

***Klebsiella* spp.'ye Karşı Bazı Antibiyotiklerin Aktivitelerinin Box-Behnken Modeli Kullanılarak İstatistiksel Optimizasyonu**

Hatice Aysun MERCİMEK TAKCI^{1*}, Pemra BAKIRHAN², Hüseyin KAYRAN³, Kardelen BÜLBÜL⁴

^{1,3}Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kilis, Türkiye

²Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Kilis, Türkiye

⁴Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi Çiftlikköy Kampüsü 33343 Yenişehir, Mersin

Geliş Tarihi: 23.01.2020

Kabul Tarihi: 29.05.2020

*Sorumlu Yazar: mersimek@hotmail.com

Öz

Eritromisin (15 µg/disk), kloramfenikol (30 µg/disk), streptomisin (10 µg/disk) ve tetrasiklin (30 µg/disk) standart antibiyotiklerinin *Klebsiella* spp.'ye karşı antibakteriyel aktivitelerinin artırılması için inkübasyon sıcaklığı (25-49°C), besiyeri başlangıç pH'sı (5-10) ve inkübasyon süresi (6-24 saat) bağımsız değişkenlerinin etkisi Box Behnken deney tasarım modeli kullanılarak optimize edilmiştir. Antibakteriyel aktiviteler Kirby-Bauer disk difüzyon metoduna göre analiz edilmiştir. Eritromisin ve streptomisin standart antibiyotikleri için, inkübasyon sıcaklığı, pH ve inkübasyon süresi değişkenleri ile ajanların etki mekanizmaları arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur. İnkübasyon sıcaklığının 25°C'den 49°C'ye; besiyeri pH'sının 5'den 10'a ve inkübasyon süresinin 6 saatten 24 saate artışının suş üzerindeki antibakteriyel aktivitenin artmasına sebep olduğu saptanmıştır. Eritromisin için en yüksek aktivite 22.50 mm inhibisyon zonu çapı ile 49°C; pH 7.5 ve 6 saat; 25°C; pH 10.00 ve 15 saatte belirlenmiştir. Streptomisin için ise 25°C; pH 10.00 ve 15 saatte en yüksek inhibisyon zonu 27.00 mm olarak kaydedilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre, eritromisin ve streptomisin aktivitelerinin artırılmasında model istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p < 0.05$), kloramfenikol ve tetrasiklin antibiyotikleri için istatistiksel açıdan anlamsız ($p > 0.05$) bulunmuştur. Streptomisin aktivitesi üzerinde inkübasyon sıcaklığının etkisi, eritromisin üzerinde ise inkübasyon süresinin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Her iki antibiyotüğün aktivitesi üzerinde inkübasyon sıcaklığı ve pH faktörlerinin etkileşimlerinin önemli olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yüzey yanıt metodu, *Klebsiella* spp., antibiyotikler.

Statistical Optimization of Activities of Some Antibiotics to *Klebsiella* spp. by Using Box-Behnken Design

Abstract

Effects of incubation temperature (25-49°C), initiation pH of media (5-10) and incubation time (6-24 h) independent variables for enhancing antibacterial activities of erythromycin (15 µg/disc), chloramphenicol (30 µg/disc), streptomycin (10 µg/disc) and tetracycline (30 µg/disc) standard antibiotics on *Klebsiella* spp. were optimized by using Box Behnken design model. Antibacterial analyses were performed by Kirby-Bauer disc diffusion method. A positive correlation was found between antibacterial activity and tested independent variables for erythromycin and streptomycin antibiotics. The increases of incubation temperature, pH and incubation time in the analyzed model were caused to the increase in antibacterial activity against *Klebsiella* spp. The highest activity for erythromycin was 22.50 mm. This activity was observed in two different optimization testing (at 49°C; pH 7.5 and 6 h; 25°C; pH 10.00 and 15 h). The highest activity (27.00 mm) for streptomycin was recorded at 25°C; pH 10.00 and 15 h. According to variance analyses, this model was statistically significant in enhancing activities of erythromycin and streptomycin ($p < 0.05$), but statistically insignificant for chloramphenicol and tetracycline. The effect of incubation temperature on streptomycin activity and incubation time on erythromycin activity was statistically significant found ($p > 0.05$). The interactions of incubation temperature and pH factors on activity of both antibiotics were detected to be statistically significant.

Keywords: Response surface method, *Klebsiella* spp., Antibiotics.

¹<https://orcid.org/0000-0002-5394-4959>

²<https://orcid.org/0000-0003-4172-0648>

³<https://orcid.org/0000-0002-9344-0296>

⁴<https://orcid.org/0000-0001-5650-5604>

1. Giriş

Antibiyotikler, bakterilerin neden olduğu enfeksiyon hastalıklarına karşı savaşta kritik öneme sahip ilaçlardır (Odonkor ve Addo, 2011). Bu hastalıkları tedavi etmek için antibiyotiklerin 70 yılı aşkın kullanımı ve enfeksiyonların prevalansındaki dramatik artış patojenlerin çoklu ve genişlemiş ilaç direncine neden olmaktadır (Navon-Venezia ve ark., 2017). Bununla birlikte, antibiyotik ilaç terapisine karşı direnç gösteren hastalık sebebi bakteriler gün geçtikçe artan sağlık problemlerine neden olmaktadır. Yara enfeksiyonu, bel soğukluğu, verem, zatürre, septisemi ve çocuklarda görülen kulak hastalıkları antibiyotiklerle tedavi edilmesi oldukça zorlaşan hastalıklarından sadece bir kaçıdır (Odonkor ve Addo, 2011). Antibiyotik dirençliliği bir mültifaktöriyel kompleks prostestir (Navon-Venezia ve ark., 2017). Bir taraftan yeni ilaç geliştirilme çalışmaları sürerken, diğer taraftan bu ilaçlara karşı bakterilerin hızlıca direnç göstermesi antibiyotiklerle tedaviyi zorlaştırmaktadır. Antibiyotiklere karşı direnç mekanizmasının başlıca 4 tipi söz konusudur: 1. Doğal direnç, 2. Geliştirilmiş direnç, 3. Çapraz direnç, 4. Çoklu ilaç direnci ve kolistin (polimiksin E) direnci (Cesur ve Demiröz, 2013).

Dış membran yapısının ve periplazmik beta-laktamazlar gibi savunma mekanizmalarının varlığından dolayı Gram-negatif bakteriler Gram-pozitiflere göre antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençlidir. Antibiyotik dirençli Gram-negatif bakterilerce gelişen enfeksiyonlar, yüksek ölüm oranları, uzayan hastane tedavisi ve fiyatları ile ilişkilendirilmektedir. *Enterobacteriaceae* ailesine ait Gram-negatif bakteriler normal intestinal floranın üyesi ve ayrıca klinik pratiklerde en çok karşılaşılan patojenler arasındadır (Ruh ve ark., 2016). Gram-negatif bakteriler arasında hastane enfeksiyonlarının en önemli sebeplerinden biri *Klebsiella* spp. suşlarıdır. Basil şekilli, aerobik ve fakültatif anaerobik, hareketsiz, nitrat pozitif ve mukoid koloni gösteren bu suşlar, idrar yolu enfeksiyonları, zatürre, septisemi, yara ve kan dolaşımı gibi en genel hastane enfeksiyonlarının sebebidir (Babakhani ve ark., 2015; Khaertynov ve ark., 2018).

Bu çalışmada, protein sentezinde etkili eritromisin (15 µg/disk), kloramfenikol (30 µg/disk), streptomisin (10 µg/disk) ve tetrasiklin (30 µg/disk) standart antibiyotiklerinin Kilis ili Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Biriminden temin edilen klinik izolat *Klebsiella* spp. suşuna karşı gösterdiği antibakteriyel aktivite üzerinde sıcaklık, zaman ve pH parametrelerinin etkileri yanıt yüzey metodolojisinin Box Behnken deney tasarım modeli kullanılarak optimize edilmiştir.

2. Materyal ve Metot

Kilis ili Devlet Hastanesine muayene için gelen hastanın idrarından örnek alınıp Eosin Metylen Blue (EMB) agardaki koloni morfolojisine göre tiplendirilen *Klebsiella* spp. suşunun

laboratuvarımızda Gr boyanma, indol, metil kırmızısı, Voges Proskauer ve sitrat testlerindeki davranışlarına göre tanımlanması yapılmıştır.

Yüzey yanıt metodolojisinin Box Behnken deney tasarım modeli kullanılarak *Klebsiella* spp. suşunun antibiyotik direnç/hassasiyet genlerinin ekspresyonu üzerinde sıcaklık, pH ve zaman parametrelerinin etkileri incelenmiştir. Bu modele göre belirtilen pH aralıklarında hazırlanan Luria-Bertani (LB) broth besiyerlerinde, Tablo 1’de verilen sıcaklık ve zaman koşullarında geliştirilen kültürlerin yoğunluğu fizyolojik tuzlu su (%0.9 NaCl) ile 0.5 MacFarland standart bulanıklığına göre ayarlanmıştır.

Standart bulanıklığa ayarlanan *Klebsiella* spp. suşu steril eküvyon çubukları ile Mueller Hinton Agar (MHA) besi yerine inoküle edilmiştir. Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibakteriyel analizler sürdürülmüştür. Besiyerine inokülasyonu takiben eritromisin (15 µg/disk), kloramfenikol (30 µg/disk), streptomisin (10 µg/disk) ve tetrasiklin (30 µg/disk) antibiyotik diskleri eşit aralıklarla yerleştirilmiştir. İnkübasyon süresini takiben disklerin etrafında bakterilerin üremediği şeffaf zonların varlığı incelenmiştir.

Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) tarafından ifade edilen hassasiyet/direnç zon çaplarına göre kullanılan antibiyotiklerin söz konusu klinik izolat üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Tüm antibakteriyel analizler üç tekrarlı yürütülmüştür.

Box-Behnken deney modeli, 2 seviyeli 3 faktöriyellik tasarımda tüm değişkenlerin (X1, X2 ve X3) orta değerlerinin alındığı merkez noktada toplamda 14 adet deney noktası içermektedir. 3 adet bağımsız (sıcaklık, pH ve inkübasyon süresi) değişkenin belirlendiği modelde tüm analizler 3 tekrarlı yürütülmüştür (Tablo 1).

Tablo 1. Antimikrobiyal çalışmada incelenen parametrelerin seviye değerleri

Seviye No	Sıcaklık (°C)	pH	Zaman (saat)
-1	25	5.00	6.00
0	37	7.50	15.00
1	49	10.00	24.00

Tablo 2’de verilen deney planına göre üç bağımsız değişkenin incelendiği 2 dereceden yanıt yüzey modelinde polinomal denklem kullanılarak her bir faktör değerlendirilmiştir. Modele ilişkin eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^N \beta_i \times X_i + \sum_{i=1}^N \beta_{ii} \times X_i^2 + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \beta_{ij} \times X_{ij}$$

Buna göre Y sistemin cevabı, N değişken sayısı (N=3), X_i ve X_{ij} bağımsız değişken, β_0 , β_i , β_{ii} ve β_{ij} sabit ve modelin regresyon katsayısını ifade etmektedir. Veri analizleri için “Design Expert statistical software” (Design Expert 8.0.7) kullanılmıştır. Modelin uyumluluğu kuadratik model varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir.

Tablo 2. Üç bağımsız değişken için Box-Behnken deneme planı, 3 merkez noktalı (4, 11 ve 13) 14 deney

Deney No	X_1 (SICAKLIK)	X_2 (pH)	X_3 (inkübasyon süresi)
1	-1	1	0
2	1	0	-1
3	1	-1	0
4	0	0	0
5	0	1	1
6	0	-1	-1
7	0	-1	1
8	-1	0	-1
9	1	0	1
10	0	1	-1
11	0	0	0
12	-1	0	1
13	0	0	0
14	-1	1	0

3. Bulgular ve Tartışma

Farklı etki mekanizmalarına sahip eritromisin (15 μ g/disk), kloramfenikol (30 μ g/disk), streptomisin (10 μ g/disk) ve tetrasiklin (30 μ g/disk) standart antibiyotikleri bakterilerde protein sentezini inhibe ederek doza bağımlı statik/sidal etki göstermektedir. Box Behnken deneme planı ile elde edilen *Klebsiella* spp. suşunun eritromisin ve streptomisine karşı gösterdiği dirençlilik/hassasiyete yönelik deneysel değerler ve tahmin edilen değerler Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. *Klebsiella* spp. suşunun eritromisin ve streptomisine karşı gösterdiği dirençlilik/hassasiyetin deneysel ve tahmin edilen değerleri

Deneme no	Sıcaklık (°C)	pH	İnkübasyon süresi (saat)	Dirençlilik/Hassasiyet Zon çapı (mm)			
				Eritromisin		Streptomisin	
				Deneysel	Tahmin Edilen	Deneysel	Tahmin Edilen
1	49.00	7.50	6.00	22.50	20.64	27.00	26.86
2	37.00	7.50	15.00	11.00	11.02	21.50	21.63
3	25.00	10.00	15.00	22.50	22.71	22.50	22.71
4	37.00	7.50	15.00	17.50	16.33	20.00	19.33
5	37.00	10.00	6.00	18.00	18.23	21.00	20.99
6	37.00	5.00	24.00	12.50	12.27	18.50	18.51
7	49.00	7.50	24.00	17.50	17.52	20.00	20.13
8	49.00	5.00	15.00	10.00	10.23	18.00	17.99
9	37.00	5.00	6.00	18.50	18.27	24.50	24.51
10	25.00	7.50	6.00	12.50	12.48	19.00	18.87
11	25.00	10.00	15.00	15.50	16.33	20.00	19.33
12	37.00	10.00	24.00	14.00	13.98	19.00	18.87
13	25.00	7.50	24.00	16.00	16.33	18.00	19.33
14	37.00	7.50	15.00	19.00	20.64	21.00	22.64

Antibiyotik dirençlilik/hassasiyetine yönelik üç bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi ortaya koyan regresyon denklemi aşağıda gibi hesaplanmıştır.

$$Y_{eritromisin} = +16.33 + 1.27X_1 + 0.23X_2 + 0.275X_3 - 9.51X_1 * X_2 + 0.88X_1 * X_3 + 0.12X_2 * X_3 - 2.96X_1^2 - 1.21X_2^2$$

$$Y_{streptomisin} = +19.33 + 2.32X_1 + 0.30X_2 + 0.94X_3 - 3.80X_1 * X_2 + 0.50X_1 * X_3 + 0.12X_2 * X_3 + 1.42X_1^2 + 0.29X_2^2$$

Eritromisin ve streptomisin antibiyotiklerin etki mekanizmaları üzerinde etkisi incelenen bağımsız değişkenlerine yönelik regresyon eşitlikleri incelendiğinde, her iki standart antibiyotik için β_i , β_{ii} ve β_{ij} katsayılarının pozitif değerlere sahip olması, inkübasyon sıcaklığı, pH ve inkübasyon süresinin değişkenleri ile antibiyotiklerin etki mekanizmaları arasında pozitif bir korelasyon olduğu gözlenmektedir. İnkübasyon sıcaklığın 25°C'den 49°C'ye; besiyeri pH'sının 5'den 10'a ve inkübasyon süresinin 6 saatten 24 saate artışının standartların aktivitelerinin artmasına sebep olmaktadır. β_i katsayısı değerlerinin +1.27 ve 2.32 olması, her iki standartın test suşuna karşı aktivitesini etkileyen en önemli bağımsız değişkenin inkübasyon sıcaklığı olduğunu göstermektedir.

Regresyon sonucu elde edilen ikinci dereceden polinomial modelin uyumluluğu korelasyon katsayısı (R^2) ile test edilmiş olup; hesaplanan korelasyon katsayısı (R^2), eritromisin için 0.9565; streptomisin için ise 0.9071 olması söz konusu modelin, deneysel verileri ile tahmin edilen verilerin tutarlı olduğunu göstermektedir.

Tablo 4. Eritromisin test suşuna karşı aktivite varyans analiz sonucu

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kare ortalaması	F-değeri	P-değeri
Model	8	188.78	23.60	13.76	<0.0052
X₁	1	9.00	9.00	5.25	0.0706
X₂	1	0.30	0.30	0.18	0.6923
X₃	1	60.50	60.50	35.27	<0.0019
X₁X₂	1	76.00	76.00	44.30	<0.0012
X₁X₃	1	3.06	3.06	1.79	0.2391
X₂X₃	1	0.063	0.063	0.036	0.8561
X₁²	1	15.00	15.00	8.75	0.0316
X₂²	1	2.50	2.50	1.46	0.2811
X₃²	0	0.000			
Kalıntı	5	8.58	1.72		
Uyum eksikliği	2	0.29	0.14	0.052	0.9505
Net hata	3	8.29	2.76		

Tablo 4 ve 5'te test edilen her bir bağımsız değişkenin eritromisin ve streptomisin aktivitesi üzerindeki etkisi ANOVA varyans analizi ile belirlenmiş olup, her bir katsayının önemini gösteren P ve F değerleri verilmiştir.

Tablo 5. Streptomisin test suşuna karşı aktivite varyans analiz sonucu

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kare ortalaması	F-değeri	P-değeri
Model	8	86.82	10.85	6.10	<0.0310
X₁	1	30.18	30.18	16.97	<0.0092
X₂	1	0.52	0.52	0.29	0.6133
X₃	1	7.03	7.03	3.95	0.1035
X₁X₂	1	12.11	12.11	6.81	<0.0477
X₁X₃	1	1.00	1.00	0.56	0.4872
X₂X₃	1	0.062	0.062	0.035	0.8587
X₁²	1	3.44	3.44	1.93	0.2230
X₂²	1	0.15	0.15	0.082	0.7861
X₃²	0	0.000			
Kalıntı	5	8.89	1.78		
Uyum eksikliği	2	0.10	0.051	0.018	0.9827
Net hata	3	8.79	2.93		

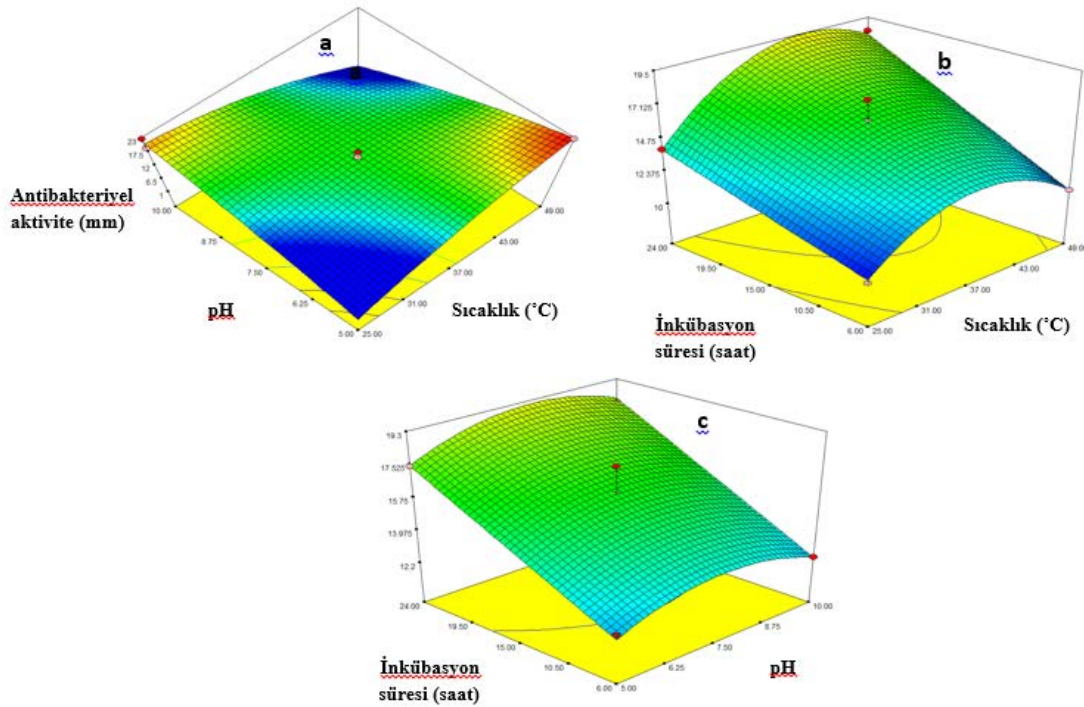
Antibakteriyel analizler için test edilen modelin P değerinin ($\text{prob}>f$) 0.05'ten küçük olması (0.0052) önerilen modelin, bağımsız değişkenler ile eritromisin aktivitesi arasındaki ilişkinin incelenmesi için istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir. Tablo 4'te P değerlerine bakıldığında, X₃ faktörünün yani inkübasyon süresinin eritromisin aktivitesi üzerinde etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır.

Antibakteriyel analizler için test edilen modelin P değerinin ($\text{prob}>f$) 0.05'ten küçük olması (0.0310) önerilen modelin, bağımsız değişkenler ile streptomisin aktivitesi arasındaki ilişkinin incelenmesi için istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. Tablo 5'te P değerlerine bakıldığında, X_1 faktörünün yani inkübasyon sıcaklığının streptomisin aktivitesi üzerinde etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır.

Bağımsız değişkenlerin etkileşimleri incelendiğinde, inkübasyon sıcaklığı ve pH faktörlerinin eritromisin ve streptomisin aktivitesi üzerindeki etkisinin önemli olduğu Tablo 4 ve 5'te gözlenmektedir ($p<0.05$). Regresyon eşitliklerine bakıldığında bu iki bağımsız değişkenin negatif bir korelasyon ile etkileşim gösterdiği saptanmaktadır.

Kloramfenikol ve tetrasiklin antibiyotikleri için model sonuçları değerlendirildiğinde, korelasyon katsayısı (R^2) kloramfenikol için 0.7274; tetrasiklin için ise 0.8417'dir. Varyans analiz sonuçlarına göre her iki antibiyotik için modelin P değeri ($\text{prob}>f$) 0.05'ten büyüktür. Buna göre veriler istatistiksel olarak anlamsızdır. Antibiyotiklerin suş üzerindeki aktiviteleri ve test edilen bağımsız değişkenler arasında herhangi bir etkileşim söz konusu değildir.

Eritromisin antibiyotiğinin *Klebsiella spp.*'ye karşı gösterdiği antibakteriyel aktivite için çizdirilen üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Eritromisin aktivitesi analizinin yüzey yanıt grafiği

a) Sabit inkübasyon süresinde (15.00); pH ve inkübasyon sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)

b) Sabit pH aralığında (7.50); inkübasyon süresi (saat) ve inkübasyon sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)

c) Sabit inkübasyon sıcaklığında (37°C); inkübasyon süresi (saat) ve pH

Sabit inkübasyon süresinde (15.00 saat), pH ve inkübasyon sıcaklığı (°C) bağımsız değişkenlerinin etkisi incelendiğinde, pH 5.0'da sıcaklığın 25°C'den 49°C'ye yükselmesi eritromisin aktivitesini 1.15 mm zon çapından 22.71 mm'ye yükselttiği hesaplanmıştır. Ancak pH 10.00 iken, sıcaklık artışının aktiviteyi 20.64 mm'den 4.15 mm zon çapına kadar azalttığı belirlenmiştir. Optimizasyon besiyerinin başlangıç pH'sı ve inkübasyon sıcaklığındaki birlikte artış antibakteriyel aktivitenin azalmasına sebep olmaktadır. Bu etkileşim sonuçları regresyon denklemindeki negatif korelasyon sonucunu desteklemektedir.

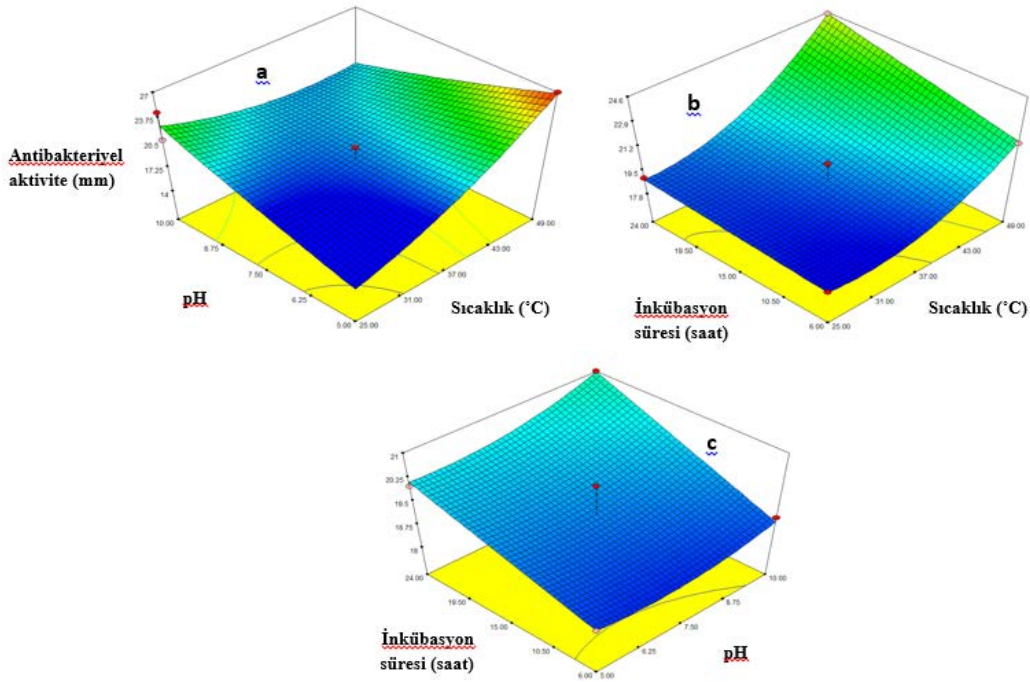
Şekil 1.b'de sabit pH (7.50) aralığında inkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığının eritromisin aktivitesine etkileri incelendiği model grafiğinde inkübasyon sıcaklığı ve süresinin artmasına bağlı olarak *Klebsiella* spp.'ye karşı antibakteriyel aktivitenin arttığı gözlenmektedir. Sabit inkübasyon sıcaklığında ise (37°C) besiyerinin pH'sı arttıkça antibakteriyel aktivitenin de arttığı belirlenmiştir (Şekil 1.c). Yüzey yanıt grafiğine göre mm cinsinden eritromisin için belirlenen en yüksek antibakteriyel aktivite 22.50 mm inhibisyon zon çapı ile 15 saatlik sabit inkübasyon süresinde 25°C, pH 10 ve 49°C, pH 5.0 optimizasyon koşullarında rastlanmıştır. En düşük antibakteriyel aktivite ise 25°C, pH 7.50 ve 6 saatlik inkübasyon süresinde 10 mm inhibisyon zon çapı olarak belirlenmiştir.

Tablo 6. *Enterobacteriaceae* için EUCAST referans değerleri

	Duyarlılık (S)	Orta dirençli (I)	Dirençlilik (R)
Eritromisin (15 µg/disk)	≥23	14-22	≤13
Kloramfenikol (30 µg/disk)	≥18	13-17	≤12
Streptomisin (10 µg/disk)	≥15	12-14	≤11
Tetrasiklin (30 µg/disk)	≥15	12-14	≤11

Yanıt yüzey grafiklerinden elde edilen veriler Tablo 6'daki EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) sınır değerlerine göre yorumlanmıştır. 6 saatlik sabit inkübasyon süresinde sıcaklık ve pH etkileşimine bağlı olarak 25°C'lik inkübasyon sıcaklığı ve besiyeri pH'sı 7.50 iken belirlenen dirençlilik (12.50 mm), sıcaklık 49°C'ye, pH ise 10.00'a arttıkça azalmış ve hassasiyetin başladığı gözlenmiştir. Bu optimizasyon koşullarında inhibisyon zon çapı 22.50 mm'ye kadar artmıştır. 37°C sabit inkübasyon sıcaklığında ise, pH ve inkübasyon süresinin etkileşimine bağlı olarak pH 7.50 ve inkübasyon süresi 15 saat iken en düşük inhibisyon zonu 11 mm olup dirençlilik olarak ifade edilmektedir. Tablo 3'te 37°C sabit inkübasyon sıcaklığındaki deneysel veriler incelendiğinde, inhibisyon zon çaplarının 11 ile 19 mm arasında değiştiği, dirençliliğin koşullara bağlı olarak azaldığı ve orta direncin olduğu belirlenmiştir.

Streptomisin antibiyotiklerinin *Klebsiella* spp.'ye karşı gösterdiği antibakteriyel aktivite için çizdirilen üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. Streptomisin aktivitesi analizinin yüzey yanıt grafiği

- a) Sabit inkübasyon süresinde (15.00); pH ve inkübasyon sıcaklığı (°C)
 b) Sabit pH aralığında (7.50); inkübasyon süresi (saat) ve inkübasyon sıcaklığı (°C)
 c) Sabit inkübasyon sıcaklığında (37°C); inkübasyon süresi (saat) ve pH

Şekil 2.a'ya bakıldığında sabit inkübasyon süresinde (15.00 saat), pH ve inkübasyon sıcaklığı (°C) bağımsız değişkenlerinin etkisi incelendiğinde, pH 5'te sıcaklığın 25°C'den 49°C'ye artışı streptomisin aktivitesini 14.61'den 26.86 mm zon çapına kadar arttırdığı hesaplanmıştır. EUCAST sınır değerlerine göre *Klebsiella* spp.'nin streptomisine karşı gösterdiği orta direncin hassasiyete değiştiği ve streptomisin aktivitesinin arttığı saptanmıştır. Fakat besiyeri pH'sı 10.00 iken sıcaklıktaki artışın inhibisyonu 22.82 mm'den 19.86 mm zon çapına kadar azalttığı ortaya konmuştur. Streptomisin antibiyotiğine karşı hassasiyetin devam etmesine karşın inhibisyon zon çapının azaldığı gözlenmektedir. *Klebsiella* spp.'nin streptomisine karşı dirençlilik gösterdiği herhangi bir deneme planı koşuluna rastlanmamıştır. Tüm deneme planlarında hassasiyetlik belirlenmiş olup, en yüksek antibakteriyel aktiviteye 27 mm inhibisyon zon çapı besiyerinin pH'sı 7.50 iken 49°C'de 6 saatlik inkübasyon süresinde rastlanmıştır. Aynı koşullarda inkübasyon süresinin 24 saatte artışı inhibisyon çapının 27 mm'den 20.00 mm'ye kadar azaldığını göstermektedir.

Sabit inkübasyon süresi (15.00 saat) ve pH (7.50)'da eritromisin antibakteriyel aktivitesinin 25°C'de 12.17 mm; 37°C'de 16.33 mm; 49°C'de ise 14.64 mm olduğu belirlenmiştir. Eritromisine karşı düşük sıcaklıkta gözlenen direncin, sıcaklık yükseldikçe azaldığı belirlenmiştir. Sabit inkübasyon sıcaklığı (37°C) ve pH (7.50)'da 6 saatlik inkübasyon süresinde aktivite 13.58 mm'dir. İnkübasyon süresi arttıkça inhibisyon zonunun da arttığı tespit edilmiştir (15. saatte 16.33 mm; 24 saatte ise 19.08 mm). İnkübasyon süresindeki artış suşun antibiyotiğe karşı gösterdiği direnci azaltarak orta direnç göstermesine neden olmuştur. Sabit inkübasyon sıcaklığı (37°C) ve süresinde

(15 saat) pH'nın artışının aktivite üzerinde etkisi incelenmiştir. pH 5.0'da inhibisyon zonu 14.90 mm; pH 7.5'da 16.33 mm; pH 10.00'da 15.36 mm olarak kaydedilmiştir. İnkübasyon süresinin artışının antibiyotiğe maruz kalma süresine bağlı olarak suş üzerindeki antibakteriyel aktivitenin artmasına; pH'nın ise bakteri gelişimine etki ederek antibiyotiğe karşı direncin azalmasına sebep olduğu söylenebilmektedir.

Streptomisin için ise sabit inkübasyon süresi (15.00 saat) ve pH (7.50)'da sıcaklık arttıkça sırasıyla 18.42; 19.00 ve 23.07 mm inhibitör aktivite gözlenmiştir. Bu optimizasyon koşullarındaki inkübasyon sıcaklığı artışı, eritromisin antibiyotiğine oranla streptomisinin suş üzerindeki aktivitesine daha yüksek oranda etki göstermiştir. Sabit inkübasyon sıcaklığı (37°C) ve pH (7.50)'da inkübasyon süresinin 6 saatten 24 saate artışı inhibisyon zon çapını 18.39 mm'den 20.27 mm'ye arttırmıştır. Sabit inkübasyon sıcaklığı (37°C) ve süresinde (15 saat) pH'nın 5.0'dan 10.00'a artışı streptomisin aktivitesini 19.32-19.93 mm aralığında sınırlı kılmıştır.

Antibiyotiklerin aktiviteleri üzerinde farklı değişkenlerin etkisi pek çok çalışma tarafından rapor edilmiştir. De silva ve ark. (2018) inkübasyon sıcaklığın (28-37°C) bakterilerin antibiyotik dirençliliği üzerindeki etkisini incelemişlerdir. İnkübasyon sıcaklığındaki (28°C) farklılığın trimetoprim-sülfametoksazol karşı duyarlılığı arttırırken, aztreonama karşı ise azalttığını bildirmişlerdir. Bu çalışma sıcaklık parametresinin farklı antibiyotiklerin etki mekanizmaları üzerinde farklılıklar gösterebileceğine yönelik sonuçlarımızı desteklemektedir. Lin ve ark. (2017) antibiyotik dirençliliğinin temel rezervi olan çeşitli hayvan gübrelerini farklı sıcaklıkta inkübe ederek, sülfonamid dirençliliği üzerinde sıcaklığın etkisini incelemiştir. Domuz gübresinde sıcaklığın artışı (minimum 60°C) sülfonamid antibiyotiklerinin miktarında azalma, tavuk gübresinde ise 30°C'de yüksek oranda degradasyon gözlenmiştir. Farklı sıcaklık (10, 35 ve 55°C) ve başlangıç pH (5, 7, 9 ve 12)'lerinde gübrede antibiyotik dirençlilik genlerinin ekspresyon seviyesi araştırılmıştır. pH değişimi olmaksızın 55°C sıcaklıkta ve çevre sıcaklığında pH'nın 12'ye artışının ekspresyon seviyesinde azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir (Li ve ark., 2020).

Macfadden ve ark. (2018) *Klebsiella* spp.'ye karşı 20 farklı antibiyotiğin etkisini inceledikleri çalışmada, sonuçlarımızdan farklı olarak lokal sıcaklıktaki artışın antibiyotiklere karşı gözlenen dirençlilikte %2.2 ($p<0.0001$) artışa sebep olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer bir çalışmada, çevre sıcaklığındaki 10°C'lik bir artışla *K. pneumoniae* suşunun 3. kuşak sefalosporinlere karşı dirençliliğinde yılda %0.9 artış kaydedilmiştir ($p<0.01$) (McGough ve ark., 2018). *P.aeruginosa*'nın imipenem, meropenem ve biapeneme karşı dirençlilik gen bölgesi (PAO1) ekspresyon seviyesi üzerinde sıcaklık etkisi incelenmiştir (Wang ve ark., 2016). PAO1 gen bölgesinde dirençlilikten sorumlu genlerin 21°C'de 37°C'den daha yüksek ekspre edildiği ifade edilmiştir.

Farklı fiziksel ve kimyasal uyaranlara karşı meydana gelen mikrobiyal cevap metabolizma, gen ekspresyonu, dış membran yapısı, kemotaksis ve diğer genel adaptif cevaplarda varyasyonlara neden

olmaktadır. Bu sebeple, mikrobiyal cevap ve test edilen antibiyotiğin yapısına bağlı olarak antibiyotik dirençlilik üzerinde etkili parametrelere ilişkin farklı sonuçlar gözlenmektedir..

Bakterilerin çeşitli antibiyotiklere karşı intrinsik direncinin mekanizmalarından biri hücrel geçirimsizliktir. Bu geçirimsiz bariyeri azaltan kimyasal ajanlar çoğu antibiyotiğe karşı bakteriyel duyarlılığın artırılmasında önemli bir role sahiptir. Eritromisin ve streptomisin gibi antibiyotiklerin gram negatif bakterilerin dış membranına penetrasyonu oldukça zayıftır ve sonuç olarak bakteriler antibiyotiklere karşı yüksek seviyede dirençlilik göstermektedir (Saha ve ark., 2008). Bu sebeple çalışmamızda istatistiksel optimizasyon metodu kullanılarak antibiyotiklerin *Klebsiella* spp.'ye karşı gösterdiği antibakteriyel aktivitenin bağımsız değişkenler ile artırılması hedeflenmiştir.

4. Sonuçlar ve Öneriler

Literatürde *Klebsiella* spp.'ye karşı etkili standart antibiyotiklerin aktivitelerinin artırılmasına ilişkin istatistiksel bir optimizasyon çalışması yer almamaktadır. Varyans analizi sonuçları değerlendirildiğinde, eritromisin ve streptomisin antibiyotiği için inkübasyon sıcaklığı, pH ve inkübasyon süresi bağımsız değişkenlerinin incelendiği model istatistiksel olarak anlamlı bulunurken; kloramfenikol ve tetrasiklin antibiyotikler için uygulanabilir bulunmamıştır. Antibiyotiklerin aktivitelerinin artırılması için farklı bağımsız değişkenler test edilmelidir. Elde edilen test sonuçlarının *in vivo* uygulanabilirliği de araştırılmalıdır.

Kaynaklar

- Babakhani, S., Shokri, S. and Baharvand M., (2015). Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* isolated from nosocomial infections in Aleshtar hospital, Lorestan province. Report of Health Care, 1(2), 55-59.
- Cesur, S., and Demiröz, A.P., (2013). Antibiotics and the Mechanisms of Resistance to Antibiotics. Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences, 21(4), 138-142.
- De Silva, P.M., Chong, P., Fernando, D.M., Wesrmacott, G. and Kumar, A., (2018). Effect of incubation temperature on antibiotic resistance and virulence factors of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 62(1), 1-11.
- Khaertynov, K.S., Anokhin, V.A., Rizvanov, A.A., Davidyuk, Y.N., Semyenova, D.R., Lubin, S.A., and Skvortsova, N.N., (2018). Virulence Factors and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated From Neonates With Sepsis, Frontiers in Medicine, 5 Article number: 225, 1-9.
- Li, M.M., Ray, P., Knowlton, K.F., Pruden, A., Xia, K., Teets, C. and Dud, P. (2020). Fate of pirlimycin and antibiotic resistance genes in dairymanure slurries in response to temperature and pH adjustment. Science of the Total Environment, 710, 136310.
- Lin, H., Zhang, J., Chen, H., Wang, J., Sun, W., Zhnag, X., Yang, Y., Wang, Q. and Ma, J. (2017). Effect of temperature on sulfonamide antibiotics degradation, and on antibiotic resistance determinants and hosts in animal manures. Science of the Total Environment, 607-608, 725-732
- MacFadden, D., McCough, S., Fisman, D., Santillana, M. and Brownstein, J. (2018). Antibiotic resistance increases with local temperature. Nature Climate Change, 8(6), 510-514.
- McGough, S.F., MacFadden, D.R., Hattab, M.W., Mølbak, K. and Santillana, M. (2018). Rates of increase of antibiotic resistance and ambient temperature in Europe: a cross-national analysis of 28 countries between 2000-2016. BioRxiv 2018. 1-17.

- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., and Carattoli, A., (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiology Reviews, 41, 252-275.
- Odonkor, S.T., and Addo, K.K., (2011). Bacteria Resistance to Antibiotics: Recent Trends and Challenges. International Journal of Biological and Medical Research, 2(4), 1204-1210.
- Ruh, E., Gazi, U., Güvenir, M., Süer, K. and Çakır, N., (2016). Antibiotic resistance rates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university-affiliated hospital in North Cyprus. Turk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 73(4), 333-344.
- Saha, S., Savage, P.B., and Bal, M., (2008) Enhancement of the efficacy of erythromycin in multiple antibiotic-resistant gram-negative bacterial pathogens. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology, 105, 822-828.
- Wang, B., Li, B., Liang, Y., Li, J., Gao, L., Chen, L., Duan, K. and Shen, L. (2016). Pleiotropic effects of temperature-regulated 2-OH-lauroyltransferase (PA0011) on *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance, virulence and type III secretion system, Microbial Pathogenesis, 91, 5-17.