T.C.

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

ÖRÜMCEK ZEHİRİNİN İNSANDA ENFEKSİYONA SEBEP OLAN BAKTERİLER ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ

SANA AB. MOHAMED MASUD

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. İBRAHİM KÜÇÜKBASMACI

KASTAMONU 2017

T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÖRÜMCEK ZEHİRİNİN İNSANDA ENFEKSİYONA SEBEP OLAN BAKTERİLER ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ

Sana AB. Mohamed MASUD

Danışman	**Yrd. Doç. Dr. İbrahim KÜÇÜKBASMACI**
Jüri Üyesi	**Doç. Dr. Ali Savaş BÜLBÜL**
Jüri Üyesi	**Doç. Dr. Talip ÇETER**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

KASTAMONU - 2017

TEZ ONAYI

Sana AB Mohamed MASUD tarafından hazırlanan **"Örümcek Zehirinin İnsanda Enfeksiyona Sebep Olan Bakteriler Üzerine Antimikrobiyal Etkisi"** adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve **oy birliği** ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Yrd. Doç. Dr. İbrahim KÜÇÜKBASMACI Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Ali Savaş BÜLBÜL Bartın Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Talip ÇETER Kastamonu Üniversitesi	.....

26/12/2017

Enstitü Müdür V. Doç. Dr. Mehmet Altan KURNAZ .....

TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

İmza
Sana AB. Mohamed MASUD

TEŞEKKÜR

Bazen, ne kadar uzakta olurlarsa olsunlar her daim yanımızda olup bizi destekleyen insanlara teşekkür kelimesi yeterli değildir. Başta annem olmak üzere, aileme şükranlarımı sunarım. Allah onlara uzun ömürler versin. Ayrıca, kocama benimle bu yolculukta beraber olduğu için teşekkür ediyorum.

Başta örümceklerle nasıl başa çıkacağımı öğreten Yrd. Doç. Dr. Zafer SANCAK, öğrencisi olmasam da rehberliği ve önerileri için Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER ve laboratuvar testini tamamlamam için tüm ihtiyaçlarımı yerine getiren bölüm başkanımız Doç. Dr. Talip ÇETER olmak üzere tezimi bitirmemde bana yardımcı olan herkese teşekkürü borç bilirim. Son olarak, danışmanım Yrd. Doç. Dr. İbrahim KÜÇÜKBASMACI'nın yaptığı her şey için minnettarım.

Sana AB. Mohamed MASUD
Kastamonu, Aralık, 2017

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÖRÜMCEK ZEHİRİNİN İNSAN ENFEKSİYONLARINA NEDEN OLAN BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ

Sana AB. Mohamed MASUD

Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. İbrahim KÜÇÜKBASMACI

Mikroorganizmalardan kaynaklanan bazı hastalıkları tedavi eden yeni antimikrobiyal ajanlar bulmak, insan sağlığı için önemlidir. Çünkü dünyada halk sağlığına karşı en büyük tehditlerden biri birçok patojenin geleneksel antibiyotiklere gösterdiği antimikrobiyal dirençtir. Mikroorganizmaların artan mikrobiyal direnç yeteneği nedeniyle acilen yeni alternatiflerin keşfedilmesi gerekmektedir. Bunun için en uygun alternatif peptitlerdir. Enfeksiyonların tedavisinde önemli rol oynayan küçük ağırlıklı ve çok işlevli en uygun moleküller ise, antimikrobiyal peptitlerdir. Bu nedenle, zehir peptitleri de dâhil olmak üzere antimikrobiyal peptitler, yeni terapötikleri tasarlamak için mükemmel adaylar olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmada, on yedi bakteri suşuna (*Bacillus subtilis* DSMZ 1971, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aeruginosa* DSMZ 50071, *Pseudomonas fluorescens* P1, *Salmonella enteritidis* ATCC 13075, *Salmonella infantis*, *Salmonella kentucky*, *Salmonella typhimurium* SL1344, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ve *Staphylococcus epidermidis* DSMZ 20044) yanı sıra bir mantara *C. albicans*'a karşı *Araneus quadratus* Clerck, 1757 zehrinin antimikrobiyal etkinliği, minimal inhibitör konsantrasyonlarını belirlemek için minimum inhibisyon konsantrasyon testi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma sonuçları zehrin toplama yılına ve her yıl kullanılan konsantrasyonlara göre farklı etkiler gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Ancak *A. quadratus* zehrinin antimikrobiyal bir ajan olarak kullanılmasının başarısını desteklemek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Bu nedenle, bu çalışma ileri teknikler uygulayarak *A. quadratus* zehrinin antimikrobiyal aktivitesinden sorumlu olan aktif maddenin daha fazla araştırılması ve saflaştırılması için temel oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal direnç, çoklu ilaç direnci gösteren patojenler, antimikrobiyal aktivite, antimikrobiyal peptitler, örümcek zehri, *Araneus quadratus*, minimum inhibisyon konsantrasyon testi, minimal inhibitör konsantrasyonları.

2017, 69 Sayfa
Bilim Kodu: 203

ABSTRACT

MSc. Thesis

ANTIMICROBIAL EFFECT OF SPIDER VENOM ON BACTERIA THAT CAN CAUSE HUMAN INFECTIONS

Sana AB. Mohamed MASUD

Kastamonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. İbrahim KÜÇÜKBASMACI

Finding a new antimicrobial agent, that cures some illnesses caused by microorganisms, is important for human health because one of the most public health threats in the world is the antimicrobial resistance of many pathogens to the traditional antibiotics. Indeed, due to rising the microbial resistance ability of microorganisms, there is still an urgent need to discover a novel alternative and the most available alternatives are antimicrobial peptides, which are small weighted and multifunctional molecules, that play major roles in overpowering the infections. Hence, antimicrobial peptides, including venom peptides, have been considered as excellent candidates for designing new therapeutics. However, this study investigated the antimicrobial activity of *Araneus quadratus* Clerck, 1757 spider venom against seventeen bacterial strains (*Bacillus subtilis* DSMZ 1971, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aeruginosa* DSMZ 50071, *Pseudomonas fluorescens* P1, *Salmonella enteritidis* ATCC 13075, *Salmonella infantis*, *Salmonella kentucky*, *Salmonella typhimurium* SL1344, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and *Staphylococcus epidermidis* DSMZ 20044) as well as one fungus (*Candida albicans* DSMZ 1386) using plate growth inhibition assay to determine the minimal inhibitory concentrations. The results of this study revealed that the venom showed different effects according to the year of collection and the concentrations used in each year, but further researches are required to support the success of the use of *A. quadratus* venom as an antimicrobial agent. Therefore, the present study will be the base for further investigation and purification of the active item that is responsible for the antimicrobial activity of *A. quadratus* spider venom by performing advanced techniques.

Key Words: Antimicrobial resistance, multidrug-resistant pathogens, antimicrobial activity, antimicrobial peptides, spider venom, *Araneus quadratus* spiders, plate growth inhibition assay, minimal inhibitory concentrations.

2017, 69 Pages
Science Code: 203

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	ix
TABLOLAR DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Antimikrobiyal Direnç (AMD)	4
1.2. Antimikrobiyal Peptitler (AMP)	5
1.3. Örümcekler	6
1.3.1. Örümcek Zehirleri	7
1.4. Çoklu İlaç Direnci Gösteren Patojenler (ÇİDG- Patojenler)	8
1.5. Gram-negatif Bakteriler	9
1.5.1. *Enterobacter aerogenes*	9
1.5.2. *Klebsiella pneumoniae*	10
1.5.3. *Pseudomonas aeruginosa*	10
1.5.4. *Pseudomonas fluorescens*	11
1.5.5. *Salmonella enteritidis*	11
1.5.6. *Salmonella kentucky*	12
1.5.7. *Salmonella infantis*	12
1.5.8. *Salmonella typhimurium*	12
1.5.9. *Escherichia coli*	13
1.6. Gram-pozitif Bakteriler	13
1.6.1. *Staphylococcus aureus*	13
1.6.2. *Staphylococcus epidermidis*	14
1.6.3. *Bacillus subtilis*	14
1.6.4. *Enterococcus faecalis*	15
1.6.5. *Enterococcus faecium*	15
1.6.6. *Enterococcus durans*	16

1.6.7. *Listeria monocytogenes* 16
1.6.8. *Listeria innocua* 16
1.7. Mantarlar 17
1.7.1. *Candida albicans* 17
2. LİTERATÜR İNCELEMESİ 18
2.1. Doğal Ürünlerin Antimikrobiyal Aktivitesi 18
2.2. Omurgalıların ve Omurgasızların Antimikrobiyal Aktivitesi 19
2.3. Örümcek Zehirinin Antimikrobiyal Aktivitesi 24
3. MATERYALLER VE YÖNTEMLER 27
3.1. Örümceklerin Toplanması 27
3.2. Zehiri Toplama 27
3.2.1. Zehiri Almanın İlk Yolu 28
3.2.2. Zehiri Almanın İkinci Yolu 29
3.2.3. Zehiri Almanın Üçüncü Yolu 30
3.3. Mikroorganizmalar 31
3.3.1. Mikroorganizmaların Aktivasyonu 32
3.4. Antimikrobiyal Test 33
3.4.1. Zehir Çözeltilerinin Hazırlanması 34
3.4.2. Bakteriyel İnokülüm Hazırlanması 34
3.4.3. Sıvı Büyüme İnhibisyonu Testi 34
3.5. Meteorolojik Veriler 36
4. BULGULAR 37
5. TARTIŞMA 42
6. SONUÇ 48
7. ÖNERİLER 50
KAYNAKLAR 51
ÖZGEÇMİŞ 69

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

	Sayfa
Fotoğraf 1.1. *Araneus quadratus* örümcek	7
Fotoğraf 3.1. Zehir salgı bezlerinin alınması	27
Fotoğraf 3.2. Zehiri almanın birinci yolu.....	28
Fotoğraf 3.3. Zehiri almanın ikinci yolu	29
Fotoğraf 3.4. Zehiri almanın üçüncü yolu.....	31
Fotoğraf 3.5. Mikroorganizmaların aktivasyonu	33
Fotoğraf 3.6. Minimum inhibisyon konsantrasyon testi	35

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 4.1. *A. quadratus* zehirinin ikinci konsantrasyonun (2016) bazı patojenlere karşı MIK değerleri 38

Tablo 4.2. *A. quadratus* zehirinin ikinci konsantrasyonun (2017) bazı patojenlere karşı MIK değerleri 39

Tablo 4.3. 2016 ve 2017 yılları arasındaki ilk dokuz ayın günlük meteorolojik verilerinin karşılaştırılması 39

Tablo 4.4. 2016 ve 2017 yılları arasındaki ilk dokuz ayın aylık meteorolojik verilerinin karşılaştırılması 40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMA	Antimikrobiyal Aktivite
AMD	Antimikrobiyal Direnç
AMP	Antimikrobiyal Peptitler
ÇİDG	Çoklu İlaç Direnci Gösteren
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
MDLDİ-UZ-KS	Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
MIK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları
OED	Otomatik Edman Degradasyonu
TF-YPSK	Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
g	Gram
kob	Koloni oluşturma birimi
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre

1. GİRİŞ

İnsan vücudu bakteriler, mantarlar, parazitler ve ölümcül olabilecek çeşitli enfeksiyonlara neden olan virüsler dâhil olmak üzere birçok mikroorganizma için cazip ve uygun ortamlardan biridir.

Yaşamın başlangıcından itibaren bilim insanları, herkes için iyi ve sağlıklı bir yaşam sağlamak üzere bu sağlık sorunlarının tümünü önlemeye, teşhis etmeye ve tedavi etmeye çalışmışlardır. Örneğin, 1940'larda, birçok enfeksiyonla savaşmak için antibiyotikleri [1]; penisilin [2-4] ve sülfonamid [2] sınıflarına ayırmış, 1970'lerde, zehir bazlı ilk başarılı ilaç olan antihipertansif Captopril® 'i keşfetmişlerdir [5-11].

Ne yazık ki, mikropların ilaçlara (antibiyotiklere) [4, 12] karşı direnç geliştirme yetenekleri bulunmakta ve bu Antimikrobiyal Direnç (AMD) [2, 13-15] olarak adlandırılmaktadır. Aslında, çoğu bakteri suşu, geleneksel antibiyotiklere dirençlidir [3, 16-19]. Olgusal olarak, bazı bakteriler Çoklu İlaç Direnci Gösteren (ÇİDG) bakteri olarak adlandırılacağı, birden fazla antibiyotik sınıfına [2, 4, 12, 19] karşı direnç geliştirebilir. Örneğin, *Staphylococcus aureus* [3], *Pseudomonas aeruginosa* [3, 18, 20, 21] ve *Enterococcus sp.* türleri [17, 20, 22, 23], en yaygın antibiyotiklere karşı dirençlidir.

Nitekim, çoklu ilaç direnci gösteren patojenlerin ortaya çıkması küresel bir endişe haline gelmiş [2, 3, 20, 22, 24, 25] ve bir felaket olarak görülmektedir [26]. Bu nedenle, artan AMD acilen klasik ilaçlara yeni etkili alternatifler keşfetmeyi gerektirmektedir [1, 12, 23, 24, 27-30]. Aslında, Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, birçok mikrobun AMD'si, 21. yüzyılın [2, 16, 31] en büyük sağlık sorunu [2, 28, 31] ve insan sağlına yönelik en büyük üç tehditten biridir [26]. Dahası, ÇİDG patojenlerin etkilerinin artışı, araştırmacıları yeni etkili antibiyotikler [3, 27] geliştirmeye yönlendirmektedir.

Son yıllarda, bilim insanları ve araştırmacılar yeni alternatif ilaçlar bulmak için, omurgalıların (insan [32], timsah [33], kurbağa [31, 34-37], yılan [38] ve balık [39] vb., omurgasızların (akrep [40-45], yengeç [46, 47], örümcek [4, 29, 48-63] ve bal

arısı [64] vb.) peptitlerini ve bitki bileşenlerini [15, 21, 65-70] yeni etkili ilaçlar geliştirmek için kullanmaktadırlar. Bu peptitlere, prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda [1, 56, 71, 72] üretilen çok işlevli moleküller olan [25] antimikrobiyal peptitler (AMP) denir. Çok çeşitli mikroorganizmalara karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye (AMA) [1, 3, 24, 25, 40, 56, 59, 61, 62, 73-75] sahip olmanın yanında kanser de dâhil olmak üzere çeşitli hastalıkların [27, 71, 76, 77] tedavisinde kullanılabilirler. Ayrıca tanı ajanları [6, 7, 11, 78] olarak davranabilirler. Dolayısıyla, AMP'ler umut vadeden terapötik adaylar [1, 24, 28, 31, 61, 76, 77, 79-82] olarak kabul edilmektedir.

AMP'lerin çoğunun biyoteknolojik kullanımlara [7, 8, 61, 83-89] sahip olduğu kanıtlanmıştır. Hayvan zehirleri aktif AMP'ler için iyi kaynaklar [31, 48, 90] olup çok sayıda biyoaktif peptitten [6, 8, 10, 50, 91] oluşmaktadırlar. Bu nedenle zehirler, yeni ilaçları keşfetmek için mükemmel kaynaklardır [6, 9, 63, 88, 90-93].

Zehirlerin ölüme neden olabileceği belirtilmelidir [88, 94, 95]. Ancak böceklerin ve hayvanların zehirleri, ilaç geliştirmede terapötik ajanlar tasarlamak ve sentezlemek için kullanılmıştır [88, 89]. Ayrıca, omurgalılardan ve omurgasızlardan birçok zehir bileşeni, yenilikçi terapötik ilaçlar olarak kullanılmaktadır [7, 8, 88, 96].

İlginç bir şekilde, hayvan zehirleri tıp alanında 7. yüzyıldan beri kullanılmakta [5, 8, 10, 97] ancak 1975'te ilk başarılı zehir kaynaklı terapötiğin keşfiyle (Captopril®) [88, 93], 1970'lere kadar modern tedavi yolu olarak başvurulmamıştır [5, 10, 88]. Aynı şekilde, Prialt® [5-10, 23, 93], Byetta® [5-7, 9, 10, 91, 94], Integrilin® [8, 10, 11], Aggrastat® [10, 11, 93], Angiomax® [10, 94] ve Exanta® [10, 11] olmak üzere altı adet yeni onaylanmış zehir bazlı ilaç bulunmaktadır. Buna ek olarak, Ancrod [9-11,88,91,93] ve Chlorotoxin [6, 7, 9, 10, 78, 98] gibi etkili rolleri olan başarılı ilaçlar olarak başka zehir peptitleri de bulunmaktadır. Ancak son yirmi yıldır, akrepler ve örümcekler gibi omurgasızlardan zehir kaynaklı ajanlara büyük bir ilgi duyulmaktadır [3, 5, 7, 8, 10, 49, 91].

Son zamanlarda, biyokimyacıların, nörobiyologların ve farmakologların örümcek zehri peptitlerine karşı ilgisi kayda değer şekilde artmıştır [49, 60, 61, 93, 99, 100,

101]. Aslında, örümcek zehri peptitleri erektil disfonksiyon, kardiyovasküler hastalıklar, kronik ağrı ve inflamasyon [9, 10, 23, 91, 93, 94, 96, 98, 100, 102] gibi birçok rahatsızlığa [23, 60, 93, 94, 100] karşı, bunun yanı sıra nörolojik bozukluklar ve kansere karşı da terapötik potansiyel etkiye sahiptir [97]. Dahası, örümcek zehri; anti-insektisit [92, 94, 97, 99-103], antimikrobiyal [23, 60, 82, 92, 94, 97, 100] antibakteriyel [4, 29, 55-61], antifungal [23, 54, 62, 100] ve antiparaziter [23, 40, 63, 94], analjezik, antiaritmik, hemolitik, sitolitik ve enzim önleyici [23, 60, 92, 94, 97, 100] faaliyetlerin yanı sıra antikanser etkisi [60, 78, 92, 94, 97, 100] sayesinde böcek öldürücü ajanlardan insan terapisine kadar çeşitli alanlarda kullanılmıştır [23, 49, 61, 89, 93, 94, 97, 99, 100]. Tüm bu özelliklerden dolayı, örümcek zehri yeni farmasötik tasarımları için doğal bir kaynak olarak kabul edilmiştir [23, 61, 78, 93, 94, 97, 100]. Ne yazık ki, 2014 yılına kadar, örümcek zehri peptitlerinden onaylanmış hiçbir ilaç yoktu [78, 94]. Buna karşın, yakın gelecekte, örümcek zehri peptitlerinin ilaç olarak kullanılabileceği [94] ve yeni terapötiklerin tasarımında kullanılabileceği önerilmektedir [78, 93, 94, 99, 103].

Son yirmi yılda, birçok örümcek zehrinin antimikrobiyal aktivitesi gibi örümcek zehrinin etkin özelliklerini belirleyen çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Bunlara örnek olarak, *Cupiennius salei* (Keyserling, 1877) [53, 55, 56], *Lachesana tarabaevi* (Zonstein & Ovtchinnikov, 1999) [50], *Acanthoscurria gomesiana* (Mello-Leitão, 1923) [62], *Lycosa singorensis* (Laxmann, 1770) [48, 49, 61], *L. carolinensis* (Walckenaer, 1805) [51, 52] ve *Oxyopes kitabensis* (Charitonov, 1969) [57] gösterilebilir.

Bu çalışmada *Araneus quadratus* Clerck, 1757 zehrinin antimikrobiyal etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. *A. quadratus* örümcekleri, en başarılı zehirli omurgasız [78, 104] olan Arachnid (Örümceğimsiler) sınıfına ve Araneae (Örümcek) takımına girerler ve iyi anti-insektisit ve antimikrobiyal peptit olan [40] biyoaktif peptitlerin [97, 104] sayıca en fazlasına sahiptirler.

Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, *A. quadratus* zehrinin antimikrobiyal aktivitesi'ni tanımlayan ilk rapordur. Çalışmamızda *A. quadratus* zehrinin AMA'sı, on yedi bakteri suşuna ve bir mantara karşı mikrodilüsyon testi ile incelenmiştir.

1.1. Antimikrobiyal Direnç (AMD)

Antimikrobiyal direnç, patojenlerin klasik antibiyotiklere gösterdiği dayanıklılık ve dirençtir. DSÖ'ye göre, AMD büyük bir halk sağlığı sorunudur [2, 26, 28, 31, 61] ve insan sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biridir [26]. Nitekim, mikropların AMD'si, hastaneye yatırılmış hastalarda, hastaneye yatırılmamış hastalarda [2, 13-15], gıda işlemede ve muhafazasında [2, 13-16] uygun olmayan geleneksel antibiyotiklerin kullanılmasından ve istismar edilmesinden kaynaklanmıştır. Ayrıca, patojenlerin çoklu ilaca direnci geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süreli ve aşırı kullanılmasından kaynaklanmaktadır [3, 59].

Olgusal olarak, AMD, zayıflamış, immünsüprese, nötropenik ve kronik hastalarda daha tehlikelidir [2] ve bu sorun topluma yayılmış olup tedavi edilmesi zor olan ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır [2]. Ayrıca, AMD coğrafi konuma ve sağlık hizmetlerine göre de değişmektedir [2, 20, 22].

Bununla birlikte, AMD ilk 1940'ların başında fark edilirken [20] çoklu ilaç direnci gösteren suşlar 1970'lerin sonlarında teşhis edilmiştir [105]. Alanis [2] tarafından belirtildiği gibi, 1945 yılında Alexander Fleming, "Penisilinin uygunsuz kullanımının dirençli (mutant formlar) seçilmesine yol açabileceğini" (s.698) söyleyerek antibiyotiğin (penisilin) kötüye kullanımı konusunda uyarıda bulunmuştur.

Aslında bakteriler, tedavisi zor olan mikroorganizmaların [2, 12, 31, 69] çoklu antibiyotik sınıflarına [2, 4, 12, 19, 33] karşı direnç geliştirme yeteneğine sahip oldukları için çoklu ilaç direnci gösteren bakteriler diye adlandırılırlar. Örneğin, *S. aureus* hemen hemen tüm geleneksel antibiyotiklere direnç gösterirken [3] *P. aeruginosa*, mevcut tüm antibiyotiklere dirençlidir [3, 18, 20, 21] ve *Enterococcus sp.* onlara karşı kullanılan en güçlü antibiyotiklere karşı duyarlı değildir [17]. Dahası, *Escherichia coli* ve *Salmonella sp.* 1950'lerin sonunda çoklu ilaç direnci gösteren bakteriler olarak düşünülmüştür [20]. Benzer şekilde, *Enterococcus sp.* [17, 20], *E. coli* [22], *Klebsiella pneumoniae* [20, 22], *P. aeruginosa* [3, 18, 20, 21] ve *S. aureus* [3, 20] türleri, DSÖ'nün internet sitesinde ÇİDG bakteri suşları olarak bildirilmiştir

[20]. Ne yazık ki, çoklu ilaç direncinin ortaya çıkması uluslararası bir endişe haline gelmiştir [2, 3, 12, 20-22, 24, 25, 30, 65, 70, 106].

Sonuç olarak, patojenlerin AMD'sinin gerçek ve kritik bir halk sağlığı sorunu olduğu muhakeme edebiliriz [2, 20, 22, 24-27, 30, 31, 61, 74, 75, 106]. Bu nedenle, antibiyotik dirençli mikropların önüne geçmek için yeni antimikrobiyal ajanların saptanması önemlidir [2, 23, 61, 75]. Ayrıca, antimikrobiyal dirençli mikroorganizmaların yaygınlaşması, araştırmacıları yeni etkin ilaçlar tasarlamaya teşvik etmiş [3, 27, 55, 59, 67] ve hala klasik antibiyotikler için alternatifler bulmaya yöneltmiştir [1, 12, 23, 24, 27, 28, 30, 61]. En iyi seçenekler, ilaç keşfi [1, 23, 24, 28, 31, 40, 47, 61, 76, 77, 79-82, 87] için umut vadeden antimikrobiyal peptitlerdir [1, 24, 26-28, 81] ve *in vivo* AMP'ler aracılığıyla uygulanan tedaviyi geliştirmek için birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Ancak bu konuda hala ilerleme kaydedilmesi gerekmektedir [3].

1.2. Antimikrobiyal Peptitler (AMP)

AMP'ler küçük [24, 25, 46, 62, 74], biyolojik [26, 27, 77], nispeten kısa [72] ve pozitif yüklü [3, 24, 25, 27, 62, 72, 74, 76, 77, 81] moleküllerinin yanı sıra bakteri gibi tek hücrelilerden insanlara kadar uzanan hemen hemen tüm organizmalarda [24, 25, 28, 39, 74, 79, 86] bulunurlar [1, 59, 71, 72]. Ayrıca, AMP'ler güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler [3, 24, 25, 40, 59, 61, 62, 73]. Böylece mikropların büyümesini engelleyip yok edebilirler [25, 61, 72, 74, 79, 81, 82]. Bu nedenle AMP'ler, bakteri, mantar, parazit bazı virüsler [3, 24, 25, 49, 56, 59, 74-77, 79, 82, 83] dâhil olmak üzere çeşitli mikroorganizmaların [1, 24, 25, 40, 47, 56, 59, 74, 75] yanı sıra kanser hücrelerini [26, 27, 56, 61, 62, 71, 82] ve çoklu ilaç direnci gösteren patojenleri [3, 24, 27, 40, 79, 82, 87] de öldürebildikleri için yeni antimikrobiyal ajanlar olarak kabul edilmektedir [40, 73, 87].

Buna ek olarak, bu AMP'lerin canlıların çoğunda doğal bağışıklığın vazgeçilmez bir parçası olduğu gösterilmiştir [1, 3, 24, 25, 35, 38, 39, 49, 62, 75, 76, 86]. Yaşayan organizmaların tüm alemleri ilk savunma hattını oluşturmak için AMP üretir [26-28, 38, 72, 77, 79].

1.3. Örümcekler

Örümcekler, tüm dünyaya yayılmış en sık karşılaşılan omurgasız hayvanlardır [10, 23, 60, 92, 93, 95, 99, 102, 107, 108]. İlginç bir şekilde, örümcekler zehirli hayvanların en büyük grubunu temsil etmektedir [10, 95, 97, 102, 107]. Aslında, potansiyel peptitlerin başlıca kaynağı olan [7, 103] kırk binden fazla örümcek türü vardır [7, 10, 78, 94, 95, 99, 102, 103, 107-109] ancak yaklaşık iki yüz türü insanlara zararlıdır [10, 95, 107, 109]. Örümcekler zehirlerini öncelikle, olağan avları olan diğer böcekleri öldürmek, felç etmek ve düşmanlarına karşı savunma amacıyla kullanırlarken [8, 10, 78, 82, 88, 92, 95, 100, 101, 104, 108] ilaç tasarımında yeni bir araç olan (örümcek zehirleri için) başka bir amacı da vardır [60, 61, 93, 94, 99, 100].

Aslında, örümcekler zehirli eklem bacaklılardır [92, 94, 97] ve eklem bacaklıların en büyük sınıfı olan Arachnida grubuna girerler [100, 101, 104]. Ayrıca, arachnidlerin zehri iyi bir antimikrobiyal ve özel kullanımları olan anti-insektisit peptit kaynağıdır [40]. Arachnida sınıfının en zehirli üyelerinin Araneae (örümcek) takımı olması [78, 104] ve aktif peptitleri en yüksek olan türler olması ilginçtir [97, 104]. Örümcekler küçük hayvanlar olsa da fazlaca zehirli peptit üretirler [97].

Çalışmamızda zehrini test ettiğimiz *Araneus quadratus* örümceğinin (Arthropoda,- Arachnida,- Araneae) adını ilk olarak Gétaz 1889'da Pays-d'Enhant'ta (Vaud, İsviçre) bir örümcek listesinde hiçbir açıklama yapmadan kullanılmıştır. Öte yandan, bu örümceğin ilk tanımı 1913'de Franganillo tarafından yapılmıştır. Bu türün Gijón ve La Guardia dağlarının eteğinde bulunan çalılarda ve karaçalılarda dişi örneklerini bulduğunda renk değiştirebildiklerini belirtmiş ve bu türleri dört belirgin lekeye sahip, açık yeşilimsi örümcekler olarak nitelendirmiştir [110], (bkz. Fotoğraf 1.1). Benzer şekilde, Simon 1929'da, *A. quadratus*'ların Fransa'da Alpler'in çayırlarındaki kısa çalılarda bulunduğunu bildirmiştir [110].

Fotoğraf 1.1. *Araneus quadratus* örümcek

1.3.1. Örümcek Zehirleri

Genel olarak zehir, "üreten hayvan tarafından beslenmeyi veya savunmayı kolaylaştırmak için normal fizyolojik veya biyokimyasal işlemleri bozan moleküller içeren, bir hayvanda özel bir bezde üretilen ve acı verici bir yara yoluyla hedef hayvana aktarılan bir salgıdır" s.1470 [10], s.501 [111].

Temel olarak örümcek zehri, yılan ve akrep gibi diğer hayvanların zehirlerine benzerdir; farmakolojik olarak çok aktif olmasının yanında aktif ve inaktif materyallerin biyolojik kompleks karışımlarından oluşmaktadır [40, 63, 78, 82, 95, 97, 100, 101]. Öte yandan, örümcek zehrinin başlıca bileşenleri proteinler, peptitler, polipeptitler, enzimler, nükleik asitler, serbest amino asitler, poliaminler, biyoaminler, monoaminler, glikoz, inorganik tuzlar ve nörotoksinlerdir [40, 58, 60, 78, 82, 93- 95, 97, 100, 101, 108, 109]. Buna ek olarak, aynı örümcek ailesinin her bir türünün kendine özgü zehir kompozisyonu [8,108] ve kendine özgü zehir etkileri bulunmaktadır [88,109]. Ayrıca, zehirler aynı türlerde bile değişiklik gösterebilir [112, 113]. Bu unsurların hepsi, araştırmacıların tüm türleri incelemesini zorlaştırmaktadır ve bu konu sınırsız çalışma gerçekleştirmeyi gerektirmektedir [88]. Bununla birlikte, bu farklı moleküllerin hepsinin farmakolojik etkileri olabilir [82] ve yeni ilaçlar geliştirmek için bilimsel araştırmacıların tıbbi ilgisini çektiğini belirtmişlerdir [78, 82, 101, 104].

Aslında, örümcek zehirleri, içinde en az bin benzersiz peptit barındırması [10, 23, 78, 92, 103] ve kırk iki bin örümcek türünün on milyonun üzerinde biyoaktif peptite sahip olması [10, 23, 93, 99, 100, 103] onları yeni terapötiklerin tasarımı için zengin, mükemmel ve doğal bir kaynak kılar [23, 89, 93, 97, 99, 100].

Eski çağlardan beri, örümcek zehirleri ve örümcek ağları geleneksel tıpta kullanılmaktadır [4, 29, 60]. Örümcek zehrinden alınan ilk AMP'ler 1980'lere dayanmaktadır [82, 89]. Şaşırtıcı bir şekilde, Xu ve arkadaşları *E. coli*'ye karşı aktif *L. singoriensis* örümcek zehrinin peptitini test ederken buldukları örümcek zehrinin AMA'sı ilk kez 1989'da bildirmiştir [56, 60, 82, 108]. Öte yandan, AMA örümcek zehri ile ilgili ilk çalışma 1998'de Yan ve Adams tarafından yazılmıştır [51, 97]. Daha sonra yapılan çalışmalar, birçok mikrobun klasik antibiyotiklere direncini arttırması nedeniyle örümcek zehirlerinin antimikrobiyal etkisini arttırdığını ortaya koymuştur [6, 82, 100]. O zamandan beri, çok sayıda örümcek zehri peptiti, antimikrobiyal aktivitelerini saptamak için analiz edilmiştir. Bunlara, *L. carolinensis* kurt örümceği [51, 52] zehrinden elde edilen Lycotoxins I ve II ve Cupiennius-1a [53] ve Cupiennius-1 [56] gibi *C. salei* zehri peptitleri örnek olarak gösterilebilir [55]. Ayrıca, *O. kitabensis* kurt örümceğinin ham zehrinden alınan Oxyopinins peptitleri [57], *Psalmopoeus cambridgi* örümcek zehrinden alınan Psalmopeotoxin I ve II peptitleri [63] ve *L. singorensis* örümcek zehrinden [61] alınan Lycosin II gibi *L. singorensis* zehir peptitleri [48] de bu duruma örnektir. Son olarak, *L. tarabaevi* türünden alınan Latarcins peptitleri (1-7) bu duruma örnek teşkil eder.

1.4. Çoklu İlaç Direnci Gösteren Patojenler (ÇİDG-Patojenler)

Aslında, birkaç gram-negatif ve gram-pozitif bakteri, yanı sıra diğer mikroorganizmalar geleneksel antibiyotik sınıflarına karşı direnç geliştirebilir [2, 4, 12, 19, 33], bu da enfeksiyonların ortadan kaldırılmasını zorlaştırır [2, 12, 31, 69]. Dahası, çoklu ilaç direnci gösteren patojenlerin gelişmesi önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir [2, 3, 12, 20-22, 24, 25, 30, 65, 70, 106]. Dolayısıyla acilen klasik ilaçlar yerine terapötik ajanlar bulunmalıdır [1, 12, 23, 24, 27, 28, 30, 61]. İlginç bir şekilde, en doğal alternatifler, çoklu ilaç direnci gösteren mikroorganizmaların üstesinden gelmek için umut verici ajanlar olan antimikrobiyal peptitlerdir [1, 26, 31, 33, 38, 61, 72]. Çünkü AMP'ler güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptir [3, 24, 25, 40, 59, 61, 62, 73].

Benzer şekilde, AMP'ler, bakterilerin hızlı ölümüne yol açan [61, 81, 82] bakteriyel hücre zarını bozma [25, 61, 81, 82] ve onlara karşı düşük direnç geliştirme özellikleri

[3, 24, 25, 49, 61, 77, 79] sayesinde, geleneksel antibiyotiklerden farklıdır. Çünkü hücre içi işlevlerini [1, 47, 60, 62, 72, 82, 87] ve patojenlerin hücre dışı yapılarını [1, 24, 25, 47, 51, 61, 72, 82, 87, 97] engelleyip değiştirerek patojenlerin ölümüne ve temizlenmesine neden olurlar [24, 72]. Dahası, AMP'lerin mikroorganizmaları birkaç saniye içinde öldürme yeteneği vardır [44, 47, 49, 75, 79, 82, 87].

Son zamanlarda, gözler antimikrobiyal ajanlar olan akrep, örümcek, bal arısı gibi omurgasız hayvanlardan elde edilen zehir bazlı ilaçlara çevrilmiştir [3, 5, 10, 91]. Ayrıca, günümüzde yeni farmasötik maddelerin geliştirilmesi [23, 61, 78, 93, 94, 97, 100] için bir kaynak olarak ve antimikrobiyal ajanlar olarak belirlenen örümcek zehri peptitlerine [60, 61, 93, 99, 100] yönelik kayda değer bir ilgi vardır [46-51].

Bu çalışmada, *A. quadratus* zehrinin antimikrobiyal aktivitesini, dokuz gram-negatif (*Enterobacter aerogenes, K. pneumoniae, P. aeruginosa, P. fluorescens, Salmonella enteritidis, S. kentucky, S. infantis, S. typhimurium* ve *E. coli*) ve sekiz gram-pozitif (*S. aureus, S. epidermidis, Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, E. faecium, E. durans, Listeria innocua* ve *L. monocytogenes*) bakterinin yanı sıra bir mantara (*Candida albicans*) karşı test edilmiştir. Tüm bu mikropların fırsatçı olduğu ve insanlarda ciddi komplikasyonlara neden olabileceği dikkat çekmektedir.

1.5. Gram-negatif Bakteriler

1.5.1. *Enterobacter aerogenes*

E. aerogenes, çubuk şekilli gram-negatif bir bakteridir [114]. Fırsatçı bir patojendir [115] ve gastrointestinal floraya aittir [114, 115]. Ayrıca, *E. aerogenes*; penisiline [20, 22], ampisiline, imipeneme [114, 116], beta-laktam antibiyotiklere [115], sefalosporinlere [20, 22, 116], siprofloksazine, gentamisine, temosiline, aminoglikozitlere, aztreonama, tobramisine, piperasiline, amikasine, kotrimoksazola, florokinolonlara, sefazoline, sefuroksime, seftriaksona, seftazidime ve amoksisilin-klavulanatına [116] çoklu ilaç direnci gösteren bir bakteri [115, 116] olmanın yanı sıra ölümcül olma oranı [116] % 38 olarak düşünülmektedir. Çünkü *E. aerogenes* hastane enfeksiyonlarından [114-116] en sık izole edilen bakterilerden biridir ve ağırlıklı olarak zayıflamış hastaları etkilemektedir [115]. Dahası, *E. aerogenes* kan

dolaşımı enfeksiyonlarına [114, 115], bakteriyemiye [114, 116], akciğer iltihabına, karın zarı iltihabına, yaralara ve idrar yolu enfeksiyonlarına [116] ve ciddi septisemiye neden olabilir [114].

1.5.2. *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae, hastane kökenli enfeksiyonlara neden olan en çok bilinen gram-negatif bakterilerden biridir [65, 117-119]. Çünkü mukozayı ve deriyi [117, 120] kommensal biçimde kolonize eder ve elle bulaşan çapraz enfeksiyonların kaynağını oluşturur [120]. Buna ek olarak, *K. pneumoniae* çoklu antibiyotik direnci gösteren bir bakteridir [118-120]. Çoklu ilaç direnci ilk kez 1992'de bildirilmiştir [120]. Penisiline, sefalosporinlere [20, 22, 119, 120], karbapeneme [22, 118-120], seftazidime, gentamisine [22, 120], siprofloksazine [118], monobaktamlara [119], imipeneme, meropeneme, ertapeneme, seftriaksona, ampisiline, amoksisiline, amikasine, tobramisine, netilmisin, aminoglikozitlere, amoksisilin-klavulanik aside, ampisilin-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam ve seftazidim-klavulanik asit inhibitörü kombinasyonlarına direnç gösterebilir [120]. Ayrıca *K. pneumoniae,* kronik obstrüktif akciğer hastalığı, akciğer iltihabı, cerrahi alan enfeksiyonu, kateterle ilişkili enfeksiyon, genital yol iltihabı [118], septisemi [117, 120], bakteriyemi [65, 118, 119], idrar yolu enfeksiyonu [65, 118, 120], kan dolaşımı enfeksiyonu [119], tüberküloz hastalarında [121] ikincil enfeksiyonlar [117], gıda zehirlenmeleri ve ishal ile [117] bağdaştırılmaktadır. Ayrıca, ölüme sebep olma oranı oldukça yüksek olabilir ve hastalıklara neden olma oranı da % 25 ila % 75 arasında değişiklik gösterebilir [118, 119, 120].

1.5.3. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, fırsatçı, çubuk şeklinde ve gram-negatif bir bakteridir [15, 117, 122]. Nemli ortamlarda [18, 122], bitkilerde, suda ve toprakta [18] bulunabilirler, ancak nadiren mikrofloranın bir parçası olarak bulunurlar [18, 122]. Bu nedenle, bu patojen; aztreonam, tikarsilin-klavulanat, piperasillin-tazobaktam [18] meropenem, imipenem, amikasin (sefepim), levofloksasin, siprofloksazin, ofloksazin, moksifloksazin, piperasilin [18, 22], amoksisilin, kloksasilin, sefuroksim, eritromisin [21], karbapenem, florokinolon [22], gentamisin, seftazidim [18, 21, 22],

sülfonamidler, kloramfenikol, trimetoprim, tetrasiklin, makrolidler, rifampin, ampisilin, sefemler, sulfametoksazol [122], aminoglikozitler, kinolonlar ve beta-laktam antibiyotikleri [18, 122] dâhil olmak üzere neredeyse tüm geleneksel antibiyotiklere [3, 18, 20, 21, 66, 118, 122] direnç gösterdiğinden hastanelerde [18] çoklu ilaç direnci gösteren patojen olarak görülen tedavilerde [40] çok kısa bir süre içinde direnç geliştirdiğinden potansiyel olarak zorlu bir patojen gözüyle bakılmaktadır. Ayrıca, *P. aeruginosa*, septik şok, karınzarı iltihabı, bakteriyemi, akciğer iltihabı [18, 122], diyabetik ayak ülseri [30], idrar yolu ve yara enfeksiyonları [30, 122] gibi hastaneye bağlı tedavisi zor enfeksiyonların [18, 40, 66, 122] yanı sıra çok yaygın olmayan toplum kökenli keratit, folikülit, kulak kanal enfeksiyonları, malignant otitis, kemik iliği iltihabı, osteomiyelit ve kalp iç zarı iltihabına da neden olmaktadır [122]. Ayrıca, *P. aeruginosa*, % 40 ila % 60 arasında ölüme sebep olma oranına sahiptir [122].

1.5.4. *Pseudomonas fluorescens*

P. fluorescens, nemli depolarda yetişebilen ve içme suyunu kirletebilen [123] çubuk şekilli gram-negatif bir bakteridir [117, 123]. Fakat nadiren insan cildinde kontaminasyona neden olur [124]. *P. fluorescens*, hastane kökenli bir patojen olup [123, 124], septisemiye, karınzarı iltihabına [123], tümörlere, bakteriyemiye [123, 124], kistik fibrozise ve bağışıklık sistemi zayıf hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilir [117]. Ayrıca, *P. fluorescens'in* bazı suşları imipeneme direnç gösterebilir [123]. Öte yandan, *P. fluorescens'un* hastalık oluşturma derecesi *P. aeruginosa'dan* daha düşüktür ve daha az patojeniktir [123, 124].

1.5.5. *Salmonella enteritidis*

S. enteritidis, gram-negatif bir bakteridir [117]. Hastanelerde ve çiftliklerde gözlemlenen ve aynı zamanda hayvanların gastrointestinal kanallarında kolonileşen ve dünya çapında önemli hastalıklar olan mide iltihabı ve gıda kaynaklı patojenler yüzünden gerçekleşen ölümlerin temel sebebi olan insanlarda et zehirlenmelerine neden olabilen yaygın bir gıda kaynaklı patojendir [117, 125-129]. Ayrıca, *S. enteritidis*, çoklu ilaç direnci gösteren bir bakteri olup [126]; amoksisiline, eritromisine, gentamisine, seftazidime, sefuroksime, kloksasiline [21], ampisiline,

seftiofura, sefoksitine, sefalosporinlere, nalidiksik aside, streptomisine, sülfisoksazol, tetrasikline, kinolonlara, amoksisilin-klavulanik aside, kloramfenikol, kanamisine ve trimetoprim-sulfametoksazola direnç gösterebilir [126].

1.5.6. *Salmonella kentucky*

S. kentucky, gıdalarda yaygın olarak [16, 125-127] görülen gıda kaynaklı bir patojen olan [129] gram-negatif bir bakteridir [16, 117]. *S. kentucky*, genellikle nadir görülen ve insan hastalıklarıyla nadiren ilişkili olmasına rağmen [129] karın ağrısı, ishal, eklem yangısı, rektal ülserasyon [129] yaşanan et zehirlenmelerinin [16, 129] yanı sıra septisemi, gıda zehirlenmesi ve idrar yolu enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyonlara [16] yol açabilir [117]. Buna ek olarak, *S. kentucky*; çoklu ilaç direnci gösteren bir bakteri olup[126, 129]; siprofloksazin, kotrimoksazol, nalidiksik asit, sülfonamit [16, 129], aminoglikozitlerin çoğu, amoksisilin, azitromisin, gentamisin [16], ampisilin, sefalosporinler, streptomisin, tetrasiklin ve kinolonlar dâhil olmak üzere birçok antimikrobiyal ilaca direnç gösterebilir [129].

1.5.7. *Salmonella infantis*

S. infantis, çubuk şeklindeki gram-negatif bir [68, 117] bakteridir ve canlı hayvanların normal florasında bulunur [117, 126, 130]. Gıda kaynaklı en önemli patojenlerden biridir [68, 127, 130]. Çiftliklerde ve hastanelerde izole edilir ayrıca küçük çocukları ve yetişkinleri etkilemektedir [127]. Ek olarak, *S. infantis*, çoklu ilaç direnci gösteren bir patojendir [16]. İnsanlarda mide iltihabına [126, 130], et zehirlenmelerine ve ölümcül sonuçları olan septisemi semptomları gibi hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olur [127]. Benzer şekilde, tüm *Salmonella sp*. türleri de idrar yolu enfeksiyonlarına, septisemiye, gıda zehirlenmesine ve ishale neden olmanın yanında [117] hastalık ve ölüm oranlarını arttırmakla ilişkilendirilir [16].

1.5.8. *Salmonella typhimurium*

S. typhimurium, bir *Salmonella* serotipidir [15]. Tüm *Salmonella sp.* türleri gram-negatif [15, 117] ve gıda kaynaklı patojenler [125-127, 131] olup memelilerde potansiyel enfeksiyonların en büyük nedenidir [125, 131]. Aslında, *S. typhimurium* da su vasıtasıyla taşınan bir patojendir, uzun süre doğal ortamda hayatta kalabilir

[132] ve ilk izolasyonu 1980'lerin başında gerçekleşmiştir [133]. *S. typhimurium* tifoya [30], septisemiye, gıda zehirlenmesine, ishale [117] ve salmonellozise neden olur [129, 132, 133]. Ayrıca, *S. typhimurium* ciddi enfeksiyon ve ölümle ilişkilendirilir [133]. Bu nedenle halk sağlığına karşı risk oluşturmaktadır [132, 133]. *S. typhimurium*; ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfonamitler, tetrasiklin [131, 133], sefalosporinler, trimetoprim ve kinolonlar dâhil olmak üzere birçok antibiyotiğe direnç gösterebilir [133].

1.5.9. *Escherichia coli*

E. coli, gram-negatif bir bakteri [15, 19, 68, 117] olup normalde memelilerin gastrointestinal kanalında bulunur [19]. Su kaynaklı [132] ve gıda kaynaklı [68] patojen olarak tanımlandığı doğal ortamlarda uzun süre hayatta kalabilir. *E. coli*; septisemi, gıda zehirlenmeleri ve ishal gibi bağırsak içi enfeksiyonlara yol açmanın yanında insanlarda ve hayvanlarda karaciğer, akciğer, soluk borusu ve kalp dış zarı gibi bağırsak dışı hastalıklarına neden olma özelliğine sahiptir [134]. Ayrıca, idrar yolu enfeksiyonlarında [19, 30, 117], bakteriyemide, [30, 134], yenidoğan menenjitinde [134], yara enfeksiyonlarında [30] ve kolibasilloziste [134] en sık rastlanan etken madde *E. coli*. Buna ek olarak, lipofilik zarından dolayı önemli direnç gösterdiği için en problemli bakterilerden biri olan *E. coli* [12], kotrimoksazole [19, 20], siprofloksazine, ko-amoksiklava [19], seftazidime [21, 22, 120], karbapeneme, seftriaksona, sefalosporine, imipeneme, meropeneme [22], amoksisiline, eritromisine, seftazidime, sefuroksime, kloksasiline [21], florokinolonlara, tetrasikline [20] ve gentamisine [120] direnç gösterebilir.

1.6. Gram-pozitif Bakteriler

1.6.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus, gram-pozitif bir bakteridir [15, 68, 117], çevresel bir mikroorganizma olup [106] anterior burun komensalıdır [117]. Ayrıca hastane ve toplum kökenli enfeksiyonlara neden olan potansiyel ölümcül bakterilerden biridir [12, 30, 59, 135]. *S. aureus*; penisilin [2, 20], metisilin [2, 20, 22, 59, 61, 115], vankomisin [2, 20, 105] ve oksasilin [22] gibi çok bilinen klasik antibiyotiklere [3, 12, 59] direnç

gösterebildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, *S. aureus* gıda kaynaklı bir patojendir [68] ve doku hasarına yol açan birçok toksin üretmektedir [117, 136]. Ayrıca, çocuk ve yaşlı hastalarda müsküloskeletal enfeksiyonunun [137], tüberküloz hastalarında da ikincil enfeksiyonların [121], bakteriyeminin [17], meme iltihabının [106], osteoartiküler enfeksiyonunun [137], gıda zehirlenmesinin [117] en büyük nedeni olup genellikle risk altındaki hastalarda piyojenik enfeksiyonlara neden olmaktadır [136]. Tedavisi zor deri enfeksiyonlarının da sebepleri arasında bulunur [106].

1.6.2. *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis, gram-pozitif bir bakteri [117] olup aynı zamanda fırsatçı insan patojenidir [136]. Normalde insan derisi ve mukoza zarına yerleşse de [106, 117, 136] kardiyovasküler, boğaz, göz, kulak, burun ve kan yolu enfeksiyonları [136] gibi hastane enfeksiyonlarının [106, 136] en sık rastlanan etiyolojisidir. Ayrıca gıda zehirlenmesine, kalp içzarı iltihabı, yumuşak doku, kemik ve eklem enfeksiyonlarına da neden olur [117]. Benzer şekilde, *S. epidermidis* risk altındaki hastalar için en bulaşıcı ajandır [136]. *S. epidermidis* bakterileri tarafından biyofilm oluşumu nedeniyle *S. epidermidis* enfeksiyonlarını yok etmek çok zordur. Ayrıca, *S. epidermidis* metisilin ve diğer antibiyotiklere direnç gösterebilir [136].

1.6.3. *Bacillus subtilis*

B. subtilis, gram-pozitif bir bakteridir [12, 117, 138, 139], hava, su, toprak, bitki ve hayvan dokuları [66, 117] da dâhil olmak üzere çevrede [66, 139] yaygındır ve uçucu çevre koşullarında hayatta kalabilir [138]. *Bacillus sp.*; kalp içzarı iltihabı ve menenjitin [138] yanı sıra gıda zehirlenmesi [66, 117, 138], şarbon hastalığı, kateterle ilişkili enfeksiyonlar [117], bakteriyemi, göz ve kulak enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonu, solunum yolu enfeksiyonu ve gastrointestinal kanal enfeksiyonları gibi tesadüfi insan enfeksiyonları için fırsatçı ve yöneticidir. Diğer yandan, *B. subtilis*, bağışıklığı zayıf hastalar hariç [12, 139] genellikle düşük patojendir [139]. *B. subtilis*, bağırsak bozukluğunu önlemek için probiyotik olarak kullanılmış olsa da septisemi gibi ciddi enfeksiyonlara yol açabilir [138, 139]. Bununla birlikte, *B. subtilis,* kloramfenikol, eritromisin, novobiosin, penisilin ve rifampine karşı antibiyotik direnci gösterebilir [139].

1.6.4. *Enterococcus faecalis*

E. faecalis, gram-pozitif bir bakteridir [117] insanların ve hayvanların gastrointestinal kanalında komensal bir mikroflora elemanıdır [17, 105, 140, 141]. Ancak ciddi hastane kökenli enfeksiyonlara [17, 105, 140-142] neden olabilir ve yüksek miktarda *E. faecalis* hastalık ve ölüm oranlarının artışına neden olur [142]. *E. faecalis*; streptogramin antibiyotiğinin yanı sıra aminoglikozit, ampisilin ve vankomisin dahil olmak üzere en yaygın anti-enterokoksik antibiyotiklere [17, 105, 140] direnç göstermesi nedeniyle çoklu antibiyotik direnci gösteren patojen olarak tanımlanmıştır [17]. Öyle ki, tedavisi zor enfeksiyonlara yol açtığı [140] ve kan dolaşımı [17, 141-143] enfeksiyonlarının yanı sıra gastrointestinal enfeksiyonu, kateterle ilişkili enfeksiyonlar [117], apikal periyodontitlar, endodontik enfeksiyonlar [141], subakut kalp iç zarı iltihapları [17, 105, 140-142], bakteriyemi [17, 142, 143], karınzarı iltihabı, endoftalmit [140], idrar yolu enfeksiyonu [17, 117, 140, 141, 143], kronik enterokoksik prostatit, endovasküler enfeksiyon [17], cilt yaraları ve komplike karın enfeksiyonları [17, 141] dahil olmak üzere tehdit oluşturan ciddi enfeksiyonlara [17, 105] neden olduğundan klinik bir sorun [17, 105, 141] olarak görülmektedir. Buna ek olarak, beyin apselerine ve septisemiye de neden olabilir [141].

1.6.5. *Enterococcus faecium*

E. faecium, gram-pozitif bir bakteridir [117]. Normal bağırsak florasının bir parçası olmakla birlikte [17, 105, 117, 140, 141], *Enterococcal sp.* türüne karşı en yararlı konvansiyonel antibiyotikler [17] olan ampisiline [17, 22, 105], vankomisine [17, 105, 143] ve aminoglikozite [17] direnç gösterdiği için çoklu ilaç direnci gösteren bir bakteri [105] olarak görülmektedir. *E. faecium*, karınzarı iltihabı, endoftalmit [140], kalp içzarı iltihabı [17, 105, 140], deri enfeksiyonları, komplike karın enfeksiyonları [17, 141], kan damar enfeksiyonları [17, 141, 143], bakteriyemi [17, 141, 143], gastrointestinal enfeksiyonlar, kateterle ilişkili enfeksiyonlar [17], idrar yolu enfeksiyonları [17, 117, 141, 143], menenjit, endovasküler enfeksiyonlar [17] gibi hastane kaynaklı [17, 105, 140, 143] ve diğer ciddi enfeksiyonlara [17] yol açtığı için klinik bir sorun olarak kabul edilmiştir [105] ve hastanede yatan hastaların kayda değer hastalık ve ölüm nedenidir [143].

1.6.6. *Enterococcus durans*

E. durans, gram-pozitif bir bakteridir [117] ve gastrointestinal kanalda bulunan küçük saf bir mikrobiyotadır [17, 105, 117, 144]. Ancak aynı zamanda nadir rastlanmasına [105, 144] rağmen insan enfeksiyonlarına neden olabilen fırsatçı bir bakteridir [105, 140]. Enterokok enfeksiyonları [105] zaman zaman *E. durans'a* bağlı olsa da bölgesel bir sorun haline gelmiş [105, 143] olup, bunların bir araya toplanması miyokardi ve akciğer doku yıkımına neden olabilir [105]. Bununla birlikte, *E. durans* suda ve hayvansal kökenli gıdalarda bulunabilir [144] ve katetere bağlı enfeksiyonların [117] yanı sıra kalp iç zarı iltihabı [17, 105, 140], bakteriyemi [17, 143], karınzarı iltihabı, endoftalmit [140], idrar yolu enfeksiyonu [17, 117, 143], komplike karın enfeksiyonları [17, 117] gibi ciddi enfeksiyonlara neden olabilir [17].

1.6.7. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes, çubuk şeklinde gram-pozitif [68, 117, 145-148], invazif, fırsatçı [147, 149] ve gıda kaynaklı patojen bir bakteridir [68, 117, 145, 147, 148, 150, 151]. Üstelik *L. monocytogenes,* konak hücrelerin hem içinde hem de dışında büyüyebilir [145, 146, 148]. Ampisilin, gentamisin ve metisilin gibi birçok klasik antibiyotiğe direnç gösterdiğinden [151] tedavi edilmesi zor toplum kökenli enfeksiyonlara neden olabilir [145]. Öte yandan, *L. monocytogenes* insanlarda ve hayvanlarda şiddetli hastalıklara neden olup [145, 147, 150, 151]; influenza benzeri semptomların ve mide iltihabının [151] yaşandığı listeriyoza [145, 146, 150, 151] gibi gıda kaynaklı enfeksiyonlar yüzünden % 30'luk ölüm oranına [146, 149, 150], sağlıklı bireylerde merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarına [146] ve duyarlı kişilerde beyin yangısı [145, 151], menenjit [117, 145, 149, 151], septisemi [145, 149, 151] gibi kliniksel hastalıklara [148, 151], hamile kadınlarda plasentit ve fetüs enfeksiyonlarına [145] ve anneden bebeğe geçen enfeksiyonlara yol açar [146].

1.6.8. *Listeria innocua*

L. innocua, çubuk şeklinde gram-pozitif bir bakteri [117, 145, 149] olup gıdalarda ve çevrede çok sık rastlanan [117, 149] gıda kaynaklı bir patojendir [145,149]. İlginç bir şekilde, *L. innocua* genellikle nonpatojeniktir (hastalığa yol açmaz) [145, 149, 151] ancak antibiyotik direnci [151] ve yaygınlığı diğer *Listeria* türlerinden [150, 151]

çok daha yüksektir. Ayrıca beyin yangısı [145], bakteriyemi [149] listeriyoza, septisemi [145, 149, 151] ve menenjit [117, 145, 149, 151] gibi insan hastalıklarıyla [149] ilişkilendirilir. Öte yandan, *L. innocua*, *L. innocua* ve *L. monocytogenes*'de belirtilen *Listeria sp.*'nin yüksek direnç düzeyinin yanında [151] penisilin ve oksasiline de direnç gösterebilir [149]. Ayrıca *L. innocua*, *L. monocytogenes* varlığı için doğrulayıcı olarak kullanılabilir [150].

1.7. Mantarlar

1.7.1. *Candida albicans*

C. albicans; gastrointestinal kanalda, kadın genital sisteminde, deride ve ağız içi boşluğunda en bol rastlanan mantardır [62, 152-156]. Tümü insan mikrobiyotası olup [62, 153, 155, 156], normalde sağlıklı yetişkinlerin gastrointestinal sisteminde % 20 ila % 80 oranında bulunurken sağlıklı kadınların vajinalarında % 20 ila % 30 oranında bulunur [54]. *C. albicans*, en yaygın fırsatçı patojenlerden biridir [54, 153-155]. Özellikle bağışıklık sistemlerinde eksiklik bulunan hastalar [62, 152-155] için en tehlikeli mantardır [24, 85, 153-156]. Ayrıca hastanede yatan hastalarda en sık izole edilen kan dolaşımı patojenleri arasında üçüncü sıradadır. Buna ek olarak, *C. albicans* neden olduğu enfeksiyonlar halk sağlığı için bir tehlike olarak değerlendirilmektedir [62, 155]. Çünkü *Candida sp.* türüne karşı terapötik ajanlar gerçekten sınırlıdır [152] ve *C. albicans* bazı suşları yaygın antifungal ajanlar olan flukonazole direnç gösterir [79, 152]. *C. albicans* enfeksiyonları, hastaların ölüm oranını % 50'ye yükselten bir risk faktörüdür [155]. Öte yandan, *C. albicans* insanlarda yenidoğan enfeksiyonları [155], deri iltihabı [152], karınzarı iltihabı [155], protez stomatiti [155, 156] ve pamukçuk [24, 62, 152, 154-156] gibi ciddi kutanöz ve mukokütanöz mantar hastalıklarına yol açabilir [24, 54, 62, 85, 152, 154, 155].

2. LİTERATÜR İNCELEMESİ

2.1. Doğal Ürünlerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Tıbbi ürünlerin ana kaynağı aslında doğal bileşiklerdir [44, 68] ve ilaç olarak kullanılan doğal ürünlerin çoğu bitkilerden elde edilir [14, 15, 21, 65, 67, 69, 70, 93]. Çünkü bitkiler patojen bakterileri öldürme kabiliyetine sahip birçok sitotoksik molekül üretirler [12]. Bu moleküllerin güçlü bir antimikrobiyal aktivitesi vardır [65, 74]. Genel olarak, bitkilerin antimikrobiyal maddeleri, gram-pozitif bakterilerin büyümesini gram-negatif bakterilerden daha çok engellerken [66], bitki bileşenleri gram-negatif bakterilere karşı güçlü bir aktivite göstermez [12].

Uzun zaman önce, bitkiler birçok eski ve yeni çalışmalarla molekül aktivitelerini ortaya çıkarma amacıyla test edilmiştir [14, 65, 69]. Örneğin; Bonjar [65], 76 familyaya ait 195 İran tıbbi bitkisinin antibakteriyel etkisini disk difüzyon yöntemini ve mikrodilüsyon testini kullanarak belirlemiştir ancak 37 familyaya ait sadece 64 bitki örneği, farklı etkileri (yüksek, orta ve düşük) olan en az bir bakteri türüne karşı antibakteriyel etki gösterirken diğer 131 bitki örneğinin hiçbiri inhibe edici etki göstermemiştir. Bunun yanında, Kumar, Chauhan, Padh ve Rajani'nin [66] 2006'da agar dilüsyon testiyle birçok insan patojenine (bakteri ve mantar) karşı gerçekleştirdiği, Hindistan'a ait 33 familyanın 61 tıbbi bitki örneğinin AMA'sını değerlendirdiği çalışmada, sadece 28 özüt, test edilen en az bir mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal bir etki sergilemiştir. Ayrıca, Doughari [67], 2006'da geleneksel olarak ilaçlarda kullanılan Demirhindi bitkisinin AMA'sını gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere ve mantara karşı hem disk difüzyonu hem de minimum inhibisyon konsantrasyon testi yöntemleri kullanarak taramış ve sonuçta demirhindi özütleri hem gram-negatif hem de gram-pozitif bakterilere karşı inhibe edici etki gösterirken hiçbir bir mantar öldürme etkisi göstermemiştir. Ayrıca, 2010'da Klančnik, Piskernik, Jeršek ve Možina [68], birtakım gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı çeşitli yöntemler uygulayarak farklı bitki özütlerinin antibakteriyel aktivitesini araştırmış ve bunun sonucunda test edilen bitki özütleri gram-pozitif bakterilerin ve *Campylobacter sp.* türünün büyümesini engellemiştir. Al Akeel ve ark. [69], disk

difüzyon testi kullanarak bazı bakteri suşlarına (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Proteus vulgaris*) karşı altı farklı tıbbi bitkinin antibakteriyel etkisini analiz etmişler ve bu bitkilerin farklı potansiyellere sahip etkili antibakteriyel aktiviteleri olduğunu bulmuşlardır. Yakın zamanlarda, Alam ve ark. [15] üç gram-negatif ve iki gram-pozitif bakteriye karşı sadece disk difüzyon yöntemini kullanarak Bangladeş'ten üç farklı bitkinin antimikrobiyal özelliklerini incelemiş ve bu karşılaştırmalı çalışmanın sonucunda test edilen bitki özütlerinin farklı antibakteriyel aktiviteler gösterdiğini bulmuşlardır. Daha da yakın bir zaman olan 2016'da, Abdalla ve Abdallah [70], Sudan'daki tıbbi bitkileri kapsayan en geniş incelemeyi ortaya koymuşlardır. Bu inceleme, *in vitro (yapay ortamda)* disk difüzyonu ve kap-plaka yöntemleri kullanılarak bazı gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkiler gösteren 64 familyaya ait 142 bitki özütünü içermektedir. Yine 2016'da, disk difüzyon testi uygulayarak Nijerya'ya ait 11 adet bitki özütünün kümes hayvanları bakterilerine karşı gösterdiği antimikrobiyal özellikleri ortaya koyan Akinyemi, Abiala, Olayiwola, Babatunde, Aiyelaagbe ve Akinyemi [21] tarafından gerçekleştirilen bir çalışma sonucunda sadece 7 bitki özütü farklı seviyelerde antibakteriyel aktiviteler göstermiştir.

2.2. Omurgalıların ve Omurgasızların Antimikrobiyal Aktivitesi

Doğal moleküller, aslında tıbbi ürünlerin en önemli kaynağıdır [44, 68]. Diğer yandan da, bitkiler farmasötik ajanlar olarak kullanılan en doğal ürünlerdir [14, 15, 21, 65, 67, 69, 70, 93]. Öte yandan, son yirmi yılda omurgalılardan ve omurgasızlardan zehir kaynaklı peptitler etkin terapötik geliştirmek için kullanılmıştır [93]. Zehir peptitleri, yeni farmakolojik ajanların tasarımı için mükemmel bir kaynak oluşturmaktadır [6, 9, 63, 88, 90, 91, 93]. Çünkü zehirler yüzlerce hatta binlerce eşsiz biyoaktif molekülü içermekte [10] ve bu durum ilaç keşfi için çok önem arzetmektedir [88, 92]. Ayrıca zehir peptitleri; tesiri, dayanıklılığı, özgünlüğü ve seçiciliği bakımından ilaç geliştirmek için yararlıdır [8, 10, 78, 91, 93, 96, 102]. Zehirlerin ilaç olarak kullanılması klasik ilaç tedavilerinin yerine geçmektedir [7, 8]. 2011'e kadar, neredeyse 60 zehir peptitinin eczanelerde satışı 13 milyar dolara yapılmıştır [10].

Bununla birlikte, insan [32], timsah [33], kurbağa [31, 34-37], yılan [38] ve balık [39] gibi omurgalılardan [3] ve akrep [40-45], yengeç [46, 47], örümcek [4, 29, 48-63] ve bal arısının [64] yanı sıra muhteşem antimikrobiyal ajan [6, 10, 91] olan diğer böcekler [73, 157] gibi omurgasızlardan alınan peptitlere bağlı tarapötiklere duyulan ilgi son yıllarda artmıştır.

Nitekim, omurgalıların ve omurgasızların peptitlerinin potansiyel AMA'sını kanıtlayan birçok çalışma bulunmaktadır.

İlk olarak, Helmerhorst, Reijnders, van't Hof, Veerman ve Nieuw Amerongen [32] insan ve böceklerden alınan katyonik peptitlerin antifungal ve hemolitik aktivilerini karşılaştırmış ve sonuçlara göre çoğu peptitin çok yüksek peptit konsantrasyonlarında bile insan kırmızı kan hücrelerinde hemolitik etki göstermeden kandidasidal aktiviteye sahip olduğunu fakat etkilerinin gerçekleştirilen koşullara bağlı olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, son zamanlarda Barksdale, Hrifko, Chung ve van Hoek [33] genellikle kliniksel olarak izole edilmiş ve çoklu ilaç direnci gösteren bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesini incelemek üzere, Amerika aligatoru *(Alligator mississippiensis)* plazmasından üç yeni peptit (Apolipoprotein 5, 6 ve Alpha-1-antiproteinaz) saptamıştır. Apolipoprotein 5 ve 6, *S. aureus, P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'ye karşı güçlü ancak *E. coli* suşlarına karşı daha az aktif olduğu saptanmıştır; Alpha-1-antiproteinaz ise *E. coli, S. aureus* ve *A. baumannii*'ye karşı çok güçlü bir aktiviteye sahip ancak *P. aeruginosa*'ya karşı zayıf bir aktivite göstermiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, Apolipoprotein 5, 6 ve Alfa-1-antiproteinaz AMP olsalar da hemolitik etki göstermemişlerdir.

Dahası, kurbağa peptitlerinin AMA'sını tespit eden eski ve yeni birçok araştırma bulunmaktadır. 1988'de Chen, Brown, Morell ve Huang [34] Afrika pençeli kurbağası *(Xenopus laevis)* derisinden [3, 13, 24, 27, 28, 34-36, 74] izole edilmiş maganin peptitlerinin (1 ve 2) ve türevlerini (A, B, C, D, E, F ve G) antimikrobiyal aktivitelerini ortaya çıkarmak için sentezleyip değerlendirmişlerdir. Bununla birlikte, Chen ve ark. [34] bu peptitlerin gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyal etkisini makro-dilüsyon testiyle tespit etmiş ve maganin peptitlerinin ve türevlerinin yüksek antimikrobiyal ve düşük hemolitik aktiviteler gösterdiklerini

kaydetmişlerdir. Aynı zamanda, Wong, Bowie ve Carver [36] tarafından çeşitli bakteri suşlarına karşı yeşil ağaç kurbağası *Litoria splendida* derisinden izole edilmiş AMP'lerin biri olan sentetik Caerin 1.1'in antibakteriyal aktivitesini göstermek için gerçekleştirilen eski bir çalışmada, Caerin 1.1. ve varyantlarının birçok mikroorganizmanın büyümesini engellediği sonucuna ulaşılmıştır. Shin ve ark. [35] melez peptitleri (*Hyalophora cecropia* pupasının hemolenfinden alınan Cecropin A ve *X. laevis* kurbağasının derisinden alınan maganin 2'yi) tasarlamış ve sentezlemiştir. Daha sonra *E. coli* ve *B. subtilis* bakterilerinin yanı sıra insan eritrositlerine karşı antimikrobiyal etkisini test etti ve tüm peptitlerin insan eritrositlerinin yanı sıra hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilere karşı farklı etkiler gösterdiği sonucuna ulaşmıştır. Aynı şekilde, "Bell Frog" *Litoria aurea* ve *L. raniformis*'in derisinin salgı bezinden sırasıyla elde edilen 17 ve 16 aurein peptiti Rozek ve ark. [37] tarafından biyomoleküler etkilerini ortaya koymak üzere test edilmiş, bu peptitlerin sadece 13'ü antikanser ve antibakteriyal aktiviteler göstermiştir. Yakın zamanda, Murray, Cooke ve Watson [31], üç bakteri suşuna ve insan hücrelerine karşı üç kurbağa türünün (*Phyllomedusa sauvagii*, *Bombina orientalis* ve *Odorrana schmacteri*) deri salgılarının AMP'lerinin antibakteriyel ve hemolitik etkileriyle ilgili bir çalışma gerçekleştirmiştir. Sadece *Phyllomedusa sauvagii*'den izole edilen AMP'ler, insan lenfositlerine karşı hemolitik etki göstermemiş ancak gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyal aktivite göstermiştir.

Diğer taraftan, 30 farklı yılan türünden alınan zehirler, disk difüzyonu testiyle test edilmiştir [38]. Örneğin, Hakim ve Reza [38] Bangladeş'te *Naja naja* yılanının zehrinin sadece iki bakteriye karşı antibakteriyal aktivitesini göstermek için disk difüzyon yöntemiyle taramış, *Naja naja* zehrinin inhibe edici etkisi *E. coli*'ye karşı kısmen aktifken, *Bacillus thuringiensis*'a karşı son derece zayıf olduğunu tespit etmiştir.

Doğal olarak, balık peptitleri de terapötik amaçlar için gelişimsel farmakolojik bileşiklerin geniş bir kaynağını temsil eder [86, 90]. Bu nedenle, balık peptitlerinin AMA'sı hakkında sayısız çalışma yapılmıştır. Örneğin, Destoumieux, Bulet, Strub, van Dorsselaer, ve Bachère [39], *Penaeus vannamei* balığından çıkarılan

antimikrobiyal peptit olan penaeidinlerin AMA'sını çeşitli mikroorganizmalara (gram-pozitif ve gram negatif bakteriler, maya ve filamentöz mantarlar) karşı minimum inhibisyon konsantrasyon testiyle araştırmıştır. Sonuç olarak, penaeidinin en çok test edilen mantarlara karşı güçlü etkisini, gram pozitif bakterilere karşı güçlü antibakteriyal etkisini, gram-negatif bakteri suşları üzerinde ise kötü veya etkisiz olduğunu göstermiştir.

Akrep, yengeç, örümcek, bal arısı ve diğer böcekler gibi omurgasız hayvanların omurgalılar gibi gelişmiş bir bağışıklık sistemine sahip olmamasına rağmen çeşitli enfeksiyonlara karşı antimikrobiyal aktivite gösteren alternatif peptitlere sahip oldukları belirtilmelidir [64].

İlk olarak, Torres-Larios, Gurrola, Zamudio ve Possani [42], *Hadrurus aztecus* akrebinin zehrinden izole edilen hadrurin peptitinin AMA'sı hakkında bir çalışma gerçekleştirmiş ve bu peptit birkaç gram-negatif ve gram-pozitif bakterinin büyümesini engellemiştir. Daha sonra, Villegas ve ark. [40], İmparator akrebinden *(Pandinus imperator)* alınan zehirli bir peptitin AMA'sını incelemiş, bu peptit, gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı potansiyel bir antibakteriyel aktivite göstermiştir. Ayrıca, Conde, Zamudio, Rodriguez ve Possani [41], yine aynı akrepten (*P. imperator*) alınan bir akrep peptitini test etmiş ve özellikle *B. subtilis* ve *K. pneumoniae*'ye karşı antibakteriyel etki sergilediği ve *Plasmodium berghei* parazitine karşı antimalaryal etkisi gösterdiği sonucuna ulaşmıştır. Aynı zamanda, *Opistophtalmus carinatus*'tan alınan Opistoporin 1 ve 2 ve *Parabuthus schlechteri*'den alınan akrep zehirlerinin Parabutoporin peptiti dâhil olmak üzere diğer birçok akrep peptiti potansiyel AMA'ları nedeniyle Moerman ve ark. [43] tarafından test edilmiş; tüm bu peptitler test edilen mikroorganizmaların (gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin yanı sıra mantarların) büyümesini engellemiştir. Salama ve Geasa [44] iki gram-pozitif ve iki gram-negatif bakterinin yanı sıra bir mantar türüne (*C. albicans*) karşı Mısır'a ait üç akrebin (*Leuirus quinquestriatus*, *Androctonus amoreuxi* ve *A.australis*) antimikrobiyal ve hemolitik aktivitelerini test etmiştir. Çalışmanın sonucunda *A. amoreuxi* ve *A.australis* zehirleri, test edilen mikroorganizmalara hiçbir etki göstermezken *L. quinquestriatus* zehri sadece iki bakteri şusuna (*B. subtilis* ve *C. freundi*) karşı etkili olmuştur. Ek olarak, El-Bitar ve

ark. [45], yine Mısır'a ait beş akrep türünün (*Scorpio maurus palmatus, L. quinquestriatus, A. amoreuxi, A.australis* ve *A. bicolor*) zehirlerinin antiviral aktivitesini hücre kültürü yöntemiyle taramış ve sadece *S. maurus palmatus* ve *A.australis* zehirlerinin anti-HIV aktivitesi gösterdiği ve *S. maurus palmatus* zehrinin dang virüsüne karşı güçlü inhibe edici etkiye sahip olduğu fakat enflüenza virüsünü engelleyemediği sonucuna ulaşmıştır.

İkinci olarak, Sperstad ve ark. [46], *Hyas araneus* deniz örümceğinin hemositleri olan Crustin'in (1 ve 2) AMA'sını iki gram-negatif ve iki gram-pozitif bakteri ve üç mayaya karşı test etmek için saflaştırılmış ve değerlendirmişlerdir. Bu peptitler, tüm test edilen patojenlere karşı potansiyel AMA'ya sahip oldukları tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Paulsen ve ark. [47] yine *H. araneus* deniz örümceğinden izole edilen Arasin 1 peptitini AMA'sını üç gram-negatif ve iki gram-pozitif bakterinin yanı sıra üç mantar türüne karşı test etmiştir. Arasin 1, bakterisidal ve fungusit aktivite göstermiştir.

Üçüncü olarak, melittin [3, 8, 27, 35, 74, 83] gibi bal arısı peptitleri, geçmiş zamanlardan itibaren yoğun bir şekilde incelenmektedir. Örneğin, çok uzun zaman önce, Casteels, Ampe, Jacobs, Vaeck ve Tempst [64] *Apis mellifera* bal arılarındaki lenf sıvısından izole edilen apidaecin peptitleriyle ilgili bir çalışma gerçekleştirmiştir. Birçok insan, hayvan, böcek ve bitki patojenlerine karşı aynı olan hem doğal hem de sentezlenmiş apidaecinin antibakteriyal etkisini büyüme inhibisyonu testiyle göstermiştir. Çalışmanın sonucuna göre apidaecin peptitleri bu mikroorganizmaların bazılarına karşı aktif olduğu gözlenmişken diğerlerine karşı ya aktif olmadığı ya da çok az aktif olduğu gözlenmiştir.

Son olarak, birçok böcek peptiti antimikrobiyal açıdan tanımlanmıştır. Örneğin, Bulet, Urge, Ohresser, Hetru ve Otvos [157], doğal ve sentezlenmiş drosocinlerin (*Drosophila* böceğinden alınan peptitler) antibakteriyal aktivitesini 14 gram-negatif ve 6 gram-pozitif bakteri suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyon testi uygulamıştır. Sonuca göre doğal drosocinin antibakteriyal etkilerinin benzediği; bazı gram-negatif bakterilere ve sadece 1 gram-pozitif bakteriye karşı kayda değer şekilde aktif oldukları görülmüştür. Benzer şekilde, Alvarez-Bravo, Kurata ve Natori [73],

böcek peptitlerine benzeyen çeşitli peptitleri sentezlemiş ve bu peptitlerin AMA'sını mikrodilüsyon yöntemini kullanarak *E. coli, S. aureus* bakterilerine ve *C. albicans*'a karşı test etmiştir. Bu peptitlerin antifungal aktivite gösterdiğini bulmuşlar fakat hepsinin önemli antimikrobiyal aktiviteye sahip olmasını bekleseler de peptitlerin tamamı bu aktiviteyi gösterememiştir.

2.3. Örümcek Zehrinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Aslında, örümcek zehri peptitleri, gram pozitif ve gram negatif bakterilerin yanı sıra mantarları [23, 84, 85, 100] da içeren geniş bir mikroorganizma grubuna karşı büyük bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir [23, 58, 63, 82, 92, 94, 97, 100]. Ayrıca, bu peptitler sıtma parazitine karşı antimalaryal etkiye sahiptir [23, 63, 94].

İlk olarak, Yan ve Adams [51] 1998'de antimikrobiyal açıdan *L. carolinensis* kurt örümceğinin zehri olan AMP'lerin AMA'sını (Lycotoxins I ve II) iki gram-negatif (*E. coli* D 31 ve *E. coli* DH 5) ve gram-pozitif bir (*B. thuringiensis*) bakterinin yanı sıra iki mantara (*C.albicans* ve *C. glabrata*) karşı minimum inhibisyon konsantrasyon testi ile incelenmiş ve bu tarama, Lycotoxins I ve II'nin en hassas mikroorganizma *B. thuringiensis* olduğu bu patojenlerin büyümesini engellediğini göstermiştir Daha sonra, Adao, Seixas, Gomes, Pessoa ve Bastos [52] yine aynı örümcekten (*L. carolinensis*) elde edilen Lycotoxin I ve Lycotoxin II'yi, olası AMA'ları için incelendiğinde, bu peptitlerin *E. coli* bakterisini ve *C. glabrata* mantarını mikro-molar konsantrasyonlarda engellediğini bulmuşlardır. Budnik ve ark. [48], *L. singorensis* kurt örümceği zehir peptitlerinin (Lycocitin 1, 2 ve 3) antimikrobiyal etkilerini ortaya koymak için, iki gram-negatif ve altı gram-pozitif bakterinin yanı sıra *C. albicans*'a karşı minimum inhibisyon konsantrasyon testi ile test etmiştir. Yaptıkları çalışmanın sonucuna göre Lycocitin 1, 2 ve 3 peptitleri gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin yanı sıra mantara karşı çeşitli AMA'lar sergilemiştir. Benzer şekilde, Liu, Qian, Li, Zhang ve Liang [49], *L. singorensis* kurt örümceğinin zehrinin biyokimyasal ve farmakolojik özelliklerini bildirmiş ve *L. singorensis* ham zehrinin AMA'sını altı bakteri ve iki mantara karşı bir minimum inhibisyon konsantrasyon testi ile tespit etmiştir. Bu nedenle özellikle *B.subtilis* ve *S. albus* dâhil olmak üzere bu bakterilerin çoğunun hassas olduğunu, ancak bu zehrin *C. albicans*'a karşı zayıf

olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Daha sonra, 2006'da Kozlov ve ark. [50], *L. tarabaevi* örümcek zehrinden Latarcin peptitlerini (1-7) çıkardı ve bu peptitlerin, üç gram-negatif ve iki gram-pozitif bakteri, iki mantar ve eritrosit olmak üzere farklı kökenlerden gelen hücrelere karşı sitolitik aktivitelerini microtiter broth dilüsyon testiyle araştırmışlardır. Sonuçlar, Latarcin peptitlerinin test edilen tüm mikroorganizmalara karşı açıkça antimikrobiyal etki gösterdiğini fakat bakterilerin, engellenecek daha yüksek peptit konsantrasyonunu gerektiren mantardan daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Benzer bir şekilde, Kuhn-Nentwig ve ark. [53], Cupiennius-1a'nın sitolitik aktivitesini bakterilere, tripanozomlara, plazmodialara, böcek, insan kan hücrelerine ve tümör hücrelerine karşı göstermiştir. Bu araştırmanın sonucunda Cupiennius-1a, microtiter broth dilüsyon testiyle test edilen tüm hücrelere karşı sitolitik aktivite sergilemiştir.

Buna ek olarak, örümcekler hakkında yapılan çoğu çalışma örümcek zehrinin AMA'sını ortaya koysa da sadece birkaç çalışma örümcek zehrinin antibakteriyal etkisi hakkındadır. Örneğin, Haeberli, Kuhn-Nentwig, Schaller ve Nentwig [55], *C. salei* örümcek zehrinden alınan beş peptitin bakterisidal etkisini iki gram-pozitif ve üç gram-negatif bakteriye karşı mikrodilüsyon testiyle saptamıştır. Test sonuçları bu peptitlerin test edilen bakteriyel türlere etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Kuhn-Nentwig ve ark. [56] tarafından minimum inhibisyon konsantrasyon testi yöntemi kullanılarak alınan ve taranan *C. salei* örümcek zehrinden Cupiennius-1 ailesi (1a-1d) iki gram-negatif ve iki gram-pozitif bakteriye karşı test edilmiş ve mikrodilüsyon testi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, Cupiennius-1 ailesinin test edilen tüm bakterilere karşı yüksek derecede aktif olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Corzo ve ark. [57], *O. kitabensis* kurt örümceğinden alınan ham zehri saflaştırıp incelemişlerdir. Oxyopinins peptitlerinin antibakteriyal aktivitesini minimum inhibisyon konsantrasyon testiyle üç bakteri şusuna (*E. coli*, *B. subtilis* ve *S. aureus*) karşı test edilmiş ve bu peptitler test edilen bakteriyal suşlarını güçlü bir şekilde engellemiştir. Vassilevski ve ark. [58], *L. tarabaevi* örümcek zehrinin peptitlerinin antibakteriyal aktivitesini on bakteri suşuna (6 gram-negatif ve 4 gram-pozitif bakteri) karşı incelemiş ve sonuç, *L. tarabaevi* örümcek zehri peptitlerinin, *E. coli* ve diğerlerine karşı çok yüksek bakterisidal etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir. Ancak eşit derecede aktif olan doğal ve sentetik peptitlerin etkisi karşılaştıran bu çalışmada *E.*

coli ve *B. subtilis* hariç doğal peptit bulunamadığından sentetik peptitler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, Ghasemi-Dizgah ve Amirmozafari [60], *Tarantula cubensis* örümcek zehrinin üç bakteri türüne (*E. coli*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*) karşı antibakteriyal aktivitesini araştırmak için disk difüzyon yöntemini kullanmıştır. Bu çalışmada bakteriyel büyümeyi inhibe edici etkiye rastlanmamış ve sonuçlarını desteklemek için başka araştırma yapmalarına gerek kalmamıştır. Buna ek olarak, yakın zamanlarda, Wang ve ark. [61] tarafından *L. singorensis* kurt örümceğinden alınan Lycosin II zehir peptitinin bakteriyal aktivitesi, hastanede yatan hastalardan izole edilen 18 klinik bakteri suşuna karşı test edilmiş, taramanın sonucu Lycosin II'nin düşük hemolitik aktiviteli tüm bakteri suşlarını engelleyebildiğini göstermiştir.

Öte yandan, sadece örümcek zehirlerinin antifungal aktivitesini ölçen diğer çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, *A. gomesiana* örümceğinin hemositlerinden saflaştırılan AMP olan Gomesin'in mantar önleyici etkisini *in vivo (yaşayan organizmada)* ve *in vitro (yapay ortamda)* kliniksel olarak izole edilmiş *C. albicans* suşlarına analiz eden Rossi ve ark. [62] tarafından farelerle ilgili bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Elde ettikleri veriler gomesinin *C. albicans* enfeksiyonlarına karşı düşük konsantrasyonlarda etkili olduğunu ve farelere karşı zehirli olmadığını göstermiştir. Böylece gomesin peptitinin insan ve hayvanlarda pamukçuğu tedavi etmek için alternatif ilaç olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Buna ek olarak, antiviral ve antiparaziter aktiviteleri gibi farklı alanlarda örümcek zehri peptitlerinin özelliklerini tarayan birçok yararlı çalışma vardır. Choi ve ark. [63] örümcek zehri peptitlerinin aynı zamanda antimalaryal etkiye sahip olduğunu kanıtlamıştır. Trinidad tarantula, (*P. cambridge*), örümceklerinden alınan Psalmopeotoxin I ve II'nin *in vitro* (*yapay ortamda*) memelilerde eritrositlerin lizisi olmadan ve nöromüsküler fonksiyonun inhibisyonu olmaksızın, *Plasmodium falciparum*'un (sıtma paraziti) intra eritrosit evresine karşı kayda değer bir antiplasmodial etkisi olduğu sonucuna ulaşırken peptitler hiçbir gram-pozitif ve gram-negatif bakterisinin yanı sıra hiçbir mantara inhibe edici etki göstermemiştir.

3. MATERYALLER VE YÖNTEMLER

3.1. Örümceklerin Toplanması

Araneus quadratus örümcekleri (Fotoğraf 1.1.), Türkiye'de, Kastamonu'da bulunan Kastamonu Üniversitesi kampüs alanından 2016 Eylül ve Ekim aylarında ve ayrıca 2017 Eylül ve Ekim aylarında canlı olarak toplanmıştır. (41˚ 26' 25,60 " K, 33˚ 45' 38,27 " D).

Örümcekler taze zehir salgı bezlerini çıkarmak ve elektrik uyarısıyla zehir alma işlemi için plastik kaplarda canlı olarak muhafaza edilmiş ve çekirgelerle beslenmiştir.

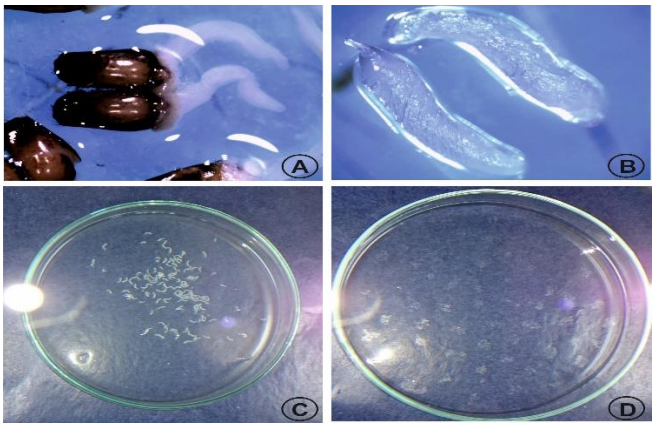
3.2. Zehir Toplama

İlk olarak, canlı *A. quadratus* örümceklerinin zehir salgı bezlerini almak için bulundukları tüpler sallanarak (fiziksel metot) uyuşturulmuştur. Daha sonra, zehir bezleri Fontax 5 mm pens kullanılarak stereomikroskop (LEICA, Almanya) altında çıkarılmıştır (Fotoğraf 3.1.). Öte yandan, Escoubas ve Rash [89] ve Escoubas, Sollod ve King [103], zehrin genellikle bezin diseksiyonu, elektrik stimülasyonu veya örümceklerin direkt sağımıyla elde edildiğini belirtmişlerdir. Ham zehri almak için üç yol kullanılmıştır.

Fotoğraf 3.1. Zehir salgı bezlerinin alınması

3.2.1. Zehiri Almanın İlk Yolu

İlk olarak, taze zehri, uyuşturulmuş örümceğin keliserlerinden zehir bezlerini Fontax 5 mm pens kullanarak cerrahi olarak ayrıldı. *A. quadratus* örümceklerinin zehir bezlerinin havuç benzeri, saydam ve son derece küçük bezler olduğunu gözlemlendi. Hemen sonra, zehir bezlerini birer birer boş, steril ve ağırlığı ölçülmüş bir petri kabına konuldu. Yarı kurumuş salgı bezi keselerine dönüşmeleri için birkaç dakika bekledikten sonra, ham zehri bezlerden çıkarmak için ince pens ile keseler çizildi. Önce petri kabının yüzeyine yapışmış yapışkan bir sıvı gibi gözüken zehir sonra kurumuş ham zehir kristallerine dönüştü (Fotoğraf 3.2.). Liu ve ark. [49], örümceğin ham zehrinin berrak, kokusuz, renksiz ve suda kolaylıkla çözünebildiğini belirtmiş olup, Rash ve Hodgson [108] da aynı fikirdedir.



Fotoğraf 3.2. Zehiri almanın birinci yolu (A) Kelirserli zehir salgı bezleri (B) Islak bezler (C) Islak salgı bezi grubu (D) Steril bir petri kabında kurutulmuş kristalize zehir

Bununla birlikte, yaklaşık yüz adet beze aynı kapta bu işlemi yapıldıktan sonra, kaç miligram zehir elde ettiğimizi öğrenmek için Hassas Denge Terazisi (Precisa, İsviçre) ile ölçüm yapılmıştır (Fotoğraf 3.3.D). Bu adımdan sonra, zehri distile suda çözmek için aynı kaba birkaç mililitre steril su enjekte edilmiştir. Daha sonra, zehir tamamen çözüldüğünde, bu çözelti filtrelenip kullanıma kadar dondurucuda muhafaza edilmiştir.

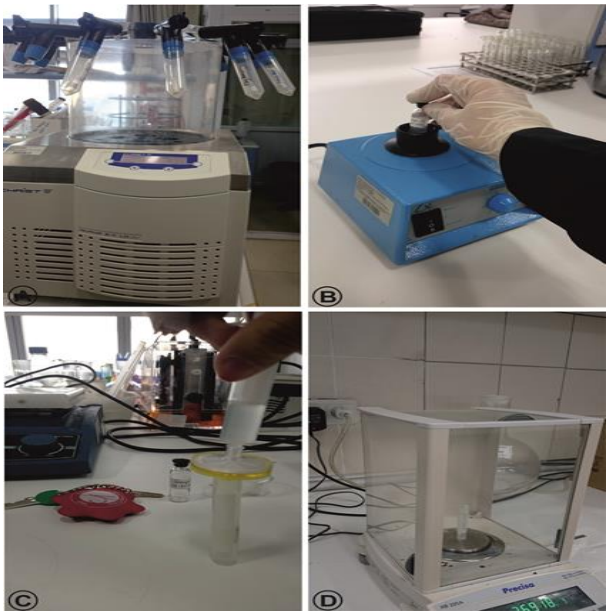
Sonuçta, yaklaşık 100 adet *A. quadratus* örümceğinden yaklaşık 4,5 mg kuru ham zehir elde edilmiştir. Escoubas ve Rash [89] tarafından belirtildiği gibi,

örümceklerden elde edilen zehir miktarı son derece düşük ve diğer zehirli hayvanlardan çıkan ham zehir miktarlarıyla karşılaştırılamayacak kadar azdır.

Özetle, birkaç miligram kurutulmuş ham zehir elde etmek için bu kötü bir yol değil, ancak çok zor ve diğer yollardan çok daha uzun süren bir işlemdir.

3.2.2. Zehiri Almanın İkinci Yolu

İkinci yol olarak, zehir bezleri kesilip çıkartıldıktan sonra, bezlerin kullanımına kadar -20 ˚C'de donması için steril su ile dolu tüplere konulmuştur. Daha sonra, zehir bezlerinin içinde bulunduğu tüpler, zehir bileşenlerini kaybetmemesi ve suyu kaynatmadan buharlaştırmak üzere liyofilizatöre (Christ, Almanya) (Fotoğraf 3.3.A) yerleştirilmiş; makine tam kurutma işlemi için saatlerce çalıştırılmıştır.



Fotoğraf 3.3. Zehiri almanın ikinci yolu (A) Liyofilizatör (B) Zehir tozunun vorteksle karıştırılması (C) Filtreleme (D) Ham zehir miktarını ölçme

Bununla birlikte, bu adımdan sonra, bezin lifleri ile kurutulmuş zehir karışımı elde edilmiştir. Daha sonra, her bir tüpte 3 mL'lik distile su içinde zehir tozunu çözmek için bu karışımlar vorteks karıştırıcı (VELP scientific, Avrupa) (Fotoğraf 3.3.B) ile karıştırılmıştır. Kısa bir süre sonra, zehirli suyu bez liflerinden ayırmak için zehir çözeltisi filtrelenmiştir (Fotoğraf 3.3.C). Ancak, ham zehir miktarını öğrenmek için, zehir çözeltileri liyofilizatör ile tekrar liyofize edilmiştir.

Bu adımla beraber, ham zehir miktarı miligram cinsinden, ham zehirli tüpler ölçülerek ve aynı tüplerin boş haliyle karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Sonuçta, yaklaşık yüz adet *A. quadratus* örümceğinden neredeyse 12 mg'lık kurutulmuş ham zehir elde edilmiştir. Ardından, liyofilize ham zehir, analizden önce -20 ° C'de saklanmış; Rash ve Hodgson [108], kurutulan zehrin birkaç ay ila bir yıl boyunca depolanabildiğini belirtmişlerdir.

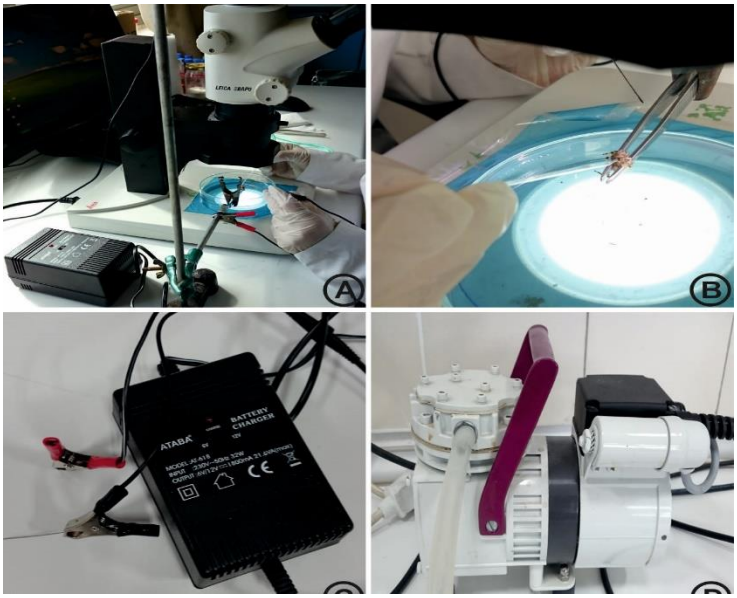
Bu yol ham zehir elde etmek için daha güvenli, kolay ve hızlı bir yoldur.

3.2.3. Zehiri Almanın Üçüncü Yolu

Üçüncü yol elektriksel stimülasyondur. Elektrik stimülasyonu birkaç büyük örümcek örneğinde denenmiş, maalesef başarılı olmamıştır (Fotoğraf 3.4.A-B).

Bu yöntemde birkaç zorlukla karşılaşılmıştır. İlk olarak, *A. quadratus* türlerinin boyutu, elektrikli sağım için uygun değildi ve Matavel, Estrada ve De Marco Almeida'ya [97] göre Araneae takımı küçük örümceklerdi. Bu yüzden küçük boyutlu örneklerden uygun miktarda zehir alınamamıştır. Karşılaşılan ikinci zorluk, örümcekleri etkileyen genel güç aslında 6 volt olmasına rağmen, bazı örümcekler 6 volt elektrik uyarısından etkilenmemiştir. Bu yüzden hiç zehir alınamamıştır. Üçüncü zorluk ise elektrikl stimülasyonu üst üste tekrar denendiği için, birkaç saat ya da birkaç gün sonra bazı örümceklerin ölmesi olmuştur.

Elektrik stimülasyonu yöntemi; şarj cihazı (Ataba, Türkiye) (Fotoğraf 3.4.C) ve örümcek zehirini sağmak için vakum pompa cihazı (Türkiye) (Fotoğraf 3.4.D) kullanılarak denenmiştir.



Fotoğraf 3.4. Zehiri almanın üçüncü yolu (A) Elektriksel stimülasyon (B) Örümceğin elektrik uyarısı kullanarak sağımı (C) Batarya doldurma cihazı (D) Vakum pompası

Sonuç olarak, *A. quadratus* örümcekleri küçük örümcekler olduğu için elektrik stimülasyon yöntemi yararlı olmamıştır. Ayrıca sağılan zehrin tükürük ve sindirim sıvılarından gelen enzimle kirlenmesi [49] elektrik stimülasyonunun diğer bir dezavantajı olmuştur.

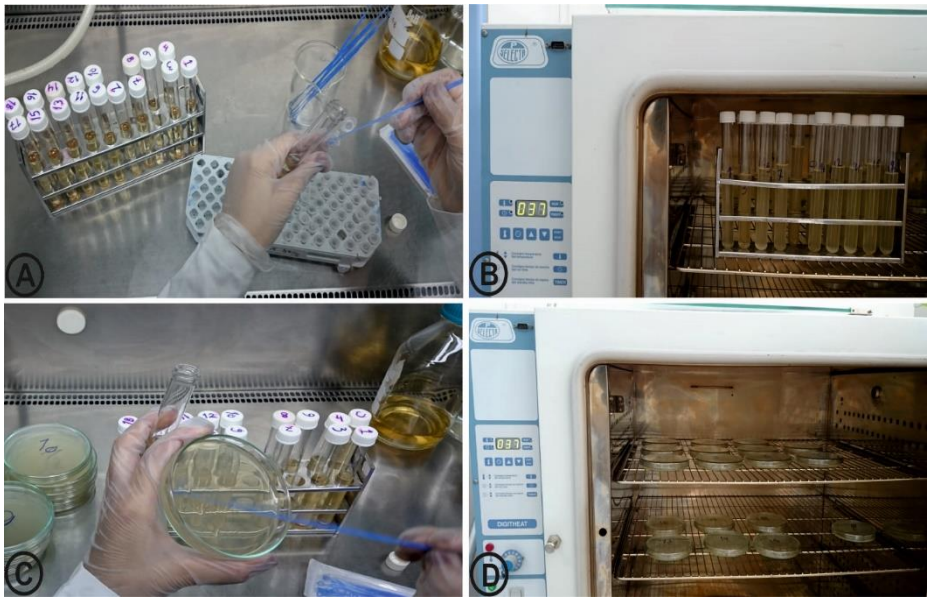
3.3. Mikroorganizmalar

Bu çalışmada test edilen tüm mikroorganizmaların Kastamonu Üniversitesi Biyoloji Laboratuvarı'nda saklanan örneklerden elde edilmiştir. Çalışmamızda *Araneus quadratus* örümcek zehrinin antimikrobiyal aktivitesi, on yedi bakteri türüne (dokuz gram-negatif (*E. aerogenes* ATCC 13048, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* DSMZ 50071, *P. fluorescens* P1, *S. enteritidis* ATCC 13075, *S. kentucky*, *S. infantis*, *S. typhimurium* SL1344 ve *E. coli* ATCC 25922) ve sekiz gram-pozitif (*S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* DSMZ 20044, *B. subtilis* DSMZ 1971, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium*, *E. durans*, *L. innocua* ve *L. monocytogenes* ATCC 7644) bakteriye] ve bir mantara (*C. albicans* DSMZ 1386) karşı minimum inhibisyon konsantrasyon testi ile analiz edilmiştir.

3.3.1. Mikroorganizmaların Aktivasyonu

İlk olarak, testte kullanılan bakteriler ve *C. albicans*'ın gliserol stokları -20 ˚C'den çıkarılmıştır. Sonra, her stoktan küçük bir damla alınmış ve 500 mL distile suya 4 g Nutrient broth ilave ederek hazırlanmış bir sıvı ortama konulmuştur. Bakteriler ve mantarlar için bu sterilize edilmiş sıvı ortam (Nutrient suyu) ile doldurulmuş, ayrıca sterilize edilmiş bir tüpe her bir patojenden az miktar konulmuştur. (Fotoğraf 3.5.A). Daha sonra, bu tüpler (mikroorganizmalar) 37 ˚C'de inkübatörde 24 saat, mantarlar ise 27 ˚C'de 48 saat bekletilmiştir (Fotoğraf 3.5.B). İnkübasyondan sonra, besleyici agarla (10 g besleyici agarı 500 mL distile suda çözüldükten sonra 15 dakika boyunca 121 ˚C'da otoklavda bekletildikten sonra sterilize edilmiş petri kabında ısınmış hale getirilerek hazırlandı) dolu on yedi petri kabında bakteriler için sürme plak yöntemini uygulamak üzere örnekleri (mikroorganizmaları) dışarı çıkardık; *C. albicans* için Sabroud Dextrose Agar (besleyici agara benzer şekilde hazırlandı) ile dolu bir petri kabı kullanılmıştır. Böylece, plastik özelerle her sıvı ortamın tabanından birer mikroorganizma damlası alarak petri kabında bulunan (katı ortam agarı) besiyerinin 4 bölgesine sürme yöntemi gerçekleştirilmiştir (Fotoğraf 3.5.C). Ardından, mikroorganizmaları içeren petri kapların 24 saat boyunca 37 ˚C'de, mantarlar ise 48 saat boyunca 27 ˚C'de inkubatörde bekletilmiştir (Fotoğraf 3.5.D). Belirtilen süreler sonunda, mikroorganizmalar gelişmiş ve bu petri kabında orta-üstel büyüme evresine [61] kadar çoğalmıştır. Sonra, kullanıma kadar buzdolabında bekletilmiştir.

Bu adımların sonunda, minimum inhibisyon konsantrasyon testini gerçekleştirmek için aktif mikroorganizmalar elde edilmiştir.



Fotoğraf 3.5. Mikroorganizmaların aktivasyonu (A) Sıvı ortamda (besleyici sıvı) mikrobiyal stokların konulması (B) Besleyici sıvıyla mikroorganizmaların inkübasyonu (C) Katı ortamda besiyerinin 4 bölgesine sürme yöntemi (D) Patojen içeren petri kaplarının inkübasyonu

3.4. Antimikrobiyal Test

Bu çalışmanın amacı, birçok geleneksel antibiyotiğe dirençli bakteri üzerinde *Araneus quadratus* örümcek zehrinin antimikrobiyal etkisini araştırmaktır. Bu amaçla, minimum inhibisyon konsantrasyonlarını (MIK) belirlemek için minimum inhibisyon konsantrasyon testi kullanılmıştır.

2016 yılının Ekim ayı ve 2017 yılının Ekim ayı olmak üzere ikişer farklı konsantrasyon denenmiştir. 2016'da, ilk konsantrasyonu (1 mg/mL) her bir mikrop için üç ayrı seferde denerken, ikinci konsantrasyonu (10 mg/mL), yeterli miktarda zehir bulunmaması nedeniyle bir kez gerçekleştirilmiştir. Bu konsantrasyonlar *C. albicans*'ın yanı sıra tüm bakteri suşlarına karşı test edilmiştir. Benzer şekilde, 2017'de, ilk konsantrasyonu (10 mg/mL) test edilen tüm patojenlere karşı üç seferde gerçekleştirlirken, ikinci konsantrasyon (20 mg/mL), ham zehir miktarına bağlı olarak 12 bakteriyel türüne karşı iki defa denenmiştir. Her ne kadar farklı sayıda farklı konsantrasyonlar uygulanmış olsa da adımlar aynı ve aşağıdaki gibidir;

3.4.1. Zehir Çözeltilerinin Hazırlanması

İlk olarak, test edilen mikroorganizmalara zehri uygulamadan önce farklı konsantrasyonlarda zehir çözeltileri yapılmıştır. 2016 Ekim'de kurutulmuş ham zehri distile suda çözerek iki adet zehir çözeltisi konsantrasyonu (1 mg/mL ve 10 mg/mL) hazırlanmış; ilk konsantrasyon, 1 mg kuru zehri 1 mL steril suya ekleyerek elde edilirken, ikinci konsantrasyonu, 10 mg'lık ham zehri 1 mL distile suda çözerek elde edilmiştir. 2017 Ekim'de de iki adet zehir çözeltisi konsantrasyonu hazırlanmıştır. İlk konsantrasyonun çözeltisini (10 mg/mL) elde etmek için 1 mL'lik steril suda 10 mg'lık kurutulmuş zehir çözülürken, ikinci konsantrasyon çözeltisi (20 mg/mL) için 1 mL'lik distile suya 20 mg'lık ham zehir eklenmiştir.

3.4.2. Bakteriyel İnokülüm Hazırlanması

Minimum inhibisyon konsantrasyon testini gerçekleştirmek için gerekli inokülümü hazırlamak üzere 500 mL distile suya 4,5 g Sodyum Klorür eklenerek Sodyum Klorür solüsyonu hazırlanmış ve otoklava konulmuştur. Bunun nedeni, bakteriler için yaklaşık 10^8 kob/mL^{-1} ve *C. albicans* için 10^7 kob/mL^{-1} olan 0,5 tüp McFarland standardıyla, testimizde bakteri ve mantar sayısını düzenlemek ve kontrol etmektir [158]. Daha sonra, bu mikroorganizmaların miktarını azaltmak için steril sodyum klorür çözeltisi kullanılmıştır. Her bir petri kabındaki her bir patojenin birkaç bakteriyel kolonisini alıp sırasıyla sodyum klorür çözeltisi ile dolu steril tüplerde çözülmüştür (Fotoğraf 3.6.A). Bu çalışmadan sonra, McFarland Ölçeğinde 0,5'lik tüp ile bu tüplerin optik yoğunluğunu karşılaştırarak inokülüm elde edilmiştir. Sonra, minimum inhibisyon konsantrasyon testini gerçekleştirmeden önce birkaç dakika beklenmiştir.

3.4.3. Sıvı Büyüme İnhibisyonu Testi

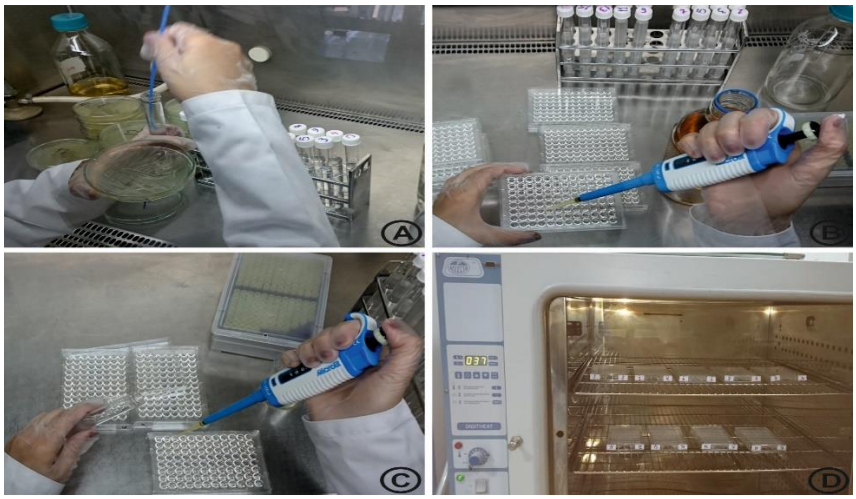
Çalışmamızda, *A. quadratus* örümcek zehrinin asgari inhibisyon konsantrasyonlarının saptanması, 200 µL'lik bir hacimde, 96 kuyucuklu U şeklinde bir plakanın tabanında büyüme inhibisyonu testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İlk adımda, hem 2016 yılının hem de 2017 yılının birinci konsantrasyonunun test edilmesi için mikrotiter plakalardaki her üç paraleldeki tüm kuyucuklara 100 µL besleyici sıvı ilave edilirken, 2016 yılının ikinci konsantrasyon testi için 100 µL'lik besleyici sıvı sadece bir sıranın kuyucuklarına, 2017 yılının ikinci konsantrasyon testi için ise iki sırasının kuyucuklarına konulmuştur (Fotoğraf 3.6.B).

İkinci olarak, sadece ilk kuyucuğa 100 µL zehir çözeltisi eklenmiş, kısa bir süre sonra, zehri besleyici sıvı ile karıştırarak zehir konsantrasyonunu yavaş yavaş seyrelttikten sonra 100 µL'lik bu karışımı bir sonraki kuyucuğa eklemek üzere alınmıştır. Bu işleme 10. kuyucuğa kadar devam edilmiş, 11. kuyucuk negatif kontrol, 12. kuyucuk ise pozitif kontrol için ayrılmıştır.

Üçüncü olarak, bakteriyel inokülüm; (Fotoğraf 3.6.C) sadece 100 ya da 200 µL'lik besleyici sıvı kullanılarak oluşturulan 11. kuyucuk yani negatif kontrol hariç tüm kuyucuklara konulurken, pozitif kontrol 100 µL besin sıvısıyla 100 µL bakteriyel inokülüm karışımı kullanılarak elde edilmiştir.

Son olarak, 96 kuyucuklu mikrotiter plakaları, bakteriler için 37 ˚C'de bir gece inkübe edilirken, *C. albicans* içeren plaka 48 saat boyunca çalkalamadan 27 ˚C'de inkübe edilmiştir (Fotoğraf 3.6.D).



Fotoğraf 3.6. Minimum inhibisyon konsantrasyon testi (A) Bakteriyel inokülümü hazırlama (B) mikrotiter kuyucuklara besleyici sıvı ekleme (C) bakteriyel inokülümü koyma (D) mikrotiter plakaların inkübasyonu

3.5. Meteorolojik Veriler

2016 yılı Ocak-Eylül arası ve 2017 yılı Ocak-Eylül arasını kapsayan dönemde Kastamonu'nun mevcut meteorolojik verileri (Yağış, Sıcaklık, Nem, Rüzgâr Hızı, Radyasyon ve Güneşlenme Zamanı), Ankara'da bulunan Orman ve Su İşleri Bakanlığı Meteoroloji Genel Müdürlüğü'nden alınmıştır. Veriler, sosyal bilimler istatistik programı (SPSS) kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, *A. quadratus* örümcek zehrinin on yedi klinik bakteri suşuna ve bir mantara karşı mikrobiyal büyüme inhibisyonunun minimal konsantrasyonlarını belirlemek için plaka büyüme inhibisyonu testi kullanarak antimikrobiyal etkisinin saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 2016 Ekim'de ve 2017 Ekim'de, *A. quadratus* zehrinin iki farklı konsantrasyonunun antimikrobiyal aktivitesi dokuz gram-negatif ve sekiz gram-pozitif bakterinin yanı sıra bir mantara karşı taranmıştır. 2016 yılında elde edilen zehrin birinci ve ikinci konsantrasyonlarında ve 2017 yılında elde edilen zehrin birinci konsantrasyonunda tüm bu mikrobiyal suşlar test edilirken, 2017 yılında elde edilen zehrin ikinci konsantrasyonu sadece on iki bakteri türü üzerinde uygulanmıştır.

Nitekim, her bir mikroorganizma, 2016 ve 2017 yıllarında elde edilen zehrin ilk konsantrasyonlarının antimikrobiyal analizi için üç paralel olarak test edilmiş, 2016 yılı zehrinin ikinci konsantrasyonu sadece bir paralel, 2017 yılı zehrinin ikinci konsantrasyonu iki paralel halinde incelenmiştir.

Ancak, 2016 yılının ilk konsantrasyonunda (1 mg/mL) bakteri suşlarının tamamında ve *C. albicans* mantarı üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Aslında, bakteri gelişiminde herhangi bir baskılanma görülmemiş ve tüm mikrotiter plakalarında test edilen mikroorganizma kolonilerinin açıkça büyüdüğünü tespit edilmiştir.

Aksine, belirgin baskılanma yanıtı, sadece bir sırada olmasına rağmen 2016'da sadece ikinci zehir dozunda (10 mg/mL) görülmüştür. Aslında, *E. aerogenes, K. pneumoniae, P. fluorescens, S. enteritidis, S. kentucky, S. infantis, S. typhimurium, E. coli, S. epidermidis, B. subtilis, E. faecium, E. durans, L. innocua* ve *L. monocytogenes* olmak üzere birçok bakteriyal türlerinin açıkça baskılandığı kaydedilmiştir. Ancak *C. albicans* büyümesinde bir baskılanma kaydedilmemiştir. Bulgularımız (Tablo 4.1.'de) gösterilmiştir.

Tablo 4.1. *A. quadratus zehrinin ikinci konsantrasyonun (2016) bazı patojenlere karşı MIK değerleri*

Patojenik suşlar	MIC değeri (mg/mL)
- Gram-negatif	
E. aerogenes	0,06
K. pneumoniae	0,5
P. aeruginosa	-
P. fluorescens	0,5
S. enteritidis	0,5
S. kentucky	0,25
S. infantis	0,5
S. typhimurium	0,5
E. coli	0,5
- Gram-pozitif	
S. aureus	-
S. epidermidis	0,5
B. subtilis	0,25
E. faecalis	-
E. faecium	0,5
E. durans	0,06
L. innocua	0,06
L. monocytogenes	0,5
- Mantar	
C. albicans	-

Yaptığımız deneyde, bu patojenlerin mikrobiyal büyüme inhibisyonunun, mikrotiter kuyucukların bulanıklığı gözlemlenerek incelenmiş ve sonuçlarımız kuyucuklarda bulunan mikroorganizmaların büyümesini pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırarak elde edilmiştir.

Çok şaşırtıcı bir şekilde, aynı işlem 2016'da üç kez uygulanmasına rağmen, 2017'nin ilk konsantrasyonu (10 mg/mL) uyguladığında hiçbir inhibe edici etki kaydedilmemiştir. Yine ilginç bir şekilde, 2017'nin ikinci konsantrasyonunun (20 mg/mL) MIK değerleri sırasıyla 1 ve 2 mg/mL olan *P. fluorescens* ve *L. monocytogenes* karşı inhibe edici etki göstermiştir. görmek (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. *A. quadratus zehrinin ikinci konsantrasyonun (2017) bazı patojenlere karşı MIK değerleri*

Patojenik suşlar	MIC değeri (mg/mL)
- Gram-negatif	
E. aerogenes	-
K. pneumoniae	-
P. fluorescens	1
S. enteritidis	-
S. kentucky	-
S. infantis	-
- Gram-pozitif	
S. epidermidis	-
B. subtilis	-
E. faecium	-
E. durans	-
L. innocua	-
L. monocytogenes	2

Ortaya çıkan beklenmedik bulgular için, 2016 ve 2017 yıllarında toplanan zehirler arasındaki bileşimsel farklılıkların çevre (iklim) koşullarının (nem, sıcaklık, yağış, rüzgâr hızı, radyasyon ve güneşlenme zamanı) önemli rolü olabileceği düşünülebilir. Bu nedenle, Kastamonu şehrinin meteorolojik verileri talep edilmiş, bu verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS statistics 25 ile yapılmış. (Tablo 4.3. ve Tablo 4.4.) sunulmuştur.

Tablo 4.3. *2016 ve 2017 yılları arasındaki ilk dokuz ayın günlük meteorolojik verilerinin karşılaştırılması*

Çift Örnek Testi								
	Çiftlerin Farkları					t	df	Sig. (2-kuyruklu)
	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalaması	% 95 Güvenilirlikle Fark Aralıkları				
				Düşük	Yüksek			
Güneşlenme süresi	1.50627	4.61917	0.28059	0.95384	2.05870	5.368	270	0.000
Maksimum/ minimum sıcaklık farkı	-0.17289	6.42950	0.38913	-0.93899	0.59320	-0.444	272	0.657
Minimum nem	3.07692	20.95789	1.26843	0.57974	5.57411	2.426	272	0.016
Minimum sıcaklık	0.57647	4.23237	0.25663	0.07124	1.08170	2.246	271	0.025
Ortalama nem	2.49890	14.36821	0.86960	0.78689	4.21091	2.874	272	0.004
Ortalama rüzgâr hızı	0.02491	0.47508	0.02875	-0.03170	0.08152	0.866	272	0.387

Tablo 4.3. *'ün devamı*

Çift Örnek Testi								
	Çiftlerin Farkları					t	df	Sig. (2-kuyruklu)
	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalaması	% 95 Güvenilirlikle Fark Aralıkları				
				Düşük	Yüksek			
Maksimum nem	0.32967	9.17043	0.55502	-0.76301	1.42235	0.594	272	0.553
Maksimum rüzgâr hızı	0.18603	2.74138	0.16622	-0.14122	0.51328	1.119	271	0.264
Maksimum sıcaklık	0.43346	6.38457	0.38712	-0.32869	1.19560	1.120	271	0.264
Toplam yağış	0.85993	6.21503	0.37684	0.11802	1.60184	2.282	271	0.023
Ortalama sıcaklık	0.40989	4.37128	0.26456	-0.11096	0.93074	1.549	272	0.122
Toplam küresel günes radyasyonu	0.56507	2.34094	0.14194	0.28563	0.84452	3.981	271	0.000

Tablo 4.4. *2016 ve 2017 yılları arasındaki ilk dokuz ayın aylık meteorolojik verilerinin karşılaştırılması*

Çift Örnek Testi								
	Çiftlerin Farkları					t	df	Sig. (2-kuyruklu)
	Ortalam	Std. Sapma	Std. Hata ortalaması	% 95 Güvenilirlikle Fark Aralıkları				
				Düşük	Yüksek			
Toplam yağış	29.70000	50.71077	16.90359	-9.27975	68.67975	1.757	8	0.117
Minimum sıcaklık	-0.21111	1.41461	0.47154	-1.29847	0.87625	-0.448	8	0.666
Ortalama maksimum nem	0.37778	3.79334	1.26445	-2.53804	3.29360	0.299	8	0.773
Ortalama maksimum sıcaklık	0.46667	2.97069	0.99023	-1.81681	2.75014	0.471	8	0.650
Ortalama minimum nem	3.21111	4.90954	1.63651	-0.56270	6.98492	1.962	8	0.085
Ortalama minimum sıcaklık	0.60000	1.74069	0.58023	-0.73801	1.93801	1.034	8	0.331
Ortalama nem	2.56667	5.37982	1.79327	-1.56863	6.70197	1.431	8	0.190
Ortalama rüzgâr hızı	0.03333	0.26458	0.08819	-0.17004	0.23670	0.378	8	0.715
Ortalama sıcaklık	0.44444	2.13197	0.71066	-1.19433	2.08322	0.625	8	0.549

Tablo 4.4. *'ün devamı*

Çift Örnek Testi								
	Çiftlerin Farkları					t	df	Sig. (2-kuyruklu)
	Ortalam-a	Std. Sapma	Std. Hata ortalam-ası	% 95 Güvenilirlikle Fark Aralıkları				
				Düşük	Yüksek			
Toplam Güneşlenme süresi	44.91111	43.08661	14.36220	11.79181	78.03041	3.127	8	0.014
Toplam küresel güneş radyasyonu	1059448.2	2110687.6	703562.5	-562969.9	2681866.3	1.506	8	0.171
Maksimum nem	-0.88889	1.05409	0.35136	-1.69914	-0.07864	-2.530	8	0.035
Maksimum rüzgâr hızı	0.26667	2.86007	0.95336	-1.93178	2.46511	0.280	8	0.787
Maksimum sıcaklık	-0.56667	2.77038	0.92346	-2.69617	1.56284	-0.614	8	0.556
Maksimum yağış	6.78889	8.50962	2.83654	0.24782	13.32996	2.393	8	0.044
Minimum nem	10.00000	7.77817	2.59272	4.02117	15.97883	3.857	8	0.005
Maksimum küresel güneş radyasyonu	15073.1	46795.9	15598.63482	-20897.4	51043.6	0.966	8	0.362

5. TARTIŞMA

Patojenlerin AMD'si insan sağlığını tehdit eden [2, 20, 22, 24-28, 30, 31, 61, 74, 75, 106] bir felakettir [26] ve en muhtemel alternatif çözüm omurgalıların ve omurgasızların AMP'lerinin kullanılmasıdır [1, 24, 26-28, 81]. İlginçtir ki, ilk AMP 1939'da keşfedilmiş olmasına rağmen [75], AMP'lerin terapi olarak gerçek kullanımı 1970'lerin başında [80, 83] Brezilya'ya ait bir yılanın zehrinden elden edilen onaylı ilk ilaçla (Captopril®) başlamıştır [5-11, 88, 93, 94].

Son yirmi yılda, akrep [40-45], örümcek yengeci [46, 47] ve örümcek [4, 29, 48-50, 52-63] gibi zehirli omurgasız hayvanların antimikrobiyal aktiviteleri hakkında çeşitli yararlı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda örümcek zehri araştırmalarında belirgin bir artış olsa da [6, 9, 60, 61, 82, 93, 99, 100] *A. quadratus* örümcek zehri hakkında herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle, çalışmamıza, *A. quadratus* örümcek zehrinin çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesini araştıran ilk deney olarak bakabiliriz.

Çalışmamızda bazı zorluklarla karşılaşılmıştır. Öncelikle, elektrik stimülasyon uygulamasının daha uygun olduğu büyük örnekler çok sayıda bulunamadığı için, yeterli miktarda zehir elde etmek zor olmuştur. Karşılaşılan ikinci zorluk; ne yazık ki, 2016'da toplanan zehrin ikinci konsantrasyonunu üç paralel olarak yapmak ve ek konsantrasyonun etkisini test etmek için yeterli miktarda zehir elde edilememiştir. Ayrıca, 2017'de toplanan zehrin ikinci konsantrasyonunda zehir miktarı sadece 12 bakteri suşunu test etmeye yeterli olmuştur.

Bununla birlikte, bu çalışmada, *A. quadratus* örümcek zehrinin antimikrobiyal aktivitesi, 96 kuyucuklu mikrotiter plakalarında gerçekleştirilen bir minimum inhibisyon konsantrasyon testi ile incelenmiş, bu test patojenlerin ve mikrobiyal büyümenin kesin inhibe edici konsantrasyonun duyarlılığını genel olarak nicel ve nitel olarak saptandığı ve en düşük inhibisyon konsantrasyonlarını belirlemek için iyi bir yöntem olduğu için kullanılmıştır [14]. Klančnik ve ark. [68] bu testi hızlı bir tarama yöntemi olarak tanımlamıştır.

Araştırmamızda bir takım zorluklar olmasına rağmen, on iki bakteri üzerinde uygulanan ikinci konsantrasyon hariç (2017) en çok bilinen bakteri suşlarını (sekiz gram-pozitif ve dokuz gram-negatif) ve tipik bir mantar (*C. albicans*) kullanılmıştır. Öte yandan, örümcek zehirlerinin antimikrobiyal aktivitesini konu alan diğer birçok çalışmada sınırlı sayıda mikrobiyal tür kullanılmıştır.

Mevcut çalışmada, iki yılda çeşitli konsantrasyonlar küçük farklılıklarla denendiği için beklenmedik ve karmaşık sonuçlar elde edilmiştir.

İlk olarak, 2016'nın ilk konsantrasyonu (1 mg/mL) test edilen tüm mikroorganizmalar için üç kez gerçekleştirildi, ancak herhangi bir inhibe edici etki göstermemiş, oysa 2016'nın ikinci konsantrasyonu (10 mg/mL) bir defa test edilmiş olmasına rağmen, 17 bakteri arasından 14'ünde kayda değer inhibe edici etki ortaya koymuştur. Ancak bu durum yetersiz zehir miktarı nedeniyle testin üç kez uygulanamaması yüzünden şüphelidir. Yine de, ikinci konsantrasyon (2016) *A. quadratus* zehrinin, *E. aerogenes, K. pneumoniae, P. fluorescens, S. enteritidis, S. kentucky, S. infantis, S. typhimurium, E. coli, S. epidermidis, B. subtilis, E. faecium, E. durans, L. innocua* ve *L. monocytogenes* karşı antibakteriyel etki göstermişken *C. albicans* üzerinde antifungal etki göstermemiştir (Tablo 4.1.).

Aslında, *Candida* türleri flukonazol de dâhil olmak üzere neredeyse tüm klasik antibiyotiklere karşı direnç göstermektedir [79]. Ancak yine de bazı AMP'lere karşı duyarlıdırlar [54, 77, 79, 85]

Hastanelerde ve toplumda karşılaşılan birçok enfeksiyon, *S. aureus* [12, 30, 59, 135], *P. aeruginosa* [18, 40, 66, 122] ve *E. coli* [12] gibi çeşitli geleneksel antibiyotiklere karşı dirençli yaşamsal bakterilerden [59] kaynaklanmaktadır. Ne yazık ki, çalışmada kullandığımız zehir sadece MIK 0,5 mg/mL'lik *E. coli*'ye karşı aktif olabilmiştir.

Buna karşılık, zehrimiz, MIK değerleri sırasıyla 0,5; 0,25; 0,5; ve 0,5 mg/mL olan tüm test edilmiş *Salmonella sp.* türlerinin (*S. enteritidis, S. kentucky, S. infantis* ve *S. typhimurium*) büyümesini engellemiştir. Aslında, tüm *Salmonella* türleri insanlara patojenik [16, 125, 131] olsa da bazı geleneksel antibiyotiklere karşı dirençlidir [16, 21, 125, 126, 129, 131, 133].

Listeria türleri birçok klasik antibiyotiklere dirençli olsa da [151] bulgularımız *A. quadratus* zehrinin, sırasıyla 0,06 ve 0,5 mg/mL'lik yüksek MIK düzeyleri ile *L. innocua* ve *L. monocytogenes*'in büyümesini engellediğini ortaya koymuştur.

Enterococcus sp. türleri bilinen birçok antibiyotiğe karşı dirençli [20, 22, 105] olsa da *A. quadratus* zehri, sırasıyla 0,06 ve 0,5 mg/mL MIK değerlerli *E. durans* ve *E. faecium*'a karşı inhibe edici etki göstermiştir.

Ayrıca, *Enterobacter aerogenes* birkaç klasik antibiyotiğe karşı dirençlidir [20, 22, 114-116]. Ancak *A. quadratus* zehri 0,06 mg/mL MIK değeriyle büyümeye karşı güçlü inhibe edici etki oluşturmuştur.

Buna ek olarak, *B. subtilis* birkaç antibiyotiğe direnç gösterirken [139], 0,25 mg/mL MIK değerine sahip *A. quadratus* zehrine duyarlı olduğu gözlenmiştir.

2016'nın ikinci konsantrasyonunda (10 mg/mL), test sadece bir paralel gerçekleştirilmiş olsa da zehrimizin birkaç bakteri karşısında etkili olduğunu belirtebiliriz. Bu nedenle, önümüzdeki yıllarda test tekrarlanarak bu sonuçlardan emin olunmalıdır. Aslında, 2017'de aynı konsantrasyonu ve aynı adımları kullanarak test tekrarlanmıştır.

2017'de uygulanan iki konsantrasyon, beklenmedik bir şekilde *A. quadratus* zehrinin antimikrobiyal aktivitesinde büyük farklar göstermiştir. 2017'deki ilk konsantrasyon (10 mg/mL), 2016'da gerçekleştirilen, on yedi bakterinin on dördüne çoklu antibakteriyal etki gösteren ve her mikroorganizma için üç paralel gerçekleştirilen ikinci konsantrasyona eşit olsa da, test edilen tüm mikroplara karşı inhibe edici etki göstermediği gözlenmiştir. Öte yandan, 2017'nin ikinci konsantrasyonu (20 mg/mL) MIK değerleri sırasıyla 1 ve 2 mg/mL olan *P. fluorescens* ve *L. monocytogenes*'e karşı inhibe edici etki göstermiştir.

Bu şaşırtıcı sonuçlar nedeniyle, zehir kompozisyonları ile iklim değişiklikleri ya da birbiriyle bağlantılı diğer birçok faktör arasında bir ilişki olduğu öne sürülebilir. Sunagar ve ark. [159], iklim zehir kompozisyonunu etkileyebileceğini ve Badhe ve ark. [160] çevresel koşullar zehirin toksisitesini önemli derecede etkilediğini

bildirmiştir. Ayrıca, Zelanis, Travaglia-Cardoso ve De Fátima Domingues Furtado'ya [161] çevre ve doğal şartlar, zehir kompozisyonunu etkilemekte olduğunu bildirmiştir. Üstelik Abdel-Rahman, Omran, Abdel-Nabi, Ueda ve McVean [162] ve Creer ve ark. [163] zehir kompozisyonu değişkenliğinin açıkça tek bir faktörle bağlantılı olamayacağını belirtmiştir. Dahası, zehir bileşenlerinin farklılıklarını etkileyebilecek birçok faktör bulunmaktır [161, 164, 165]. Ek olarak, Abdel-Rahman ve ark. [162] genetik, coğrafi ve yerel çevresel koşulların yanı sıra yaş, beslenme ve cinsiyetin her bireyin zehir protein profilini etkileyebileceğini düşünmektedir.

Aslında organizmalar, yaşadığı çevreye uygun olarak zaman içerisinde gelişen toplumların bir parçasıdır ve birey sadece büyümeyi çok fazla ya da çok az etkileyen çevresel faktörlerin toleransı içinde yaşayabilir [166]. Organizmaların özellikleri, bireyin ömrü boyunca sıkça değişmektedir [167]. Benzer şekilde, bireysel zehir kompozisyonu, gen düzenlemesinin, diğer faktörlerin ve zehir proteininin etkileri nedeniyle zaman içinde değişmektedir [162, 165, 167-172]. Zehir proteini konsantrasyonları da kısa sürede önemli ölçüde değişebilir [173]. Ayrıca, zehir kompozisyonunu değişkenliği çeşitli seviyelerde (cins, tür, alttür, popülasyon ve bireysel düzeylerde) değerlendirilmektedir [168, 174, 175]. Çok sayıda çalışma, zehirlerin etkisi ve kompozisyonunda gözle görülür türler içi ve arası varyasyonları göstermiştir [112, 113, 159-165, 167-172, 175-197]. Bu varyasyonlar; beslenme [161, 162, 164, 167-169, 173-175, 180, 183, 191, 192, 198], çevre (iklim) [159, 161, 162, 165, 171, 183], yaş (boyut) [162, 164, 165, 168, 170, 174, 175, 178, 180, 181, 184, 186, 187, 189, 192, 197], cinsiyet [112, 162, 165, 174, 183, 187, 192, 193, 197], mevsimsel değişiklikler [162, 167, 174, 192] ve coğrafi kökenlerin [112, 161-165, 167, 169, 172-176, 178, 180-184, 191, 192, 196, 197] yanı sıra genetik etkiler [160, 162, 165, 168, 170-172, 176] gibi bazı kısıtlı faktörlere bağlıdır. Çok sayıda zehirli hayvan türünün zehir (protein) bileşiminde tür içi ve türler arası varyasyonlar iyi bilinmektedir ve iyi belgelenmiştir [162, 172, 178-181, 183, 185, 188, 196, 199]. Örümcek zehir kompozisyonları; türler arası çeşitliliğin biyokimyasal bileşimin zehirlerde genel bir fenomen olarak görüldüğü, tür içi [112, 113] ve genetik değişimler [165] gösterebilir [178, 179, 189, 196, 198]. Aslında, örümcek zehirlerinin karmaşıklığı ve zehir kompozisyonu varyasyonu arttıkça zehir

karmaşıklığının da artması nedeniyle tür içi çeşitliliğin tespit edilmesi kolay değildir [178, 180].

Öte yandan, zehir kompozisyonu ve etkinliği arasında yakın bir ilişki vardır [172, 173, 179, 180]. Tür içi zehir varyasyonu etkinliği değiştirebilir [112, 174]. Örneğin, erkek ve dişi *T. agrestis* örümcek zehirleri, konsantrasyon açısından benzer ancak dişi zehirlerinin erkeklerden daha fazla böcek öldürme etkisi vardır [112]. Bu da, bu türün böcek öldürme gücünde cinsiyetler arası farklılıklar olduğu anlamına gelmektedir.

Ayrıca, Kuehn ve McCormick [200], iklim değişikliklerinin çeşitli popülasyonların sağlığını etkilediğini belirtmiştir. Liu ve ark. [201] da ısıl gerilimin (sıcaklık ve nem) hayvan sağlığını ve ürünlerinin bileşimlerini etkileyebileceğini düşünmektedir. Genel olarak, birçok böcek türü, aşırı sıcaklık, nem veya yağış ile iklime karşı çok hassastır. Ayrıca, iklim koşulları yalnızca örümcek dağılımını değil aynı zamanda bu omurgasızların işlevsel rolünü de değiştirebilir [202]. Örümceklerin tür içi ve türler arası yaşam öyküsü özellikleri (gelişim, olgunlaşma ve üreme), termal koşullardan [203-205] etkilenmektedir. Çünkü çevresel koşullar ve yaşam öyküsü olayları arasında bir ilişki vardır [203, 206]. Benzer şekilde, birçok çalışma, iklim değişikliklerinin çeşitli hayvan gruplarında kalıtsal genetik değişiklikler yarattığını göstermiştir [206]. Örneğin Jones [205], sıcaklığın örümceklerin büyümesi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu ve nem oranının büyüme oranı üzerinde az bir etkiye sahip olduğunu gösteren bir araştırma yapmıştır. Li ve Jackson [204] da sıcaklık ve örümcek büyümesi arasındaki ilişkiler hakkında bir çalışma yapmıştır. Ortaya konan tüm kanıtlardan, zehrin iklim koşullarına (sıcaklık, nem vb.) göre değiştiği sonucunu çıkarabiliriz.

Temel olarak, varsayımımızı desteklemek için 2016'nın ilk dokuz ayı ve 2017'nin ilk dokuz ayı arasındaki farkı karşılaştırmak üzere istatistiksel analizler (SPSS) yapılmıştır. Şaşırtıcı bir şekilde, istatistiksel analiz; günlük ortalama nem (P = 0,004), günlük minimum nem (P = 0,016), aylık minimum nem (P = 0,005), aylık maksimum nem (P = 0,035), günlük minimum sıcaklık (P = 0,025), günlük toplam yağış (P = 0,023), aylık maksimum yağış (P = 0,044), günlük toplam küresel

radyasyonu (P = 0,000), günlük toplam güneşlenme zamanı (P = 0,000) ve aylık toplam güneşlenme zamanı (P = 0,014) arasında önemli derecede ve istatiksel olarak kayda değer farklıları (P < 0,05) ortaya çıkarmıştır.

Bu nedenle iklim, zehir kompozisyonlarını etkileyebilen ve zehirlerin antimikrobiyal etkisinde değişikliğe neden olabilecek yeni bir parametre olarak düşünülebilir. Ancak iklim değişikliklerinin zehir varyasyonunu etkileyen ana faktörler arasına girmesi için yeni çalışmalar gerçekleştirilmelidir.

Son olarak, mevcut araştırmanın *A. quadratus* zehri hakkında daha ileri çalışmalar gerçekleştirmek için iyi bir referans olabileceğine inanıyoruz.

6. SONUÇ

Geleneksel antibiyotiklere karşı mikrobiyal direncin artması nedeniyle dünya, halk sağlığını etkileyen kritik bir problemle karşı karşıyadır [2, 6, 26, 28, 61, 81, 151]. Antimikrobiyal direnç, büyük bir halk sağlığı tehdidi olarak kabul edilmiş [2, 20, 22, 24-27, 30, 31, 61, 74, 75, 106] ve bu durum, doğal antimikrobiyal peptitleri temsil eden [1, 24, 26-28, 81], çeşitli patojenlerin AMD'sini aşmak için potansiyel bir çözüm sunan yeni ve güçlü antimikrobiyal ajanların [1, 23, 24, 29] tasarımını gerektirmektedir. Ancak halen etkili potansiyel ilaçlar olarak bu molekülleri geliştirmek ve iyileştirmek için birçok araştırma gerekmektedir [25, 28, 72, 77, 79].

Genellikle, AMP'leri; geleneksel antibiyotiklere karşı önemli alternatifler yapan, güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmalarıdır [24, 28, 75, 76, 79, 80, 82]. Omurgasızların peptitleri bilinen AMP2'si en bol gruplarından biridir [24]. Öte yandan, zehir peptitleri yeni farmasötik ajanların tasarımı için mükemmel bir kaynaktır [6, 9, 63, 88, 91, 93] ve zehirlerin ilaç olarak kullanılması, klasik ilaç tedavilerinin yerine geçmektedir [7, 8]. Nitekim yılanların, balıkların, akreplerin, örümceklerin vb. zehir molekülleri terapötik bir potansiyele sahiptir ve yeni ilaçlar yaratmak için ilaç firmalarını cezbetmektedir [59, 90, 98].

Genel olarak, farklı zehirli hayvanlardan elde edilen sayısız zehir peptiti, tıpkı yılanlardan [38], akreplerden [40-45], örümceklerden [4, 29, 48-63] alınan peptitler gibi antimikrobiyal ajanlar olarak önemli rol oynadıklarını ortaya çıkarmak üzere taranmıştır. Örümcek zehri özellikle son yıllarda biyokimyacıların ve farmakologların dikkatini çekmiş çünkü tarımdan tutun da insan klinik tedavilerine kadar biyoteknolojik yenilikler tasarlamak için mükemmel, doğal ve ideal bir kaynaktır [23, 49, 61, 89, 93, 94, 97, 99, 100].

Bununla birlikte, örümcekler dünyaya en çok yayılmış omurgasızlar olsa da [10, 23, 60, 92, 93, 95, 99, 102, 107, 108], *A. quadratus* örümcek zehrinin antimikrobiyal etkisi hakkında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız, *A. quadratus* örümcek zehrinin antimikrobiyal aktivitesini inceleyen ilk rapordur.

Bununla birlikte, çalışmamızda, *A. quadratus* örümcek zehrinin etkisini, on yedi bakteri suşu ve *C. albicans*'a karşı etkisini araştırılmış ve bu patojenlerin en düşük inhibisyon konsantrasyonlarını tespit etmek için minimum inhibisyon konsantrasyon testi gerçekleştirilmiştir. 2016 Ekim'de ve 2017'de Ekim'de iki konsantrasyonu çok küçük farklılıklarla test edilmiş olunsa da sonuçlar beklenmedik şekilde farklılıklar göstermiştir.

Şaşırtıcı bir şekilde, sonuçlarımız *A. quadratus* zehrinin toplama yılına ve her yıl kullanılan konsantrasyonlara göre farklı etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur.

Bu farklı sonuçlar nedeniyle, iklim koşullarındaki farklılıkları analiz edilmiş ve 2016 ve 2017 yıllarında toplanan zehirler arasında bileşimsel farklılık olduğunu düşünülmektedir. (Nem, Sıcaklık, Yağış, Güneşlenme zamanı ve Radyasyon) arasında istatistiksel olarak önemli farklar ($P < 0,05$) tespit edildiğinden, zehir faaliyetindeki farklılıklar ile iklim değişiklikleri arasında bir ilişki olduğu kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamız *A. quadratus* zehrinin potansiyelinin doğal, potansiyel ve yeni bir antibakteriyal madde olarak tartışmış olmasına rağmen, bu türün zehir bileşimindeki değişiklikleri kontrol etmek için yeni bir alan açacak ve ileride bu yönde yapılacak çalışmalar için bir temel olacaktır.

7. ÖNERİLER

Bu çalışma, ileride yapılacak araştırmalar için bir temel oluşturmaktadır. İlk olarak, test edilen konsantrasyonların bulgularını desteklemek için önümüzdeki yıllarda antimikrobiyal testin tekrarlanmasını, sonra da *A. quadratus* örümcek zehrinin hemolitik aktivitesinin ilaç keşfi konusunda zehir peptitlerini kullanılmasının etkinliğinin incelenmesini, ikinci olarak, Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (TF-YPSK) kullanarak ham zehir kesitlemeleriyle antimikrobiyal etkiden sorumlu önemli peptitleri bilmek için zehir bileşenlerinin biyokimyasal yapısının saflaştırılması için gelişmiş bir çalışma yapılmasını, daha sonra da ham zehir kesitlemelerinin Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MDLDİ-UZ-KS) ayrılmasını ve Otomatik Edman Degradasyonu (OED) ile zehir peptitlerinin amino asit dizilişinin ölçülmesini tavsiye ediyoruz. Son olarak, zehir faaliyetlerini etkileyen nedenlerin ve faktörlerin araştırılmasının yanı sıra bu türdeki zehir kompozisyonu varyasyonunu doğru bir şekilde değerlendirilmesini öneririz. Farklı örümcek türlerinden alınan çeşitli zehir peptitlerin antimikrobiyal aktivitesinin izole edilmesi ve araştırılması gelecek nesillerde gerçekleştirilecek biyomedikal uygulamaları için yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Omardien, S., Brul, S., & Zaat, S. A. (2016). Antimicrobial activity of cationic antimicrobial peptides against gram-positives: Current progress made in understanding the mode of action and the response of bacteria. *Frontiers in cell and developmental biology*, *4*.

2. Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. *Archives of medical research*, *36*(6), 697-705.

3. Aoki, W., & Ueda, M. (2013). Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. *Pharmaceuticals*, *6*(8), 1055-1081.

4. Mirghani, M. E. S., Kabbashi, N. A., Elfaki, F. A. M., & Zulkifli, M. Z. (2012). BT-201: Investigation of the spider web for antibacterial activity.

5. King, G. F. (2013). Venoms to drugs: translating venom peptides into therapeutics. *Aust Biochem*, *44*(3), 13-5.

6. Lewis, R. J., & Garcia, M. L. (2003). Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery*, *2*(10), 790-802.

7. Escoubas, P., & King, G. F. (2009). Venomics as a drug discovery platform. *Expert review of proteomics*, *6*(3), 221-224.

8. Kool, J. (2016). Pharmaceutical properties of venom toxins and their potential in drug discovery. *Indonesian Journal of Pharmacy*, *27*(1), 1.

9. Vetter, I., Davis, J. L., Rash, L. D., Anangi, R., Mobli, M., Alewood, P. F., ... & King, G. F. (2011). Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. *Amino acids*, *40*(1), 15-28.

10. King, G. F. (2011). Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert opinion on biological therapy*, *11*(11), 1469-1484.

11. Markland, F. S., & Swenson, S. D. (2016). Applications of Snake Toxins in Biomedicine. *Venom Genomics and Proteomics*, 393-424.

12. Kumar, R., & Patial, S. J. P. (2016). A Review on Efflux Pump Inhibitors of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria from Plant Sources. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, *5*(6), 837-855.

13. Conlon, J. M. (2004). The therapeutic potential of antimicrobial peptides from frog skin. *Reviews in Medical Microbiology*, *15*(1), 17-25.

14. Das, K., Tiwari, R. K. S., & Shrivastava, D. K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*, *4*(2), 104-111.

15. Alam, M. N., Rahman, M. H., Abeden, M. J., Faruk, M., Biozid, M. S., Chowdhury, S., Islam, M. R., Abu Sayeed, M. (2015). Comparative study of preliminary antimicrobial activity of three different plant extracts. *Int J Pharm*, *5*(4), 1087-1090.

16. Le Hello, S., Harrois, D., Bouchrif, B., Sontag, L., Elhani, D., Guibert, V., ... & Weill, F. X. (2013). Highly drug-resistant *Salmonella enterica* serotype *Kentucky* ST198-X1: a microbiological study. *The Lancet infectious diseases*, *13*(8), 672-679.

17. Arias, C. A., Contreras, G. A., & Murray, B. E. (2010). Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical microbiology and infection*, *16*(6), 555-562.

18. Paterson, D. L. (2006). The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species*. *Clinical infectious diseases*, *43*(Supplement 2), S43-S48.

19. Abdelhalim, K. A., & Ibrahim, A. M. (2013). Evaluation of antimicrobial resistance of urinary tract isolated *Escherichia coli* from Omdurman Teaching Hospital in Sudan. *African Journal of Bacteriology Research*, *5*(6), 76-77.

20. Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, *10*, S122-S129.

21. Abiala, M., Olayiwola, J., Babatunde, O., Aiyelaagbe, O., & Akinyemi, S. (2016). Evaluation of therapeutic potentials of plant extracts against poultry bacteria threatening public health. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*(1), 417.

22. Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., Pollock, D. A., & Fridkin, S. K. (2008). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *29*(11), 996-1011.

23. Saez, N. J., Senff, S., Jensen, J. E., Er, S. Y., Herzig, V., Rash, L. D., & King, G. F. (2010). Spider-venom peptides as therapeutics. *Toxins*, *2*(12), 2851-2871.

24. Wang, S., Zeng, X., Yang, Q., & Qiao, S. (2016). Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *International journal of molecular sciences*, *17*(5), 603.

25. Sang, Y., & Blecha, F. (2008). Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal Health Research Reviews*, *9*(02), 227-235.

26. Scocchi, M., Mardirossian, M., Runti, G., & Benincasa, M. (2016). Non-membrane permeabilizing modes of action of antimicrobial peptides on bacteria. *Current topics in medicinal chemistry*, *16*(1), 76-88.

27. Giuliani, A., Pirri, G., & Nicoletto, S. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, *2*(1), 1-33.

28. Mangoni, M. L., & Bhunia, A. (2015). Editorial: Antimicrobial Peptides in Medicinal Chemistry: Advances and Applications.

29. Roozbahani, H., Asmar, M., Ghaemi, N., & Issazadeh, K. (2014). Evaluation of antimicrobial activity of spider silk *Pholcus phalangioides* against two bacterial pathogens in foodborne. *Int J Adv Biol Biomed Res*, *2*(7), 2197-2199.

30. Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *1*(2), 154-160.

31. Murray, D., Cooke, G., Watson, C. J. (2014). The end of the antibiotic era? Bioprospecting for novel antimicrobial compounds with tropical frogs - A Pilot Study.

32. Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS letters*, *449*(2-3), 105-110.

33. Barksdale, S. M., Hrifko, E. J., Chung, E. M. C., & van Hoek, M. L. (2016). Peptides from American alligator plasma are antimicrobial against multi-drug resistant bacterial pathogens including *Acinetobacter baumannii*. *BMC microbiology*, *16*(1), 189.

34. Chen, H. C., Brown, J. H., Morell, J. L., & Huang, C. M. (1988). Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. *Febs Letters*, *236*(2), 462-466.

35. Shin, S. Y., Kang, J. H., Lee, M. K., Kim, S. Y., Kim, Y., & Hahm, K. S. (1998). Cecropin a-magainin 2 hybrid peptides having potent antimicrobial activity with low hemolytic effect. *IUBMB Life*, *44*(6), 1119-1126.

36. Wong, H., Bowie, J. H., & Carver, J. A. (1997). The solution structure and activity of caerin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog, *Litoria splendida*. *The FEBS Journal*, *247*(2), 545-557.

37. Rozek, T., Wegener, K. L., Bowie, J. H., Olver, I. N., Carver, J. A., Wallace, J. C., & Tyler, M. J. (2000). The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. *European Journal of Biochemistry*, *267*(17), 5330-5341.

38. Hakim, M., & Reza, M. A. (2015). *In vitro* Antibacterial Activity of Snake Venom, *Naja naja* from Bangladesh. *British Biotechnology Journal*, *8*(2), 1-5

39. Destoumieux, D., Bulet, P., Strub, J. M., van Dorsselaer, A., & Bachère, E. (1999). Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *European Journal of Biochemistry*, *266*(2), 335-346.

40. Villegas, E., Olivos, P., Padilla, P., Cordero, P., Obregón, V., Lina, L., ... & Corzo, G. (2014). Evaluation of antimicrobial and insecticidal proteins in arachnid venoms. *Biotechnology Summit 2014. Santa María Huatulco, Oaxaca, Mexico, 8-10 October, 2014*, 342-348.

41. Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., & Possani, L. D. (2000). Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS letters*, *471*(2-3), 165-168.

42. Torres-Larios, A., Gurrola, G. B., Zamudio, F. Z., & Possani, L. D. (2000). Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *European journal of biochemistry*, *267*(16), 5023-5031.

43. Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., ... & Verdonck, F. (2002). Antibacterial and antifungal properties of α-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *European Journal of Biochemistry*, *269*(19), 4799-4810.

44. Salama, W., & Geasa, N. (2014). Investigation of the antimicrobial and hemolytic activity of venom of some Egyptian scorpion. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, *6*(1), 21-28.

45. El-Bitar, A. M., Sarhan, M. M., Aoki, C., Takahara, Y., Komoto, M., Deng, L., ... & Hotta, H. (2015). Virocidal activity of Egyptian scorpion venoms against hepatitis C virus. *Virology journal*, *12*(1), 47.

46. Sperstad, S. V., Haug, T., Paulsen, V., Rode, T. M., Strandskog, G., Solem, S. T., ... & Stensvåg, K. (2009). Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. *Developmental & Comparative Immunology*, *33*(4), 583-591.

47. Paulsen, V. S., Blencke, H. M., Benincasa, M., Haug, T., Eksteen, J. J., Styrvold, O. B., ... & Stensvåg, K. (2013). Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide arasin 1—and mode of action studies of the N-terminal, proline-rich region. *PLos one*, *8*(1), e53326.

48. Budnik, B. A., Olsen, J. V., Egorov, T. A., Anisimova, V. E., Galkina, T. G., Musolyamov, A. K., ... & Zubarev, R. A. (2004). De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. *Journal of mass spectrometry*, *39*(2), 193-201.

49. Liu, Z. H., Qian, W., Li, J., Zhang, Y., & Liang, S. (2009). Biochemical and pharmacological study of venom of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, *15*(1), 79-92.

50. Kozlov, S. A., Vassilevski, A. A., Feofanov, A. V., Surovoy, A. Y., Karpunin, D. V., & Grishin, E. V. (2006). Latarcins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(30), 20983-20992.

51. Yan, L., & Adams, M. E. (1998). Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(4), 2059-2066.

52. Adao, R., Seixas, R., Gomes, P., Pessoa, C. C., & Bastos, M. (2008). Membrane structure and interactions of a short Lycotoxin I anaiogue.

53. Kuhn-Nentwig, L., Willems, J., Seebeck, T., Shalaby, T., Kaiser, M., & Nentwig, W. (2011). Cupiennin 1a exhibits a remarkably broad, non-stereospecific cytolytic activity on bacteria, protozoan parasites, insects, and human cancer cells. *Amino acids*, *40*(1), 69-76.

54. Riciluca, K. C. T., Sayegh, R. S. R., Melo, R. L., & Silva, P. I. (2012). Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. *Results in immunology*, *2*, 66-71.

55. Haeberli, S., Kuhn-Nentwig, L., Schaller, J., & Nentwig, W. (2000). Characterisation of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Toxicon*, *38*(3), 373-380.

56. Kuhn-Nentwig, L., Müller, J., Schaller, J., Walz, A., Dathe, M., & Nentwig, W. (2002). Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Journal of Biological Chemistry*, *277*(13), 11208-11216.

57. Corzo, G., Villegas, E., Gómez-Lagunas, F., Possani, L. D., Belokoneva, O. S., & Nakajima, T. (2002). Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(26), 23627-23637.

58. Vassilevski, A. A., Kozlov, S. A., Samsonova, O. V., Egorova, N. S., Karpunin, D. V., Pluzhnikov, K. A., ... & Grishin, E. V. (2008). Cyto-insectotoxins, a novel class of cytolytic and insecticidal peptides from spider venom. *Biochemical Journal*, *411*(3), 687-696.

59. Yigit, N., & Benli, M. (2008). The antibacterial activity of hemolymph of spider, *Agelena labyrinthica* (Araneae: Agelenidae). *Journal of Forestry Faculty*, *8*, 120-4.

60. Ghasemi-Dizgah, A. R. M. I. N., & Amirmozafari, N. O. U. R. (2015). Evaluation of antibacterial effect of *Tarantula cubensis* venom (Theranekron). *Int J Biology Pharm Appl Sci*, *4*, 5980-9.

61. Wang, Y., Wang, L., Yang, H., Xiao, H., Farooq, A., Liu, Z., ... & Shi, X. (2016). The Spider Venom Peptide Lycosin-II Has Potent Antimicrobial Activity against Clinically Isolated Bacteria. *Toxins*, *8*(5), 119.

62. Rossi, D. C., Muñoz, J. E., Carvalho, D. D., Belmonte, R., Faintuch, B., Borelli, P., ... & Daffre, S. (2012). Therapeutic use of a cationic antimicrobial peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* in the control of experimental candidiasis. *BMC microbiology*, *12*(1), 28.

63. Choi, S. J., Parent, R., Guillaume, C., Deregnaucourt, C., Delarbre, C., Ojcius, D. M., ... & Molgo, J. (2004). Isolation and characterization of Psalmopeotoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula *Psalmopoeus cambridgei*. *FEBS letters*, *572*(1-3), 109-117.

64. Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., & Tempst, P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO journal*, *8*(8), 2387.

65. Bonjar, G. S. (2004). Evaluation of antibacterial properties of Iranian medicinal plants against *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchoseptica*. *Asian J. Plant Sci*, *3*(1), 82-86.

66. Kumar, V. P., Chauhan, N. S., Padh, H., & Rajani, M. (2006). Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, *107*(2), 182-188.

67. Doughari, J. H. (2006). Antimicrobial activity of *Tamarindus indica Linn*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *5*(2), 597-603.

68. Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods*, *81*(2), 121-126.

69. Al Akeel, R., Al-Sheikh, Y., Mateen, A., Syed, R., Janardhan, K., & Gupta, V. C. (2014). Evaluation of antibacterial activity of crude protein extracts from seeds of six different medical plants against standard bacterial strains. *Saudi journal of biological sciences*, *21*(2), 147-151.

70. Abdalla, W. E., & Abdallah, E. M. (2016). Promising Sudanese Medicinal Plants with Antibacterial Activity-a Review Article. *Biological Forum – An International Journal*, *8*(1), 299-323.

71. Anderson, G. M. (1997). Antimicrobial peptides of vertebrates. *Herborn Litterae*, Herborn-Dill, Germany: 98-110.

72. Strempel, N., Strehmel, J., & Overhage, J. (2015). Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. *Current pharmaceutical design*, *21*(1), 67-84.

73. Alvarez-Bravo, J., Kurata, S., & Natori, S. (1994). Novel synthetic antimicrobial peptides effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochemical journal*, *302*(2), 535-538.

74. Rao, A. G. (1995). Antimicrobial peptides. *Mol. Plant-Microbe Interact*, *8*(1), 6-13.

75. Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, *6*(12), 1543-1575.

76. Wang, G., Mishra, B., Lau, K., Lushnikova, T., Golla, R., & Wang, X. (2015). Antimicrobial peptides in 2014. *Pharmaceuticals*, *8*(1), 123-150.

77. Brandenburg, L. O., Merres, J., Albrecht, L. J., Varoga, D., & Pufe, T. (2012). Antimicrobial peptides: multifunctional drugs for different applications. *Polymers*, *4*(1), 539-560.

78. Pineda, S. S., Undheim, E. A., Rupasinghe, D. B., Ikonomopoulou, M. P., & King, G. F. (2014). Spider venomics: implications for drug discovery. *Future medicinal chemistry*, *6*(15), 1699-1714.

79. Seo, M. D., Won, H. S., Kim, J. H., Mishig-Ochir, T., & Lee, B. J. (2012). Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. *Molecules*, *17*(10), 12276-12286.

80. Kosikowska, P., & Lesner, A. (2016). Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015). *Expert opinion on therapeutic patents*, *26*(6), 689-702.

81. Lee, T. H., N Hall, K., & Aguilar, M. I. (2016). Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure. *Current topics in medicinal chemistry*, *16*(1), 25-39.

82. Santos, D. M., Reis, P. V., & Pimenta, A. M. (2016). Antimicrobial Peptides in Spider Venoms. *Spider Venoms*, 361-377.

83. Gordon, Y. J., Romanowski, E. G., & McDermott, A. M. (2005). A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Current eye research*, *30*(7), 505-515.

84. Hetru, C., Hoffmann, D., & Bulet, P. (1998). Antimicrobial peptides from insects. *Molecular mechanisms of immune responses in insects*, 40-66.

85. van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. A. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and molecular life sciences*, *70*(19), 3545-3570.

86. Masso-Silva, J. A., & Diamond, G. (2014). Antimicrobial peptides from fish. *Pharmaceuticals*, *7*(3), 265-310.

87. Scocchi, M., Tossi, A., & Gennaro, R. (2011). Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(13), 2317-2330.

88. Mohanty, I., Arunvikram, K., Behera, D., Milton, A., Prince, A., Elaiyaraja, G., ... & Dhama, K. (2016). Immunomodulatory and Therapeutic Potential of Zootoxins (Venom and Toxins) on the Way Towards Designing and Developing Novel Drugs/Medicines: An Overview. *International Journal of Pharmacology*, *12*(2), 126-135.

89. Escoubas, P., & Rash, L. (2004). Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, *43*(5), 555-574.

90. Church, J. E., & Hodgson, W. C. (2002). The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon*, *40*(8), 1083-1093.

91. Hodgson, W. C., & Isbister, G. K. (2009). The application of toxins and venoms to cardiovascular drug discovery. *Current opinion in pharmacology*, *9*(2), 173-176.

92. Sahayaraj, K. (2013). Therapeutic biomolecules of venomous arthropods. *J Bioequiv Availab*, *5*(3).

93. Escoubas, P., & Bosmans, F. (2007). Spider peptide toxins as leads for drug development. *Expert opinion on drug discovery*, *2*(6), 823-835.

94. Sannaningaiah, D., Subbaiah, G. K., & Kempaiah, K. (2014). Pharmacology of spider venom toxins. *Toxin Reviews*, *33*(4), 206-220.

95. Yigit, N., Bayram, A., Danisman, T., & Sancak, Z. (2007). Functional morphology of the venom apparatus of the Funnel spider, *Agelena gracilens* (Araneae: Agelenidae) from Turkey. *Entomological News*, *118*(2), 161-167.

96. King, G. F. (2014). The future of venoms-based drug discovery: An interview with Glenn King. *Future medicinal chemistry*, *6*(15), 1613-1615.

97. Matavel, A., Estrada, G., & De Marco Almeida, F. (2016). Spider Venom and Drug Discovery: A Review. *Spider Venoms*, 273-292.

98. Dutertre, S. (2014). Venomics in medicinal chemistry. *Future medicinal chemistry*, *6*(15), 1609-1610.

99. Klint, J. K., Senff, S., Rupasinghe, D. B., Er, S. Y., Herzig, V., Nicholson, G. M., & King, G. F. (2012). Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: pharmacological tools and potential therapeutic leads. *Toxicon*, *60*(4), 478-491.

100. Gupta, R. K., & Upadhyay, R. K. (2016). Spider venom toxins its biological effects and allergic immune responses: A Review. World Journal of Pharmaceutical research, 5(5), 88-131.

101. Cordeiro, F. A., Amorim, F. G., Anjolette, F. A., & Arantes, E. C. (2015). Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, *21*(1), 24.

102. Wood, D. L., Miljenović, T., Cai, S., Raven, R. J., Kaas, Q., Escoubas, P., ... & King, G. F. (2009). ArachnoServer: a database of protein toxins from spiders. *BMC genomics*, *10*(1), 375.

103. Escoubas, P., Sollod, B., & King, G. F. (2006). Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon*, *47*(6), 650-663.

104. Sollod, B. L., Wilson, D., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., Drinkwater, R., & King, G. F. (2005). Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries?. *Peptides*, *26*(1), 131-139.

105. Mundy, L. M., Sahm, D. F., & Gilmore, M. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, *13*(4), 513-522.

106. Basualdo, C., Sgroy, V., Finola, M. S., & Marioli, J. M. (2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary microbiology*, *124*(3), 375-381.

107. Yigit, N., Bayram, A., Danisman, T., & Sancak, Z. (2006). Functional morphology of the venom apparatus of *Larinioides ixobolus* (Araneae: Araneidae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *9*(10), 1975-1978.

108. Rash, L. D., & Hodgson, W. C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, *40*(3), 225-254.

109. Yigit, N., Bayram, A., Ulasoglu, D., Danisman, T., Corak Ocal, I., & Sancak, Z. (2008). Loxosceles spider bite in Turkey (*Loxosceles rufescens*, Sicariidae, Araneae). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, *14*(1), 178-187.

110. Breitling, R., Lemke, M., Bauer, T., Hohner, M., Grabolle, A., & Blick, T. (2015). Phantom spiders: notes on dubious spider species from Europe. *Arachnologische Mitteilungen*, *50*, 65-80.

111. Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D., King, G. F., ... & Renjifo, C. (2009). The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual review of genomics and human genetics*, *10*, 483-511.

112. Binford, G. J. (2001). An analysis of geographic and intersexual chemical variation in venoms of the spider *Tegenaria agrestis* (Agelenidae). *Toxicon*, *39*(7), 955-968.

113. Herzig, V., Ward, R. J., & Dos Santos, W. F. (2004). Ontogenetic changes in *Phoneutria nigriventer* (Araneae, Ctenidae) spider venom. *Toxicon*, *44*(6), 635-640.

114. Jha, P., Kim, C. M., Kim, D. M., Chung, J. H., Yoon, N. R., Jha, B., ... & Jeon, D. Y. (2016). Transmission of Enterobacter aerogenes septicemia in healthcare workers. *SpringerPlus*, *5*(1), 1397.

115. Ronveaux, O., Gheldre, Y., Glupczynski, Y., Struelens, M., & Mol, P. (1999). Emergence of Enterobacter aerogenes as a major antibiotic-resistant nosocomial pathogen in Belgian hospitals. *Clinical microbiology and infection*, *5*(10), 622-627.

116. De Gheldre, Y. V. E. S., Maes, N., Rost, F., De Ryck, R. A. F. A. E. L., Clevenbergh, P., Vincent, J. L., & Struelens, M. J. (1997). Molecular epidemiology of an outbreak of multidrug-resistant Enterobacter aerogenes infections and in vivo emergence of imipenem resistance. *Journal of clinical microbiology*, *35*(1), 152-160.

117. Lowy, F. (2013, May). Bacterial Classification, Structure and Function. Web.

118. Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Kofteridis, D., Virtzili, S., Chelvatzoglou, F. C., Papaioannou, V., ... & Michalopoulos, A. (2007). Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case–control study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *60*(5), 1124-1130.

119. Girmenia, C., Serrao, A., & Canichella, M. (2016). Epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in Mediterranean countries. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, *8*(1).

120. French, G. L., Shannon, K. P., & Simmons, N. (1996). Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. *Journal of clinical microbiology*, *34*(2), 358-363.

121. Hasan, Z. A., Al-Sulami, A. A., 2Asaad M.R. Al-Taee, A. M. R., & Al-Rubeai, D. B. (2015). Gram positive and Gram negative bacteria from sputum of clinically Tuberculosis suspected patients. *International Journal of Current Research*, *7*(4), 14289-14291.

122. Rossolini, G. M., & Mantengoli, E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*, *11*(s4), 17-32.

123. Wong, V., Levi, K., Baddal, B., Turton, J., & Boswell, T. C. (2011). Spread of *Pseudomonas fluorescens* due to contaminated drinking water in a bone marrow transplant unit. *Journal of clinical microbiology*, *49*(6), 2093-2096.

124. Hsueh, P. R., Teng, L. J., Pan, H. J., Chen, Y. C., Sun, C. C., Ho, S. W., & Luh, K. T. (1998). Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* Bacteremia among Oncology Patients. *Journal of clinical microbiology*, *36*(10), 2914-2917.

125. Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Wolfgang, D. R., Hovingh, E., & Schukken, Y. H. (2007). Longitudinal study of a clonal, subclinical outbreak of *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Cerro in a US dairy herd. *Foodborne pathogens and disease*, *4*(4), 449-461.

126. Lestari, S. I., Han, F., Wang, F., & Ge, B. (2009). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars in conventional and organic chickens from Louisiana retail stores. *Journal of food protection*, *72*(6), 1165-1172.

127. Miller, T., Prager, R., Rabsch, W., Fehlhaber, K., & Voss, M. (2010). Epidemiological relationship between *Salmonella infantis* isolates of human and broiler origin. *Lohmann Inf*, *45*(2).

128. Patrick, M. E. (2004). *Salmonella enteritidis* Infections, United States, 1985–1999-Volume 10, Number 1—January 2004-Emerging Infectious Disease journal-CDC.

129. Collard, J. M., Place, S., Denis, O., Rodriguez-Villalobos, H., Vrints, M., Weill, F. X., ... & Bertrand, S. (2007). Travel-acquired salmonellosis due to *Salmonella kentucky* resistant to ciprofloxacin, ceftriaxone and co-trimoxazole and associated with treatment failure. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *60*(1), 190-192.

130. Villamizar, R. A., Maroto, A., Rius, F. X., Inza, I., & Figueras, M. J. (2008). Fast detection of *Salmonella infantis* with carbon nanotube field effect transistors. *Biosensors and Bioelectronics*, *24*(2), 279-283.

131. Torpdahl, M., Sørensen, G., Lindstedt, B. A., & Nielsen, E. M. (2007). Tandem repeat analysis for surveillance of human *Salmonella typhimurium* infections. *Emerging infectious diseases*, *13*(3).

132. Jimenez, L., Muniz, I., Toranzos, G. A., & Hazen, T. C. (1989). Survival and activity of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in tropical freshwater. *Journal of applied bacteriology. Oxford*, *67*(1), 61-69.

133. Helms, M. (2005). International *Salmonella typhimurium* DT104 Infections, 1992–2001-Volume 11, Number 6—June 2005-Emerging Infectious Disease journal-CDC.

134. El Tawab, A. A. A., Ammar, A. M., El-Hofy, F. I., Hakeem, M. A., & Galil, N. M. A. (2016). Molecular Screening Of Virulence Genes In Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *BVMJ*, *30*(1), 137-149.

135. Tiemersma, E. W., Bronzwaer, S. L., Lyytikäinen, O., Degener, J. E., Schrijnemakers, P., Bruinsma, N., ... & Grundmann, H. (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. *Emerging infectious diseases*, 10(9), 1627-1634.

136. Vuong, C., & Otto, M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and infection*, *4*(4), 481-489.

137. Martínez-Aguilar, G., Avalos-Mishaan, A., Hulten, K., Hammerman, W., Mason Jr, E. O., & Kaplan, S. L. (2004). Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *The Pediatric infectious disease journal*, *23*(8), 701-706.

138. Kandi, V. (2016). Clinical Significance of *Bacillus species* Other than Bacillus anthracis. *J Med Microb Diagn*, *5*(2), e130. doi:0.4172/2161-0703.1000e130

139. Oggioni, M. R., Pozzi, G., Valensin, P. E., Galieni, P., & Bigazzi, C. (1998). Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(1), 325-326.

140. Macovei, L., Ghosh, A., Thomas, V. C., Hancock, L. E., Mahmood, S., & Zurek, L. (2009). *Enterococcus faecalis* with the gelatinase phenotype regulated by the fsr operon and with biofilm-forming capacity are common in the agricultural environment. *Environmental microbiology*, *11*(6), 1540-1547.

141. Kayaoglu, G., & Ørstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, *15*(5), 308-320.

142. Gentry-Weeks, C., Estay, M., Loui, C., & Baker, D. (2003). Intravenous mouse infection model for studying the pathology of *Enterococcus faecalis* infections. *Infection and immunity*, *71*(3), 1434-1441.

143. Stosor, V., Peterson, L. R., Postelnick, M., & Noskin, G. A. (1998). *Enterococcus faecium* bacteremia: does vancomycin resistance make a difference?. *Archives of Internal Medicine*, *158*(5), 522-527.

144. Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Descheemaeker, P., Baele, M., Van Landuyt, H. W., Gordts, B., ... & Haesebrouck, F. (2002). Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, E. hirae and E. villorum. *Journal of applied microbiology*, *92*(5), 821-827.

145. Hof, H. (2003). History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *35*(3), 199-202.

146. Pizarro-Cerdá, J., & Cossart, P. (2006). Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *The Journal of pathology*, *208*(2), 215-223.

147. Schuppler, M. (2014). How the interaction of *Listeria monocytogenes* and *Acanthamoeba sp.* affects growth and distribution of the foodborne pathogen. *Applied microbiology and biotechnology*, *98*(7), 2907-2916.

148. Kallipolitis, B. H., & Ingmer, H. (2001). *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. *FEMS microbiology letters*, *204*(1), 111-115.

149. Favaro, M., Sarmati, L., Sancesario, G., & Fontana, C. (2014). First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and eternecept. *JMM Case Reports*, *1*(2).

150. Moharem, A. S., Raj, A. C., & Janardhana, G. R. (2007). Incidence of *Listeria species* in seafood products of Mysore, India. *Journal of food safety*, *27*(4), 362-372.

151. Pesavento, G., Ducci, B., Nieri, D., Comodo, N., & Nostro, A. L. (2010). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria sp.* isolated from raw meat and retail foods. *Food Control*, *21*(5), 708-713.

152. Sun, P., Sun, Y., Wu, H., Zhu, W., Lopez, J. L., Liu, W., ... & Fang, J. (2011). Atmospheric pressure cold plasma as an antifungal therapy. *Applied Physics Letters*, *98*(2), 021501.

153. Yang, S., Fu, Y., Wu, X., Zhou, Z., Xu, J., Zeng, X., ... & Zeng, Y. (2014). Baicalin prevents *Candida albicans* infections via increasing its apoptosis rate. *Biochemical and biophysical research communications*, *451*(1), 36-41.

154. Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O., & Hube, B. (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cellular microbiology*, *6*(10), 915-926.

155. Jabra-Rizk, M. A., Kong, E. F., Tsui, C., Nguyen, M. H., Clancy, C. J., Fidel, P. L., & Noverr, M. (2016). *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. *Infection and Immunity*, *84*(10), 2724-2739.

156. Cavalcanti, Y. W., Morse, D. J., da Silva, W. J., Del-Bel-Cury, A. A., Wei, X., Wilson, M., ... & Williams, D. W. (2015). Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *Biofouling*, *31*(1), 27-38.

157. Bulet, P., Urge, L., Ohresser, S., Hetru, C., & Otvos, L. (1996). Enlarged Scale Chemical Synthesis and Range of Activity of Drosocin, an O-Glycosylated Antibacterial Peptide of Drosophila. *European journal of biochemistry*, *238*(1), 64-69.

158. Canli, K., Akata, I., & Altuner, E. M. (2016). In vitro antimicrobial activity screening of Xylaria hypoxylon. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines (AJTCAM)*, *13*(4), 42-46.

159. Sunagar, K., Undheim, E. A., Scheib, H., Gren, E. C., Cochran, C., Person, C. E., ... & Antunes, A. (2014). Intraspecific venom variation in the medically significant Southern Pacific Rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*): Biodiscovery, clinical and evolutionary implications. *Journal of proteomics*, *99*, 68-83.

160. Badhe, R. V., Thomas, A. B., Harer, S. L., Deshpande, A. D., Salvi, N., & Waghmare, A. (2006). Intraspecific variation in protein pattern of red scorpion (*Mesobuthus tamulus*, *coconsis*, *pocock*) venoms from Western and Southern India. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, *12*(4), 612-619.

161. Zelanis, A., Travaglia-Cardoso, S. R., & De Fátima Domingues Furtado, M. (2008). Ontogenetic changes in the venom of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) and its biological implication. *South American Journal of Herpetology*, *3*(1), 43-50.

162. Abdel-Rahman, M. A., Omran, M. A. A., Abdel-Nabi, I. M., Ueda, H., & McVean, A. (2009). Intraspecific variation in the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* venom collected from different biotopes. *Toxicon*, *53*(3), 349-359.

163. Creer, S., Malhotra, A., Thorpe, R. S., Stöcklin, R. S., Favreau, P. S., & Chou, W. S. H. (2003). Genetic and ecological correlates of intraspecific variation in pit viper venom composition detected using matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and isoelectric focusing. *Journal of Molecular Evolution*, *56*(3), 317-329.

164. Mackessy, S. P. (1988). Venom ontogeny in the Pacific rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and C. v. oreganus. *Copeia*, 92-101.

165. Daltry, J. C., Ponnudurai, G., Shin, C. K., Tan, N. H., Thorpe, R. S., & Wolfgang, W. (1996). Electrophoretic profiles and biological activities: intraspecific variation in the venom of the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Toxicon*, *34*(1), 67-79.

166. Abdel-Nabi, I. M., McVean, A., Abdel-Rahman, M. A., & Omran, M. A. A. (2004). Intraspecific diversity of morphological characters of the burrowing scorpion *Scorpio maurus palmatus* (Ehrenberg, 1828) in Egypt (Arachnida: Scorpionida: Scorpionidae). *Serket*, *9*(2), 41-67.

167. Mackessy, S. P., Williams, K., & Ashton, K. G. (2003). Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: a case of venom paedomorphosis?. *Copeia*, *2003*(4), 769-782.

168. Gibbs, H. L., Sanz, L., Chiucchi, J. E., Farrell, T. M., & Calvete, J. J. (2011). Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult Dusky Pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*). *Journal of proteomics*, *74*(10), 2169-2179.

169. Wray, K. P., Margres, M. J., Seavy, M., & Rokyta, D. R. (2015). Early significant ontogenetic changes in snake venoms. *Toxicon*, *96*, 74-81.

170. Madrigal, M., Sanz, L., Flores-Díaz, M., Sasa, M., Núñez, V., Alape-Girón, A., & Calvete, J. J. (2012). Snake venomics across genus Lachesis. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. *Journal of proteomics*, *77*, 280-297.

171. Rivera-Ortiz, J. A., Cano, H., & Marí, F. (2011). Intraspecies variability and conopeptide profiling of the injected venom of Conus ermineus. *Peptides*, *32*(2), 306-316.

172. Margres et al. (2015a) (Margres, M. J., McGivern, J. J., Seavy, M., Wray, K. P., Facente, J., & Rokyta, D. R. (2015). Contrasting modes and tempos of venom expression evolution in two snake species. *Genetics*, *199*(1), 165-176.

173. Aird, S. D., Aggarwal, S., Villar-Briones, A., Tin, M. M. Y., Terada, K., & Mikheyev, A. S. (2015). Snake venoms are integrated systems, but abundant venom proteins evolve more rapidly. *BMC genomics*, *16*(1), 647.

174. Chippaux, J. P., Williams, V., & White, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, *29*(11), 1279-1303.

175. Gao, J. F., Qu, Y. F., Zhang, X. Q., He, Y., & Ji, X. (2013). Neonate-to-adult transition of snake venomics in the short-tailed pit viper, Gloydius brevicaudus. *Journal of proteomics*, *84*, 148, -157.

176. Chang, D., Olenzek, A. M., & Duda, T. F. (2015, April). Effects of geographical heterogeneity in species interactions on the evolution of venom genes. In *Proc. R. Soc. B* (Vol. 282, No. 1805, p. 20141984). The Royal Society.

177. Saviola, A. J., Pla, D., Sanz, L., Castoe, T. A., Calvete, J. J., & Mackessy, S. P. (2015). Comparative venomics of the Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) from Colorado: identification of a novel pattern of ontogenetic changes in venom composition and assessment of the immunoreactivity of the commercial antivenom CroFab®. *Journal of proteomics*, *121*, 28-43.

178. Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomics of the *lancehead pitviper* Bothrops asper: geographic, individual, and ontogenetic variations. *Journal of proteome research*, *7*(8), 3556-3571.

179. Rokyta, D. R., Margres, M. J., Ward, M. J., & Sanchez, E. E. (2017). The genetics of venom ontogeny in the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *PeerJ*, *5*, e3249.

180. Margres et al. (2015b) Margres, M. J., Wray, K. P., Seavy, M., McGivern, J. J., Sanader, D., & Rokyta, D. R. (2015). Phenotypic integration in the feeding system of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Molecular ecology*, *24*(13), 3405-3420.

181. Saravia, P., Rojas, E., Arce, V., Guevara, C., López, J. C., Chaves, E., ... & Gutiérrez, J. M. (2002). Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake Crotalus durissus: pathophysiological and therapeutic implications. *Revista de biología tropical*, *50*(1), 337-346.

182. Schenberg, S. (1959). Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies. *Science*, *129*(3359), 1361-1363.

183. Currier, R. B., Harrison, R. A., Rowley, P. D., Laing, G. D., & Wagstaff, S. C. (2010). Intra-specific variation in venom of the African Puff Adder (*Bitis arietans*): Differential expression and activity of snake venom metalloproteinases (SVMPs). *Toxicon*, *55*(4), 864-873.

184. López-Lozano, J. L., de Sousa, M. V., Ricart, C. A. O., Chávez-Olortegui, C., Sanchez, E. F., Muniz, E. G., ... & Morhy, L. (2002). Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild Bothrops atrox specimens from Amazonian rain forest. *Toxicon*, *40*(7), 997-1006.

185. Saldarriaga, M. M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M. F., Díaz, A., & Gutiérrez, J. M. (2003). Ontogenetic variability of Bothrops atrox and Bothrops asper snake venoms from Colombia. *Toxicon*, *42*(4), 405-411.

186. Guércio, R. A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., López-Lozano, J. L., Paba, J., Sousa, M. V., & Ricart, C. A. (2006). Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake Bothrops atrox. *Proteome science*, *4*(1), 11.

187. Mackessy, S. P., Sixberry, N. M., Heyborne, W. H., & Fritts, T. (2006). Venom of the Brown Treesnake, *Boiga irregularis*: ontogenetic shifts and taxa-specific toxicity. *Toxicon*, *47*(5), 537-548.

188. Gibbs, H. L., & Chiucchi, J. E. (2011). Deconstructing a complex molecular phenotype: population-level variation in individual venom proteins in eastern massasauga rattlesnakes (*Sistrurus c. catenatus*). *Journal of molecular evolution*, *72*(4), 383-397.

189. Gibbs, H. L., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2009). Snake population venomics: proteomics-based analyses of individual variation reveals significant gene regulation effects on venom protein expression in *Sistrurus* rattlesnakes. *Journal of molecular evolution*, *68*(2), 113-125.

190. Andrade, D. V., & Abe, A. S. (1999). Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. *Herpetologica*, *55*(2), 200-204.

191. Daltry, J. C., Wüster, W., & Thorpe, R. S. (1996). Diet and snake venom evolution. *Nature*, *379*(6565), 537-540.

192. Queiroz, G. P., Pessoa, L. A., Portaro, F. C., Maria de Fátima, D. F., & Tambourgi, D. V. (2008). Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon*, *52*(8), 842-851.

193. Boevé, J. L., Kuhn-Nentwig, L., Keller, S., & Nentwig, W. (1995). Quantity and quality of venom released by a spider (*Cupiennius salei*, Ctenidae). *Toxicon*, *33*(10), 1347-1357.

194. de Oliveira, K. C., de Andrade, R. M. G., Piazza, R. M., Ferreira, J. M., Van Den Berg, C. W., & Tambourgi, D. V. (2005). Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon*, *45*(4), 421-429.

195. de Andrade, R. M. G., De Oliveira, K. C., Giusti, A. L., da Silva, W. D., & Tambourgi, D. V. (1999). Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon*, *37*(4),627-632.

196. Omran, M. A., & McVean, A. (2000). Intraspecific variation in scorpion *Leiurus quinquestriatus* venom collected from Egypt (Sinai and Aswan deserts). *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, *19*(3-4), 247-264.

197. Abdel-Rahman, M. A. (2008). Intraspecific diversity of scorpions venom and its implication in the pathophysiological effects. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, *14*(1), 191-191.

198. Wüster, W., Daltry, J. C., & Thorpe, R. S. (1999). Can diet explain intraspecific venom variation? Reply to Sasa. *TOXICON-OXFORD-*, *37*, 253-258.

199. Massey, D. J., Calvete, J. J., Sánchez, E. E., Sanz, L., Richards, K., Curtis, R., & Boesen, K. (2012). Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from Southern Arizona. *Journal of proteomics*, 75(9), 2576-2587.

200. Kuehn, L., & McCormick, S. (2017). Heat Exposure and Maternal Health in the Face of Climate Change. *International journal of environmental research and public health*, *14*(8), 853.

201. Liu, Z., Ezernieks, V., Wang, J., Arachchillage, N. W., Garner, J. B., Wales, W. J., ... & Rochfort, S. (2017). Heat Stress in Dairy Cattle Alters Lipid Composition of Milk. *Scientific Reports*, *7*.

202. Birkhofer, K., & Wolters, V. (2012). The global relationship between climate, net primary production and the diet of spiders. *Global Ecology and Biogeography*, *21*(2), 100-108.

203. Bonte, D., Travis, J. M., De Clercq, N., Zwertvaegher, I., & Lens, L. (2008). Thermal conditions during juvenile development affect adult dispersal in a spider. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(44), 17000-17005.

204. Li, D., & Jackson, R. R. (1996). How temperature affects development and reproduction in spiders: a review. *Journal of Thermal Biology*, *21*(4), 245-274.

205. Jones, S. E. (1941). Influence of temperature and humidity on the life history of the spider *Agelena naevia* Walckenaer. *Annals of the Entomological Society of America*, *34*(3), 557-571.

206. Bradshaw, W. E., & Holzapfel, C. M. (2006). Evolutionary response to rapid climate change. Science (Washington), 312(5779), 1477-1478.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sana AB. Mohamed MASUD

Doğum Tarihi ve Yeri : 03.04.1986, Trablus-Libya

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : smasud@ogr.kastamonu.edu.tr

Eğitim Durumu

Lise : Al-Ezdihar, Trablus-Libya

Lisans : Trablus Üniversitesi, Trablus-Libya

Mesleki Deneyim

İş Yeri : Trablus Üniversitesinde Öğretim Görevlisi Asistanı, Trablus-Libya