

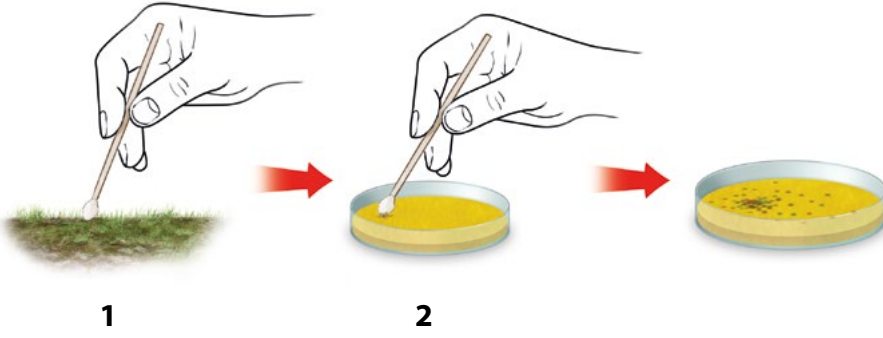
Bilim İnsanları Kayıp Bakterilerin



P e ş i n d e

Havada, suda, toprakta, vücudumuzda... Bakteriler her yerde. Onları göremesek de aslında Dünya üzerindeki canlıların kütlece yarısından fazlasını oluşturuyorlar. Sayıları kadar çeşitlilikleri de yüksek. Kimilerine vücudumuzun sağlıklı işleyişi için bağımlıyız, kimileri bizi öldürebilecek kadar tehlikeli, kimileriye ekolojik dengenin devamı için önemli işlevler görüyor. Vücudumuzun ve doğal çevrenin önemli birer bileşeni olmalarının yanı sıra insan yaşamındaki en dikkat çekici faydalarından biri günümüzde kullanılan antibiyotiklerin neredeyse yarısının kaynağı olmaları.

Şaşırtıcı olansa yeryüzündeki bakterilerin büyük çoğunluğunun henüz tanınmıyor olması. Şimdiye kadar laboratuvar ortamında büyütülüp incelenebilen bakteriler tüm bakterilerin tahminen %1'inden daha az. Geriye kalan büyük çoğunluktan elde edilebilecek bilgilerin hem yeni ilaçlar geliştirilmesine hem de bakterilerin etkili olduğu tüm doğal süreçlerin daha iyi anlaşılmasına yönelik çığır açıcı etkiler yaratabileceği öngörülüyor. İşte bilim insanları şimdiye kadar karanlıkta kalmış bu çoğunluğu, laboratuvar ortamında incelemenin yeni yollarını arıyor.



Doğal bir ortamdan alınan örnek (1) bir petri kabındaki steril (hiçbir mikroorganizmanın bulunmadığı) besi ortamına aktarılır (2). Kapağı kapatılan petri kabı uygun sıcaklıkta bir süre bekletilirse besi yerinde bakteri kolonilerinin oluştuğu görülür. Bu, bakterileri kültüre almakta kullanılan klasik yöntemdir. Ancak bakterilerin %1'den az bir kısmı bu yöntemle kültüre alınabiliyor.

Bakteriler laboratuvar ortamında klasik olarak petri kabı denen özel tabaklar içindeki besi ortamlarında büyütülüyor. Bakterilerin büyümesi tek bir bakterinin besi ortamında çoğalarak koloni adı verilen topluluğu oluşturması anlamına geliyor. Bakterinin laboratuvar ortamında bu şekilde, başka bakterilerden ayrılmış saf kültür olarak büyütülmesine bakteriyi kültüre alma deniyor. Bakterileri kültüre almadan genetik olarak incelemeyi sağlayan bazı teknikler olsa da fizyolojileri ile ekolojide, konakçı organizmanın sağlığında ve doğal ürünlerin üretiminde üstlendikleri rolleri tam olarak anlamının yolu onları kültüre almaktan geçiyor. Şimdiye kadar kültüre alınabilen bakterilerin var olan bakteri türlerinin %1'den daha küçük bir kısmına karşılık geldiği tahmin ediliyor.

Kayıp Bakteriler Nasıl Fark Edildi?

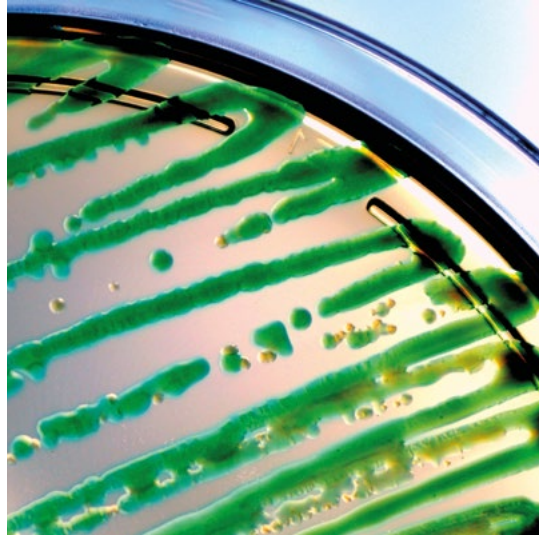
Belirli bir ortamdaki bakterilerin hepsinin laboratuvar ortamında çoğaltılamadığına ilişkin ilk doğrudan kanıt mikroskop incelemelerinden elde edildi. Mikroskopta gözlenen bakterilerin sayısının petri kabında büyüyenlerden çok daha fazla olduğu gözlemlendi. “Büyük sayım anomalisi” olarak adlandırılan bu olgu ortamdaki çeşitlilik gösterse de, mikroskopta gözlemlenen sayılar petri kabında gözlemlenen sayıların yüzlerce ya da binlerce katı olabiliyor. Bu gözlem hem araştırmacıları kültür yöntemleri üzerinde çalışmaya teşvik etti hem de laboratuvar ortamında büyütülemeyen bakterilerin filogenetik kimliklerini, yani canlı sınıflandırmasında hangi kategoriye dahil oldukları konusunu gündeme getirdi. Acaba bunlar kültüre alınabilenlerden farklı bakteriler miydi? Kültüre alınamayan bakterilerin ölü hücreler olabileceği bile öne sürüldü, ancak pek çoğunun aslında metabolik açıdan etkin olduğu gösterildi. Dış ortamlardan alınan karışık örneklerden doğrudan DNA dizilimi verisi elde etmeye yarayan moleküler teknikler sayesinde, ortamda bulunan mikroorganizmaların kimlikleri konusunda bilgi edinmek mümkün oldu. Sınıflandırma açısından anlam taşıyan belirli gen bölgelerinin dizilimlerinin incelenmesi, kültür ortamında hiçbir zaman gözlenmemiş muazzam bir canlı çeşitliliği ortaya çıkardı. Öyle ki 1987’de Carl Woese tarafından tanımlanan on bir şubelik (bakteri krallığındaki en üst düzey kategori) sınıflandırma bugün yerini, çoğu kültüre alınamayan üyelerce temsil edilen seksen beşin üzerinde şubeye bıraktı.



Muazzam Ama Kayıp Çeşitlilik

Biyolojik çeşitliliği ölçme yollarından biri yaşam ağacının belirli bir dalındaki, geçerli biçimde tanımlanmış tür sayısını belirlemektir. Gözlemlenmesi, fark edilmesi ve dolayısıyla tanımlanması çeşitli sebeplerle görece daha zor olan pek çok canlı grubu için biyologlar -tanımlanmış türlerden ya da ilişkili başka canlı gruplarının sayısından yola çıkarak- tür çeşitliliğine ilişkin tahminlerde bulunur.

Northeastern Üniversitesi'nden Eric J. Stewart bu tür bir tahmini bakteriler için kabaca şu şekilde yapıyor: Dünyadaki toplam tahmini böcek türü sayısı 800.000 ile 1,2 milyon arasında. Tahmini bakteriyel çeşitlilik de en az bu kadar, büyük ihtimalle de bundan kat kat fazla olmalı. Çünkü her bir böcek türünün kendine has en az bir bakteri türüyle endosimbiyotik ilişki içinde yaşadığı kabul ediliyor. Doğal çevredeki farklı bakterilerin yaşayabileceği, çok daha fazla sayıda farklı yaşama ortamı da hesaba katılırsa çok daha büyük sayılara ulaşılır. İşte bu büyük sayılara karşın, şimdiye kadar geçerli biçimde tanımlanmış bakteri türü sayısının sadece 7000'in biraz üzerinde olması şaşkınlık uyandırıyor. Aradaki bu büyük farkın en önemli sebebi bakterilerin tür düzeyinde tanımlanabilmesi için saf kültürlerine ihtiyaç duyulması. Bakterilerin saf kültürleri elde edilemediği sürece gerekli fizyolojik bilgilerin elde edilmesi çok zor. Bakterilerin bu anlamda "kayıp" olarak nitelenen büyük çoğunluğunun devasa bir metabolik çeşitlilik de barındırdığı tahmin ediliyor.



Faydalı Maddelerin Kaynağı Olarak Bakteriler

Henüz kültüre alınamamış bakterilere yönelik araştırmalara olan ilgi son yıllarda hayli artmış durumda. Bunun en önemli nedenlerinden biri küresel ölçekte hissedilmeye başlanan antibiyotik krizi. Mevcut antibiyotiklerin yaklaşık yarısı bakterilerden elde edilmişti. Yeni antibiyotikler aramak için de şimdiye kadar incelenmemiş bakterilere yönelmek gerekiyor.

Hastalık yapıcı bakteriler gitgide daha fazla antibiyotiğe karşı direnç geliştiriyor. Hatta geçtiğimiz yılın Kasım ayında Çin'de, bakterilerin henüz direnç geliştirmedeği son antibiyotik olarak bilinen kolistine karşı direnç gösteren bakteriler keşfedildi. Çoklu antibiyotik direnci olan, süper-mikrop olarak da anılan dirençli bakterilerin, özellikle de hastanelerde tehlikeli enfeksiyonlara yol açarak yılda 700.000 civarında ölüme neden olduğu tahmin ediliyor. Eğer bir çözüm bulunamazsa 2050'ye gelindiğinde bu enfeksiyonların her yıl 10 milyonun üzerinde, yani günümüzde kanserden kaynaklı ölümlerden daha fazla ölüme neden olacağı tahmin ediliyor. Dolayısıyla insanlığın acilen yeni antibiyotiklere ihtiyacı var. Bu ihtiyaç bazı yetkili mercileri de inisiyatif almaya itti. Geçtiğimiz yılın Mayıs ayında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) antibiyotik direnciyle savaşmaya yönelik küresel bir plana onay verdi. İngiltere hükümeti tarafından görevlendirilen bir kurul küresel ilaç endüstrisine antibiyotik araştırmalarını yeniden canlandırmak için toplam 2 milyar dolar değerinde yatırım yapma çağrısında bulundu. Kuruldaki araştırmacılar, yeni ilaçların keşfi için kültüre alınamayan mikroorganizmaları araştırmaya yönelik alternatif yollar bulunması gerektiğini de vurguladı.



Ticari olarak erişilebilir ilaç nitelikli kimyasal maddelerin yarısını bakterilerden elde edilen doğal ürünler ve bunların türevleri oluşturuyor. Bakterilerin ürettiği küçük doğal moleküllerin çeşitliliğinin bir milyar özgün bileşiğin üzerinde olduğu tahmin ediliyor. Dolayısıyla sadece sınırlı sayıda bakterinin incelenebilmesinin en temel sonuçlarından biri antibiyotiklerin keşfedilme sürecinin sekteye uğraması. Klinik kullanıma başarıyla uyarlanan son yeni antibiyotik sınıfı 1987’de keşfedilmişti. O zamandan beri yenilik olarak sadece mevcut antibiyotiklerin türevleri ya da çeşitlemeleri piyasaya sürüldü. “Antibiyotik boşluğu” olarak adlandırılan bu durum hâlâ devam ediyor.

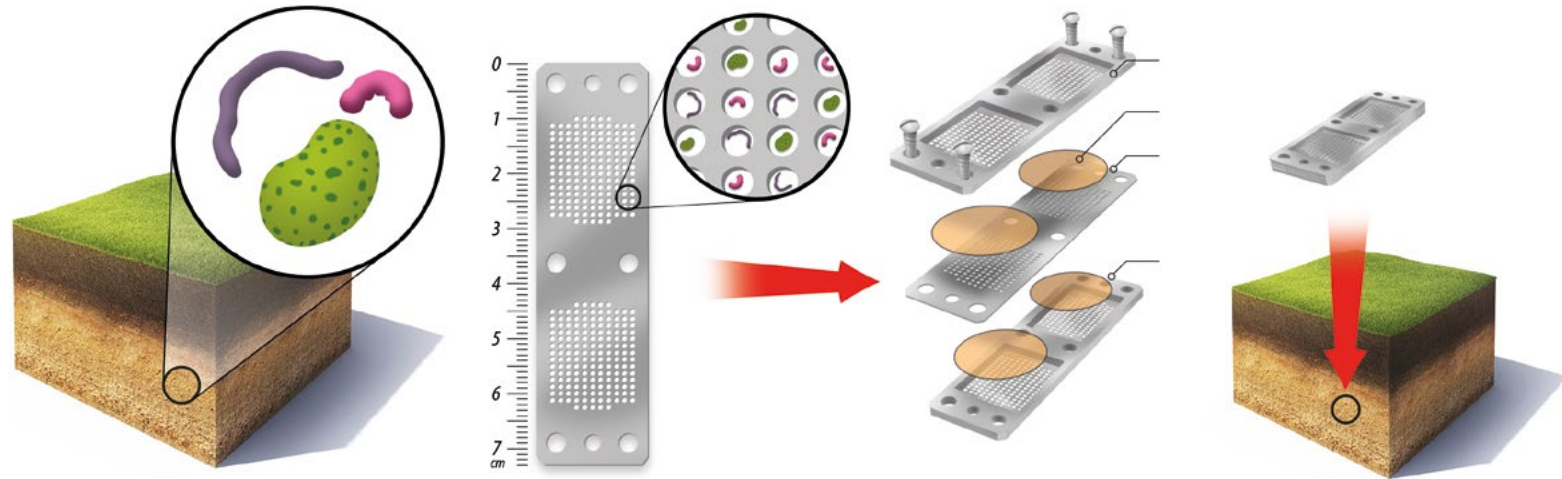
Üstelik bakterilerden elde edilebilecek doğal ürünler antibiyotiklerle sınırlı da değil. Mikroorganizma kaynaklı çeşitli ikincil metabolitler organ nakillerinde, kanser tedavisinde, kolesterol kontrolünde, ayrıca böcek, mantar ve parazit karşıtı kimyasal maddeler olarak işlev görüyor. Dolayısıyla daha çeşitli ve daha fazla mikrobiyal doğal ürünün elde edilmesinin insan yaşamının çok farklı alanlarında fayda sağlayacağı ortada.

Neden Kültüre Alınamıyorlar?

Bakterilerin büyük çoğunluğunun laboratuvar ortamında büyütülememesinin ana sebebi bilim insanlarının bu canlıların doğal ortamındaki bazı temel unsurları gözden kaçırmaması. Yani sorun yeterince denememeleri ya da akıllıca çözümler sunamamaları değil. Bir mikroorganizmanın doğal ortamındaki hangi unsurun laboratuvar ortamında eksik kaldığını bulabilmek için besin, pH, osmotik koşullar, sıcaklık ve daha pek çok unsurun sayısız kombinasyonu ile denemeler yapmak gerekiyor. Buysa makul bir süre ve çaba harcanarak üstesinden gelinemeyecek kadar kapsamlı bir iş.

Standart besi ortamlarını bakterinin ihtiyaç duyduğu düşünülen unsurları ekleyerek modifiye etmek, bakterileri kültüre alma çalışmalarında klasik yaklaşım olarak süregeldi ve önceden kültüre alınmayan pek çok bakterinin kültüre alınmasında işe yaradı. Ancak bakterilerin çoğu için yetersiz kalan bu yaklaşım artık yerini yavaş yavaş farklı stratejilere bırakmaya başladı.

iChip’in Çalışma İlkesi



1
Çevreden bir örnek
(burada topraktan) alınır.

2
Alınan örnek seyreltilir ve
iChip plakası seyreltilmiş
örnek içine alınır.
Böylece her bir kuyucuğa tek
bir bakteri hücresi düşmesi
sağlanır.

3
iChip plakaları molekülleri
geçirebilen bir zarla kaplanır.
Bu zar bakterilerin çevreyle
etkileşimine ve kendi
aralarındaki kimyasal iletişime
de imkân tanır.

4
iChip cihazı çevresel örneğin
alındığı ortama geri konur.
Burada küçük moleküller
ve başka organizmalardan
kaynaklı metabolitler
iChip'teki bakterilerin
büyümesine yardım eder.

Doğal Ortamın Nimetlerinden Faydalanmak

Bakteriler doğada çok çeşitli ortamlarda, çoğu zaman da başka canlılarla bir arada yaşıyor. Bu yüzden de çoğu bakteri için laboratuvarında uygun büyüme ortamını oluşturmak bir sorun. Bu durum araştırmacıları alternatif bir yaklaşıma yönlendirdi. Araştırmacılar, her bakteri kendi doğal ortamında rahatça yaşadığına göre onları laboratuvarındaki yapay bir ortam yerine kendi ortamlarında büyütmenin daha iyi bir fikir olabileceğini düşündü. Tabii bu durumda aşılması gereken en önemli zorluk bakterileri ortamdaki diğer mikroplardan ayrı olarak elde edebilmek.

Northeastern Üniversitesi'nden Slava Epstein ile Kim Lewis bakterilerin doğal ortamlarında büyümesini sağlayacak çip şeklinde bir cihaz geliştirdi.

Başparmak büyüklüğündeki iChip adlı cihazda çok küçük hacimli, 384 kuyucuk var. Bu kuyucuklar agarla (besi ortamına fiziksel destek sağlayan jölemsi malzeme) karıştırılan ve her bir kuyucuğa sadece bir hücre girmesini sağlamak amacıyla seyreltilen toprak örnekleriyle dolduruluyor. Çip moleküllerin iki yönlü geçişine izin veren ancak bakterileri kuyucuklara hapseden özel bir zarla kaplanıyor. Daha sonra araştırmacılar çipi toprak örneklerinin alındığı doğal ortama, örneğin çayırılık bir alana yerleştiriyor.

Araştırmacılar bir ay bu şekilde beklettikleri çiplerin kuyucuklarındaki kolonileri petri kaplarına aktardı. Daha sonra da petri kaplarında büyüttükleri kültürlerden aldıkları özütleri antibiyotik etkinliği açısından inceledi. Bu yöntemle 10.000 kadar bakteri türü izole ettiler. Bu sayı, toprak örneklerini doğrudan petri kaplarına aktarmış olsalar yani klasik yöntemi kullanmış olsalar elde edecekleri sayının çok üzerinde. Araştırmacıların elde ettiği kültürlerden biri teiksobaktin adlı antibiyotik sentezleyen, *Elfmitheria terrae* adını verdikleri bir bakteriye aitti. Bu keşif hayli ses getirdi çünkü bu antibiyotik 1987'den beri keşfedilen ilk antibiyotikti. Üstelik dirençli bakteriler üzerinde etkili oldu ve hedef mikroorganizmalar teiksobaktine direnç geliştirmede, 20-30 yıl kadar da direnç geliştirmeyeceği düşünülüyor.

Bakterilerin doğal ortamından yararlanılarak elde edilen başarılarından biri de *Alphaproteobacteria* sınıfına ait SAR11 grubundan bakterilerin izole edilmesiydi.

Daha önce kültüre alınamamış olsalar da, Dünya'da büyük miktarda SAR11 grubu bakteri bulunduğu ve bunların okyanuslardaki birincil üretimde, yani fotosentezle organik madde üretiminde önem taşıyan bir canlı grubu olduğu biliniyordu.

Giovannoni ve ekibi bu bakterileri kültüre alabilmek için bakterilerin doğal ortamı olan okyanus suyunu büyütme ortamı olarak kullandı. Ancak araştırmacılar hücreleri ayrı ayrı bölmelere hapsedmeye çalışmak yerine, SAR11 grubu bakterilerin okyanus suyu örneklerinde en çok bulunan canlılardan olmasını bir fırsat olarak değerlendirdi. Bir seyreltme tekniği kullanarak bakterileri diğer organizmalardan ayırdılar. Bu teknikte belirli bir hacimde sadece bir ya da birkaç bakteri bulunacak şekilde bir dizi seyreltme işlemi gerçekleştiriliyor. Araştırmacılar bakterileri bu şekilde mikrolitre hacimli kuyucuklarda ayırmayı ve bakterilerin saf kültürlerini elde etmeyi başardı. SAR11 grubu bakterilerin kültüre alınması da bu bakterilerle ilgili pek çok araştırma yapılmasına imkân sağladı. Bakterilerin genom dizilimi belirlendi ve bakterilerin besin ihtiyaçlarının daha iyi anlaşılmasına ve kültür koşullarının geliştirilmesine yönelik yeni bilgiler elde edildi. Ayrıca bu bakterilerin fotosentezinde görev alan proteorodopsin isimli proteinin işlevi açıklık kazanmaya başladı. Bunun da okyanuslardaki karbon döngüsünün daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması bekleniyor.

Metagenomik Yaklaşımla Kültürden Bağımsız Araştırmalar

Bir yanda bakterileri kültüre alma teknikleri konusundaki çalışmalar, diğer yanda tek hücre genom analizleriyle yürütülen çalışmalar süredursun, bir kısım araştırmacılar da bakterilerden elde edilebilecek faydalı maddeleri, bakteri kültürleriyle de bakterileri fiziksel olarak ayırmakla da hiç uğraşmadan, doğrudan toplu DNA verilerini inceleyerek araştırıyor. Metagenomik olarak adlandırılan bu yeni yaklaşımda pek çok farklı organizmayı içeren karışık örneklerde DNA dizi analizi yapılıyor. Bu şekilde oluşturulan metagenomik kütüphaneler biyoinformatik yöntemleriyle inceleniyor. Kütüphaneler farklı iki yaklaşımla taranıyor. Dizi temelli yaklaşımda kütüphanede belirli DNA dizileri olup olmadığı (örneğin bilinen bir enzime ilişkin genin DNA dizisi) araştırılıyor. İşlev temelli yaklaşımdaysa kütüphane, bakterilerin gösterdikleri özellikler ya da işlevleri (örneğin bir pigmentin ya da bir antibiyotik var olup olmadığı) açısından taranıyor. Şimdiye kadar bilim insanları bu yaklaşımla ilaç özellikli yeni maddeler bulmayı ve beklenmedik yerlerde yeni dirençlilik genleri keşfetmeyi başardı.



DNA'nın Anlattıkları

Bir kısım bilim insanı ise bakterileri, farklı bir yaklaşımla kültüre alma basamağını tamamen atlayarak ve doğrudan tek bir bakteriye ait DNA bilgilerini inceleyerek araştırıyor.

Önceleri çok sayıda farklı mikroorganizmanın karışık olarak bulunduğu örneklerdeki tüm DNA moleküllerinin dizin analizi üzerinden incelemeler yapıyorlardı. Bu yaklaşım, söz konusu örnekte, daha önce kültüre alınamamış bakteriler olup olmadığı konusunda fikir verse de o bakterilerin bütünü hakkında pek fazla bilgi sağlamıyordu. Zaten kültüre alınabilenler dışında çok çeşitli bakteriler de olduğu konusundaki en önemli kanıtlardan biri bu genetik verilerdi.

Gelişmiş DNA dizin analizi teknikleri sayesinde artık kültüre almaya gerek kalmadan da bakteriler hakkında daha ayrıntılı bilgiler edinmek mümkün. Öyle ki kültüre alınamamış tek bir hücrenin genomu bile incelenebiliyor. ABD Enerji Bakanlığı bünyesindeki Joint Research Center'dan Tanja Woyke yaklaşık on yıllık bir geçmişi olan bu tekniği, bilinmeyen bakterileri keşfetmek amacıyla kullanıyor. Woyke ve ekibi Nevada'daki bir ılganın dip tortusu ve Pasifik Okyanusu'ndaki bir hidrotermal baca da dahil dokuz farklı ortamdan örnek topladı. 200 kadar hücreyi ayırdılar ve genom dizilimlerini çıkardılar. Genom verilerinin analizi sonucunda bakteriler, daha önce kültüre alınmış temsilcileri bulunmayan 20 yeni gruba ayrıldı.

İsveç Federal Teknoloji Enstitüsü'nden Jörn Piel ve ekibi yine aynı tekniği kullanarak deniz süngerlerinde bulunan, daha önce kültüre alınmamış bakterileri araştırdı. Deniz süngerlerinin çok çeşitli kimyasal maddeler salgıladığı biliniyordu. Bunlar arasında antikanser ve antibiyotik nitelikli maddeler ile başka tıbbi uygulamalara yönelik özellikler gösteren pek çok madde var. Deniz süngerlerinin, vücut ağırlığının %40'ını bulan miktarda mikroorganizma toplulukları içerdiği de biliniyordu. Bunların salgılanan çok çeşitli kimyasal maddenin de kaynağı olduğu düşünülüyordu, ancak bu mikroorganizmalar kültüre alınamadığı için bu kesin olarak bilinmiyordu.

Piel ve ekibi süngerden izole ettikleri hücrelerin ayrı ayrı DNA dizi analizlerini yaptı ve bu hücrelerin genomlarında, biyolojik olarak etkin moleküllerin üretiminde rol oynadığı bilinen iki gen kümesinin var olup olmadığını araştırdı. Bu genleri *Enthothelonella* adlı bakteride buldular. Bu bakteri üzerindeki daha ayrıntılı analizlerse daha şaşırtıcı bir durumu ortaya çıkardı. Görünüşe göre bu bakteri süngerdeki biyoetkin bileşiklerin neredeyse tamamının üretiminden sorumluydu. Piel'in ekibi şimdi de *Enthothelonella*'daki gen kümelerini kültüre alınabilen bir organizmaya, örneğin *Escherichia coli*'ye aktararak söz konusu maddelerin üretimini sağlamayı amaçlıyor.

Karanlıktaki Bakteriler Umut Işığı

Araştırmacılar farklı kültüre alma teknikleri kullanılarak yeni bakteri türleri üzerinde yaptıkları çok sınırlı kapsamdaki araştırmalarda bile yeni bilgilere ulaştı. Buna küresel antibiyotik krizinin çözümüne yardımcı olma potansiyeli taşıyan yeni bir antibiyotik de dahil. Bazı bakterilerin kültüre alınabilmesi bütün bir araştırma alanının kaderini değiştirdi. Şimdiye kadar elde edilen bilgilerin büyük bir buzdağının tepesi olduğu düşünülüyor. Yeni teknolojilerin yardımıyla karanlıkta kalmış daha fazla bakteri gün ışığına çıkarıldıkça insanlığın ve gezegenimizin geleceği için faydalı olabilecek daha fazla bilgiye erişilebileceğine ise kesin gözüyle bakılıyor.

Kaynaklar

- <http://www.wired.com/2014/12/oneill-rpt-amr/>
- Lok, C., "Mining The Microbial Dark Matter", *Nature*, Cilt 522, s. 270-273, 2015.
- Stewart, E. J., "Growing Unculturable Bacteria", *Journal of Bacteriology*, Cilt 194, Sayı 16, s. 4151-4160, 2012.
- <https://www.newscientist.com/article/mg22930540-700-mining-the-hidden-treasure-of-the-worlds-unknown-bacteria/>

