



Use of Cross-Streak Method to Determine Antimicrobial Activity[#]

Mustafa Ersal^{1,a,*}

¹Department of Biotechnology, Institute of Science and Technology, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>[#]This study was presented as an oral presentation at the 4th International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress (Afyonkarahisar, TARGID 2019)</p> <p><i>Review Article</i></p> <p>Received : 30/06/2019 Accepted : 04/09/2019</p> <p>Keywords: Antimicrobial activity Determination of activity Primary screening Cross-streak method Microbiological diagnosis</p>	<p>Antimicrobial susceptibility testing can be used for prediction of therapeutic results, epidemiology and drug discovery. Microbial infections are an important problem which have developed resistance towards antimicrobial agents. Otherwise, efficacy of these agents is considerable with treatment failures associated with multidrug-resistant bacteria and it has become a global concern to public health. Therefore, explore the new antimicrobial agents and widely use of antimicrobial susceptibility need to be developed. There are many techniques for the determination of antimicrobial activity. Many of these techniques, which are applied to inhibit sensitive microorganisms, are based on diffusion-related methods in the solid or semi-solid production environment. Cross-streak among these techniques is an easy technique that allows for relatively rapid screening of cultures in research for the discovery of the new antibiotics. However, the biggest disadvantage of the Cross-streak test is the difficulty in obtaining quantitative data. Because the edges of the inhibition zone are usually very fuzzy and unclear. Some antimicrobial susceptibility testing techniques were standardized by Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) to determine the striking steps in this area. This testing procedure requires the use of specific test conditions and methods. In addition, the medium, incubation conditions and time are among these requirements. It is important to understand and develop the Cross-streak method from the currently used activity determination methods.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(sp1): 160-162, 2019

Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesinde Cross-Streak Metodu Kullanımı

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Derleme Makale</i></p> <p>Geliş : 30/06/2019 Kabul : 04/09/2019</p> <p>Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite Aktivitenin belirlenmesi Birincil tarama Cross-Streak yöntemi Mikrobiyolojik teşhis</p>	<p>Antimikrobiyal duyarlılık testleri, ilaçların keşfedilmesi, epidemiyoloji ve terapötik sonuçların tahmini için kullanılabilir. Günümüzde mikrobiyal yaşamdaki dirençlilik artış göstermekte olduğu için antimikrobiyal bileşikler etkilerini kaybetmekte ve bu durum onları tehlikeye sokmaktadır. Ayrıca, antimikrobiyal ajanların etkileri, çoklu ilaca dirençli bakterilerle ilişkili tedavilerde başarısızlık göstermektedir. Bu durum, halk sağlığı için küresel bir endişe olma durumuna gelmiştir. Bu yüzden, yeni antimikrobiyal ajanların keşfedilmesi ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yaygın olarak kullanılması ve geliştirilmesi gerekmektedir. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için birçok teknik bulunmaktadır. Duyarlı mikroorganizmaları inhibe etmek amacıyla uygulanan bu tekniklerden çoğu, katı ya da yarı katı üretim ortamındaki difüzyon ile ilişkili metotlara dayalıdır. Bu teknikler arasında Cross-streak ise yeni antibiyotik keşfi için yapılan araştırmalarda kültürlerin nispeten hızlı bir şekilde taranmasını sağlayan kolay bir tekniktir. Fakat Cross-streak testinin en büyük dezavantajı, niceliksel verilerin elde edilmesindeki güçlüğüdür. Çünkü inhibisyon bölgesinin kenarları genellikle çok bulanık ve belirsizdir. Bazı antimikrobiyal duyarlılık test teknikleri, bu alandaki dikkat çekici adımlar belirlenerek Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından standardizasyona tabi tutulmuştur. Bu test prosedürü, spesifik test koşullarının ve metotlarının kullanımına gereksinim duymaktadır. Ayrıca, besiyeri ve inkübasyon koşulları ile zaman bu gereksinimler arasındadır. Hali hazırda kullanılan aktivite belirleme yöntemlerinden Cross-streak yönteminin iyi anlaşılıp geliştirilmesi önem arz etmektedir.</p>

^a ersal.m@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0002-2401-1201>



Giriş

Antimikrobiyal duyarlılık testi; ilaçların keşfedilmesi, epidemiyoloji ve terapötik sonuçların tahmini için kullanılabilir. Golden era (altın çağ) devriminden sonra, hemen hemen bütün önemli antibiyotik grupları (tetrasiklinler, sefalosporinler, amino glikozitler ve makrolitler) keşfedilmiştir. Bu sayede, kemoterapi uygulamalarındaki ana sorunlar 1960larda çözülmeye başlamıştır. Günümüzde tarih kendini tekrarlamaktadır. Mikrobiyal yaşamdaki dirençlilik artış göstermekte olduğu için antimikrobiyal bileşikler etkilerini kaybetmekte ve bu durum onları tehlike sokmaktadır (Mayers ve ark., 2017).

Antimikrobiyal ajanların etkileri, çoklu ilaca dirençli bakterilerle ilişkili tedavilerde başarısızlık göstermektedir. Bu durum, halk sağlığı için küresel bir endişe olma durumuna gelmiştir (Guschin ve ark., 2015; Martin ve ark., 2015). Bu yüzden, yeni antimikrobiyal ajanların keşfedilmesi gerçekten önemli bir konudur. Doğal ürünler bugün bile hala yeni ilaç moleküllerinin ana kaynaklarından birisidir. Bu ürünler hayvan, bitki ve mikroorganizmalar gibi çeşitli organizmalardan türetilmektedir. Özellikle mikrobiyal ve bitkisel ürünler, şimdiye kadar keşfedilmiş antimikrobiyal bileşiklerin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (Bérdy, 2005). Son yıllarda, mikrobiyal dirençlilik ile mücadele için çeşitli kaynaklardan yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi ve araştırılması konusuna olan ilgi giderek artmaktadır (Balouiri ve ark., 2016).

Antimikrobiyal aktivite belirlenmesi için birçok teknik bulunmaktadır. Bunlardan bazıları antimikrobiyal ajanların sıvı kültürde seyreltilmesine dayanmaktadır. Fakat, çoğu teknik duyarlı mikroorganizmaların büyümesini inhibe etmek için katı veya yarı-katı kültür ortamında difüzyon uygulamasına dayanmaktadır (Parente ve ark., 1995; Fleming ve ark., 1975; Çon ve ark., 2001). In vitro koşullarda kullanılan teknikler arasında Cross-streak metodu, mikroorganizmaların antagonistik ilişkilerinin hızlı taranması için kullanılan bir tekniktir (Lertcanawanichakul ve Sawangnop, 2011).

Cross-Streak Tekniği

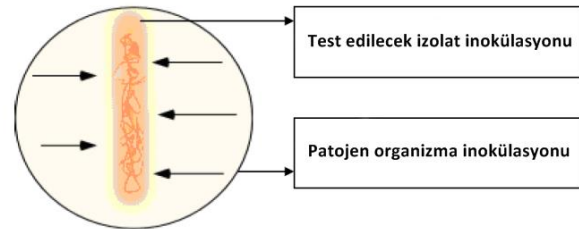
Çoklu ilaca dirençli bakterilerle mücadelede yeni keşfedilecek antimikrobiyal ürünlerin cezbedici özellikleri bulunmaktadır. Yeni ürünlerin keşfedilmesi çevre, tarım ve insan sağlığı uygulamaları için gereklidir. Bu tarz uygulamalarda kullanılan ürünlerin saf ya da ekstrakte formları antimikrobiyal aktivitenin taranmasını ve/veya miktarının belirlenmesini sağlamaktadır. Hali hazırda kullanılan aktivite belirleme yöntemlerinin iyi anlaşılıp geliştirilmesi önem arz etmektedir (Balouiri ve ark., 2016).

Mikrobiyal enfeksiyonlar, mevcut mikrobiyal ajanlara karşı geliştirdikleri direnç sebebiyle önemli bir klinik tehdit haline gelmiştir (Balouiri ve ark., 2016). Bunun yanı sıra, çoklu ilaca dirençlilik artıktıkça, antibiyotik keşfi ve geliştirilmesi düşüş göstermektedir (Fischbach ve ark., 2009; Walsh, 2009). Bu nedenle, çoklu ilaç direncine sahip patojenik bakteri suşları ile mücadele etmek için yeni antibiyotiklerin keşfine ve/veya geliştirilmesine sürekli ve döngüsel olarak bir ihtiyaç vardır (Clardy ve ark., 2006).

Bazı antimikrobiyal duyarlılık test teknikleri, Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ve European

Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından bu alandaki dikkat çekici adımlar belirlenerek standardizasyona tabi tutulması gerekliliğini belirtmiştir. Fakat, doğal ürünlerin testleri yapılırken standardize edilmiş protokollerin bazı modifikasyonları gerekmektedir. Bu nedenle, kültür ortamının seyreltilmesi ve yüksek konsantrasyonlu bir inokulum kullanılarak mikrobiyolojinin temellerinin değiştirilmemesine dikkat edilmelidir. Diğer taraftan, test edilen mikroorganizmanın büyümesinde etkili olabilecek çözümler kullanılmasına dikkat edilir ise, standardize edilmiş protokollerde ufak metodolojik adaptasyonların yapılmasına imkan sağlar. Bu durum, araştırmacıların sonuçları karşılaştırabilmesine ve doğru deneysel yaklaşımlar kazanılmasına olanak sağlar (Balouiri ve ark., 2016). Sonuç olarak, bakteriyel patojene karşı in vitro koşullarda antimikrobiyal duyarlılık testi için uygun metotlar kullanılmak zorundadır (OIE, 2012).

Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde birincil tarama yöntemi olan Cross-streak tekniği, antimikrobiyal aktivitesi belirlenecek olan mikrobiyal örneğin agar plakasının merkezine tek bir hat boyunca çizgi çizilerek inoküle edilerek gerçekleştirilir. İnokülasyon işlemi sonunda petri uygun sıcaklık ve sürede inkübasyona kaldırılır. Test edilecek patojen organizma, inokülüne uygulanan inkübasyon süresi sonrası merkezdeki inokülasyona dik olacak şekilde çizgi çizilerek petriye ekilir. Daha sonra petri tekrar inkübasyona kaldırılır. Mikrobiyal örnek ile test edilen mikroorganizmalar arasındaki antimikrobiyal interaksiyon inkübasyon süresi sonrasında inhibisyon zonlarının mm cinsinden ölçülmesiyle analiz edilir (Balouiri ve ark., 2016). Cross-streak tekniği Şekil 1'de görsel olarak verilmiştir.



Şekil 1 Cross-streak Tekniği.

Figure 1 Cross-streak Method

Cross-streak uygulamasının temelinde, test edilen izolat ile test edilen patojen organizmanın rekabet etme zorunluluğu yatmaktadır. Bu durum sonucu izolat bulunduğu ortamda patojene karşı metabolit üretmeye başlamaktadır. Ürettiği metaboliti öncü olarak kullanmadığı için agarda yeterli miktarda metabolit kalmaktadır. Sonuç olarak, ortamda üretilen bu metabolit sonucunda patojene karşı bir inhibisyon zonu oluşmakta ve antimikrobiyal aktivite test edilmektedir.

Cross-streak tekniği, antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan bir ön tarama yöntemidir. Bu teknik hem hızlı hem de ucuz bir yöntemidir. Çoklu izolat çalışmalarında en aktif izolat ya da izolatların belirlenmesinde çok uygun bir test yöntemidir. Bu sayede çoklu izolat ile yapılan çalışmalarda maliyet ve süre büyük oranda azalmaktadır. Cross-streak tekniğinde kullanılan antimikrobiyal ajanlar hızlı sonuç vermelerine

rağmen yöntem, spesifik ekipmanlar ile daha sonraki denemelerde yeniden kullanılabilirlik ve standardizasyon koşullarına ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca test edilen mikroorganizmalarda görülen hücre hasarı ve canlılık üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Ek olarak, antimikrobiyal duyarlılık testi (AST) metodolojisinin seçiminde; performans kolaylığı, esneklik, otomatik veya yarı otomatik sistemlere adaptasyon, maliyet, tekrarlanabilirlik, güvenilirlik, doğruluk, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) üyelerinin ilgilendiği organizmalar ve antimikrobiyaller ile duyarlılık testine tabi tutulacak organizma aralığı için uygun validasyon verilerinin mevcudiyeti gibi faktörlere dikkat etmek gerekmektedir (OIE, 2012).

Modifiye edilmiş Cross-streak metodu kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, antimikrobiyal aktivite belirlemek için 30 aktinobakteriyel kültür çalışılmıştır. Bunlardan 28 tanesinin, gram-negatif ve gram-pozitif bakteri ile maya gibi çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı aktif bileşikler ürettikleri bulunmuştur (Velho-Pereira ve Kamat, 2011).

Yapılan çalışmada, *Bacillus* türlerinin, Gram (+) ve Gram (-) patojen bakterilere karşı (*Staphylococcus aureus* TISTR 517 ve *Escherichia coli* TISTR 887) antagonistik etkisinin Cross-streak ve agar-well difüzyon metodları karşılaştırılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Kullanılan Cross-streak metodu sonuçları ile agar-well difüzyon metodu sonuçları karşılaştırıldığında, Cross-streak metodu ile daha yüksek inhibisyon sonuçları elde edildiği belirlenmiştir. (Lertcanawanichakul ve Sawangnop, 2011).

Sonuç

Özetle, antimikrobiyal aktivite araştırmasında Cross-streak yöntemi pratik ve uygun bir tekniktir. Çeşitli organizmalar tarafından üretilen antimikrobiyal bileşikler, patojen mikroorganizmaların büyümesini kontrol etmek için büyük bir potansiyele sahiptir (Mazza, 1994; Adami ve Cavazzoni, 1993; Kumprecht ve Zobac, 1996; Hyronimus ve ark., 2000; Choopan ve ark., 2011).

Kaynaklar

Adami A, Cavazzoni V. 1993. Biomass production, preservation and characteristics of a strain of *Bacillus coagulans* usable as probiotic. *MAN Microbiologie, aliments, nutrition*, 11(1): 93-100.

Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*. 6(2): 71-79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005

Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*. 6(2): 71-79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005

Bérdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*. 58(1): 1-26. DOI: 10.1038/ja.2005.1

Choopan A, Nakbud K, Dawveerakul K, Chawawisit K, Lertcanawanichakul M. 2008. Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity of *Brevibacillus laterosporus* strain SA14. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*. 5(1): 47-56. DOI: 10.2004/wjst.v5i1.112

Clardy J, Fischbach MA, Walsh CT. 2006. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature biotechnology*. 24(12), 1541. DOI: 10.1038/nbt1266

Çon AH, Gökalp HY, Kaya M. 2001. Antagonistic effect on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua* of a bacteriocin-like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. *Meat Science*. 59(4): 437-441. DOI: 10.1016/S0309-1740(01)00099-7

Fischbach MA, Walsh CT. 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*. 325(5944): 1089-1093. DOI: 10.1126/science.1176667

Fleming HP, Etchells JL, Costilow RN. 1975. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Applied Microbiology*, 30(6): 1040-1042.

Guschin A, Ryzhikh P, Rummyantseva T, Gomberg M, Unemo M. 2015. Treatment efficacy, treatment failures and selection of macrolide resistance in patients with high load of *Mycoplasma genitalium* during treatment of male urethritis with josamycin. *BMC infectious diseases*. 15(1): 40. DOI: 10.1186/s12879-015-0781-7

Hyronimus B, Le Marrec C, Sassi AH, Deschamps A. 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*. 61(2-3): 193-197. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00366-4

Lertcanawanichakul M, Sawangnop S. 2008. A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*. 5(2): 161-171. DOI: 10.2004/wjst.v5i2.86

Martin I, Sawatzky P, Liu G, Mulvey MR. 2015. STIs and sexual health awareness month: Antimicrobial resistance to *Neisseria gonorrhoeae* in Canada: 2009-2013. *Canada Communicable Disease Report*. 41(2): 35. DOI: 10.14745/ccdr.v41i02a04

Mayers DL, Sobel JD, Ouellette M, Kaye KS, Marchaim D. 2017. *Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects* (Vol. 2). Springer. DOI: 10.1007/978-3-319-47266-9

Mazza P. 1994. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. *Bollettino chimico farmaceutico*, 133(1): 3-18.

OIE. 2012. *Laboratory Methodologies For Bacterial Antimicrobial Susceptibility Testing, Guideline 2.1, Terrestrial Manual*. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/GUIDE_2.1_ANTIMICROBIAL.pdf

Parente E, Brienza C, Moles M, Ricciardi A. 1995. A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *Journal of microbiological methods*. 22(1): 95-108. DOI: 10.1016/0167-7012(94)00068-I

Velho-Pereira S, Kamat NM. 2011. Antimicrobial screening of actinobacteria using a modified Cross-streak method. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 73(2): 223. DOI: 10.4103/0250-474X.91566