

ÖLÜMCÜL OLMAYAN ANTİBİYOTİK DOZLARININ *Aeromonas Veronii* ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Berfin EROĞLU¹, Eda DELİK¹, Burcu Emine TEFON-ÖZTÜRK^{1*}

¹Akdeniz University, Faculty of Science, Department of Biology, 07070, Antalya, Türkiye

Özet: Antibiyotikler, genellikle bakteriyel hastalıkların tedavisinde geniş çapta kullanılan farmasötik ajanlardır. Ancak, son yıllarda antibiyotiklerin kontrolsüz ve yanlış kullanımı, bakterilerin birçok farklı ortamda öldürücü olmayan sub-minimum inhibisyon konsantrasyonlarına (sub-MİK) maruz kalmasına neden olmuştur. Bu durum, antibiyotiklerin bakterilerin virülans faktörleri üzerindeki etkilerini anlamak açısından kritik bir önem taşımaktadır. Sub-MİK seviyelerdeki antibiyotikler, bakteriyel virülans ve direnç mekanizmalarını etkileyerek, enfeksiyon kontrolü ve tedavi stratejilerini yeniden değerlendirmeyi gerektirir. Bu çalışmada, bir tatlı su kaynağından izole edilen *Aeromonas veronii* izolatının klinikte yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı antimikrobiyal duyarlılığı değerlendirilmiş ve duyarlı olduğu antibiyotikler için MİK değerleri belirlenmiştir. Ayrıca, antibiyotiklerin sub-MİK (MİK/2 ve MİK/4) dozlarının bakterinin biyofilm oluşturma kapasitesiyle morfolojisi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonuçlar, *A. veronii*'nin çalışmada kullanılan 14 antibiyotikten 4'üne (ampisilin, seftazidim, seftriakson ve trimetoprim-sülfametoksazol) direnç gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca sub-MİK'lerin biyofilm oluşumunu azalttığı, siprofloksasinin uzun filamentli, meropenemin ise yuvarlak hücre morfolojisine neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular, antibiyotiklerin sub-MİK'lerinin bakteriyel virülans ve morfolojik özellikler üzerindeki etkilerini aydınlatmakta ve bu etkilerin klinik ve çevresel antibiyotik yönetiminde göz önünde bulundurulması gerektiğini vurgulamaktadır. Bu tür çalışmalar, antibiyotik direncinin önlenmesi ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: *Aeromonas veronii*, Antibiyotik, Bakteriyel morfoloji, Biyofilm, Sub-MİK

Investigation of the Effects of Non-Lethal Antibiotic Doses on *Aeromonas veronii*

Abstract: Antibiotics are widely used pharmaceutical agents for the treatment of bacterial diseases in general. However, in recent years, the uncontrolled and incorrect use of antibiotics has led to bacteria being exposed to non-lethal sub-minimum inhibitory concentrations (sub-MIC) in various environments. This situation is critically important for understanding the effects of antibiotics on bacterial virulence factors. Antibiotics at sub-MICs affect bacterial virulence and resistance mechanisms, necessitating a reevaluation of infection control and treatment strategies. In this study, the antimicrobial susceptibility of *Aeromonas veronii* isolate, isolated from a freshwater source, to antibiotics commonly used in clinical practice was evaluated, and MICs were determined for the antibiotics to which it was sensitive. Additionally, the effects of sub-MIC (MIC/2 and MIC/4) doses of antibiotics on the bacterium's biofilm formation capacity and morphology were investigated. The results revealed that *A. veronii* was resistant to 4 out of 14 antibiotics tested in the study (ampicillin, ceftazidime, ceftriaxone, and trimethoprim-sulfamethoxazole). Furthermore, sub-MICs were observed to reduce biofilm formation, with ciprofloxacin causing long filamentous morphology and meropenem resulting in a round cell morphology. These findings shed light on the effects of sub-MIC antibiotics on bacterial virulence and morphological characteristics and emphasize that these effects should be considered in clinical and environmental antibiotic management. Such studies are of great importance in preventing antibiotic resistance and developing treatment strategies.

Keywords: *Aeromonas veronii*, Antibiotics, Bacterial morphology, Biofilm, Sub-MIC

*Sorumlu yazar (Corresponding author): Akdeniz University, Faculty of Science, Department of Biology, 07070, Antalya, Türkiye

E mail: burcufefon@akdeniz.edu.tr (B. E. TEFON-ÖZTÜRK)

Berfin EROĞLU



<https://orcid.org/0000-0002-9099-7603>

Eda DELİK



<https://orcid.org/0000-0002-9047-2874>

Burcu Emine TEFON-ÖZTÜRK



<https://orcid.org/0000-0003-1690-9879>

Gönderi: 23 Ağustos 2024

Kabul: 30 Eylül 2024

Yayınlanma: 15 Kasım 2024

Received: August 23, 2024

Accepted: September 30, 2024

Published: November 15, 2024

Cite as: Eroğlu B, Delik E, Tefon-Öztürk BE. 2024. Investigation of the effects of non-lethal antibiotic doses on *Aeromonas veronii*. BSJ Eng Sci, 7(6): 1148-1154.

1. Giriş

Antibiyotikler, patojenlerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde oldukça önemlidir. Antibiyotiklerin hem tarımsal hem de tıbbi amaçlarla aşırı kullanımı, bakterilerin minimum inhibisyon konsantrasyonlarından (MİK) daha düşük antibiyotik dozlarına (sub-MİK) sürekli olarak maruz kalmasına yol açmaktadır (Liu ve ark., 2021). Bu antibiyotik dozları bakterilerde fenotipik ve genotipik değişikliklere neden olabilmekte, sinyal

molekülleri olarak hareket edebilmekte ve bakterilerin fizyokimyasal özelliklerini ve virülans genlerinin ekspresyonunu değiştirebilmektedir (Narimisa ve ark., 2020). Son çalışmalar, sub-MİK antibiyotiklerin bakterilerde morfolojik değişikliklere, biyofilm oluşturma kapasitesinde artışa, bakteriyel yapışma kapasitesinde artışa ve dış membran proteinlerinin aşırı ekspresyonuna neden olabileceğini göstermiştir (Dhabaan ve ark., 2016; Chadha ve Khullar, 2021; Chen



ve ark., 2021; Delik ve ark., 2023; Opstrup ve ark., 2023; Delik ve ark., 2024). Bakteri hücrelerindeki bu değişiklikler antibiyotiklere karşı direnç gelişimini teşvik edebilmektedir. Bu nedenle, bakterilerde çoklu antibiyotik direnci gelişimini önlemek ve hastalıkların tedavisinde doğru antibiyotik kullanım stratejilerini belirlemek için bakterilerin antimikrobiyal direnç profillerinin belirlenmesi ve sub-MİK'lerin bakteriler üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

Aeromonas veronii, Aeromonadaceae ailesine ait bir Gram-negatif bakteri türüdür ve çeşitli çevresel ortamlarda, özellikle tatlı su ekosistemlerinde bulunur. Ayrıca, hem insanlarda hem de hayvanlarda enfeksiyonlara neden olabilmektedir. İnsanlarda, genellikle bağırsak enfeksiyonları, yara enfeksiyonları ve sepsis gibi çeşitli klinik tablolarla ilişkilidir (Pereira ve ark., 2008; Janda ve Abbott, 2010). Bu bakteri özellikle antibiyotiklere karşı yüksek direnç gösterebilen bir türdür. Beta-laktam antibiyotikler, aminoglikozidler ve kinolonlar gibi çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirebilir. Bu özellikleri, özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan bireylerde ve hastane ortamlarında ciddi enfeksiyon riskleri oluşturur (Yuwono ve ark., 2021). Ayrıca, biyofilm oluşturma yeteneği bakterinin çevresel koşullara ve antibiyotik tedavisine karşı direncini artırabilir. Bu durum, *A. veronii*'nin tedavisinde zorluklar yaratarak enfeksiyonların yayılmasını kolaylaştırabilmektedir. *A. veronii*'nin su kaynaklarından ve hayvanlardan insanlara bulaşabilmesi, çevresel sağlık ve halk sağlığı açısından önemlidir. Bu bakterinin doğal ortamları arasında tatlı su göletleri, nehirler ve akarsular bulunur ve bu ortamlarda bakteriyel kontaminasyon riskleri göz önüne alınmalıdır (Ghenghesh ve ark., 2008). Gerçekleştirilen bu çalışmada, bir tatlı su kaynağından (Antalya Boğaçay) *A. veronii* izole edilerek tanımlanmıştır. Bakterinin 14 antibiyotiğe karşı antimikrobiyal duyarlılığı belirlenerek duyarlı olduğu antibiyotikler için MİK değerleri araştırılmıştır. Ayrıca, sub-MİK'lerdeki antibiyotiklerin bakteri hücre morfolojisi ve biyofilm oluşturma kapasitesi üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Su Örneklerinin Toplanması ve Bakteri İzolasyonu

Bu çalışmada kullanılan su örnekleri 2021 yılında Antalya (Türkiye) ilinde sık insan faaliyetleri (yüzme ve balık tutma gibi) nedeniyle önemli olan ve tarım arazilerinin sulanmasında kullanılan bir tatlı su kaynağından (Boğaçay) izole edilmiştir (coğrafi koordinatlar 36°51'12.5"K 30°37'39.1"D). Su örnekleri steril falcon tüplerine alınarak soğuk zincir altında laboratuvara taşınmıştır.

50 mL su örnekleri, %0,85 NaCl ile seri olarak (1:10) seyreltilmiştir. Her bir seyreltiden 200 µL süspansiyon yayma plak tekniği kullanılarak Nutrient Agara (NA) transfer edilmiş ve 30 °C'de 96 saat inkübe edilmiştir.

Ardından besiyerinde büyüyen koloniler seçilerek tek tek NA'ya aktarılmıştır. İzolatların alt kültürleri yapılmış ve daha sonraki çalışmalar için -80 °C'de gliserollü stokları hazırlanmıştır.

2.2. Bakteri İzolatının Tanımlanması

Seçilen izolatların moleküler tanımlaması, 16S rRNA gen bölgelerinin DNA dizi analizi ve aynı bölgeye karşılık gelen proteinler için matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF) ile gerçekleştirilmiştir (Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı, Antalya). İzolatların genomik DNA izolasyonu, ticari bir genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır (Zymo Research, ABD). 16S rRNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonu için evrensel primerler (8F ve 1492R) kullanılmış ve reaksiyonlar önceden belirlenmiş bir protokole göre gerçekleştirilmiştir (Eden ve ark., 1991). PCR ürünleri, daha önce tanımlandığı şekilde iki yönlü olarak Sanger dizilemesi ile analiz edilmiştir (Delik ve ark., 2024). Sonuçlar, National Center for Biotechnology Information (NCBI) veritabanının Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (BLASTn) programı kullanılarak hizalanmış ve izolatlar moleküler olarak tanımlanarak NCBI erişim numaraları elde edilmiştir.

2.3. Antibiyotik Duyarlılığı ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatının antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından tanımlanan disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (CLSI, 2021). Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri (Biyoanaliz, Türkiye); antimetabolitlerden trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX) (1,25/23. 75 µg/disk), beta laktamlardan ampisilin (10 µg/disk), imipenem (10 µg/disk), meropenem (10 µg/disk), sefazolin (30 µg/disk), seftazidim (30 µg/disk), seftriakson (30 µg/disk) ve sefuroksim (30 µg/disk), kloramfenikol antibiyotik grubundan kloramfenikol (30 µg/disk), makrolidlerden azitromisin (15 µg/disk), klaritromisin (15 µg/disk) ve eritromisin (15 µg/disk), kinolonlardan siprofloksasin (5 µg/disk) ve tetrasiklin antibiyotik grubundan tetrasiklin (30 µg/disk) kullanılmıştır. Bakteri hücreleri CLSI standartlarına uygun olarak %0.85'lik NaCl içerisinde 0.5 McFarland standartına ayarlanmış ve Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerine yayılmıştır. Antibiyotik diskleri bakteri ekimi gerçekleştirilmiş MHA üzerine yerleştirilmiştir. Hazırlanan örnekler 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından antibiyotiklerin oluşturduğu zon çapları ölçülmüş ve antimikrobiyal duyarlılık profili (dirençli veya duyarlı) CLSI standartlarına göre belirlenmiştir.

Antibiyotiklerin MİK değerlerini belirlemek için sıvı dilüsyon yöntemi kullanılmıştır (CLSI, 2021). Farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren Mueller Hinton Broth'a (MHB) 0.5 McFarland standardına ayarlanmış bakteri hücreleri eklenmiştir. Örnekler 37 °C'de 150 rpm'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, bakteri üremesinin olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak belirlenmiştir.

2.4. Sub-MİK'lerin Biyofilm Oluşumuna Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Antibiyotiklerin biyofilm oluşumuna olan etkileri, Tang ve ark., (2020)'nin belirttiği yöntemle göre modifiye edilerek belirlenmiştir. Bakteri hücrelerinin başlangıç konsantrasyonu Nutrient Broth (NB) besiyerinde OD600 nm'de 0.05 absorbans değerine ayarlanmış ve örnekler üzerine son konsantrasyon MİK/2 ve MİK/4 olacak şekilde antibiyotik ara stoklarından eklenmiştir. Hazırlanan örneklerden 96 kuyucuklu hücre kültürü plakasının her bir kuyucuğuna 200 µL eklenmiştir ve 37 °C'de 24 saat statik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından plakalarda yer alan örnekler dökülmüş ve plakaların her bir kuyusu distile su ile yıkanmıştır. Yıkama adımının ardından oluşan biyofilmler 200 µL kristal viyole çözeltisi (%0,1) ile 30 dakika boyanmıştır. Ardından fazla boya distile su yardımıyla uzaklaştırılmış ve kalan biyofilmler %95 etanol ile çözdürülerek OD590'da absorbans değerleri alınmıştır.

2.5. Sub-MİK'lerin Bakteri Morfolojisi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Bakteri morfolojisindeki değişiklikler ışık mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Bakteri izolatu son konsantrasyon MİK/2 ve MİK/4 olacak şekilde antibiyotik içeren NB'de 37 °C'de 150 rpm'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, her kültürden örnek alınarak lam üzerine sabitlenmiş ve Gram boyamaları yapılmıştır. Sub-MİK antibiyotiklerin bakteri morfolojisi üzerindeki etkisi, boyanmış örneklerin

mikroskop altında incelenmesiyle belirlenmiştir.

2.6. İstatistik Analizler

Tüm deneyler birbirinden bağımsız olarak en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) (IBM SPSS yazılım programı sürüm 22) (SPSS, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, çoklu karşılaştırmalarda farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için tamamlayıcı bir Post-Hoc analizi olarak Tukey testi kullanılmıştır. P<0.05 olan örnekler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. Bulgular

3.1. Bakteri İzolatının Tanımlanması

Antalya'daki tatlı su kaynağından izole edilen bakteri kolonisi hem 16S rRNA gen bölgesinin DNA dizi analizi hem de MALDI-TOF ile tanımlanmıştır. Her iki analizde de bakteri izolatu *A. veronii* by *veronii* NAA12 (GenBank ID: PQ219646.1) olarak tanımlanmıştır.

3.2. Antibiyotik Duyarlılığı ve MİK Değerleri

Bakterinin antimikrobiyal duyarlılığı ve duyarlı olduğu antibiyotikler için MİK değerleri Tablo 1'de verilmiştir. İzolatın ampisilin, seftazidim, seftriakson ve TMP-SMX antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu gözlemlenmiştir. Antibiyotiklerin MİK değerleri karşılaştırıldığında, en yüksek MİK değerinin azitromisin antibiyotiğine ait olduğu belirlenmiştir. En düşük MİK değerleri ise beta-laktam üyesi olan karbapenem grubu antibiyotiklere (imipenem ve meropenem) karşı gözlemlenmiştir.

Tablo 1. Bakterinin antibiyotik duyarlılığı ve MİK değerleri

Antibiyotikler	Antibiyotik Duyarlılığı	MİK (µg/mL)
TMP-SMX	R	-
Ampisilin	R	-
İmipenem	S	0.01
Meropenem	S	0.03
Sefazolin	S	0.06
Seftazidim	R	-
Seftriakson	R	-
Sefuroksim	S	4
Kloramfenikol	S	4
Azitromisin	S	6
Klaritromisin	S	0.5
Eritromisin	S	1
Siprofloksasin	S	0.07
Tetrasiklin	S	0.3

R= dirençli, S= duyarlı

3.3. Sub-MİK'lerin Biyofilm Oluşumuna Olan Etkileri

Tüm antibiyotiklerin MİK/2 ve MİK/4 dozları antibiyotiksiz ortamda yetiştirilen bakteriye kıyasla biyofilm oluşumunu azaltmıştır (P<0.05) (Şekil 1). Biyofilm oluşumuna karşı en etkili antibiyotiğin tetrasiklin olduğu görülmüştür. MİK/4 sefazolin ve imipenem varlığında biyofilm miktarının kontrole yakın olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, sub-MİK kloramfenikol ve klaritromisin varlığında oluşan biyofilm miktarları

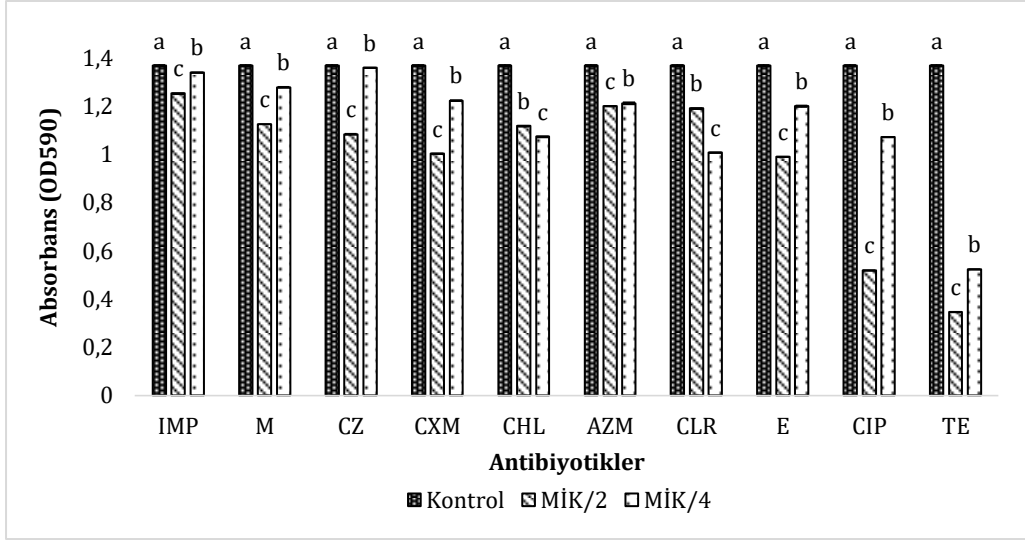
karşılaştırıldığı zaman antibiyotiklerin MİK/2 dozlarındaki biyofilm oluşumunun MİK/4 dozlarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

3.4. Sub-MİK'lerin Bakteri Morfolojisi Üzerindeki Etkileri

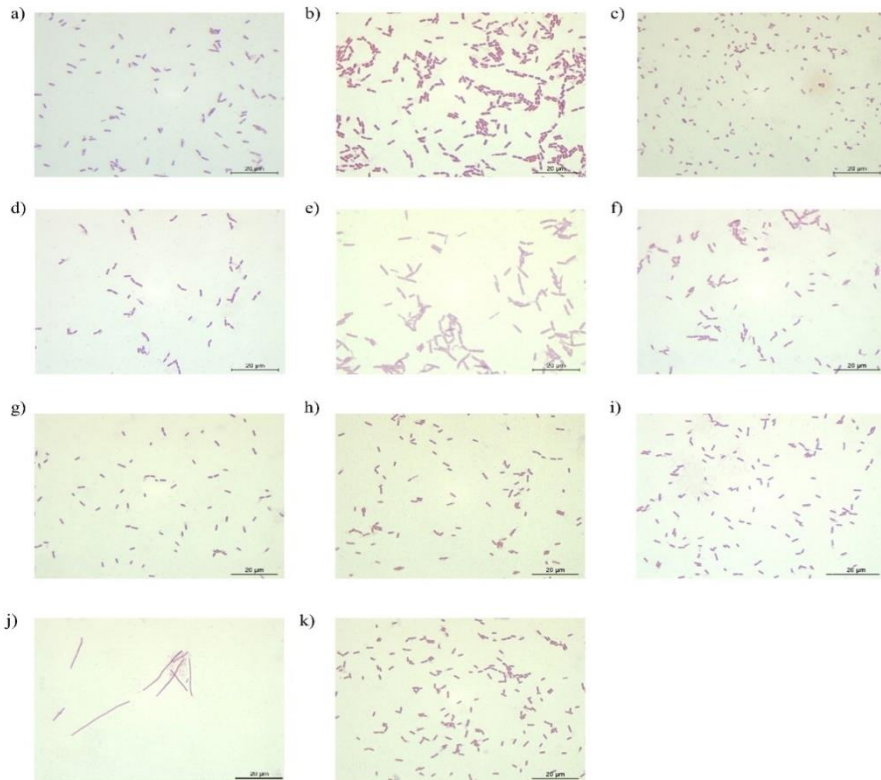
Sub-MİK antibiyotik varlığında büyütülen bakterilerde meydana gelen morfolojik değişiklikler Şekil 2'de gösterilmiştir. MİK/2 ve MİK/4 antibiyotik varlığında büyütülen bakteri hücrelerinin hücre morfolojilerinin

benzer olduğu gözlemlenmiştir. Bakteriyel morfolojideki en belirgin değişiklik siprofloksasin ve meropenem antibiyotiklerinde gözlemlenmiştir. Antibiyotik uygulamasından önce basil hücre morfolojisine sahip bakteri hücreleri meropenem uygulamasının ardından yuvarlak bir morfoloji gösterirken siprofloksasinli ortamda büyütülen bakteri hücreleri inkübasyon sonunda uzun filament yapıda bir hücre morfolojisi

sergilemiştir. Ayrıca sefuroksim varlığında bakteri hücreleri kontrol grubuna kıyasla daha uzun bir hücre morfolojisi sergilemiştir. Ancak bu değişim, siprofloksasin ve meropenem sub-MİK'lerindeki değişim kadar net olmamıştır. Çalışmada kullanılan diğer antibiyotikler ise bakteri hücrelerinde morfolojik değişime neden olmamıştır.



Şekil 1. Sub-MİK'lerin biyofilm oluşumuna etkisi. Kontrol= antibiyotiksiz ortamda büyütülmüş bakteri, IMP= imipenem, M= meropenem, CZ= sefazolin, CXM= sefuroksim, CHL= kloramfenikol, AZM= azitromisin, CLR= klaritromisin, E= eritromisin, CIP= siprofloksasin, TE= tetrasiklin. Üst simgelerde yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir (P<0.05).



Şekil 2. Sub-MİK'lerin bakteri morfolojisine etkisi, a) Kontrol (antibiyotiksiz ortamda büyütülmüş bakteri), b) imipenem c) meropenem d) sefazolin e) sefuroksim f) kloramfenikol g) azitromisin h) klaritromisin i) eritromisin j) siprofloksasin k) tetrasiklin.

4. Tartışma

Bu çalışma Antalya'daki tatlı su kaynağından izole edilen *A. veronii* izolatının antimikrobiyal duyarlılığını ve sub-MİK antibiyotiklerin biyofilm oluşumu ve morfolojik değişiklikler üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bulgularımız, çevresel *Aeromonas* türlerinin antibiyotiklere karşı direnç geliştirme potansiyelini ortaya koyarak, bu bakterilerin hem insan sağlığı hem de çevresel riskler açısından önemini vurgulamaktadır. *Aeromonas* türlerinin çevresel adaptasyon kabiliyeti onları birçok farklı ortamda hayatta kalmaya uygun hale getirmektedir (Pessoa ve ark., 2019). Çeşitli çalışmalarda, bu bakterilerin gıda ürünlerinde, su kaynaklarında ve insan enfeksiyonlarında yaygın olarak bulunduğu ve izole edildiği görülmüştür (Li ve ark., 2015; Alhazmi, 2015). Bu çalışmanın bulguları izolatın TMP-SMX, ampisilin, seftazidim ve seftriakson gibi yaygın antibiyotiklere dirençli olduğunu ve bu durumun çevresel *Aeromonas* türlerinin halk sağlığı açısından ciddi bir risk oluşturabileceğini göstermektedir (Janda ve Abbott, 2010). Özellikle *Aeromonas* cinsinin sucül ortamlarda yaygın olması ve antropojenik etkiler nedeniyle bu ortamlarda antibiyotik dirençli suşların gelişme olasılığının yüksek olması, bu bakterilerin izlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Gomes ve ark., 2021). Benzer şekilde Eid ve ark., (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, Akdeniz'den izole edilen *Aeromonas* suşlarının %90'ının çoklu ilaca dirençli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Woo ve ark., (2022), Kore'de su hayvanlarından izole edilen *A. veronii* ve *A. hydrophila* suşları arasında çoklu ilaca dirençli suşlar bulunduğunu ve bu suşlarda direnç genlerinin yaygın olduğunu bildirmiştir. Bu durum, çevresel kaynaklı *Aeromonas* türlerinin insan sağlığı için potansiyel bir tehdit oluşturabileceğini göstermektedir. Biyofilm oluşumu *Aeromonas* türlerinin önemli bir virülans faktörüdür ve bu bakterilerin çeşitli yüzeylere tutunarak enfeksiyona yol açma potansiyelini artırır (Dias ve ark., 2018). Bu çalışmada sub-MİK'lerin *A. veronii* izolatının biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Bu bulgu antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarının bile biyofilm oluşumu üzerinde önemli etkileri olabileceğini göstermektedir (Lebeaux ve ark., 2014). Ancak Dias ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada, yüksek konsantrasyonlardaki antibiyotiklerin biyofilm oluşumunu etkileyemediğini belirtmişlerdir. Bu çelişkili bulgular, biyofilm oluşumunun antibiyotik türü ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini düşündürmektedir. Biyofilm oluşumuna karşı en etkili antibiyotığın tetrasiklin olduğu bulgumuz, bu ilacın biyofilmle ilişkili enfeksiyonların tedavisinde potansiyel olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının biyofilm oluşumunu farklı şekilde etkileyebileceği bulgusu, biyofilm oluşumunun antibiyotik konsantrasyonlarına duyarlı olduğunu göstermektedir (Lebeaux ve ark., 2014). Özellikle kloramfenikol ve klaritromisin gibi antibiyotiklerin daha düşük konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu fazla

etkilememiş olması bu tür alt-doza uygulamaların direnç gelişimi ve enfeksiyon kontrolünde dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

Morfolojik değişiklikler açısından sub-MİK siprofloksasin ve meropenem varlığında *A. veronii* izolatında gözlemlenen belirgin değişiklikler, bu antibiyotiklerin hücre bölünmesini ve morfolojiyi etkileyebileceğini göstermektedir (Lewis, 2001). Bu tür morfolojik değişiklikler bakterilerin çevresel stres faktörlerine adaptasyon mekanizmaları ile ilişkili olabilir ve bakterilerin hayatta kalma stratejilerini anlamak için önemlidir. Salama (2020)'nin belirttiğine göre bakteri morfolojisi de bir virülans belirleyicisidir ve bakteri direncinde rol oynayan faktörlerden biridir. Örneğin kıvrımlı morfoloji yüzeye tutunma ve kolonizasyonda, çubuk şeklindeki morfolojinin ise yüzey tutunmasında, komşu hücrelerle iletişimde ve biyofilm oluşumunda daha etkili olduğu belirtilmiştir (Persat ve ark. 2014; Lin ve ark. 2015). Bu nedenle *A. veronii* izolatında meydana gelen bu morfolojik değişikliklerin antibiyotik direnç mekanizmaları ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (Rowlett ve ark., 2017).

Sub-MİK antibiyotiklerin bakteri morfolojisi ve biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerinin anlaşılması antibiyotik direnç mekanizmalarının karmaşıklığını çözmek için önemlidir. Sub-MİK seviyelerinin, bakterilerin çevresel stres faktörlerine adaptasyonunu ve virülansını nasıl etkilediğini incelemek hem çevresel hem de klinik açıdan önemli bulgular sunabilir. Bu nedenle, antibiyotiklerin yalnızca terapötik dozlarının değil, aynı zamanda düşük konsantrasyonlarının da bakteri davranışı üzerindeki etkilerini araştırmak, antibiyotik direncinin yayılmasını önlemek ve etkili tedavi stratejileri geliştirmek için önemlidir. Bu bulgular, antibiyotiklerin sub-MİK dozlarının potansiyel risklerini daha iyi anlamamız gerektiğini ve bu konuda daha fazla araştırma yapılmasının gerekliliğini vurgulamaktadır.

4. Sonuç

Bu çalışma *Aeromonas* türlerinin çevresel ve klinik ortamlarda antibiyotik direnci ve biyofilm oluşturma potansiyelini vurgulamakta ve bu bakterilerin izlenmesi ve kontrol edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarının bile bakteriyel özellikler üzerinde önemli etkileri olabileceği gerçeği, çevresel antibiyotik kirliliğinin kontrol altına alınması gerektiğini vurgulamaktadır. Gelecekte yapılacak çalışmalar, bu bakterilerin direnç mekanizmalarını ve çevresel yayılmalarını daha iyi anlamaya yönelik olmalıdır.

Katkı Oranı Beyanı

Yazarların katkı yüzdeleri aşağıda verilmiştir. Yazarlar makaleyi incelemiş ve onaylamıştır.

	B.E.	E.D.	B.E.T.Ö.
K	34	34	33
T	34	34	33
Y	30	30	40
VTI	34	34	33
VAY	34	34	33
KT	34	34	33
YZ	34	34	33
KI	30	30	40
GR	34	34	33
PY	30	30	40
FA			100

K= kavram, T= tasarım, Y= yönetim, VTI= veri toplama ve/veya işleme, VAY= veri analizi ve/veya yorumlama, KT= kaynak tarama, YZ= Yazım, KI= kritik inceleme, GR= gönderim ve revizyon, PY= proje yönetimi, FA= fon alımı.

Çatışma Beyanı

Yazarlar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

Etik Onay Beyanı

Bu araştırmada hayvanlar ve insanlar üzerinde herhangi bir çalışma yapılmadığı için etik kurul onayı alınmamıştır.

Kaynaklar

Alhazmi MI. 2015. Isolation of *Aeromonas* spp. from food products: emerging *Aeromonas* infections and their significance in public health. *J AOAC Int*, 98(4): 927-929.

Chadha J, Khullar L. 2021. Subinhibitory concentrations of nalidixic acid alter bacterial physiology and induce anthropogenic resistance in a commensal strain of *Escherichia coli* in vitro. *Lett Appl Microbiol*, 73(5): 623-633.

Chen J, Zhou H, Huang J, Zhang R, Rao X. 2021. Virulence alterations in *Staphylococcus aureus* upon treatment with the sub-inhibitory concentrations of antibiotics. *J Adv Res*, 31: 165-175.

CLSI, 2021. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100 2021.

Delik E, Eroğlu B, Tefon-Öztürk BE. 2024. Evaluation of the in vitro effects of concentrations of antibiotics on three Enterobacteriaceae isolates. *World J Microbiol Biotechnol*, 40(2): 1-16.

Delik E, Eroğlu B, Çolak ÇY, Özçelik AT, Öztürk BET. 2023. Alterations of Growth, Biofilm-Forming, and Gene Expression of *Bordetella pertussis* by Antibiotics at Sub-Minimal Inhibitory Concentrations. *Res Microbiol*, 2023: 104058.

Dhabaan GN, AbuBakar S, Cerqueira GM, Al-Haroni M, Pang SP, Hassan H. 2016. Imipenem treatment induces expression of important genes and phenotypes in a resistant *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(3): 1370-1376.

Dias C, Borges A, Saavedra MJ, Simões M. 2018. Biofilm formation and multidrug-resistant *Aeromonas* spp. from wild

animals. *J Glob Antimicrob Resist*, 12: 227-234.

Eden PA, Schmidt TM, Blakemore RP, Pace NR. 1991. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int J Syst Evol Microbiol*, 41(2): 324-325.

Eid HM, El-Mahallawy HS, Shalaby AM, Elsheshtawy HM, Shetewy MM, Eidaroos NH. 2022. Emergence of extensively drug-resistant *Aeromonas hydrophila* complex isolated from wild *Mugil cephalus* (striped mullet) and Mediterranean seawater. *Vet World*, 15(1): 55.

Ghenghesh KS, Ahmed SF, El-Khalek RA, Al-Gendy A, Klena J. 2008. *Aeromonas* associated infections in developing countries. *J Infect Dev Ctries*, 2: 81-9.

Gomes S, Fernandes C, Monteiro S, Cabecinha E, Teixeira A, Varandas S, Saavedra MJ. 2021. The role of aquatic ecosystems (River Tua, Portugal) as reservoirs of multidrug-resistant *Aeromonas* spp. *Water*, 13(5): 698.

Janda JM, Abbott SL. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev*, 23(1): 35-73.

Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. 2014. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol*, 78(3): 510-543.

Lewis KIM. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(4): 999-1007.

Li F, Wang W, Zhu Z, Chen A, Du P, Wang R, Wang D. 2015. Distribution, virulence-associated genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolates from diarrheal patients and water. *China. J Infect*, 70(6): 600-608.

Lin TY, Santos TM, Kontur WS, Donohue TJ, Weibel DB. 2015. A cardiolipin-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides* has an altered cell shape and is impaired in biofilm formation. *J Bacteriol*, 197(21): 3446-3455.

Liu B, Zhang X, Ding X, Wang Y, Zhu G. 2021. Regulatory mechanisms of sub-inhibitory levels antibiotics agent in bacterial virulence. *Appl Microbiol Biotechnol*, 105(9): 3495-3505.

Narimisa N, Amraei F, Kalani BS, Mohammadzadeh R, Jazi FM. 2020. Effects of sub-inhibitory concentrations of antibiotics and oxidative stress on the expression of type II toxin-antitoxin system genes in *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist*, 21: 51-56.

Opstrup KV, Christiansen G, Birkelund S. 2023. Beta-lactam induced morphological changes in serum of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* blood isolates. *Microbes Infect*, 25(1-2): 105036.

Pereira CS, Amorim SD, Santos AFDM, Siciliano S, Moreno IB, Ott PH, Rodrigues DDP. 2008. *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonadaceae* family pathogens isolated from marine mammals of Southern and Southeastern Brazilian coast. *Braz J Microbiol*, 39: 749-755.

Persat A, Stone HA, Gitai Z. 2014. The curved shape of *Caulobacter crescentus* enhances surface colonization in flow. *Nat Commun*, 5(1): 3824.

Pessoa RBG, de Oliveira WF, Marques DSC, dos Santos Correia MT, de Carvalho EVMM, Coelho LCBB. 2019. The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microb Pathog*, 130: 81-94.

Rowlett VW, Mallampalli VK, Karlstaedt A, Dowhan W, Taegtmeier H, Margolin W, Vitrac H. 2017. Impact of membrane phospholipid alterations in *Escherichia coli* on cellular function and bacterial stress adaptation. *J Bacteriol*, 199(13): 10-1128.

Salama NR. 2020. Cell morphology as a virulence determinant: lessons from *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Microbiol*, 54, 11-17.

- Tang M, Wei X, Wan X, Ding Z, Ding Y, Liu J. 2020. The role and relationship with efflux pump of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Pathog*, 147:104244.
- Woo SJ, Kim MS, Jeong MG, Do MY, Hwang SD, Kim WJ. 2022. Establishment of epidemiological cut-off values and the distribution of resistance genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* isolated from aquatic animals. *Antibiotics*, 11(3): 343.
- Yuwono C, Wehrhahn MC, Liu F, Riordan SM, Zhang L. 2021. The Isolation of *Aeromonas* Species and Other Common Enteric Bacterial Pathogens from Patients with Gastroenteritis in an Australian Population. *Microorganisms*, 9(7): 1440.