

# BAKTERİLERİN ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIĞINA ANTİOKSİDANLARIN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

## The Effect of Antioxidants on Antibiotic Sensitivity of Bacteria

Akif İ. QURBANOV<sup>1</sup>, Azade ATTAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Azerbaycan Tıp Üniversitesi,  
Mikrobiyoloji ve İmmünoloji  
AbD, BAKÜ

<sup>2</sup>Yıldız Teknik Üniversitesi,  
Biyomühendislik Bölümü,  
İSTANBUL

İletişim:

Azade ATTAR,  
Yıldız Teknik Üniversitesi,  
Davutpaşa Kampusu,  
Kimya Metalürji Fakültesi,  
Biyomühendislik Bölümü,  
34210 Esenler, İSTANBUL  
Tel: 0212 449 17 53  
Faks: 0212 449 15 60

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki antioksidanların (askorbik asit, emoksipin, tokoferol asetat ve iyonol); bakterilerin antibiyotik hassasiyeti üzerine etkisi çalışılmıştır.

**Yöntem:** Solunum tipleri farklı olan bakterilerden aerob olarak *Pseudomonas aeruginosa* ve fakültatif anaerob olarak *Escherichia coli* kullanılmış; mikroorganizmaların antibiyotik hassasiyeti Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) olarak dilüsyon testi ile belirlenmiştir.

**Bulgular:** Değişik konsantrasyonlardaki antioksidanlar *P.aeruginosa*'nın polimiksin ve streptomisine duyarlılığını artırırken, *E.coli*'nin duyarlılığını azaltmıştır.

**Sonuç:** Antibiyotik duyarlılığına antioksidanların etkisi bakterinin solunum tipine dayanmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Antioksidan, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, polimiksin, streptomisin

### ABSTRACT

**Objective:** The effect of different concentrations of antioxidants (ascorbic acid, emoxipin, tocopherol acetate and ionol) on antibiotic sensitivity of bacteria was studied.

**Method:** Bacteria belong to different respiration types: *Pseudomonas aeruginosa* as aerobe and *Escherichia coli* as facultative anaerobe were used. Antibiotic sensitivity of microorganisms was determined as minimum inhibitory concentration (MIC) by dilution test.

**Results:** Different concentrations of antioxidants increased the sensitivity of *P.aeruginosa* but decreased the sensitivity of *E.coli* to polymyxine and streptomycin.

**Conclusion:** The effect of antioxidants on antibiotic sensitivity depends on respiration type of bacteria.

**Key words:** Antioxidant, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, polymixin, streptomycin

## GİRİŞ

Enfeksiyon prosesinin tüm evrelerinde organizmanın çeşitli savunma mekanizmalarının uyarılması sonucu serbest radikaller meydana gelir. Ancak oluşan bu serbest radikaller organizmada çeşitli hasarlara yol açmaktadırlar. Son yıllarda serbest radikallerin meydana getireceği zararlı etkileri antioksidanlar kullanılarak nötralize etmekle ilgili çalışmalar büyük önem taşımaktadır (1,2). Enfeksiyöz hastalıklarda antioksidanların mikroorganizmalara etkisi incelenirken antibakteriyel ilaçlara olan duyarlılıklarının öğrenilmesi de çok önemlidir. Bu amaçla aerob ve anaerob gruptan olan bakterilerin antibakteriyel ilaçlara karşı duyarlılığı ve direncine antioksidanların etkisinin araştırılmış ve yapılan deneylerde çeşitli antioksidanların (askorbik asit, emoksipin, tokoferol asetat ve iyonolün) aerob (*Pseudomonas aeruginosa*) ve fakültatif anaerob (*Escherichia coli*) bakterilerin polimiksin ve streptomisine olan duyarlılığına etkisi incelenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Deneylerde aerob (*P.aeruginosa*) ve fakültatif anaerob (*E.coli*) bakteriler ve antioksidanlardan askorbik asit, emoksipin, tokoferol asetat ve iyonol kullanılmıştır. Bu antioksidanların her iki gruptan olan bakterilerin polimiksin

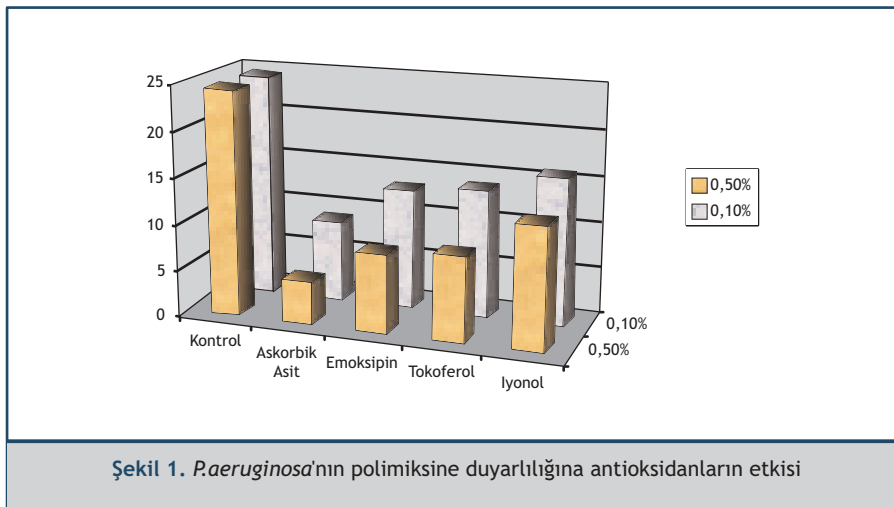
ve streptomisine olan duyarlılığına etkisi araştırılmıştır. Antioksidanların *P.aeruginosa* ve *E.coli*'nin polimiksin ve streptomisine olan duyarlılığına etkisi dilüsyon yöntemiyle incelenmiştir. Kültür ortamında antioksidanların son konsantrasyonu % 0.1 ve % 0.5 olmuştur. Antibakteriyel etkinin tayini için Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Metodu kullanılmıştır (3). Elde edilen sonuçlar Student-t testi ile SPSS (Statistical Packages of Social Sciences, version 9.0 for Windows, SPSS, Inc. Chicago, IL) Programında değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

Antioksidanların *P.aeruginosa*'nın polimiksin ve streptomisine duyarlılığına etkisi Şekil 1 ve 2'de verilmiştir.

Şekillerden görüldüğü gibi antioksidan içeren ortamda *P.aeruginosa*'nın polimiksin ve streptomisine duyarlılığı önemli ölçüde artmıştır. *P.aeruginosa* için polimiksin MİK  $24.4 \pm 1.25 \mu\text{g}$  olduğu halde % 0.1'lik askorbik asit etkisiyle bu değer  $8.8 \pm 1.25 \mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ), emoksipin etkisiyle  $13.1 \pm 1.25 \mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ), tokoferol etkisiyle  $13.8 \pm 1.25 \mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ), iyonol etkisiyle ise  $13.1 \pm 1.25 \mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ) olmuştur.

Gösterilen antioksidanlar daha yüksek konsantrasyonda (% 0.5) *P.aeruginosa*'nın polimiksin duyarlılığını yoğun bir biçimde artırmıştır.



*P.aeruginosa* için polimiksin MİK  $24.4 \pm 1.25$  µg olduğu halde % 0.5'lik askorbik asit etkisiyle bu değer  $4.5 \pm 0.63$  µg ( $p < 0.001$ ), emoksinin etkisiyle  $8.4 \pm 0.63$  µg ( $p < 0.001$ ), tokoferol etkisiyle  $9.1 \pm 0.7$  µg ( $p < 0.001$ ), iyonol etkisiyle ise  $15.9 \pm 0.63$  µg ( $p < 0.01$ ) olmuştur.

Ordinat oku üzerinde polimiksinin MİK'i µg ile gösterilmiştir.

Antioksidanların etkisiyle bu bakterinin streptomisine karşı duyarlılığının da yükseldiği tespit edilmiştir. Antioksidanların % 0.1 konsantrasyonda *P.aeruginosa*'nın streptomisine duyarlılığı nispeten zayıf etki göstermiştir. *P.aeruginosa* için streptomisin MİK  $23.4 \pm 0.63$  µg olduğu halde % 0.1'lik askorbik asit etkisiyle bu değer  $11.3 \pm 1.25$  µg ( $p < 0.05$ ), emoksinin etkisiyle  $10 \pm 1.3$  µg, tokoferol etkisiyle  $13.8 \pm 0.6$  µg ( $p < 0.05$ ), iyonol etkisiyle ise  $17.7 \pm 1.3$  µg ( $p < 0.05$ ) olmuştur.

Antioksidanların incelenen daha yüksek konsantrasyonda (% 0.5) *P.aeruginosa*'nın streptomisine duyarlılığı yoğun bir biçimde artırmıştır. *P.aeruginosa* için streptomisin MİK  $23.4 \pm 0.63$  µg olduğu halde % 0.5'lik askorbik asit etkisiyle bu değer  $4.3 \pm 0.63$  µg ( $p < 0.001$ ), emoksinin etkisiyle  $8.4 \pm 0.63$  µg ( $p < 0.001$ ), tokoferol etkisiyle  $10.3 \pm 1.50$  µg ( $p < 0.01$ ), iyonol etkisiyle ise  $11.6 \pm 0.31$  µg ( $p < 0.01$ ) olmuştur. Sonuçlardan anlaşılacağı gibi antiok-

sidanların % 0.5'lik konsantrasyonunda *P.aeruginosa*'nın streptomisine duyarlılığını yaklaşık 2.5 kez artırmıştır.

Ordinat oku üzerinde streptomisin MİK'i µg ile gösterilmiştir.

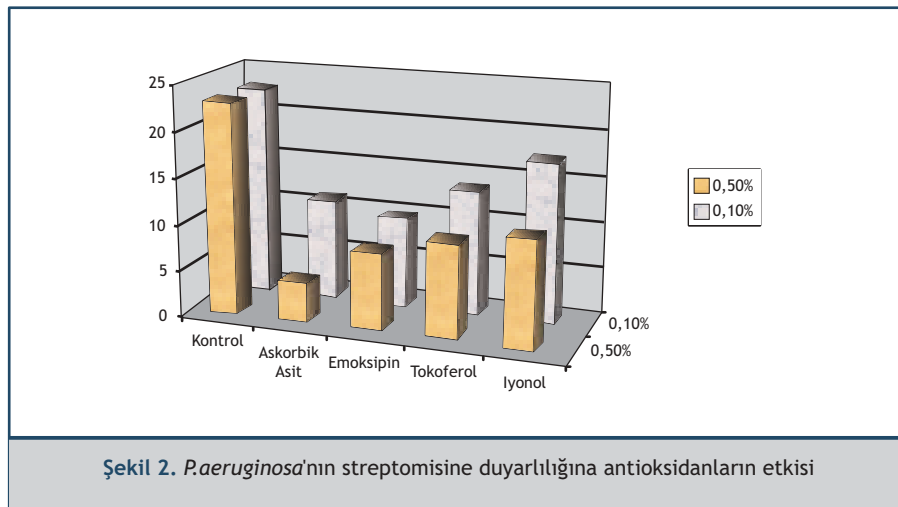
Böylelikle kullanılan antioksidanlar *P.aeruginosa*'nın polimiksin ve streptomisine duyarlılığını önemli derecede artırmıştır.

Antioksidanlar *E.coli*'nin polimiksin ve streptomisin duyarlılığını ise *P.aeruginosa*'nın aksine önemli şekilde azaltmıştır. *E.coli* için polimiksin MİK  $2.5 \pm 0.17$  µg olduğu halde % 0.1'lik askorbik asit etkisiyle bu değer  $3.3 \pm 0.31$  µg ( $p > 0.05$ ), emoksinin etkisiyle  $3.4 \pm 0.16$  µg ( $p > 0.05$ ), tokoferol etkisiyle  $4.2 \pm 0.31$  µg ( $p < 0.05$ ), iyonol etkisiyle ise  $9.5 \pm 0.31$  µg ( $p < 0.001$ ) olmuştur.

Gösterilen antioksidanlar daha yüksek konsantrasyonda (% 0.5) *E.coli*'nin polimiksin duyarlılığını yoğun bir biçimde zayıflatmıştır. *E.coli* için polimiksin MİK  $2.5 \pm 0.17$  µg olduğu halde % 0.5'lik askorbik asit etkisiyle bu değer  $5.9 \pm 0.31$  µg ( $p < 0.05$ ), emoksinin etkisiyle  $7.8 \pm 0.63$  µg ( $p < 0.05$ ), tokoferol etkisiyle  $4.6 \pm 0.31$  µg ( $p < 0.05$ ), iyonol etkisiyle ise  $14.7 \pm 0.31$  µg ( $p < 0.001$ ) olmuştur.

Ordinat oku üzerinde polimiksinin MİK'i µg ile gösterilmiştir.

Antioksidanların etkisiyle *E.coli*'nin



streptomisine karşı duyarlılığının zayıfladığı tespit edilmiştir. *E.coli* için streptomisinin MİK  $11.3 \pm 0.63 \mu\text{g}$  olduğu halde % 0.1'lik askorbik asit etkisiyle bu değer  $25.6 \pm 0.63 \mu\text{g}$  ( $p > 0.05$ ), emoksipin etkisiyle  $13.8 \pm 2.50 \mu\text{g}$  ( $p > 0.05$ ), tokoferol etkisiyle  $11.3 \pm 0.63 \mu\text{g}$  ( $p > 0.05$ ), iyonol etkisiyle ise  $22.5 \pm 2.50 \mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ) olmuştur. Sonuçlardan görüldüğü gibi besi yerindeki % 0.1'lik konsantrasyondaki antioksidanlar *E.coli*'nin streptomisine duyarlılığını azaltmıştır.

Gösterilen antioksidanlar daha yüksek konsantrasyonda (%0.5) *E.coli*'nin streptomisine duyarlılığını yoğun bir biçimde zayıflatmıştır. *E.coli* için streptomisin MİK  $11.3 \pm 0.6 \mu\text{g}$  olduğu halde % 0.5'lik askorbik asit etkisiyle  $57.5 \pm 5.0 \mu\text{g}$  ( $p < 0.001$ ), emoksipin etkisiyle  $18.8 \pm 2.50 \mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ), tokoferol etkisiyle  $23.4 \pm 3.10 \mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ), iyonol etkisiyle ise  $30 \pm 5.0 \mu\text{g}$  ( $p < 0.001$ ) olmuştur. Görüldüğü gibi besi yerindeki % 0.5'lik konsantrasyondaki antioksidanlar *E.coli*'nin streptomisine duyarlılığını 2-6 kez azaltmıştır.

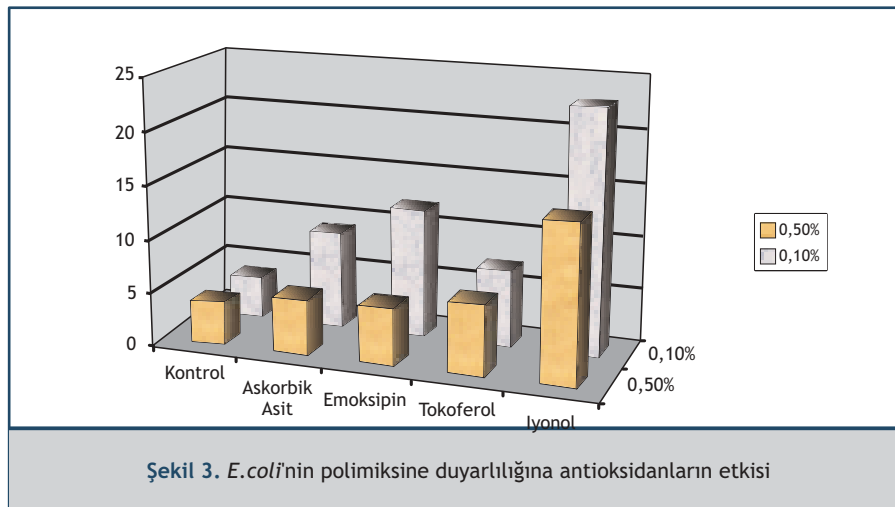
Ordinat oku üzerinde streptomisin MİK'i  $\mu\text{g}$  ile gösterilmiştir.

Sonuçlardan anlaşılacağı üzere, bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılığına antioksidanlardan ziyade bakterinin solunum tipi etki etmektedir. Gösterilen antioksidanların etkisin-

den aerob bakteri olan *P.aeruginosa*'nın polimiksine ve streptomisine duyarlılığı 2-5 kez arttığı halde fakültatif anaerob olan *E.coli*'nin aynı antibiyotiklere duyarlılığı 2-6 kez azalmıştır.

Antioksidanların mikroorganizmaların antibakteriyel ilaçlara karşı duyarlılığına etkisi diğer araştırmacılar tarafından da incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar bazı araştırmaların sonuçlarını onaylar nitelikte olup onlarla karşılaştırılabilir. B. D. Rawal askorbik asitin etkisinden *P.aeruginosa*'nın polimiksine, eritromisine, klo-ramfenikole, neomisine ve tetrasikline karşı duyarlılığının arttığını belirtmiştir (4). L-askorbat yüksek konsantrasyonlarda ( $300 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) *P.aeruginosa*'ya karşı MİK) 3 kez, polimiksin B'nin MİK'i ise ( $3 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) 100 kez azaltır (5). Bu uygulamada görülmüştür ki, askorbik asit *P.aeruginosa*'ya karşı polimiksinin ve streptomisin minimal inhibisyon konsantrasyonunu 2-5 kez azaltmıştır.

Antioksidanların etkisinden *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerinin antibiyotiklere duyarlılığının azalması hakkındaki bilgiler de aldığımız sonuçlarla karşılaştırılabilir. Askorbik asit 13 kimyevi terapötik preparatın (ofloksasin, fleroksasin, tetrasiklin, doksisisiklin, v.s.) *S.aureus* ve *E.coli*'ye karşı antibakteriyel etkisini %9.6'dan %40.7'ye ve %10.1'den %45.5'e kadar azaltmıştır. Böylece, ofloksasin ve tetra-



Şekil 3. *E.coli*'nin polimiksine duyarlılığına antioksidanların etkisi

siklinin askorbik asitle kombinasyonu 24 saatlik inkübasyondan sonra bu bakterilerin ml ile ölçülen tek koloni oluşturma hızını önemli miktarda artırmıştır (6). Bizim çalışmamızda ise askorbik asit *E.coli*'nin polimiksin ve streptomisine olan duyarlılığını 2-5 kez azaltmıştır.

### TARTIŞMA

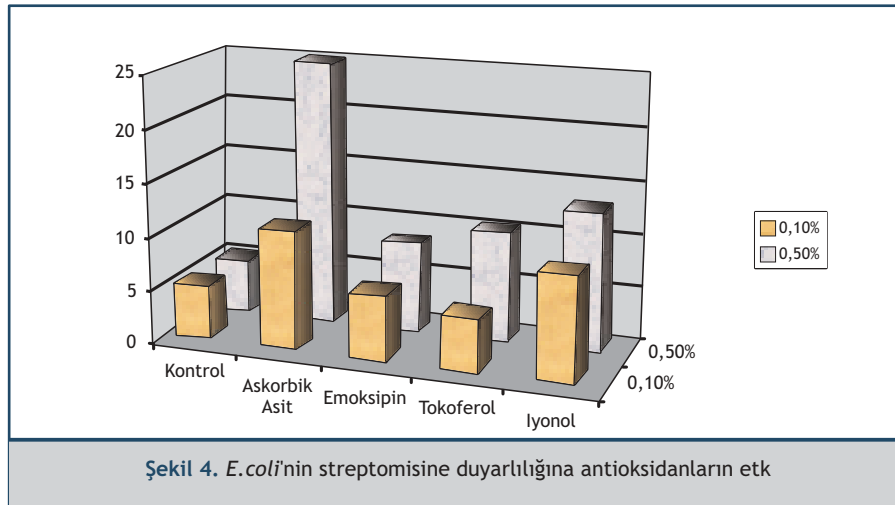
Mikroorganizmaların antibakteriyel ilaçlara duyarlılığı ve direncine antioksidanların etki mekanizmasını açıklamak oldukça zordur. Ancak bazı araştırmacılara göre L-askorbatın etkisinden *P.aeruginosa*'nın rifampisine ve polimiksinine duyarlılığının artması bu antioksidanın *P.aeruginosa* hücre duvarının geçirgenliğini artırmasıyla bağlantılıdır. Magnezyum iyonları askorbik asitin *P.aeruginosa*'ya bakterisid etkisini nötralleştirdiğinden askorbik asitin *P.aeruginosa*'nın hücre duvarında, hücre membranında ve ribozomlarda magnezyum birleştiren bölgelerle rekabet halinde olduğu fikri ileri sürülmüştür. Bu düşüncelere istinaden askorbik asitin etkisiyle *P.aeruginosa*'nın hücre yüzeyinde değişimler meydana gelir, bu da onun antibiyotiklere karşı duyarlılığını artırır (4).

Mikroorganizmaların anti-bakteriyel preparatlara duyarlılığı ve direncine antioksidanların etkisinin diğer olası mekanizmaları hak-

kında da çeşitli fikirler öne sürülmüştür. Askorbik asit etkisiyle *Enterobacter cloacae* hücre dışı indükleyici beta-laktamaz fermentasyon aktivitesinin inhibisyonu, *S.aureus*'un antibiyotiklere plazmidli suşlarında dirençlilik plazmidlerin yitirilmesine neden olmuştur (7). Bazı araştırmacılar anti-mikrop preparatların etkisinden mikrop hücrelerinde reaktif oksijen radikallerinin indüksiyonunun mikroorganizmaların anti-mikrop preparatlara duyarlılığı ve direncine antioksidanların etki mekanizmasını düşünmek için zorunlu bir durum olduğunu gösterirler. Örneğin, siprofloksasin etkisiyle bakteri hücrelerinde reaktif oksijen radikallerinin -süperoksit iyonunun ve hidrojen peroksitin- miktarının arttığı tespit edilmiştir (8).

Böylece mikroorganizmaların antimikrop preparatlara duyarlılık ve direncine antioksidanların etkisinin mekanizması çok çeşitli görüşlerle açıklanmaya çalışılmıştır. Önerilen bu mekanizmalar her incelemenin sonucunu ayrı ayrı açıklasa da mikroorganizmaların antimikrop preparatlara duyarlılık ve direncine antioksidanların etkisinin genel bir kanuna uygunluğunun varlığını şüphe altına alır.

Çalışmamızda mikroorganizmaların antibakteriyel preparatlara duyarlılık ve direncine antioksidanların etkisinin öğrenilmesine dair



Şekil 4. *E.coli*'nin streptomisine duyarlılığına antioksidanların etkisi

mevcut literatürden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, mikroorganizmaların anti-bakteriyel preparatlara karşı duyarlılığına antioksidanların *in vitro* etkisinin mikroorganizmaların solunum tipiyle bağlı olduğu gösterilmiştir. Öyle ki antioksidanların etkisiyle ortamdaki oksijenin konsantrasyonu azalır. Sonuçta zorunlu aerob olan *P.aeruginosa*'nın artışı zayıflar, bu da onun antibiyotiklere karşı duyarlılığını artırır. Mikroorganizmanın solunum tipine göre anaerobiyoza gittikçe görülen durumun tersi meydana gelir, yani antioksidanların katılımıyla mikroorganizmanın miktarı artar ve böylelikle de antibiyotiklere duyarlılığı azalır.

Mikroorganizmaların anti-bakteriyel preparatlara duyarlılık ve direncine antioksidanların etkisinin mekanizması hakkında ileri sürdüğümüz bu yeni iddiayı doğrulamak amacıyla diğer araştırmacıların aldığı sonuçları gözden geçirmek gerekir. Çoğunlukla araştırmalarda antioksidanların etkisinden zorunlu aerob bakteri olan *P.aeruginosa*'nın antibiyotiklere duyarlılığının arttığı tespit edilmiştir. Öyle ki, askorbik asit etkisinden *P.aeruginosa*'nın polimiksine, eritromisine, kloramfenikole, neomisine ve tetrasikline (4), rifampisine ve polimiksin B'ye (5) karşı duyarlılığının arttığı belirtilmiştir. Askorbik asit kimyevi ve terapötik preparatların (ofloksasin, fleroksasin, tetrasiklin, doksisisiklin, v.s.) fakültatif aerob olan *E.coli* bakterisine karşı antibakteriyel etkisini % 10.1'den % 45.5'e kadar artmıştır (6).

Mikroorganizmaların anti-mikrop preparatlara duyarlılık ve direncine antioksidanların etkisinin mekanizması hakkında ileri sürülen yeni iddiayı diğer bir aerob mikroorganizma olan *C.albicans*'ın antifungal preparatlara duyarlılık ve direncine antioksidanların etkisinin öğrenilmesine dair araştırmalar da ispat etmektedir. Bu araştırmalarda çeşitli antioksidanlar *C.albicans*'ın itrakonazol ve flukonazole (9), imidazol preparatlarına (10), amfoterisin B'ye (11-13)

duyarlılığını önemli derecede artırmıştır. Fakat gösterilen araştırmalarda da mantarların anti-mikrop preparatlara duyarlılık ve direncine antioksidanların etkisi diğer mekanizmalarla açıklanır. Bu etkinin antioksidanların *C.albicans* P-450 sitokromuna sinerjizmiyle (9), mantarın hücre duvarında amfoterisinle birleşen sterollerle önceden karşılıklı etkileşimde bulunmasıyla (14) ilgili olduğuna inanılmaktadır.

Mikroorganizmaların anti-bakteriyel preparatlara duyarlılık ve direncine antioksidanların etki mekanizmasına yönelik bulgularımız enfeksiyöz hastalıkların mücadelesinde göz önüne alınması kesin bir bakış açısı vaat eder. Etkenin solunum tipi dikkate alınarak antioksidanların uygulanması ile başarılı sonuçlar elde edilecektir.

#### KAYNAKLAR:

- 1.Gutteridge J, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. Ann. N Y Acad. Sci. 2000; 899: 136-147.
- 2.Knight J. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. Ann. Clin. Lab. Sci. 2000; 30 (2): 145-158.
- 3.Diagnostic microbiology, Ed. by Ellen Jo B. and Sydney M.F. Toronto, 1991; 861.
- 4.Rawal B. Bactericidal action of ascorbic acid on *psuedomonas aeruginosa*: alternation of cell surface as a possible mechanism. Chemotherapy, 1978; 24 (3): 166-171.
- 5.Pillai S, Pillai C, Shankel D, Mitscher L. The ability of certain antimutagenic agents to prevent development of antibiotic resistance. Mutat Res. 2001; 496 (1-2):61-73.
- 6.Belicova A, Dobias J, Ebringer L, Krajcovic J. The effect of ascorbic acid on the antibacterial activity of selected antibiotics and synthetic chemotherapeutic agents in *in vitro* conditions. Ceska Slov Farm. 2000; 49 (3): 134-138.
- 7.Amabile-Cuevas C, Pina-Zentella R, Wah-Laborde M. Decreased resistance to antibiotics and plasmid loss in plasmid-carrying strains of *Staphylococcus aureus* treated with ascorbic acid. Mutat Res. 1991; 264 (3): 119-125.
- 8.Goswami M, Mangoli S, Jawali N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemoter. 2006; 50 (3): 949-954.

9. D'Auria F, Tecca M, Strippoli R, Simonetti N. In vitro activity of propyl gallate-azole drug combination against fluconazole- and itraconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Lett Appl Microbiol.*, 2001; 32 (4) : 220-223.
10. Strippoli V, Dauria F, Tecca M. et al. Propyl gallate increases in vitro antifungal imidazole activity against *Candida albicans*. *Int. J. Antimicrob Agents*, 2000; 16 (1): 73-76.
11. Beggs W, Andrews F. Antioxidant-mediated increases in the antifungal activities of amphotericin B and its methyl ester derivative. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1980; 29 (2): 389-392.
12. Brajtburg J, Elberg S, Kobayashi G, Medoff G. Effects of ascorbic acid on the antifungal action of amphotericin B. *J. Antimicrob Chemother.* 1989; 24 (3): 333-337.
13. Cosgrove R. Effect of butylated hydroxyanisole on the antifungal activity of amphotericin B. *Microbios*, 1983; 37 (147): 23-28.
14. Brajtburg J, Elberg S, Kobayashi G, Medoff G. Effects of ascorbic acid on the antifungal action of amphotericin B. *J. Antimicrob Chemother.* 1989; 24 (3): 333-337.