.

Besiyeri 3. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (pH 8.6)

Pepton	10,0 g
Glikoz	40,0 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 ml

121 °C'de 1.1 atm basınçta 15 dk süre ile steril edilmiştir.

Besiyeri 4. Potato Dextrose Agar (PDA)

Patates infüzyonu	4,0 g
D (+) glikoz	20,0 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 ml

121 °C 'da otoklavda 15 dakika sterilize edilmiştir.

Besiyeri 5. Yeast Malt Agar (YMA)

Malt ekstrat	3,0 g
Maya ekstraktı	3,0 g
Dekstroz	10,0 g
Pepton	5,0 g
Agar	20,0 g
Saf su	1000 ml

0.4 M KOH ve 1 N H₂SO₄ ile pH 7.5±0.2'ye ayarlanarak otoklavda 121 °C'de 1.1 atm basınçta 15 dk süre ile steril edilmiştir.

2.3. Çözeltiler**Çözelti 1. Serum fizyolojik**

NaCl	0,85
Saf su	100 ml

Hazırlanan çözelti otoklavda 121 °C'de 1.1 atm basınçta 15 dk süre ile steril edilmiştir.

Çözelti 2. Mc farland Standart Çözeltisi

BaCl ₂ (%1.175 ,0.048 M)	0.5 ml
H ₂ SO ₄ (%1, 0.18 M.)	99.5 ml

BaCl₂ ve H₂SO₄ karıştırıldığında elde edilen bulanık çözelti spektrofotometre de 625nm dalgaboyunda okutulmuştur. Bu dalga boyunda absorbans değeri 0.08-0.10 aralığına denk

gelmiştir. Bu değer 0.5 Mc Farland standardı olarak kabul edilmiştir Standardın bulanıklılığı ile bakteri süspansiyonlarının bulanıklılığı çıplak göz ile karşılaştırılarak ayarlanır. 0,5 Mc Farland standardı ml de 10^8 bakteri varlığını göstermiştir. Standart, karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır. 3 ayda bir tekrar hazırlanmalıdır [38].

Çözelti 3. %01 TritonX 100

Triton X100	1 ml
Distile su	1000 ml

121°C’de 15 dakika süre ile steril edildi.

2.4. Ceviz Yapraklarından Özüt Hazırlama

Kurutulmuş ceviz yapraklarından özüt hazırlama işleminde su ve alkol çözücü olarak kullanılmıştır. 10 g ceviz yaprağı 100 ml etil alkol ve saf su içinde blenderde parçalanarak homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat tülbentten süzülüş, 20000 rpm hızında 5°C de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Oluşan supernatant kısmı alınmıştır. Su ile hazırlanan özütlerdeki su, Anadolu Üniversitesi BİBAM (Bitki İlaç Bilimsel Araştırma Merkezi)’da bulunan liyofilizatörde uzaklaştırılmıştır. Alkolle hazırlanan özütlerdeki alkol ise, evaporatörde uzaklaştırılarak su ve alkol ekstraları elde edilmiştir.

Bu özütler antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde ve ince tabaka kromatografisinde doğrudan kullanılmıştır. Sulu özütlerin 0,1 mg tartılıp, 2 ml DMSO içinde çözünmesi sağlanmış, alkol özütleri ise 0,1 mg tartılıp 1 ml DMSO içinde çözünmesi sağlanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan saf juglon da 0,1 mg tartıldıktan sonra 1 ml DMSO içinde çözülmüştür.

2.5. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Kromatografi, bir karışımın poröz bir ortamda, hareketli bir çözücünün etkisiyle karışımı oluşturan bileşiklerin farklı hareketleri sonucu bileşenlerine ayrılması olarak tanımlanabilir. Başlıca silika ve aliminyum ile kaplanmış tabakalar yaygın olarak cam, aliminyum veya plastik üzerinde kullanılır. Silika hafif asidik olup, hafif bazik aliminyuma nazaran daha çok kullanılır. İnce tabaka kromatografisi işlemleri sırasında F_{254} (Merck, 0,25 µm kalınlığında) İTK plağı kullanılmıştır.

Su ve alkol özütleri alkolde çözündürülerek plağa uygulanmıştır. İTK plakası levhanın sağından ve solundan 1 cm içeri, alt kısımdan da 2 cm olacak şekilde uygulanacak örnek

sayısına göre eşit şekilde kurşun kalemle işaretlenmiştir. Örnekler bu noktanın tam ortasına gelecek şekilde 5 µl kılcal boru yardımı ile emdirilmiştir. Bu işlem en az 4 kez tekrar edilmiştir.

Hareketli faz olarak Toluen: Etilasetat: Metanol: Butanal (29.1: 0.9: 5: 5) kullanılmıştır. Yürütme çözeltisi (hareketli faz) ile doygun hale gelen tankın içine plaka düzgün şekilde yerleştirilmiştir. Örnek uygulanan noktaların sıvı içinde kalmamasına özen gösterilmiştir. Yürütme işlemi plakanın üst kısmından 0,3 cm kalana kadar devam etmiş ve süre sonunda tankın içinden çıkarılan plakalar havada kurutulmuştur. Plaka üzerinde oluşan spotlar UV ışığı altına gözlemlenmiştir. Yürütme sonunda çözücünün ve örneklerin ilerlediği mesafe metrik bir cetvelle ölçülmüştür. Her madde için uygulama koşulları belirtilerek karakteristik bir değer olan R_f ile ifade edilir [39,40,41].

$$R_f = \text{Maddenin ilerlediği yol} / \text{Çözücünün ilerlediği yol}$$

2.6. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

2.6.1. Antibakteriyal Aktivitenin Belirlenmesi

Elde edilen ceviz yaprağı özütlerinin antibakteriyal aktivitesinin belirlenmesinde “Agar Kuyucuk Yöntemi” kullanılmıştır. Test bakteri kültürlerini aktive etmek için ilk önce insan patojeni olanlar Nutrient agar (NA) besiyeri bulunan tüplere, bitkilerde hastalık yapan bakteriler ise yeast malt agar (YMA) besiyeri bulunan petrilere ekimleri yapılmış ve insan patojeni olanlar 37 °C de 24 saat, bitki patojenleri ise 25 °C de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri kültürlerinin yoğunluğu steril serum fizyolojik ile Mc Farland 0,5 (yaklaşık 10^8 cfu/ml) tüpüne göre ayarlanmıştır. Steril petrilere 20 ml MHA besiyeri dökülerek donmaya bırakılmıştır. Daha sonra bu petri plaklarının üzerine 100 µl kültür içeren ve vorteks ile iyice karışması sağlanmış 45 °C de sıvı halde korunan 5 ml MHA besiyeri ilave edilmiş, yüzeye yayılması sağlanmıştır. Daha sonra steril mantar delici (cork borer) yardımı ile aseptik koşullarda her bir petri plağında birbirinden mesafeli 10 mm çapında çukurlar açılmıştır.

Hazırlanan ceviz özütleri ve juglon çözeltilerden petrilere açılan çukurlara 100 µl ilave edilmiş, daha sonra 30 dk buzdolabında maddelerin difüze olması için bekletilmiştir. İnsan patojeni olan bakteriler 37 °C de 24 saat, bitki patojenleri ise 25 °C de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra çukurların etrafında bakterilerin üreyemedikleri bölgeler (zonlar) oluşmuştur. Bu zonlar kumpas yardımı ile ölçülmüştür.

2.6.2. Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi

Çalışmada kullandığımız fungusları aktive etmek için PDA besiyeri bulunan tüplere ekimleri yapılmış 25 °C de 72 saat inkubasyona bırakılmıştır. Daha sonra oluşan sporlar %1 lik Triton x 100 çözeltisi ile besiyeri yüzeyinden kazınarak alınmış ve yoğun spor süspansiyonları elde edilmiştir. Spor süspansiyonları Thoma lamında sayılarak 10^6 spor/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Steril petrilere 20 ml SDA besiyeri dökülmüştür. 45 °C de sıvı halde korunan 5 ml SDA bulunan tüplere 100 µl spor süspansiyonu ilave edilerek vortekslenmiştir. Daha sonra petrilere dökülüp yüzeye yayılması sağlanmıştır.

Ceviz özütleri ve juglondan hazırlanan çözeltilerden petrilere açılan çukurlara 100 µl ilave edilmiş, daha sonra maddelerin difüze olması için 30 dak buzdolabında bekletilmiş ve 25 °C de 72 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra çukurların etrafında bakterilerin üreyemedikleri bölgeler (zonlar) oluşmuştur. Bu zonlar kumpas yardımı ile mm cinsinden ölçülmüştür.

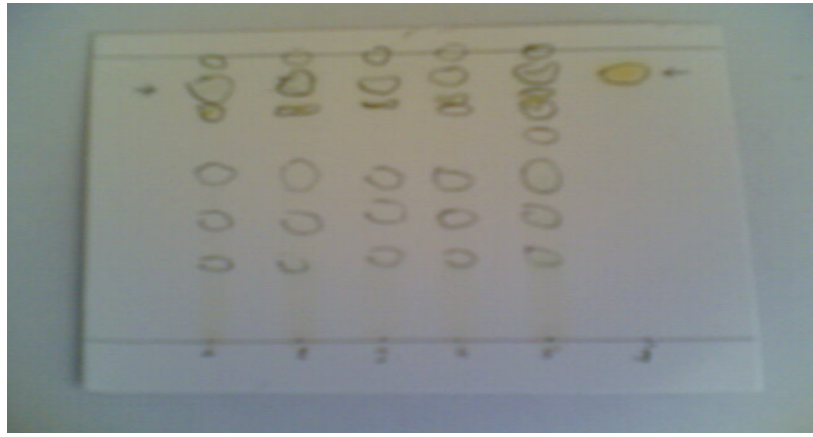
2.7. Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK)'nın Belirlenmesi

Juglon ve Şebin varyetesine ait özütlerin *Pseudomonas gingeri*, *Staphylococcus aureus* bakterileri ve *Candida albicans* fungusu için MİK değerleri tespit edilmiştir. MİK değerinin tespiti için 2 mg juglon ve Şebin varyetesine ait özütten tartılmış ve 5 ml DMSO içinde çözülmüştür. Müller Hinton Broth besiyeri hazırlanmıştır. Bu besiyerinden küçük tüplere 400 µl koyulmuştur. İlk tüpe 400 µl juglon ve özüt ilave edilmiştir. Daha sonra 2. tüpe ise 1. tüpten 400 µl aktarılmıştır. Bu şekilde devam edilerek 11. yani son tüpten 400 µl alınıp dışarıya atılmıştır. Böylece bütün tüplerde eşit madde olması sağlanmıştır. Daha sonra her bir tüpe yoğunluğu 0,5 Mc Farland ile ayarlanmış (yaklaşık 10^8 cfu/ml) bakteri ve fungus süspansiyonlarından 20 µl ilave edilmiştir. *Ps. gingeri* 27 °C de 24 saat *S. aureus* ve *C. albicans* ise inkubasyona bırakılmıştır. Bulanıklık oluşan tüplerde üreme olduğu kabul edilerek, bulanıklılığın oluşmadığı en yüksek konsantrasyon MİK olarak belirlenmiştir.

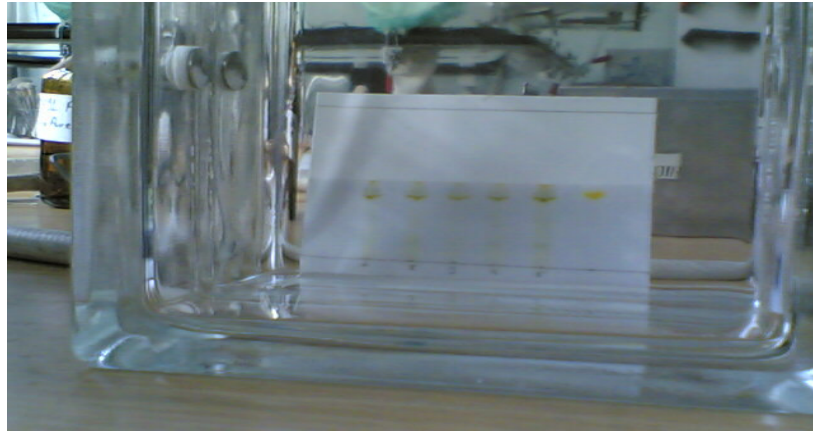
3. BULGULAR

3.1. Ceviz Özütleri ve Juglon'un İTK Sonuçları

İnce tabaka kromatografi sonuçlarına göre ceviz yapraklarından hazırlanan özütlerde juglon varlığı tespit edilmiştir. Şekil 3.9 da görüldüğü gibi juglon $R_f = 0,9$ da sarı renkli benekler halinde belirmiştir. Bu bölge tüm özütlerde de bulunmaktadır.



[a]



[b]

Şekil 3.1. Ceviz özütlerinin ve saf juglonun kromatografi plağındaki genel görüntüsü. [a] Kromatografi plağının yürütme tankındaki görüntüsü, [b] Plaktaki oklar juglonun bulunduğu yerleri göstermektedir. Sağ kenardaki tek benek saf juglona aittir. Aynı hizadaki diğer benekler ise özütlerde bulunan juglona aittir.

3.2. Ceviz Özütleri ve Juglonun Bakteriler Üzerine Etkisi

Ceviz özütleri ve juglon allelokimyasalı kullanılan bakterilerin yarısı üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Kullanmış olduğumuz özütler denemede kullanılan 11 bakteri türünün 5 tanesini inhibe etmiştir. Aynı şekilde, juglon allelokimyasalı da 5 bakteri türü üzerinde etkili olmuştur. Yani bakterilerin üremelerini engellemiştir. Ceviz yaprağından hazırlanan özütlerden etil alkol ile hazırlananlar su ile hazırlanan özütlere oranla daha fazla inhibisyon göstermiştir (Çizelge 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.4.)

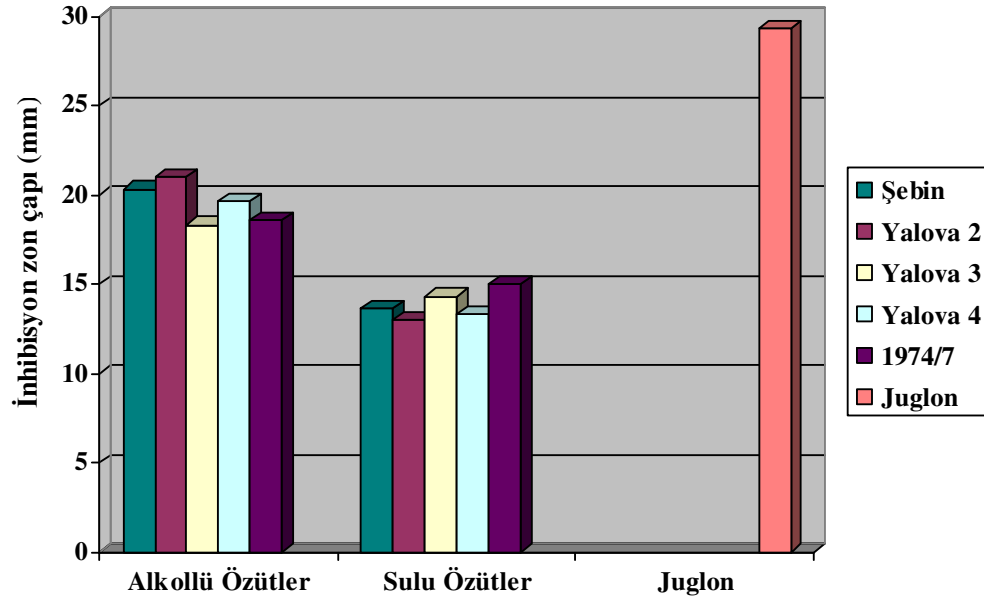
Alkollü özütler *Staphylococcus aureus* bakterisi üzerinde diğer bakterilere göre daha etkili olmuş, bu bakterinin alkollü özütlere karşı duyarlı olduğu bulunmuştur. Alkollü özütlere karşı genel itibari ile etki gösteren bakteri türlerinin üzerinde az duyarlı veya duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Kullanılan bakteri türlerinin çoğunluğunun sulu özütlere karşı dirençli oldukları bulunmuştur. Sulu özütlerden 1974/7 varyetesinden hazırlanan özüt, *S. aureus* ve *B. cereus* üzerinde yüksek derecede antibakteriyel etki göstermiştir. Juglon allelokimyasalı ise etki gözüken türler üzerinde önemli derecede inhibisyon etkisi göstermiştir. Etki gözüken bakteri türlerinin tamamı juglona karşı duyarlıdır. Özütlerle juglon karşılaştırıldığında juglon özütlere göre daha etkili bulunmuştur. İlginç olarak, *Y. enterocolitica* bakterisi alkollü özütlere karşı duyarlı veya az duyarlı iken sulu özütlere karşı tamamen dirençli bulunmuştur. *Streptococcus faecium*, *Streptococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* bakteri türleri ise hem juglona hem de özütlere karşı dirençli bulunmuştur (Çizelge 3.1.).

Çalışmamızda hem juglon hem de özütlere karşı en duyarlı bakteri *Staphylococcus aureus* ve ikinci sırada *Pseudomonas gingeri* olmuştur. Alkollü özütler, *S. aureus* bakterisine sulu özütlerden daha etkili iken, sulu özütler ile alkollü özütlerin *Ps. gingeri* üzerine etkisi arasında bir farklılık görülmemiştir (Şekil 3.3. ve Şekil 3.5.).

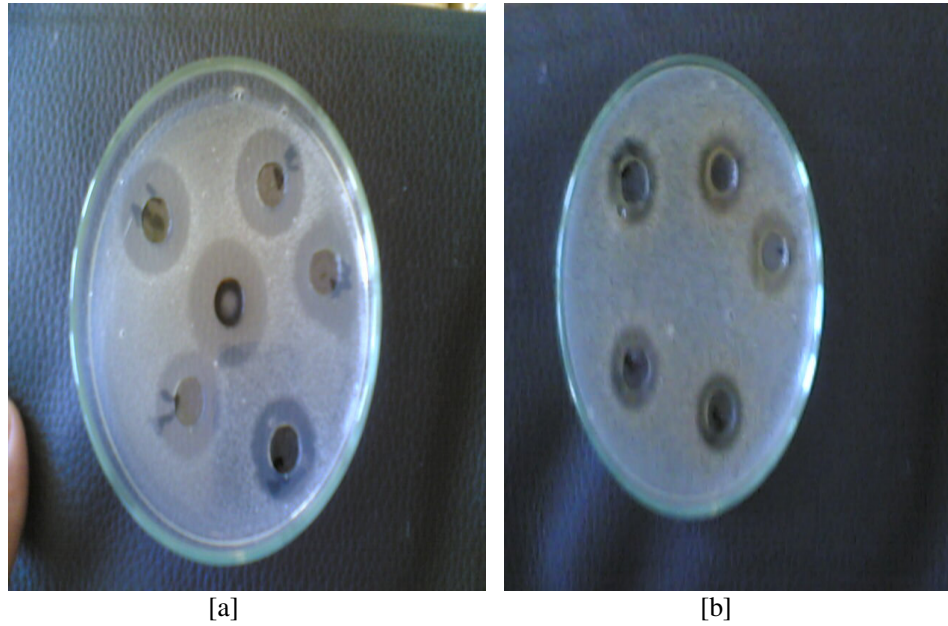
Çizelge 3.1. Ceviz özütleri ve juglonun antibakteriyel etkisi (ortalama inhibisyon zon çapları (mm), n=3, çukur çapı 10 mm)

BAKTERİLER	Alkollü Özütler (0,1 mg/ml)					Sulu Özütler (0,05 mg/ml)					JUGLON (0,1 mg / ml)
	Şebın	Yalova 2	Yalova 3	Yalova 4	1974/7	Şebın	Yalova 2	Yalova 3	Yalova 4	1974/7	
1. <i>Ps. gingeri</i>	14,6	14,3	15,0	14,3	14,0	14,0	12,6	13,0	13,0	14,0	29,3
2. <i>Ps. phaseolica</i>	12,0	17,3	15,0	14,6	14,6	13,3	12,0	13,0	13,0	12,6	21,6
3. <i>S. aureus</i>	20,3	21,0	18,3	19,6	18,6	13,6	13,0	14,3	13,3	15,0	29,3
4. <i>B. cereus</i>	18,0	17,6	18,3	16,0	15,6	14,3	12,6	13,6	14,0	15,3	29,0
5. <i>Y. enterocolitica</i>	18,0	17,6	18,0	15,0	16,0	0	0	0	0	0	28,3
6. <i>St. faecium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7. <i>S.epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8. <i>S. typhimurium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9. <i>P. vulgaris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10. <i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10. <i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

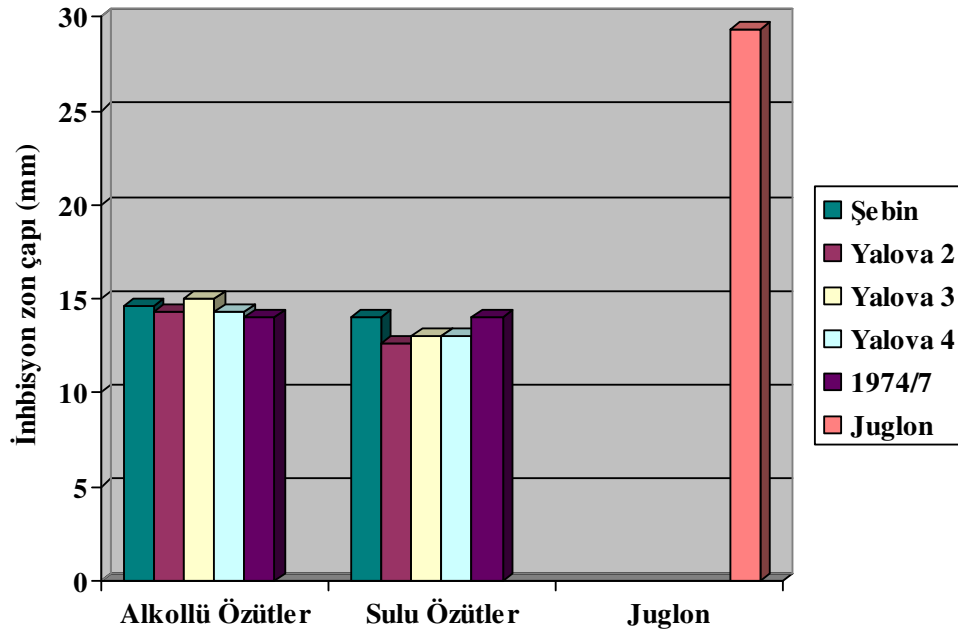
Çizelgedeki değerler mm olarak ölçülen inhibisyon zon çaplarıdır. Rakamın yüksek olması inhibisyonun yüksekliğini göstermektedir. Zon çapı 14 mm den küçük ise mikroorganizma dirençli, 14-17 mm arasında ise az duyarlı, 17 mm den büyük ise az duyarlı ve 17 mm den büyük ise duyarlı olarak kabul edilmiştir (Çetin 1973).



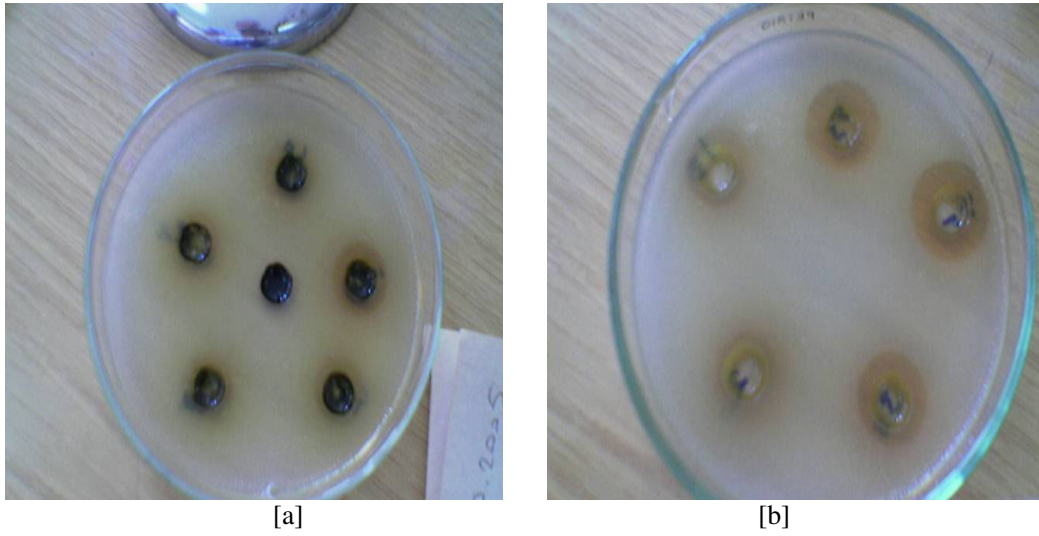
Şekil 3.2. Ceviz özütleri ve juglonun *S. aureus* bakterisi üzerine etkisi



Şekil 3.3. Ceviz özütleri ve juglonun *S. aureus* bakterisi üzerine inhibisyon etkisinin genel görünüşü [a] Alkollü özütler (kenarda) ve juglon (ortada), [b] Sulu özütler.



Şekil 3.4. Ceviz özütleri ve juglonun *P. gingeri* bakterisi üzerine etkisi



Şekil 3.5. Ceviz özütleri ve juglonun *P. gingeri* bakterisi üzerine etkisi [a] Alkollü özütler (kenarda) ve juglon (ortada), [b] Sulu özütler.

3.3. Ceviz Özütleri ve Juglonun Funguslar Üzerine Etkisi

Kullanılan ceviz özütleri ve juglon allelokimyasalı, kullandığımız fungus türleri üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Kullandığımız 9 fungus türünün tümü, özütler ve juglon allelokimyasalı tarafından inhibe edilmiştir. Yani fungusların üremelerini ve gelişmelerini engellemiştir. Alkollü özütler ile sulu özütler arasında antifungal etki yönünden önemli bir fark görülmemiştir (Çizelge 3.2, Şekil 3.6. ve Şekil 3.7.)

Kullandığımız 9 fungus türünden 6 tanesi alkollü ve sulu ceviz özütlerine karşı dirençli bulunmuştur. Sulu ve alkollü özütler, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *Fusarium solani* ve *F. graminearum* türleri zayıf bir antifungal aktivite göstermişlerdir. Bu türler ceviz özütlerine dirençli bulunmuştur. Alkollü ve sulu özütler, *Geotrichium candidum*, *Botrytis cinerea* ve *Candida albicans* türleri üzerinde ise daha etkili olmuşlardır. Bu üç türün ceviz özütlerine karşı az duyarlı ve duyarlı oldukları tespit edilmiştir. İlginç olarak, *A. niger* fungusu alkollü özütlerle karşı dirençli bulunmuş yani zayıf bir inhibisyon etkisine rastlanmış, fakat sulu özütlerde ise hiçbir inhibisyona rastlanmamıştır.

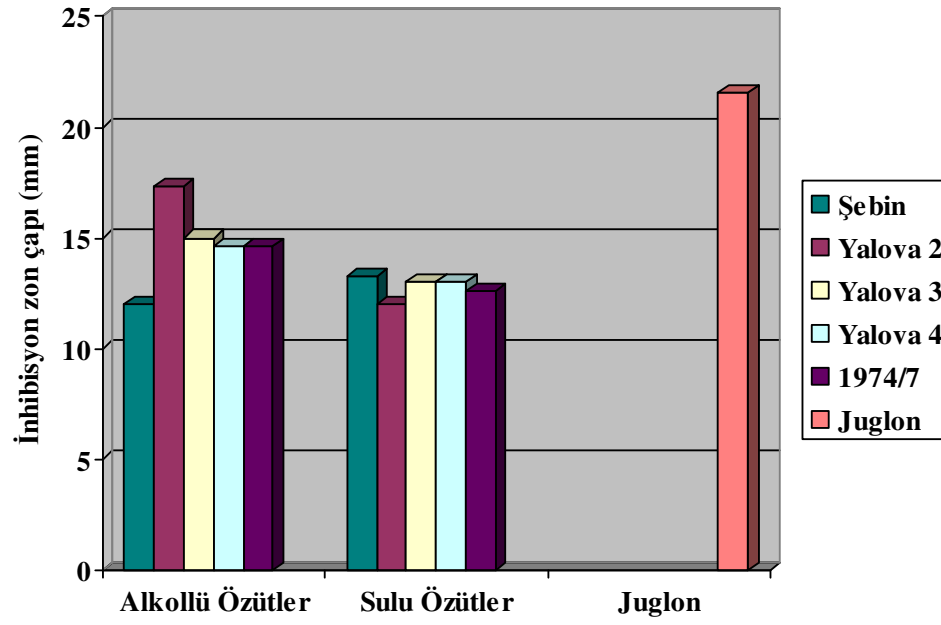
Çalışmamızda kullandığımız fungus türlerinden hem ceviz özütlerine hem de juglona karşı en duyarlı tür *Candida albicans*, daha sonra da *Botrytis cinerea* ve *Geotrichium candidum* türleri gelmektedir. *C. albicans* türünde alkollü özütlerin sulu özütlerle oranla daha etkili oldukları görülmektedir. *Botrytis cinerea* ve *Geotrichium candidum* türlerinde ise alkollü özütler ile sulu özütler arasında önemli derecede bir fark görülmemektedir. Juglon allelokimyasalı ise bu üç türde de alkollü ve sulu özütlerden daha fazla inhibisyon etkisi göstermiştir (Şekil 3.6., Şekil 3.7, Şekil 3.8., Şekil 3.9. ve Şekil 3.11.).

Juglon allelokimyasalı kullanılan tüm fungus türlerini inhibe etmiştir. Kullanılan bütün fungus türleri juglon allelokimyasalına karşı duyarlı bulunmuştur. Juglonun en etkili inhibisyon gösterdiği tür ise *Aspergillus niger*'dir (Şekil 3.10.). Özütlerle juglon karşılaştırıldığında, juglonun özütlerle oranla daha etkili olduğu bulunmuştur. Juglon özütlerle oranla daha fazla antifungal aktivite göstermiştir.

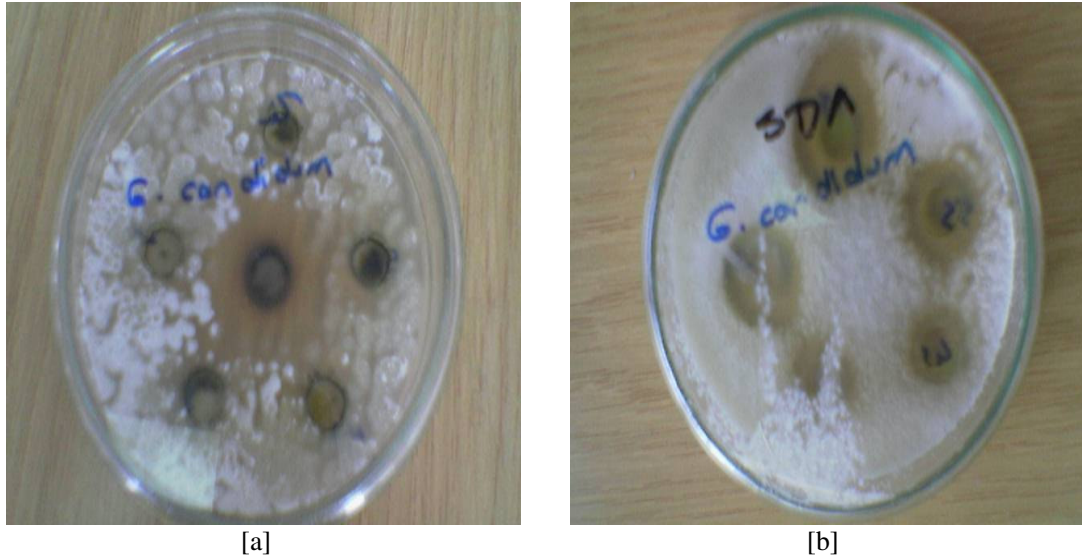
Çizelge 3.2. Ceviz özütleri ve juglonun antifungal etkisi (ortalama inhibisyon zon çapları (mm), n=3, çukur çapı 10 mm)

FUNGUSLAR	Alkollü Özütler (0.1 mg/ml)					Sulu Özütler (0.05 mg/ml)					JUGLON (0.1 mg / ml)
	Şebin	Yalova 2	Yalova 3	Yalova 4	1974/7	Şebin	Yalova 2	Yalova 3	Yalova 4	1974/7	
1. <i>Aspergillus flavus</i>	13,3	13,6	14,6	13,3	13,6	11,3	11,3	12,6	12,6	12,6	32,6
2. <i>Aspergillus fumigatus</i>	12,0	13,0	12,0	12,0	12,3	12,6	12,3	14,0	12,6	12,6	28,6
3. <i>Aspergillus niger</i>	12,0	12,0	13,3	12,0	12,0	0	0	0	0	0	33,3
4. <i>Aspergillus parasiticus</i>	12,3	12,6	12,6	12,0	12,3	12,0	13,0	12,6	12,6	12,3	28,0
5. <i>Fusarium solani</i>	13,3	12,3	14,0	12,0	12,0	12,3	12,0	12,0	12,0	12,0	29,3
6. <i>Fusarium graminearum</i>	12,6	14,0	12,6	12,3	13,3	13,3	12,0	12,3	12,0	12,6	22,7
7. <i>Geotrichium candidum</i>	15,6	15,3	14,0	15,3	16,0	16,6	16,0	17,0	16,3	17,3	28,6
8. <i>Botrytis cinerea</i>	16,6	16,6	18,0	20,0	16,3	16,6	18,6	18,0	18,6	16,6	26,6
9. <i>Candida albicans</i>	24	22,3	24,3	23,7	20,7	19,0	20,7	21,7	18,3	17,7	28,7

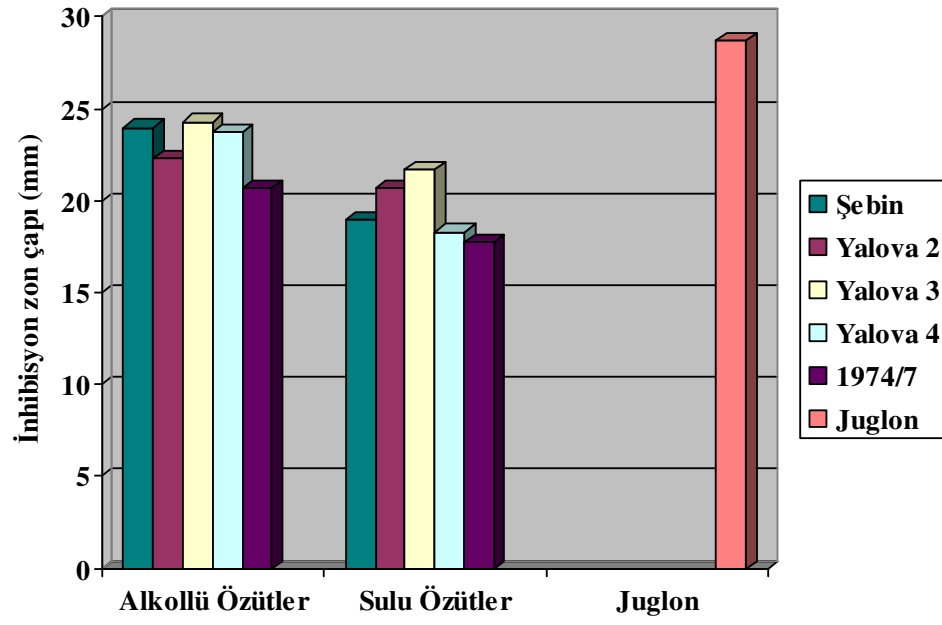
Çizelgedeki değerler mm olarak ölçülen inhibisyon zon çaplarıdır. Rakamın yüksek olması inhibisyonun yüksekliğini göstermektedir. Juglon allelokimyasalı kontrol olarak kullanılmıştır. Zon çapı 14 mm den küçük ise dirençli, 15-16 mm arasında ise az duyarlı, 17 mm büyük ise funguslar duyarlı olarak kabul edilmişlerdir (Çetin 1973).



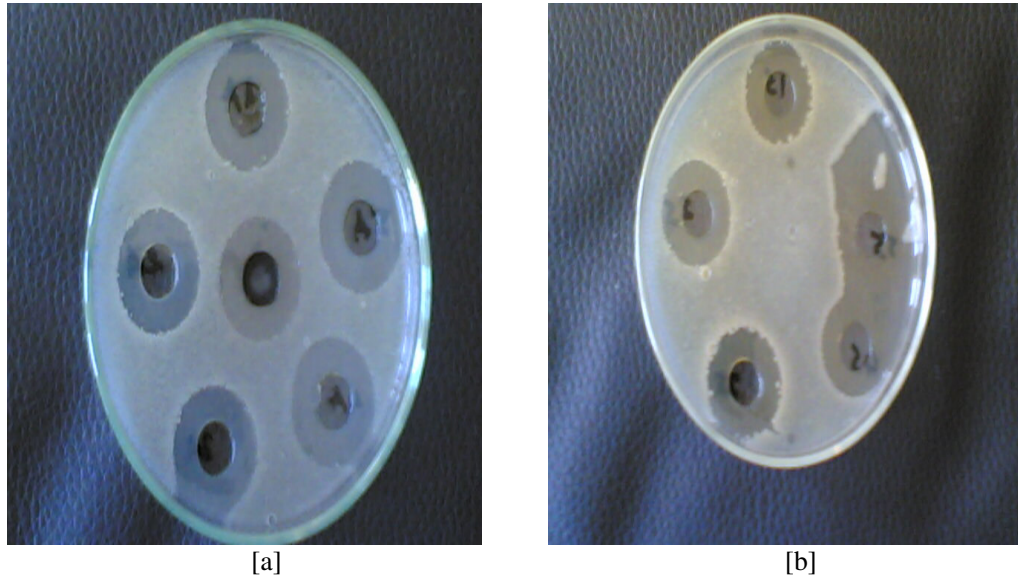
Şekil 3.6. Ceviz özütleri ve juglonun *G. candidum* fungusu üzerine etkileri



Şekil 3.7. Ceviz özütleri ve juglonun *G. candidum* fungusu üzerine etkisinin genel görünüşü [a] Alkollü özütler (kenarda) ve juglon (ortada) [b] Sulu özütler.

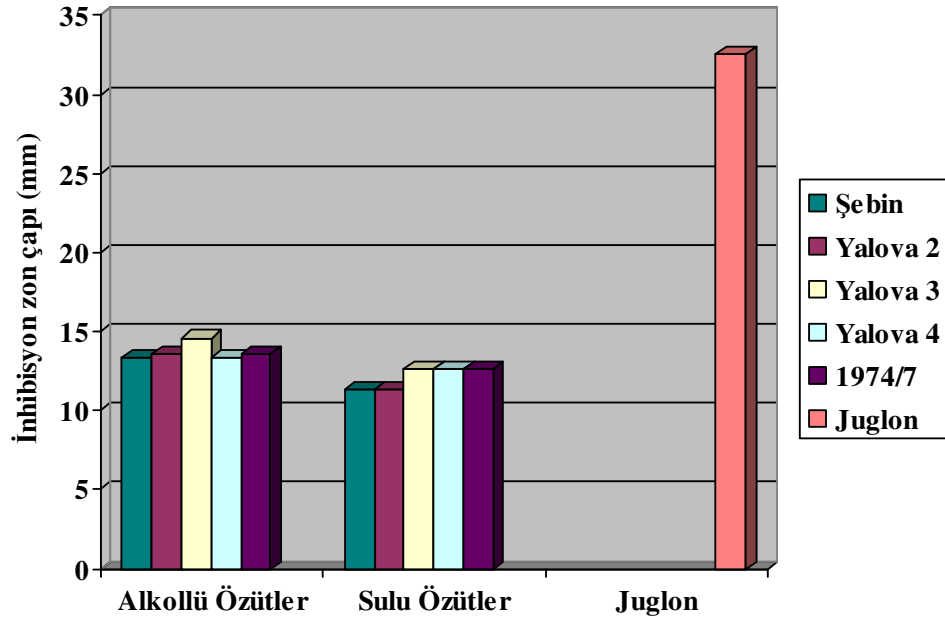


Şekil 3.8. Ceviz özütlерinin ve juglonun *C. albicans* üzerine etkisi

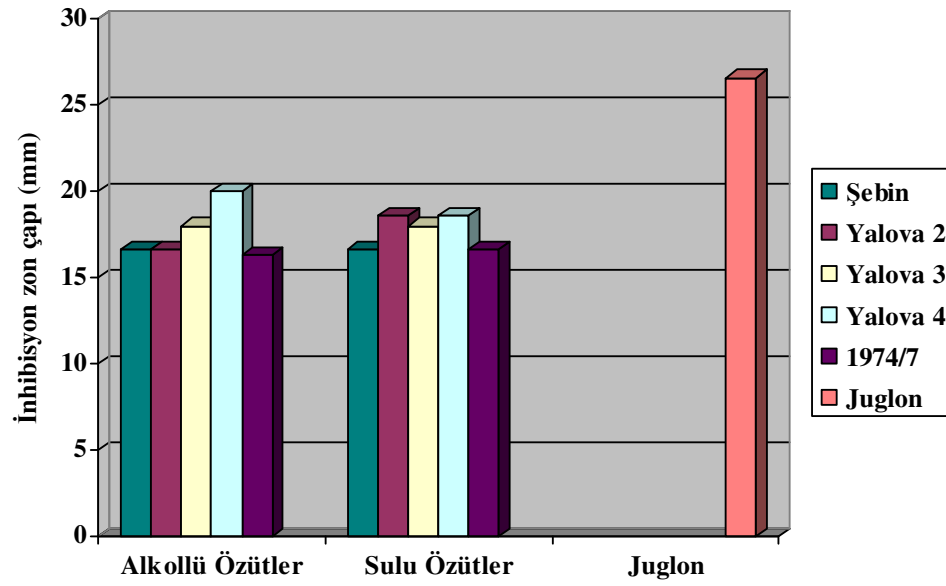


Şekil 3.9. Ceviz özütlерinin ve juglonun *C. albicans* üzerine etkisi

[a] Alkollü özütlr (kenarda) ve juglon (ortada) [b] Sulu özütlr.



Şekil 3.10. Ceviz özütlerinin ve juglonun *A. flavus* üzerine etkisi



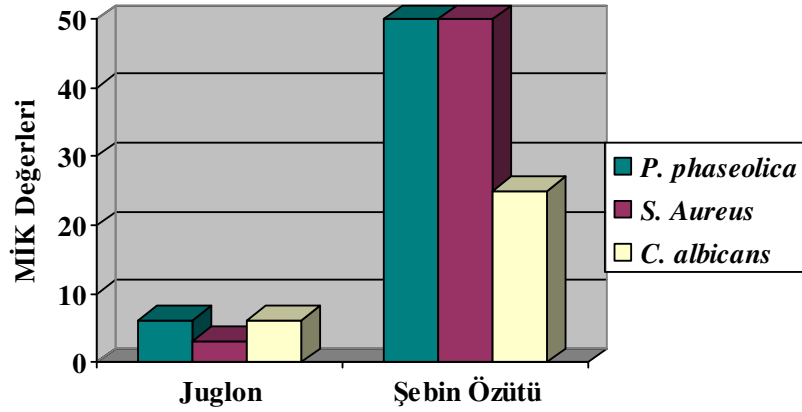
Şekil 3.11. Ceviz özütlerinin ve juglonun *B. cinerea* üzerine etkisi

3.4. Ceviz Özütleri ve Juglon'un MİK Değerleri

Juglon ve Şebın varyetesinden elde edilen özütün MİK değerleri Çizelge 3.3 de verilmiştir. Çalışmada, Şebın özütü ve juglon allelokimyasalının 2 bakteri ve bir fungus türüne ait MİK değerleri tespit edilmiştir.

Çizelge 3.3. Juglon ve Şebın özütünün mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği minimum konsantrasyon değerleri (MİK)

MİKROORGANİZMALAR	JUGLON (µg/ml)	ŞEBİN ÖZÜTÜ (µg/ml)
<i>Pseudomonas phaseolica</i> (Bakteri)	6.250	50
<i>Staphylococcus aureus</i> (Bakteri)	6.250	50
<i>Candida albicans</i> (Fungus)	3.125	25



Şekil 3.12. Juglon ve Şebın özütünün mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon gösterdiği minimum konsantrasyon değerleri (MİK).

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, ceviz özütlerinin ve juglon allelokimyasalının bazı bakteri ve fungus türleri üzerinde inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Hem juglon hem de ceviz yaprak özütleri kullandığımız bakterilerin yarısında ve fungus türlerinin ise tamamında büyüme ve üremelerini engelleyici bir etki göstermişlerdir. Allelokimyasal maddelerin gerek bitkiler gerekse mikroorganizmalar üzerinde çoğunlukla inhibisyon etkisi yaptığı, nadiren de olsa büyümeyi teşvik edici etki gösterdiği bilinmektedir [2,3,4]. Bu durum allelokimyasal maddenin çeşidine, konsantrasyonuna ve mikroorganizmanın türüne göre değişmektedir. Çalışmamızda kullandığımız ceviz özütleri ve juglon allelokimyasalı kullandığımız mikroorganizmalar üzerinde genelde inhibisyon etkisi göstermiş veya hiçbir etki göstermemiş, ancak hiç birisinde olumlu etki gözükmemiştir. Juglon ve ceviz özütlerinin kullandığımız mikroorganizmalar üzerinde olumlu etki gösterdiğine dair literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda da juglonun ve ceviz özütlerinin değişik konsantrasyonlarda uygulanması sonucu antifungal ve antibakteriyel aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir. Krajci ve Lynch yaptıkları çalışmada juglon ve ceviz özütlerini çeşitli konsantrasyonlarda uygulamış (1,0 - 0,0156 mg/ml aralığında), kullandıkları bütün mikroorganizmalarda juglonun ve ceviz özütünün inhibisyon etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir [25]. Çalışmamızda ise ceviz yapraklarından hazırladığımız alkollü özütleri ve juglonu 0,1mg/ml, sulu özütleri ise 0,05 mg/ml olacak şekilde kullanarak inhibisyon etkisi tespit edilmiştir. İki çalışma arasındaki farklılık kullanılan konsantrasyonların farklılığından kaynaklanabilir. Adulaziz M.Alkhawajah yaptığı çalışmada dietil eterle hazırlanan ceviz (*Juglans regia* L.) özütlerini çeşitli konsantrasyonlarda, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus aeruginosa*, *Streptococcus mutans* ve *Candida albicans* türleri üzerinde antibakteriyel ve antifungal etkileri tespit etmiştir. *Salmonella typhimurium* bakterisi üzerinde inhibisyon etkisi görülmemiştir [29]. Araştırmamızda *S. typhimurium*, *E. coli*, *C. albicans* türleri kullanılmıştır. *C. albicans* ve *S. typhimurium* türlerinde benzer sonuçlara rastlanılmıştır, fakat *E.coli* türünde çalışmamızda hiçbir etki görülmemiştir. Bunun sebebi olarak da kullanılan ceviz özütündeki konsantrasyon farkı ve çözücü olarak kullanılan maddelerdeki farklılıktan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sedigheh Mehrabian ve arkadaşları, bazı havasal mikroorganizmalar üzerinde üç bitkinin (*Rubia tinctorium*, *Carthamus tinctorius*, *Juglans regia*) antimikrobiyal etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmada, üç bitkiden su, metanol ve kloroform ile hazırladıkları özütleri, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. mycoides* bakteri türleri ve *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* ve *Geotrichum candidum* fungus türleri üzerine uygulamıştır. Özütleri 200 µg/ml uygulamış ve kloroformik ve sulu özütler en az antimikrobiyal etkiyi

göstermiştir [32]. Çalışmamızda da genel olarak, sulu özütler alkollü özütlerle oranla daha az etki göstermiştir. G.H. Shahidi Bonjar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, İran'ın güneydoğusunda yetişen tıbbi bitkilerin antibakteriyel ve antifungal etkilerini araştırmıştır ve ceviz (*Juglans regia* L.) çiçek kısmından metanolle hazırlanan özütler *Bacillus pumilis* türünde 10 mm, *S. aureus* türünde 9 mm ve *B. cereus* türünde ise 9 mm inhibisyon zonu göstermiştir [38]. Çalışmamızda ceviz yaprak özütlerini kullandık, *S. aureus* bakterisi üzerinde 9 mm den daha yüksek zon çapları belirlenmiştir. Adı geçen çalışmada ise çiçek özütlerinin kullanılmış olması, yaprağa göre çiçekte daha az juglon bulunduğuna işaret edebilir.

Alice M. Clark ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, juglon ve ticari fungal ve bakteriyel ajanların inhibisyon etkilerini araştırmışlar ve MİK değerlerini belirlemişlerdir. *S. aureus* bakterisi için 12,5 µg/ ml, *C. albicans* fungusu içinse 0.78 µg/ ml olarak MİK değerlerini bulmuşlardır [26]. Bizim çalışmamızda juglonun *S.aureus* için 3,125 µg/ ml, *Candida albicans* içinse, 6.25 µg/ ml olarak tespit edilmiştir. MİK değerleri arasındaki farklılık deneyde kullanılan bakteri strainine ve deneyin yapılış koşullarından kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda kullandığımız *Pseudomonas gingeri* ve *P. phaseolica* bakteri türleri bitki patojeni bakterilerdir. Juglon ve ceviz özütlerinin bu bakteriler üzerinde inhibisyon etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmamızda *P. phaseolica* türü için belirlenen Şebn özütünün ve juglonun MİK değerlerine ilişkin verilere daha önce literatürde rastlanmamıştır. MİK değerleri karşılaştırıldığında juglon allelokimyasalının özüte göre on kat daha düşük bir konsantrasyonda *P. phaseolica* bakterisini inhibe etmiştir. *C. albicans* fungusuna karşı ise, özüt etkisi juglonla mukayese edildiğinde arada yedi kat civarında bir konsantrasyon farkı vardır. Dolayısı ile ceviz özütü juglonla kıyaslandığında juglon allelokimyasalı daha düşük konsantrasyonlarda hem bakteriler hem de funguslar üzerinde etkili olmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızda ceviz özütlerinin ve juglonun bakteriler ve funguslar üzerinde antibakteriyel ve antifungal etkileri tespit edilmiştir. Bakterilerden ziyade funguslar üzerinde daha etkili sonuçlar elde edilmiştir. Bazı bakterilerin dirençli olması, allelokimyasalların tipik özelliklerinden birisidir. Bu çalışmada kullanılan *Ps. gingeri*, *Ps. phaseolica*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Y. enterocolitica*, bakteri türleri juglona duyarlı bulunmuştur. Bu bakteriler aynı zamanda ceviz özütlerine karşı da duyarlı yada az duyarlı bulunmuştur. Dolayısı ile juglon veya ceviz özütleri gelecekte yapılacak daha geniş çaplı araştırmalarla bu bakterilerin sebep olduğu hastalıklar ile mücadelede biyolojik kökenli bir ilaç olarak kullanılabilir. Aynı şekilde juglon ve ceviz yaprak özütlerinin geniş spektrumlu antifungal etki göstermesi sebebiyle gelecekte yapılacak ileri bir araştırmayla fungus ilacı (fungusit) olarak

kullanılma potansiyeline sahip olduğu anlaşılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Rice, E.L., 1979, Allelopathy-an update, The Botanical Review, 45, 15-109.
2. Hale, M.G. and Orcutt., D.M., 1987, The physiology of plants under stress, Blacksburg, Virginia, USA, 206p.
3. Rizvi., S.J.H. and Rizvi., V., 1992, Allelopathy, Chapman and Hall, New York, USA, 480p.
4. Rice, E.L., 1984, Allelopathy, Academic Press, New York.
5. Rietveld., W.J., 1983, Allelopathic effect of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species, Journal of Chemical Ecology, 9, 2,
6. Tekintaş, E., Tanrısever, A., Mendilcioğlu, K., İnal, A., 1988, Juglon'un tohum çimlenmesine etkileri üzerine bir araştırma, E.Ü. Ziraat Fak. Der., 25, 2, 200-213.
7. Daglish, C., 1950, The identification of the 'apparent vitamin C' of the walnut (*Juglans regia*) with hydrojuglone glucoside, Biochemicals Journal., 047 (462-466).
8. Whittaker, R.H. and Feeny, P.P., 1971, Allelochemicals: Chemicals interactions between species, Science, 171, 757-771.
9. Tukey, H. B. and Mecklenburg, R. A., 1964, Influence of Foliar Leaching on Root Uptake and Translocation of Calcium-45 to the Stems and Foliage of *Phaseolus vulgaris*, Plant Physiology, 39(4): 533-536.
10. Akça, Y., 2005, Ceviz Yetiştiriciliği, Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Yayın Dairesi Başkanlığı Matbaası, Ankara.
11. Ölez, H., 1971, Marmara Bölgesi Cevizlerinin (*Juglans regia* L) Seleksiyon Yolu İle Islahı Üzerinde Araştırmalar, Doktora tezi, s:12.
12. İnal, S, 1946,Ceviz Ağacı İktisadi önemi ve yetiştirilmesi (Frankhase' den çeviri), Türkiye Ormancıları Cemiyeti, Yayın No:1.
13. Kocaçalışkan, İ. Ve Terzi, İ., 2001, Allelopathic effects of wallnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth, Journal Hortical Science Biotechnology, 76, 436-440.

KAYNAKLAR DİZİNİ Devamı

14. Funk., D.T., Case, P.J., Rietveld, W.J. and Plares, R.E., 1979, Effects of juglone on the growth of coniferus seedlings, Forest Science, 25, 452-454.
15. Seguira-Aguilar, J., Hakman, J., Rydstorm, J., 1992, The effect of 5 OH-1,4 naphthoquinone on Norway spruce seeds during germination, Plant Physiology., 203, 191-197.
16. Bettina, S., Leopold, D.J. and Walton, D.C., 1990, Seasonal patterns of juglone in soil beneath *Juglans nigra* (Black walnut) and influence of *J. nigra* on understory vegetation, Journal Chemical Ecology., 16, 1111-1130.
17. Piedrahita, O., 1984, Black walnut toxicity, Factsheet, 11, 7-8.
18. Pratavera, A.G., Kuniyuki, A.H. and Ryugo, K., 1983, Growth inhibitors in xylem exudates of Persian walnuts (*Juglans regia* L.) and their possible role in graft failure, J. American Social Hortical Science, 108(6), 1043-1046.
19. Eriş, A., Barut, E., 1989, Cevizlerde (*Juglans regia* L.) kanamanın şiddetinin değişimi üzerine bir araştırma, Bahçe, 18(1-2), 3-7.
20. Köeppe, D.E., 1972, Some reactions of isolated corn mitochondria influenced by juglone, Physiol Plant, 27, 89-94.
21. Neave, I.A. and Dawson J.O., 1989, Juglone reduces growth, nitrogenease activity and root respiration of actinorhizal black alder seedlings, Journal of Chemical Ecology, 15, 1823-1836.
22. Ponder, F.Jr. and Tadros S.H., 1985, Juglone concentration in soil beneath black walnut interplanted with nitrogen-fixing spesicies, Journal of Chemical Ecology, 11, 7, 937-941.
23. Hejl, A.M. and Koster, K.L., 2004, Juglone disrupts root plasma membrane H⁺-ATPase activity and impairs water uptake, root respiration, and growth in soy bean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*), Journal of Chemical Ecology, 30, 2, 453-471.
24. Krajci, W.M. and Lyncnh, D.L., 1978, The inhibition of various microorganisms by crude walnut hull extracts and Juglone. Microbios Letters. 4, 175-181.
25. Clark, A.m., Jurgens, T.M. and Hufford, C.D., 1990, Antimicrobial activity of juglone, Phytotherapy Research, 4, 1.

KAYNAKLAR DİZİNİ Devamı

26. Didry N., Dubreuil L., Pinkas M., 1994, Antimicrobial activity of anthraquinonic and naphthoquinonic compounds on oral bacteria, *Pharmazie*, 49, 681-683.
27. Akhtar, M.A., Rahber-Bhatti, M.H and Aslam, M., 1997, Antibacterial activity of plant diffusate against *Xanthomonas campestris pv. citri*, *International Journal of Pest Management*, 43(2), 149-153.
28. Alkhawajah, A.M., 1997, Studies on the antimicrobial activity of *Juglans regia*, *American Journal of Chinese Medicine*, Vol. XXV, No. 2 : 175-180.
29. Ali-Stayeh, M.S. and Abu Ghdeib, S.I., 1999, Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes, *Mycoses*, 42, 665-672.
30. Shahla, M., 1999, Inhibition of *Staphylococcus aureus* mediated by extracts of Iranian plants, *Pharmaceutical Biology*, 37, 5, 375-377.
31. Mehrabian, S., Majd, A. and Majd, I., Antimicrobial effects of three plants (*Rubia tinctorum*, *Carthamus tinctorius* and *Juglans regia*) on some airborne microorganisms, *Aerobiologia*, 16, 455-458.
32. Hadacek, F. and Harald, G., 2000, Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice, *Phytochemical Analysis*, 11, 137-147.
33. Omar, S., Lemonnier, B., Jones., Ficker., Smith, M.L., Nema, C., Towers, G.H.N., Goel, K. and Arnason, J.T., 2000 Antimicrobial activity of extracts of eastern North american hardwood trees and relation to traditional medicine, *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 161-170.
34. Lopez A., Hudson., J.B. and Towers G.H.N., 2001, Antiviral and antimicrobial activities of Colombian plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 189-196.
35. Mouhajir, F., Hudson, J.B., Rejdali, M. and Towers G.H.N., 2001, Multiple antiviral activities of medicinal plants used by berber peoples of Morocco, *Pharmaceutical Biology*, 39, 5, 364-374.
36. Arora, S., Kaur, K. and Kaur, S., 2003, Indian medicinal plants as a reservoir of protective phytochemicals, *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis Supplement*, 1, 295-300.

KAYNAKLAR DİZİNİ Devamı

37. Shahidi-Bonjar, G.H., Aghighi, S., Karimi-Nik, A., 2004, Antibacterial and Antifungal survey in plants used in Indegenous Herbal-Medicine of South East Regions of Iran, Journal of Biological Sciences, 4, 3, 405-412.
38. National Committee for Clinical Laboratory Standards, (NCCLS) 1990, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard (M2-A4), National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
39. Ay, M., 1998, Organik kimyada araştırma teknikleri, A.Ü. F.F. Döner sermaye İşletmesi Yayınları, No ,53.
40. Erdik, E., Obah, M., Yüksekışık, N., Öktemer, A., Pekel, T., İhsanoğlu, E., 1997, Denel Organik Kimya A.Ü.F.F. Döner Sermaye İşletmesi Yayınları No, 44 Ankara.
41. Gündüz, T., 1997, İstrümental Analiz A.Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü Bilge Yayıncılık, Ankara.