YÜZYILLIK İLAÇ: Keçi boynuzunun (Ceratonia siliqua) gram negatif bakterilerden; Escherichia Coli, Klebsiella pneumoniae ve gram pozitif bakterilerden; Staphylococcus Aureus, Bacillus subtilis'e karşı ve bunun yanında maya benzeri funguslardan ise Candida albicans'a karşı antifungal etkilerinin araştırılması

Mehmet Atalay Kibar

Rehber Öğretmen: M.Şirin Güntürkün

TED Ankara Koleji Vakfı Özel Lisesi

AMAÇ

Keçi boynuzunun (Ceratonia siliqua) gram negatif bakterilerden; Escherichia Coli, Klebsiella pneumoniae ve gram pozitif bakterilerden; Staphylococcus Aureus, Bacillus subtilis'e karşı ve bunun yanında maya benzeri funguslardan ise Candida albicans'a karşı antifungal etkilerinin araştırılması

GİRİŞ

Keçiboynuzu (Ceratonia siliqua), baklagiller (Fabaceae) familyasından olup Akdeniz ikliminin hüküm sürdüğü yerlerde doğal olarak yetişen ve baklaları (meyveleri) yenen, herdem yeşil çalı ya da ağaç formunda olan bir bitki türü. Uzun ömürlü ve boyu 10 m. kadar olan maki türü bir ağaçtır. Sert ve koyu yeşil yapraklıdır. Yaprakları, karşılıklı dizilmiş bileşik yapraklar olup boyları 10-20 cm. uzunluğunda olup damla uçludur. Çiçekleri; 6-12 cm. uzunluğunda olup açık yeşilimsi kırmızı, küçük ve çok sayıdadır. Ağacın meyveleri (legümen) ise 15-20 cm. kadar olabilen ve ilk zamanlar yeşil ama olgunlaştığında kahverengileşmektedir.[1]

1.1 Gallik Asit Özellikleri:

Moleküler Formülü: $C_7H_6O_5$

Ortalama Ağırlığı: 170.119507 Da

IUPAC İsmi

3,4,5-Trihidroksibenzoik asit

SMILES:

C1=C(C=C(C(=C1O)O)O)C(=O)O[3]

1.2 Kullanım Alanı:

Tüm fenolik bileşikler gibi gallik asit de hücrelere zarar verebilen serbest radikalleri nötrize eden kuvvetli bir antioksidandır. Gallik asitin, salıklı hücrelere zarar vermeden kanserli hücrelere sitotokisite gösterdiği bulunmuştur. Prostat kanserine karşı ve lösemiye karşı koruma sunduğu gösterilmiştir.[4]

1en ünlüsü sayılan O157:H7 adlı serotip kanlı ishale ve ölüme yol açabilir. E. coli, normal bağırsak florasına aittir, biyolojik sınıflandırmada da bağırsaklarda yaşayan bakterilerden oluşan enterik bakteriler ailesinde yer alır. Bakteri çubuk şeklinde olup, boyutları 1-2 µm uzunluğunda ve 0.1-0.5 µm çapındadır. E. coli Gram-negatif bir bakteri olduğundan endospor oluşturmaz, pastörizasyon veya kaynatma ile ölür. Memeli hayvanların bağırsaklarında büyümeye adapte olmuş olduğu için en iyi vücut sıcaklığında çoğalır [5]

MATERYAL

Besiyerleri, Kimyasal Bileşikler

- Mueller Hinton Broth
- Mueller Hinton Agar
- Sabouraud liquid medium
- Sabouraud dextrose agar

RPMI (Pholine propanesulfonic acid ilave tamponlanmış)

Cihazlar

Füme Hood

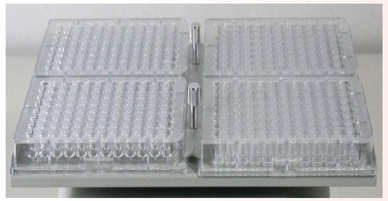
Etüv

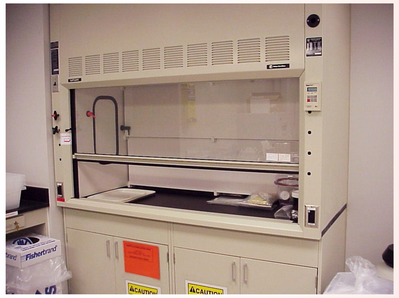
Hassas Terazi

Mikropleyt

Mikropipetler

Parafilm Kağıdı





YÖNTEM

Test örneği gallik asit uygun su %80: %20 (DMSO/etanol (1:1)+1% Tween 80) çözücüde 512 µg/ml konsantrasyonda hazırlanarak 0.22mm milipor filtreden süzüldükten sonra stok solüsyon olarak kullanıldı. Referans antibakteriyel ajanlardan (ketokonazol flukonazol, levofloxacin, ampisillin) CLSI kriterlerine uygun çözücülerinde hazırlanıp deneyde test edilmiştir (CLSI; NCCLS, 1996). Antibakteriyel aktivite testinde gram negatif bakterilerden; E. coli, K. pneumoniae ve gram pozitif bakterilerden; S. aureus, B. subtilis'e karşı denenmiştir. Maya benzeri funguslardan ise C. albicans ve C. krusei' ye karşı antifungal aktivite araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite testinde; mikroorganizmaların üretilmeleri ve dilüsyonların hazırlığında, Mueller Hinton Broth, Mueller Hinton Agar, antifungal aktivite testinde Sabouraud liquid medium, Sabouraud dextrose agar, pholine propanesulfonic acid ilave tamponlanmış RPMI kullanılmıştır. Kültür süspansiyonları; her bakteri için CLSI kriterlerine göre McFarland 0,5 (108Cfu/ml) yoğunluğundaki gram negatif ve gram pozitif bakteri kültür süspansiyonundan, 105 Cfu/mL bakteri yoğunluğunda hazırlanıp Mikrodilüsyon yöntemi ile testte denenmiştir. Besiyerleri içeren 96-kuyulu mikropleytte maddelerin çift katlı dilüsyonları (512, 128…..–0.125µg ml-1) yapıldıktan sonra her örnek için 10µl bakteri ve fungus kültür süspansiyonlarından kuyucuklara ilave edilerek 37ºC'de 24-48 saat inkübasyon sonrası minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Besiyeri kontrol plak-

Maddeler	Gram negatif		Gram pozitif		Mantar
	E. coli	K. pneumoniae	S. aureus	B. subtilis	C. albicans
Gallik asit	512	512	512	16	512
levofloxacin	0.12	<0.12	0.5	0.5	-
ampisillin	2	2	<0.12	<0.12	-
ketokonazol	-	-	-	-	1
flukonazol	-	-	-	-	4

TABLO-1 Deneyde kullanılan bakteriler ve mantarların sadece Gallic Asite karşı

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Besiyerleri içeren 96-kuyulu mikropleytte maddelerin çift katlı dilüsyonları (512, 128…..–0.125µg ml-1) yapıldıktan sonra elde eldilen sonuçlarda E.coli bakterisinin ürediği ve gallik asitin bu üreme üzerinde herhangi bir dilüsyonda(seyreklikte) etkisi gözlenmediği ortaya çıkmıştır.

Besiyerleri içeren 96-kuyulu mikropleytte maddelerin çift katlı dilüsyonları (512, 128…..–0.125µg ml-1) yapıldıktan sonra elde eldilen sonuçlarda K. pneumoniae bakterisinin ürediği ve gallik asitin bu üreme üzerinde herhangi bir dilüsyonda(seyreklikte) etkisi gözlenmediği ortaya çıkmıştır.

Besiyerleri içeren 96-kuyulu mikropleytte maddelerin çift katlı dilüsyonları (512, 128…..–0.125µg ml-1) yapıldıktan sonra elde eldilen sonuçlarda S. aureus bakterisinin ürediği ve gallik asitin bu üreme üzerinde herhangi bir dilüsyonda(seyreklikte) etkisi gözlenmediği ortaya çıkmıştır.

Besiyerleri içeren 96-kuyulu mikropleytte maddelerin çift katlı dilüsyonları (512, 128…..–0.125µg ml-1) yapıldıktan sonra elde eldilen sonuçlarda C. albicans bakterisinin ürediği ve gallik asitin bu üreme üzerinde herhangi bir dilüsyonda(seyreklikte) etkisi gözlenmediği ortaya çıkmıştır.

Besiyerleri içeren 96-kuyulu mikropleytte maddelerin çift katlı dilüsyonları (512, 128…..–0.125µg ml-1) yapıldıktan sonra elde eldilen sonuçlarda B. subtilis bakterisinin ürediği ve gallik asitin bu üreme üzerinde bir etkisi olduğu gözlemiştir. Çift katlı dilüsyonlardan 16 µg ml-1 dilüsyonunda bakterinin üremesinin durduğu ve bundan sonra azalan dilüsyonlarda da üremenin gözlenmediği ortaya çıkmıştır.

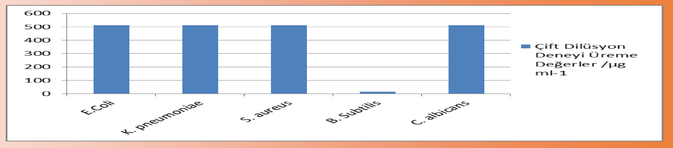
Maddeler	Gram negatif		Gram pozitif		Mantar
	E. coli	K. pneumo-	S. aureus	B. subtilis	C. albicans
Gallik asit	512 µg ml-1	512 µg ml-1	512 µg ml-1	16 µg ml-1	512 µg ml-1

Doğal antioksidan ve antibiyotiklerin unutulması üzere ilaç sanayisinin ortaya çıkışı ve gelişmesi en küçük bir olayda bile bir ilaç yada ağrı kesici almaya yönelim günümüz toplumunda gözden kaçmayan bir ayrıntıdır. Bu ilaçların insan vücudunda ne kadar pozitif bir etki yaratsa da negatif etkileri yadsınamayacak kadar fazladır. Bundan dolayı bu projenin amacı grip ve benzeri küçük çaplı hastalıklarda maaliyeti az olan keçiboynuzunun antimikrobiyal etkisinin saptanması bu çalışmanın esas üzerinde durduğu konuyu oluşturmuştur.

Keçi boynuzu içinde bulunan gallik asit ile yapılan antimikrobiyal araştırmalarda sadece B. Subtilis üzerinde bir etki gözlenmiştir. (Tablo-1)Bildiğimiz kadarıyla ve elimizdeki verilere dayanarak gallik asitin iyi bir antimikrobiyal etkisi olmadığı gözler önüne serilmiştir. Başta sujlarda ekimi yapılan bakteriler ile beraber kolonileşme sürecindeki etki gözlenmek için gallik asit eklenmiştir. 24 saatin sonunda plaklara bakıldığında E. Coli, K. Pneumoniae, S. Aureus, ,C. Albicans bakteri ve mantarlarında gallik asitin kolonileşmelerine bir etkisi bulunmadığı ve üremenin devam ettiği gözlenmiştir. B. Subtilis bakterisinde ise 16 µg ml-1 plağında ve ondan sonra üremenin durduğu ve kolonileşme gözlenmediği ortaya çıkmıştır. Bu verilere bakıldığında B. Subtilis bakterisinin gallik asit karşısında antimikrobiyal etkisi bulunan tek bakteridir.

Gün geçtikçe önüne geçilemeyen bir sorun haline gelen antibakteriyel direnç sorunu yeni ve tamamlayıcı çalışmalar çok gereksinim olduğunu yada doğal olan yiyecekleri kullanımına dönülmesinin gerektiği açıkça ortaya konulmuştur. Bu doğal yiyeceklerin kişinin bedenine hem besin olarak girmesi hem de kişiye yarar sağlaması bu projenin pozitif bir sonuç çıkarması sonucunda etkisini hayli bir arttırmaktadır.

Elde edilen veriler ne kadar umut vermese de başka bakteri ve mantarlar üzerinde denenmesi sonucunda yeni oluşacak veriler hakkında bir bilgi veremeyiz. Bu da bize hala bu projede umut olduğu konusunda bir dayanak olabilir. İlerleyen dönemlerde akademik hayatımda bu tip organik ve insana faydalı olan maddelerin ve bu maddelerin yararları hakkında bilgilerle ilgili araştırmalar yapmayı istiyorum. Bu araştırmalarım sonucu elde edeceğim bilgileri insanlarla paylaşıp en azından bu teknoloji dünyasında biraz doğallık oluşturmaya çalışmak en büyük amaçlarımdan biri.



TEŞEKKÜR:

Bu projenin yapımında her konuda yardımcı ve destekçim olan danışman öğretmenim Sayın Şirin Güntürkün ve proje koordinatörüm Sayın Demet İzgü'ye, deneysel aşamada bana yol gösteren Fen ve Teknoloji dersi öğretmeni Sayın Neslihan Öztürk'e, yardımlarını esirgemeyen Dr. Ali Karahan'a ve Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Sayın Doç.Dr. Hatice Nurhan Büyükkartal'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Maddeler	Gram negatif		Gram pozitif		Mantar
	E. coli	K. pneumoniae	S. aureus	B. subtilis	C. albicans
Gallik asit	512	512	512	16	512
levofloxacin	0.12	<0.12	0.5	0.5	-
ampisillin	2	2	<0.12	<0.12	-
ketokonazol	-	-	-	-	1