



Doğal Kaynaklardan Yeni Antimikrobiyal Madde Tarama Yöntemleri

Fatih Ahmet KORKAK^{1, a}
Zeliha KESKİN ALKAÇ^{1, b}
Sadettin TANYILDIZI^{1, c}
Gürdal DAĞOĞLU^{1, d}

¹ Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Farmakoloji ve Toksikoloji
Ana Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-0857-8654

^b ORCID: 0000-0003-4914-3152

^c ORCID: 0000-0001-7012-5392

^d ORCID: 0000-0002-0137-5934

Antibiyotikler, Bacillaceae, Actinomycetales, Streptomyces gibi bazı mikroorganizmalar tarafından çok basamaklı biyosentetik yollar ile üretilen sekonder metabolitler olup mikroorganizmalar için bir savunma özelliği ve hayatta kalma mekanizması olarak nitelendirilmektedir. Bu nedenle insan ve hayvan sağlığında bakteriyel hastalıklarla mücadelede önemli bir yere sahiptir.

Antibiyotikler geçmişten günümüze bakteriyel hastalıkların sağaltımında önemli bir yer tutmasına rağmen toplum tarafından bu ilaçlar önemsenmemiş ve bilinçsizce kullanılmıştır. Antibiyotiklerin başlıca insan hekimliği, veteriner hekimlik ve çevre gibi alanlarda fazla ve yanlış kullanımı, kalıntı sürelerinin takipsizliği ve çevresel bulaşma ciddi bir şekilde artan antimikrobiyal direnç ve buna bağlı olarak antibiyotiklere dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Antimikrobiyal direnç dünya çapında insan ve hayvan sağlığını tehdit eden en önemli sorunlardan biri haline gelmiştir.

Tarihsel olarak, son 40 yılda üretilen antibakteriyellerin yaklaşık %60'ı doğal kaynaklardan türetilmiştir. Var olan antibiyotiklerden sentetik olarak üretilen yeni moleküller daha çok önümüzdeki birkaç yıl için etkinliğini korurken, mikrobiyal doğal ürünlerden keşfedilmeyi bekleyen yeni moleküllerin antimikrobiyal direnç sorununu azaltacağı öngörülmektedir.

Bu derlemede doğal kaynaklardan yeni antimikrobiyal maddelerin tespit edilmesi ve tanımlanmasında kullanılan yöntemler hakkında genel bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik, mikrobiyal doğal ürünler, antimikrobiyal direnç

New Antimicrobial Substance Screening Methods from Natural Sources

Antibiotics, are the secondary metabolites produced by some microorganisms such as Bacillaceae, Actinomycetales, Streptomyces etc. via multi-step biosynthetic pathways and are characterized as a defense feature and survival mechanism for microorganisms. For this reason, they have an important place in combating against bacterial diseases in human and animal health.

Although antibiotics have an important place in the treatment of bacterial diseases from past to present, these drugs have been ignored and used unconsciously by the society. The overuse and misuse of antibiotics, mainly in human medicine, veterinary medicine and the environment, the lack of follow-up of the residual periods and environmental contamination have led to the emergence of bacteria resistant to antibiotics, which significantly increases antimicrobial resistance. Antimicrobial resistance has become one of the most important problems threatening human and animal health worldwide.

Historically, about 60% of antibacterials produced in the last 40 years have been derived from natural sources. While new molecules produced synthetically from existing antibiotics will maintain their effectiveness for the next few years, it is predicted that new molecules waiting to be discovered from microbial natural products will reduce the antimicrobial resistance problem.

In this review, it is aimed to give general information about the methods used in the detection and identification of new antimicrobial substances from natural sources.

Key Words: Antibiotic, microbial natural products, antimicrobial resistance

Geliş Tarihi : 06.07.2022

Kabul Tarihi : 12.08.2022

Yazışma Adresi Correspondence

Fatih Ahmet KORKAK
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Farmakoloji ve Toksikoloji
Ana Bilim Dalı
Elazığ – TÜRKİYE

fakorkak@firat.edu.tr

1.Giriş

Antibiyotikler, Bacillaceae, Actinomycetales, Streptomyces vb. bazı mikroorganizmalar tarafından çok basamaklı biyosentetik yollar ile üretilen sekonder metabolitler olup mikroorganizmalar için bir savunma özelliği ve hayatta kalma mekanizması olarak nitelendirilmektedir (1). Bakteriyel hastalıklar 19. yüzyılın ortalarına kadar ciddi mortalite ve morbiditeye sahip iken antibiyotiklerin keşfi bu etkilerde önemli düşüşler sağlayarak modern tıbbın temelini oluşturmuştur (2).

Antibiyotikler geçmişten günümüze bakteriyel hastalıkların sağaltımında önemli bir yer tutmasına rağmen toplum tarafından bu ilaçlar önemsenmemiş ve bilinçsizce kullanılmıştır (3). Antibiyotiklerin başlıca insan hekimliği, veteriner hekimlik ve çevre gibi alanlarda fazla ve yanlış kullanımı, kalıntı sürelerinin takipsizliği ve çevresel bulaşma ciddi bir şekilde artan antimikrobiyal direnç ve buna bağlı olarak antibiyotiklere dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına yol açmıştır (4-8). Bu durum her geçen gün etkili antibiyotik sayısının azalmasına ve dirençli patojen bakterilerin sayısında da artmaya sebep olmuştur (9, 10).

Antimikrobiyal direnç (AMR) dünya çapında insan ve hayvan sağlığını tehdit eden en önemli sorunlardan biri haline gelmiştir (11). Öyle ki ilaca dirençli patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlardan kaynaklı dünyada her yıl en az 700.000 kişinin öldüğü tahmin edilmekte ve antimikrobiyal direnç ele alınmadığı taktirde bu sayının 2050 yılına kadar 10 milyona çıkabileceği öngörülmektedir (12). Günümüzde antibiyotiğe dirençli patojenlerin neden olduğu ciddi enfeksiyonlar artık mevcut tedavilere yanıt vermemekle beraber kullanılan antibiyotiklere karşı direnç de geliştirebilmektedir (10). 2019 yılının sonlarında ortaya çıkan ve milyonlarca insanın ölümüne sebep olan COVID-19 pandemisi birçok sorunu da beraberinde getirmiştir (13). Bu sorunlardan belki de en önemlisi, özellikle hastanede yatan ve bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda gözlenen, genellikle çoklu ilaca dirençli patojenlerle ilişkili yüksek sayıda ikincil enfeksiyonlardır (14). COVID-19 tedavisinde antibiyotiklerin yoğun bir şekilde kullanılmasının (15, 16) var olan AMR'in daha da yayılmasına neden olabileceği bildirilmiştir (17, 18). Antibiyotik direncinin büyümesi ve tedavi seçeneklerinin hızla tükeniyor olmasının yakın gelecekte büyük olasılıkla daha fazla olumsuz klinik, ekonomik ve toplumsal sonuçları olacaktır (19, 20). Bu duruma karşı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2017 yılında yeni antibiyotik geliştirilmesi gereken antibiyotiğe dirençli patojenler listesi yayınlamış ve bu liste Tablo 1'de sunulmuştur (21).

Tablo 1. DSÖ'nde yayınlanan dirençli patojenler (21).

Öncelik Durumu	Kritik	Yüksek	Orta
Dirençli Patojenler	~ <i>Acinetobacter baumannii</i> , karbapenem dirençli ~ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , karbapenem dirençli ~ <i>Enterobacteriaceae</i> , karbapenem dirençli,	~ <i>Enterococcus faecium</i> , vankomisine dirençli ~ <i>Staphylococcus aureus</i> , metisiline dirençli, vankomisine orta ve dirençli ~ <i>Helicobacter pylori</i> , klantromisine dirençli ~ <i>Campylobacter</i> spp., florokinolon dirençli ~ <i>Salmonellae</i> , florokinolon dirençli ~ <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , sefalosporin dirençli, florokinolon dirençli	~ <i>Streptococcus pneumoniae</i> , penisiline duyarlı olmayan ~ <i>Haemophilus influenzae</i> , ampisiline dirençli ~ <i>Shigella</i> spp., florokinolon dirençli

Artan bu klinik ihtiyaca rağmen, yanlış ekonomik modeller nedeniyle büyük ilaç şirketlerinin antibiyotik araştırmalarından çekilmesi, piyasaya yeni antibiyotik sınıflarının ulaşmaması ile sonuçlanmış, antibiyotik keşfi akademik ve küçük biyoteknoloji şirketleri tarafından araştırılmaya bırakılmıştır (22). Ancak yetersiz finansman kaynağı nedeniyle araştırmalar sonuçsuz kalmaktadır (23).

Tarihsel olarak, son 40 yılda üretilen antibakteriyellerin yaklaşık %60'ı doğal kaynaklardan türetilmiştir (24). Var olan antibiyotiklerden sentetik olarak üretilen yeni moleküller daha çok önümüzdeki birkaç yıl için etkinliğini korurken, mikrobiyal doğal ürünlerden keşfedilmeyi bekleyen yeni moleküllerin AMR sorununu azaltacağı öngörülmektedir (25).

Bu derlemede doğal kaynaklardan yeni antimikrobiyal maddelerin tespit edilmesi ve tanımlanmasında kullanılan yöntemler hakkında genel bilgi verilmiştir.

2. Antimikrobiyal Etken Madde Tarama Yöntemleri

2.1. Örneklerin Toplanması, Birincil Tarama ve İdentifikasyonu

Bitki, su, toprak ve hayvanlardan alınan örnekler su, sıcak su, damıtılmış su, metanol, %0.9 NaCl izotonik, aseton, kloroform gibi çeşitli çözeltilerde çözündürülür, karıştırılır, tortunun çökmesi beklenir ve süpernatant kısım birincil tarama için alınır (26-29).

Birincil tarama için daha önceden mikroorganizma ekilen farklı besi yerlerine (Nutrient Agar, LB Broth Agar, Actinomycete Isolation Agar, Potato Dextrose Agar ve Sabouraud-2 % Glucose Agar gibi) numunenin (süpernatant) belirli bir miktarda ekimi yapılır ve her biri birbirinden farklı sıcaklıklarda (28 °C, 35 °C veya 50 °C) inkübasyona bırakılır (3). İnkübasyon bittikten sonra, çevresinde temiz alan oluşturan mikroorganizmalar seçilir (29, 30).

Belirlenen mikroorganizmaların izolasyon, tanı ve identifikasyonu ise temel mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak yapılır (31).

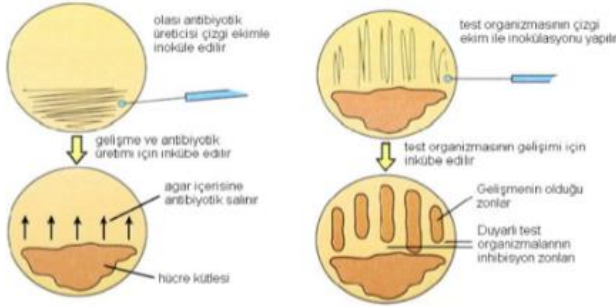
2.2. İkincil Tarama

Birincil tarama sonucu seçilen mikroorganizmaların antimikrobiyal aktiviteleri test mikroorganizmaları kullanılarak çoğunlukla çapraz çizgi metodu ile belirlenir (29). Antimikrobiyal aktivite tayini için *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi çeşitli test mikroorganizmaları kullanılır (30).

2.2.1. Çapraz-Çizgi Yöntemi (Cross-Streak)

Çapraz-çizgi (cross-streak) metodu yeni mikrobiyal izolatlardan antibiyotik taramak amacıyla ilk defa Sir Alexander Fleming tarafından kullanılmıştır. Bu yöntemde göre olası antibiyotik üreticisi olan organizma petri kabının yarısından az bir kısmını kaplayacak şekilde ekilir ve belirli bir sıcaklıkta inkübe edilir. Yeterli büyüme oluştuktan sonra sıvı besi yerinde geliştirilmiş olan test bakterileri olası antibiyotik üreticisi olan bakteri hücre kütesine dikey olacak şekilde öze ile çizgi ekim yapılarak inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda ortaya çıkan inhibisyon zonları test bakterilerinin üreyemediğini ve bu da bakterinin etkili bir antibiyotik ürettiğini göstermektedir (Şekil 1) (32).

Bu yöntemle inhibisyon zonu oluşturan mikroorganizmalar antimikrobiyal aktivite tayini için seçilir (29).



Şekil 1. Çapraz – çizgi yöntemi (32)

2.3. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Antimikrobiyal aktivite tayini, inhibisyon zonu oluşturan mikroorganizmaların etkinliklerini belirlemek amacıyla kullanılır. Antimikrobiyal aktivite tayini için çeşitli in vitro yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin amacı maddenin antimikrobiyal etkisinin olup olmadığı, var ise minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve mikroorganizma spektrumu belirlenir. Antimikrobiyal aktivite testleri içinde en uygun yöntemi seçmek önemlidir. Yöntemin seçiminde; maddelerin miktarı, sayısı, çözünürlüğü ayrıca kullanılacak mikroorganizmanın yoğunluğu, özelliği ve cinsi rol oynar ve en önemlisi sonuçların tekrarlanabilir ve güvenilir olması gereklidir (33). Antimikrobiyal aktivite testlerinin değerlendirilmesinde yaygın şekilde Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) standartları kullanılmaktadır (34). Antimikrobiyal aktivite testleri bu standarda göre bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı in vitro etkinliğini tespit etmek amacıyla uygulanan testlerdir. Bu testler içerisinde en çok difüzyon, dilüsyon ve epsilometre testi (Etest) olmak üzere üç yöntemden yararlanılmaktadır (34).

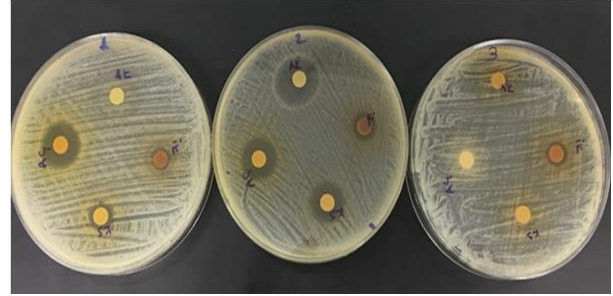
2.3.1. Difüzyon Yöntemleri

2.3.1.1. Disk Difüzyon Testi

Disk difüzyon testi laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılığının tespitinde en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntemin en önemli avantajı uygulaması kolay ve ucuz olmasıdır. Kirby-Bauer tarafından geliştirilmiş olduğundan bu isimlerle de anılmaktadır (35). Test, kağıt olan disklere emdirilen antibiyotiğin, daha önceden duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besi yerine difüze olması temeline dayanmaktadır. Bu amaçla; miktarları belirli antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test için kullanılacak olan mikroorganizmanın inoküle edildiği katı besi yerlerine yerleştirilirler. Bir süre sonra diskler çözünüp besi yerine doğru difüze olurken, inoküle edilen mikroorganizma da çoğalmaya başlar. İnkübasyondan sonra diskin çevresinde mikroorganizma üretmesi görülmez. Diske emdirilen madde mikroorganizmaya ne kadar duyarlı ise etrafında oluşan inhibisyon zonu o kadar geniş olacaktır. İnhibisyon zonu

ölçülerek (çapı mm şeklinde ölçülerek), standart zon tablolarına göre karşılaştırmalar yapılır ve test mikroorganizmasına karşı hali hazırda kullanılan antibiyotiklere karşı etkinlik durumu belirlenir (Şekil 2) (36).

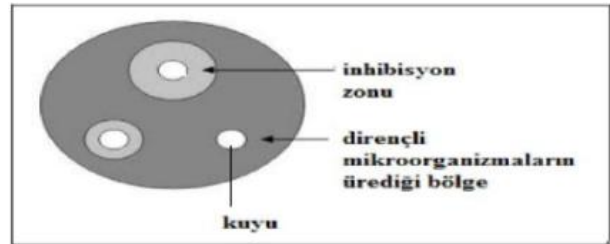
Bakteriyostatik ve bakterisidal etkiler bu yöntemle ayırt edilemez. Besi yeri olarak genellikle Mueller Hinton, Nutrient agar, Tryptone Soya agar vb. kullanılır. Disk difüzyon testi bize "kalitatif" sonuçlar sağlar ve MİK hesaplaması mümkün değildir (33). Duyarlılık kategorileri şeklinde sonuçlar verir ve organizmalar, test edilen antimikrobiyal bileşiğe duyarlı, orta veya dirençli olarak kategorize edilir (37).



Şekil 2. %50 lik ethanol ekstratlarının disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenen inhibisyon alanları (mm). 1; *Staphylococcus aureus*, 2; *Escherichia coli*, 3; *Bacillus subtilis* (36)

2.3.1.2. Agar Kuyu Difüzyon Testi

Şekil 3'de gösterildiği gibi agar kuyu difüzyon yönteminde test mikroorganizmalarının bulunduğu agar plakları yüzeyine steril kuyucuklar açılır. Antibiyotik numuneleri kuyucuklara belirli miktarda etrafa taşmayacak şekilde doldurulur. Daha sonra kuyulardaki antibiyotik agar içersine yayılır ve test mikroorganizmasına etkili olduğu düzeylerde üremeyi durdurur. Böylece, Şekil 3'de görüldüğü gibi kuyucukların çevresinde test mikroorganizmalarının üremediği dairesel bir inhibisyon zonu oluşur (38).



Şekil 3. Agar kuyu difüzyon yöntemi (35)

2.3.2. Dilüsyon Yöntemleri

Dilüsyon yöntemleri numunenin suda homojen bir şekilde dağılmasını gerektiren tekniklerdir. Esas olarak bir ekstraktın uçucu yağın veya saf maddenin MİK değerlerini belirlemek için kullanılır (33). Antimikrobiyal aktivitenin ön taramasında kullanılabilirler. Dilüsyon yönteminde bulanıklık, bakteri yoğunluğunun bir

göstergesi olarak alınır. Büyüme olmadığında ise ortam berrak kalır (39).

Dilüsyon yöntemleri difüzyon tekniklerine göre daha küçük ekstrakt hacimleri için geliştirilmiş hassasiyet, kantitatif analiz ve test numunesinin bakteriyostatik ve bakterisidal etkilerini ayırt etme yeteneği gibi bazı avantajlar sunar. Bir dizi mikroorganizma için kullanılabilen ekonomik bir testtir ve oldukça tekrarlanabilir sonuçlar verir. Tüp dilüsyon ve agar dilüsyon yöntemi olmak üzere iki farklı dilüsyon testi vardır (37).

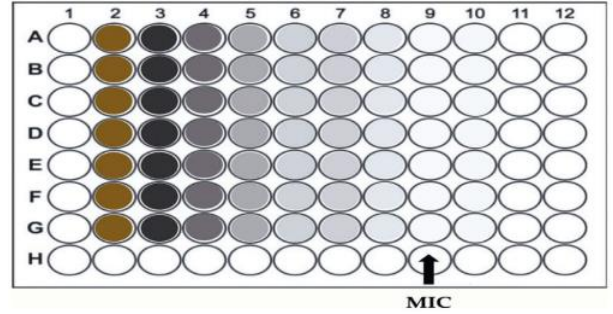
2.3.2.1. Tüp Dilüsyon Yöntemi

Antibiyotik duyarlılık testlerinin gerçekleştirilmesine yönelik geliştirilen tüp dilüsyon yöntemi, patojenik organizmalarla ilgili olarak minimum inhibitör konsantrasyonunu tanımlamak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ayrıca, agar difüzyon testindeki inhibisyon bölgesinin boyutu ile minimal inhibitör konsantrasyonlarını karşılaştırmak için bir referans olarak kullanılır (40). Ayrıca bu yöntem, bir antibiyotiğe direnç seviyelerini belirlemek için de kullanılır. Antibiyotikğin seri dilüsyonları, standart sayıda organizma ile aşılınmış ve öngörülen bir süre boyunca inkübe edilmiş sıvı bir ortamda yapılır. Bulanıklık görünümünü önleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu (en yüksek seyreltme), MİK olarak kabul edilir (41). Bu yöntemde çoğunlukla katyon (kalsiyum ve magnezyum) eklenmiş Mueller-Hinton buyyon besi yeri kullanılır (33). Test edilecek antimikrobiyal ajanlar özel çözücüler içinde hazırlanır ve ardından sıvı besi yerlerinde iki kat azalan sulandırılmalar yapılır. Daha sonra test mikroorganizması standart bir miktarda hazırlanıp, antimikrobiyal ajanların bulunduğu besi yerlerine eşit miktarlarda eklenir. Ayrıca sadece besi yeri konmuş bir tüp, besi yeri kontrolü olarak ve antimikrobiyal ajan katılmayan ancak test mikroorganizması eklenmiş bir besi yeri de kontrol amaçlı olarak hazırlanır (42). Besi yerleri bir gece 35°C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra test mikroorganizması üremesini gösteren bulanıklık yönünden incelenir. Test mikroorganizmasının üremesini önleyen ve gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu, MİK olarak değerlendirilir (Şekil 4) (43, 44).

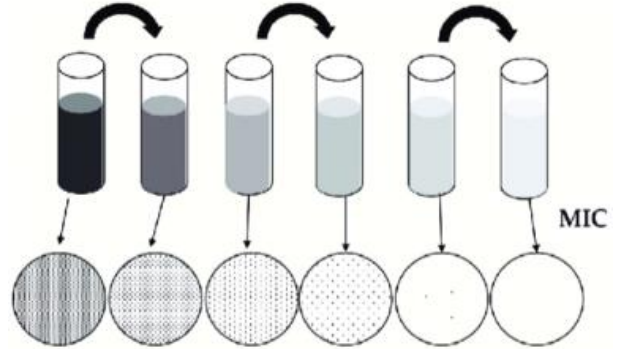
2.3.2.2. Agar Dilüsyon Yöntemi

Agar dilüsyon, ekstraktların antimikrobiyal potansiyelini araştırmak için iyi bilinen bir yöntemdir. Yaygın olarak yeni antimikrobiyal ajanların ve duyarlılık testi protokollerinin değerlendirilmesi için bir referans yöntem olarak kullanılır (45). Bu yöntemin prensipleri tüp dilüsyon yöntemiyle aynıdır. Aralarındaki tek fark antibiyotik sulandırılmalarının agar ile karıştırılarak petri plaklarına dökülmesidir. Böylece her plakta antibiyotikğin farklı konsantrasyonları bulunur. Bu yöntem için de tüp dilüsyonda olduğu gibi önerilen besi yeri Mueller-Hinton agardır (46). Agar dilüsyon yönteminde antimikrobiyal ajan, filtre ile sterilize edildikten sonra erimiş agar ortamına dahil edilir ve her plaka farklı bir konsantrasyonu içerir. Muller-Hinton agar, test için

kullanılan besi yerinin organizmalara ve bazı durumlarda test edilecek antibiyotiğe göre belirlenmesine rağmen yaygın olarak kullanılmaktadır (33). MİK, organizmanın büyümesini tamamen inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak okunur. Aşı veya tek bir koloninin neden olduğu hafif bir bulanıklık, büyüme olarak okunmamalıdır. Agar dilüsyon plakalarını hazırlamak için gereken işçilik ve nispeten kısa raf ömürleri bu yöntemin dezavantajlarıdır. Ek olarak, duyarlılık sonuçlarının manuel olarak değerlendirilmesi ve yorumlanması zaman alıcı olabilir (Şekil 5) (45).



Şekil 4. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi (44)



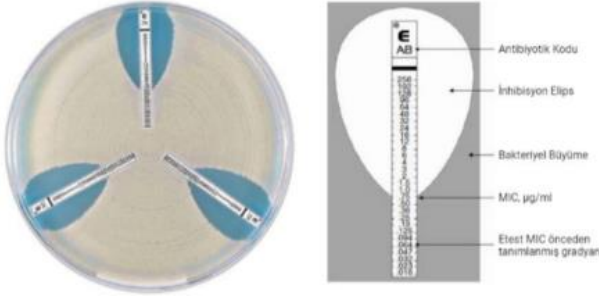
Şekil 5. Agar Dilüsyon Yöntemi (45)

2.3.3. Epsilometre Testi (Etest)

İsveç'te geliştirilmiş, hem disk difüzyon hem de agar dilüsyon yöntemlerinin prensiplerini birleştiren bir gradyan tekniği olan yenilikçi bir ticari antimikrobiyal duyarlılık testidir (46). İlk olarak, 1988'de Antimikrobiyal Ajanlar ve Kemoterapi (ICAAC) toplantısında sunulmuştur. Etest plastik şeritler, kuru formda antimikrobiyal konsantrasyon gradyanı ile emdirilir. Etest şeridinin üst yüzeyinin bir ölçüğü vardır; karşılık gelen bir MİK aralığında kalibre edilir. Test organizması ile aşılınmış agar plakasının yüzeyine yerleştirildiğinde, test şeridi üzerindeki antimikrobiyal, sürekli gradyan tarzında derhal plakaya aktarılır. Optimum inkübasyon süresinden sonra, antimikrobiyal aktivite, şerit etrafında inhibe edilmiş büyümenin bir elipsi olarak görülür. MİK değeri, elipsin ölçükle kesiştiği noktadan elde edilir. Çoğu laboratuvar ortamında yüksek oranda tekrarlanabilir sonuçlar verir (Şekil 6) (45).

2.4. Antimikrobiyal Etken Maddelerin Tanımlanması ve Tespiti

Elde edilen antimikrobiyal etken maddenin tanımlanması, kimliğinin, kimyasal ve moleküler yapısının belirlenmesi işlemleri ile ilgili birkaç yöntemden aşağıda kısaca bahsedilmiştir.



Şekil 6. Etest inhibisyon elipsinin kesişim noktasında MİK'yi organizmanın ve kalibre edilmiş şeridin büyümesi (45)

2.4.1. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Yöntemi

"Thin layer chromatography" yani ince tabaka kromatografisi (TLC) olarak bilinen yöntem çok kolay, hızlı ve maliyetinin az olması nedeniyle; maddelerin kalitatif analizleri, ayrılması ve bilinmeyen karışımların kaç bileşenden oluştuğunu tespit etmek için sıkça kullanılan bir yöntemdir (47).

Bu yöntemde madde önce katı bir yüzeye (alüminyum veya slika) ekilir ve uygun bir çözücü içine batırılır böylece çözücünün katı yüzey üzerinde ilerlemesi sağlanır. Çözücünün yüzey üzerinde ilerlemesiyle birlikte madde de ilerleyecektir (47). Bu basit yöntemle metabolitler kültürden kesilen küçük miselyum tıpasına bir damla çözücü damlatılarak ekstrakte edilir. Ardından tıpa ıslatılmış tarafı aşağı gelecek şekilde bir TLC plakasına birkaç saniye süreyle yerleştirilir ve daha sonra tıpa çıkarılır. Plaka yıkanır ve floresanla veya seçici püskürtmeden sonra ultraviyole (UV) ışığı altında görselleştirilir. Yöntem ilkel görünse de ilkel koşullar altında bile sınıflandırma, tanımlama ve metabolit tespiti için etkili olduğu kanıtlanmıştır (48).

2.4.2. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Yöntemi

Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) atom çekirdeğinin belirli manyetik özelliklerini kullanan bir araştırma tekniğidir (49). Nükleer manyetik rezonans olgusuna dayanan NMR spektroskopisi, içerisindeki atomun yapısı, reaksiyon durumu, dinamiği ve molekülün kimyasal yapısı hakkında ayrıntılı bilgi verir. Bu nedenle organik kimyada bilinmeyen maddelerin kimliğini doğrulamak için kullanılır (50). Doğal ürün ekstraktlarından bilinen veya istenmeyen bileşiklerin hızlı bir şekilde tanımlanması için kullanılır. Son birkaç yılda teknolojiye gelişmeler, sıvı kromatografi kütle spektrometrisi (LC-MS), LC-MS-MS, sıvı kromatografi nükleer manyetik rezonans (LC-NMR) gibi tandem analitik tekniklerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır.

LC-NMR, HPLC ayırma gücünü NMR üstün yapısal bilgi içeriğiyle birleştirir. Bu iki teknik geleneksel olarak ilgilenilen moleküllerin yapılarını izole etmek ve belirlemek için doğal ürün kimyagerleri tarafından kullanılan birincil cihazlar olmuştur (51). LC-NMR, LC-MS ile karşılaştırıldığında daha düşük hassasiyetine rağmen bilinen bileşiklerin hızlı bir şekilde tanımlanması ve yeni bileşiklerin yapı sınıflarının tanımlanması için güçlü bir araç sağlar. LC-NMR, özellikle LC-MS'den gelen verilerin eksik olduğu veya bir numunenin aktif bileşeninin güvenilir bir şekilde tanımlanmasına izin vermediği durumlarda yararlıdır (50).

2.4.3. Kütle Spektrometresi Yöntemleri

Kütle spektrometrisi (MS), çok çeşitli kimyasal bileşiklerin tanımlanması için kullanılan güçlü bir karakterizasyon tekniğidir. En basit haliyle MS, bir numunedeki kimyasal türlerin moleküler ağırlığını belirlemek için yalnızca bir araçtır. Bununla birlikte, modern makinelerden elde edilebilen yüksek çözünürlük ile izomerleri, izotopları ve hatta nominal olarak aynı moleküler ağırlıklara sahip bileşikleri ayırt etmek mümkündür. Birçok iyonizasyon tekniği vardır. Bunlardan en önemlileri elektron iyonizasyonu (EI), elektrosprey iyonizasyonu (ESI) ve matrisli ilişkili lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI)'dur (52).

MS yöntemine doğal ürünlerin tanımlanmasında sıklıkla başvurulmaktadır. Bu yöntem ile bir karışımdaki metabolitlerin tespit edilmesinin yanı sıra metabolitin kimyasal yapısı hakkında da fazlaca bilgi alınmaktadır. MS yöntemi; sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (Liquid chromatography-mass spectrometry- LC-MS), nükleer manyetik rezonans (MS/NMR), gaz kromatografisi (Gas chromatography-GC/MS) gibi analitik yöntemler ile kombine kullanılarak doğal ürünlerin tespit edilmesini daha da kolaylaştırmaktadır (53).

2.4.4. Polymerase Chain Reaction (PCR -Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Bakterilerin 16S rRNA Amplifikasyonu, Dizilimi ve Moleküler Tanımlanması

Bu yöntem ile elde edilen antimikrobiyal maddenin fenotipik identifikasyonu yapılır. Fenotipik identifikasyon yapılırken bakterilerdeki hedef genlere bakılır. Bu genlerde fonksiyonun evrim boyunca değişmemiş olması ve tüm bakteriler için korunmuş bir bölgeye sahip olması gibi bazı özellikler istenir. 16S rRNA geni ile tanımlama yapılmasının sebebi; bütün bakterilerde bu gen bulunur, fonksiyonel olarak korunmuştur, üzerinde iyi korunmuş ve heterojen bölgeler içerir. Ayrıca 16S rRNA'nın yeterli veri tabanı bulunmaktadır. Bu yöntemde temel olarak çeşitli antimikrobiyal duyarlılık testleri sonucu elde edilen izolatlardan DNA örnekleri çoğaltılır ve 16S rRNA büyütülür. Amplifiye edilmiş 16S rRNA, PCR'de saflaştırılmış ve dizinlenmiştir. Elde edilen diziler NCBI BLAST'a (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool - Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi Temel Yerel Hizalama Arama Aracı) tabi tutularak moleküler tanımlama yapılır (54).

3. Sonuç

Antibiyotikler pek çok hastalığın tedavisinde yaygın kullanılan ilaçlardır. Bilinçsiz kullanımlarından dolayı birçok mikroorganizma antibiyotiklere karşı direnç kazanmıştır. Antibiyotik üretiminin temelini sentetik ürünler ve doğal yollardan üretilen maddeler oluşturur. Sentetik olarak üretilen antibiyotiklerin kimyasal yapıları benzerlik gösterdiğinden bu ilaçlara karşı da çapraz direnç çok çabuk oluşmaktadır. Antibiyotiklere karşı oluşan direnç olayı enfeksiyöz hastalıkların tedavisi için yeni antimikrobiyal ilaçlara olan ihtiyacı arttırmaktadır.

Mikrobiyal doğal ürünler geçtiğimiz yüzyılda ilaçlar için kaynak olarak çok önemli bir rol oynamıştır. Bununla birlikte doğal ürün kimyasının tamamen sentetik tabanlı keşif yöntemleriyle rekabet etmeye devam edebilmesi için, doğal ürün araştırmalarının; seçme, tarama, de-

replikasyon, izolasyon ve yapı açıklama süreçlerinin etkinliğini sürekli olarak geliştirilmesi gerekir.

Doğada bulunan mikroorganizmalar hayatta kalabilmek için pek çok savunma mekanizması geliştirirler. Bu mekanizmalardan biri de antimikrobiyal maddeler salgılayarak kendilerini diğer mikroorganizmalara karşı korumaktır. Bu şekilde ürettikleri antimikrobiyal maddeler tespit edilerek bunlardan yeni antibiyotikler keşfedilebilir ve böylece antibiyotik direncinin önüne geçilebilir.

Yapılan çalışmalar gösteriyor ki toprak, su, bitki, hayvanlar vb. kaynaklar yeni antimikrobiyal maddeler bulmak için çok zengin kaynaklardır. Önümüzdeki yıllarda enfeksiyon hastalıklarının büyük sorunlar oluşturabileceği öngörülmektedir. Bu nedenle doğal kaynaklardan yeni antibiyotiklerin keşfi çok önemli ve elzemdir.

Kaynaklar

1. Talaro A, Talaro K. *Foundation in Microbiology*. 10nd Edition, New York: W.M. Brown, 2018.
2. Walsh C, Wright G. Introduction: Antibiotic resistance. *Chem Rev* 2005; 105: 391-394.
3. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health* 2017; 10: 369-378.
4. Ventola C Lee. The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics* 2015; 40: 277-283.
5. Byrne MK, Mielle S, McGlenn A, et al. The drivers of antibiotic use and misuse: The development and investigation of a theory driven community measure. *BMC Public Health* 2019; 19: 1-11.
6. Nadimpalli ML, Marks SJ, Montealegre MC, et al. Urban informal settlements as hotspots of antimicrobial resistance and the need to curb environmental transmission. *Nature Microbiology* 2020; 5: 787-795.
7. World Health Organization. "WHO report on surveillance of antibiotic consumption 2016-2018 early implementation". <https://www.who.int/publications/i/item/9789241514880/01.07.2022>.
8. Schrader SM, Vaubourgeix J, Nathan C. Biology of antimicrobial resistance and approaches to combat it. *Sci Trans Med* 2020; 12: eaaz6992.
9. Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 71-109.
10. Genilloud O. Natural products discovery and potential for new antibiotics. *Curr Opin Microbiol* 2019; 51: 81-87.
11. Palma E, Tilocca B, Roncada P. Antimicrobial resistance in veterinary medicine: An overview. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 1914.
12. World Health Organization. "New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis". <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis/01.07.2022>.
13. Zhou P, Liu Z, Chen Y, et al. Bacterial and fungal infections in COVID-19 patients: A matter of concern. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2020; 41: 1124-1125.
14. Chen X, Liao B, Cheng L, et al. The microbial coinfection in COVID-19. *Applied microbiology and biotechnology* 2020; 104: 7777-7785.
15. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *The Lancet* 2020; 395: 1054-1062.
16. Nori P, Szymczak W, Puius Y, et al. Emerging co-pathogens: New Delhi metallo-beta-lactamase producing Enterobacteriales infections in New York City COVID-19 patients. *Int J Antimicrob Agents* 2020; 56: 106179.
17. Rawson TM, Ming D, Ahmad R, Moore LS, Holmes AH. Antimicrobial use, drug-resistant infections and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 2020; 18: 409-410.
18. Bengoechea JA, Bamford CG. SARS-CoV-2, bacterial co-infections, and AMR: The deadly trio in COVID-19? *EMBO Molecular Medicine* 2020; 12: e12560.
19. Nieuwlaat R, Mbuagbaw L, Mertz D, et al. Coronavirus disease 2019 and antimicrobial resistance: Parallel and interacting health emergencies. *Clin Infect Dis* 2021; 72: 1657-1659.
20. Bassetti M, Giacobbe DR. A look at the clinical, economic, and societal impact of antimicrobial resistance in 2020. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2020; 21: 2067-2071.
21. World Health Organization. "WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics are Urgently Needed". <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed/01.07.2022>.
22. Trusts PC. "Antibiotics currently in global clinical development". <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/data-visualizations/2014/antibiotics-currently-in-clinical-development/01.07.2022>.
23. Dougan G, Dowson C, Overington J. Meeting the discovery challenge of drug-resistant infections: Progress and focusing resources. *Drug Discov Today* 2019; 24: 452-461.

24. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* 2020; 83: 770-803.
25. Silver LL. Are natural products still the best source for antibacterial discovery? The bacterial entry factor. *Expert Opin Drug Discov* 2008; 3: 487-500.
26. Parekh J, Chanda S. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turkish Journal of Biology* 2007; 31: 53-58.
27. Mothana RAA, Lindequist U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *J Ethnopharmacol* 2005; 96: 177-181.
28. Serpi M, Ozdemir Z, Salman Y. Bazı Bitki Ekstrelerinin *Propionibacterium acnes* üzerine antibakteriyel etkilerinin araştırılması. *Tarım ve Doga Dergisi* 2012; 15: 7-12.
29. Kocabaş A, Başkaya Y. Toprakta izole edilen mikroorganizmaların antimikrobiyal madde üretim potansiyellerinin belirlenmesi. *Tarım ve Doga Dergisi* 2016; 19: 393-398.
30. Gislin D, Sudarsanam D, Raj GA, Baskar K. Antibacterial activity of soil bacteria isolated from Kochi, India and their molecular identification. *J Genet Eng Biotechnol* 2018; 16: 287-294.
31. Dolapçı İ. Bakterilerde İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri. 1.Baskı, Ankara Üniversitesi: Tıp Fakültesi, 2016.
32. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biology of Microorganisms*. 9nd Edition, USA: Pearson Education, 2000.
33. Abbasoglu U. Antimikrobiyal aktivite araştırma yöntemleri. *FABAD J Pharm Sci* 1996; 22: 111-118.
34. Şengün İ, Öztürk B. Bitkisel kaynaklı bazı doğal antimikrobiyaller. *Anadolu University of Sciences & Technology-C: Life Sciences & Biotechnology* 2018; 7: 256-276.
35. Usta A. Toprakta Antibiyotik Üreten *Bacillus sp.*'lerin Taranması, Antibiyotik Üretimi Üzerine Bazı Parametrelerin Etkisi ve Sporulasyonla İlişkinin Belirlenmesi. Master's Thesis. Bursa: Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü 2012.
36. Akın M. "Endemik Bitkilerden Antimikrobiyal Maddeler". https://www.researchgate.net/publication/327622332_Endemik_Bitkilerden_Antimikrobiyal_Maddeler / 01.07.2022.
37. Nasir B, Fatima H, Ahmed M, Haq IU. Recent trends and methods in antimicrobial drug discovery from plant sources. *Austin J Microbiol* 2015; 1: 1-12.
38. Nathan P, Law EJ, Murphy DF, MacMillan BG. A laboratory method for selection of topical antimicrobial agents to treat infected burn wounds. *Burns* 1978; 4: 177-187.
39. Rios JI, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *J Ethnopharmacol* 1988; 23: 127-149.
40. Branch A, Starkey DH, Power EE. Diversifications In The Tube Dilution Test For Antibiotic Sensitivity Of Microorganisms. *Appl Microbiol* 1965; 13: 469-472.
41. Pathogenic Microbiology. "Broth Tube Dilution Method". <https://science.umd.edu/classroom/bsci424/LabMaterialsMethods/BrothTubeMIC.htm#:~:text=The%20tube%20dilution%20test%20is,incubated%20for%20a%20prescribed%20time> / 01.07.2022.
42. Sümerkan B. Antibiyotik duyarlılık testleri ve standardizasyon. *Flora Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi* 1996; 1: 24-30.
43. Wikler M. "CLSI M7- A7, methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically". <https://www.semanticscholar.org/paper/Methods-for-dilution-antimicrobial-susceptibility-%3A-Wikler-Clinical/e418f7892e51569e2357e30ae0cd9a43454b127a/> 01.07.2022.
44. Vega-Jiménez AL, Vázquez-Olmos AR, Acosta-Gío E, Álvarez-Pérez MA. In vitro antimicrobial activity evaluation of metal oxide nanoparticles. 1. Edition, *Nanoemulsions Prop Fabr Appl* 2019: 1-18.
45. Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC. *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. 1. Edition, Boca Raton: Crc Press 2007.
46. Demirpek U. "Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri". <https://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf> / 01.07.2022
47. Anonim. "İnce Tabaka Kromatografisi". <https://www.kimyasanal.com/konu/tlc-thin-layer-chromatography/> 01.07.2022.
48. Larsen TO, Smedsgaard J, Nielsen KF, Hansen ME, Frisvad JC. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Nat Prod Rep* 2005; 22: 672-695.
49. Bobzin SC, Yang S, Kasten TP. LC-NMR: A new tool to expedite the dereplication and identification of natural products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2000; 25: 342-345.
50. Anonim. "Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi". https://tr.wikipedia.org/wiki/N%C3%BCkleer_manyetik_rezonans_spektroskopisi /01.07.2022.
51. Bobzin SC, Yang S, Kasten TP. Application of liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy to the identification of natural products. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2000; 748: 259-267.
52. Kum E. Karasal Aktinomisetlerde Yeni İlaç Adaylarının Kimyasal ve Genomik Olarak Taranması. Doktora Tezi, Diyarbakır: Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2019.
53. Bouslimani A, Sanchez LM, Neha GN, Pieter CD. Mass spectrometry of Natural Products: Current, Emerging and Future Technologies. *Nat Prod Rep* 2014; 31: 718-729.
54. Karahan ZC. "16s rRNA analizi". https://www.tmcnline.org/userfiles/sunumlar/08_Kas/Zeynep_Ceren_Karahan.pdf / 01.07.2022.