



Antimicrobial Activity of Boric Acid Solution Against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*

Ziya İLHAN¹ İsmail Hakkı EKİN² Özgül GÜLAYDIN²

¹ Balıkesir University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Balıkesir, Turkey

² Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Van, Turkey

Received: 08.05.2019

Accepted: 06.11.2019

ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the antibacterial effects of boric acid (H_3BO_3) against *Listeria (L.) monocytogenes* and *Staphylococcus (S.) aureus*. The antibacterial effects of boric acid were analyzed according to the recommendations of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) of boric acid were determined as 1/32 (1.93 mg/ml) and 1/16 (3.80 mg/ml) for *L. monocytogenes* and *S. aureus*, respectively. Therefore, it was concluded that boric acid, a by-product of boron, can be used as an alternative antibacterial agent and more detailed *in vitro* and *in vivo* studies is necessary.

Keywords: Antibacterial effect, boric acid, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*

ÖZ

Borik Asitin *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus*'a Karşı Antimikrobiyel Etkisi

Bu çalışmada, borik asidin (H_3BO_3) *Listeria (L.) monocytogenes* ve *Staphylococcus (S.) aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı. Antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesinde National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) kriterleri dikkate alındı. Borik asidin minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyonu (MBK) *L. monocytogenes* için 1/32 (1.93 mg/ml), *S. aureus* için ise 1/16 (3.80 mg/ml) olarak belirlendi. Sonuç olarak, ülkemizin önemli yeraltı zenginliklerinden bor madeninin bir yan ürünü olan borik asidin, daha ayrıntılı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarından sonra alternatif bir antibakteriyel olarak kullanılabilmesi kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel etki, borik asit, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*

GİRİŞ

Bor, doğada bileşikler halinde bulunan ve oldukça farklı alanlarda kullanılan bir elementtir. Bor ve bor ürünlerinden iletişim araçları, savunma, tekstil, tarım, cam, seramik, inşaat ve ilaç sanayisinden enerjiye kadar pek çok alanda yararlanılmaktadır (Kuru ve Yarat 2017). Bor ürünlerinden sağlık alanında ise diş, kemik, eklem ve alerjik hastalıklar ile psikiyatri, menopoz ve kanser tedavisinde yararlanılmaktadır (Demirtaş 2010; Nielsen ve Meacham 2011; Zan ve ark. 2013). Sağlık alanındaki en önemli özelliklerinden biri antibakteriyel etkisinin olmasıdır. Bu özelliğinden dolayı antibiyotik, antiseptik, sterilizasyon işlemleri ve antibakteriyel kremlerde kullanılmaktadır (Yılmaz 2012; Demirci ve ark. 2015a; Demirci ve ark. 2015b; Yakıncı ve Kök 2016). Son yıllarda tekstil sanayinde antibakteriyel özellikli nanoteknolojik kumaşların üretiminde de bor ürünlerinin kullanımıyla ilgili çalışmaların yapıldığı bildirilmektedir (Akbar ve ark. 2017).

Listeria (L.) monocytogenes hayvanlarda daha çok septisemi, meme enfeksiyonları, sinirsel semptomlar ve yavru atmalara neden olmaktadır. Etken insanlarda ise genellikle sepsis, meningoensefalitis, serebrit, febril gastroenteritis ve çeşitli fokal lezyonlardan sorumlu tutulmaktadır. Bakteri genellikle kontamine süt, süt ürünleri, et ve çiğ sebze gibi çeşitli besin maddeleriyle insanlara bulaşarak, besin kaynaklı salgınlara neden olmaktadır. Etken bu yönüyle halk sağlığı için önemli bir tehdit olarak nitelendirilmektedir (Evirgen 2005; Quinn ve ark. 2011).

Staphylococcus (S.) aureus gerek insan gerekse hayvanlarda önemli piyojenik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Özellikle *S. aureus*'un metisiline dirençli suşları (MRSA) uzun süredir ölümlü sonuçlanabilen enfeksiyonlara yol açarak, birçok insanın ölümünden sorumlu tutulmaktadır. MRSA ilk kez 1961 yılında tanımlandıktan sonra tüm dünyada önemli bir sağlık problemi olduğu anlaşılmıştır. Kısaca, birçok *S. aureus* suşunda olduğu gibi özellikle MRSA günümüzde hem

beşeri hekimlikte hem de veteriner hekimlikte önemini korumaktadır (Quinn ve ark. 2011; Şen ve Özdemir 2016). Antibiyotiklerin keşfiyle birlikte enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde yeni bir dönem başlamış olmasına karşın, zaman içerisinde değişik nedenlere bağlı olarak bakteriler tarafından birçok antimikrobiyel maddeye karşı direnç geliştirilmiştir. Günümüzün önemli halk sağlığı sorunlarından olan antimikrobiyel madde dirençliliği, yeni kuşak maddelerin kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Mikroorganizmalarda gelişen değişik antimikrobiyel madde dirençlilik mekanizmalarıyla, hastane kaynaklı enfeksiyonlar olarak adlandırılan yeni sağlık problemleriyle son zamanlarda daha fazla karşılaşılmaktadır.

Gerçekleştirilen bu çalışmada, önemli sağlık sorunlarına neden olan ve zamanla çeşitli antimikrobiyel maddelere karşı direnç geliştiren *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı, Dünya'daki en önemli rezervleri ülkemizde bulunan bor madeninin bir yan ürünü olan borik asidin antibakteriyel etkinliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bakteri Suşları

Çalışmada, Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonlarından sağlanan *L. monocytogenes* (ATCC® 7644) ve *S. aureus* (ATCC® 25923) suşları kullanıldı.

Bakteri Sulandırmalarının Belirlenmesi

Bakteri kültürlerinden Brain Heart Infusion Broth'a (BHIB, pH: 7.2) (299070, BD, France) ekimler yapılarak, 37°C'de ve aerobik ortamda 24-48 saat inkube edildi. Üreyen bakteri kültürlerinden çizme yöntemiyle Brain Heart Infusion Agar'a (BHIA, pH: 7.2) (53286, BD, France) pasaj yapılarak, kültürlerin saflık kontrolleri yapıldı. BHIB'ta üreyen saf bakteri kültürlerinden alınarak, steril fizyolojik tuzlu suda (FTS, pH: 7.2), log₂ tabanına göre 10 katlı sulandırmalar yapıldı. Her sulandırmadan 2 adet BHIA'a ekimler yapılarak, 37°C'de ve aerobik ortamda 24 saat inkube edildi. Üreyen koloniler çıplak gözle sayılarak, cfu/ml olarak sayıları saptandı. Böylece yaklaşık olarak McFarland Standart Tüp No: 0.5 yoğunluğunda bakteri sulandırmaları belirlendi (Arda 1985).

Borik Asidin Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonunun (MBK) Belirlenmesi

Borik asidin MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesinde National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) kriterleri dikkate alındı (NCCLS 2000). Çalışmada ticari borik asit (H₃BO₃, M: 61.83 g/mol) (A2940, Applichem, Darmstadt, Germany) kullanıldı. MBK amacıyla borik asit içeren FTS ile dilue edilen bakteri sulandırmalarının her birinden 2 adet BHIA'a ekimler yapılarak, 37°C'de ve aerobik ortamda 24 saat üretildi. Bakteri üremeleri çıplak gözle değerlendirildi.

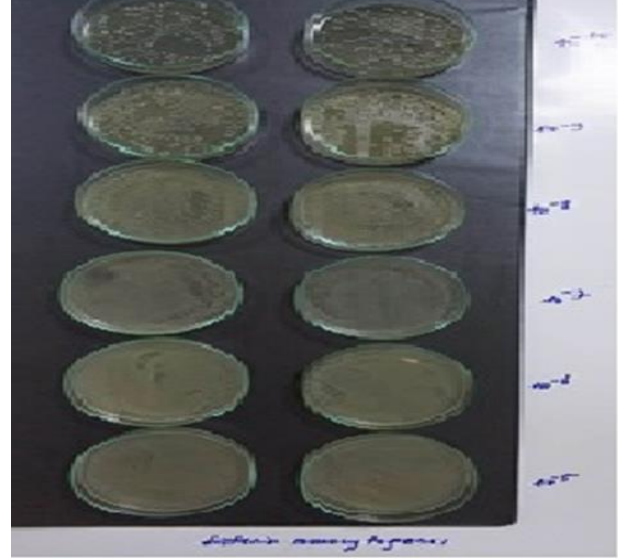
Pozitif ve Negatif Kontroller

Çalışma kapsamında pozitif kontrol olarak borik asit içermeyen bakteri kültürü (McFarland No: 0.5), negatif kontrol olarak ise bakteri içermeyen steril distile su kullanıldı ve değerlendirmeler aynı şekilde çıplak gözle yapıldı.

BULGULAR

Bakteri Sulandırmaları

Teste kullanılan bakteri sulandırmaları *L. monocytogenes* için 2.4X10⁶ cfu/ml, *S. aureus* için ise 1.8X10⁶ cfu/ml olarak belirlendi (Şekil 1 ve 2).



Şekil 1. Log₂ tabanına göre 10 katlı dilusyonu yapılan *L. monocytogenes* (BHIA).

Figure 1. 10 fold dilution of *L. monocytogenes* based on log₂ (BHIA).

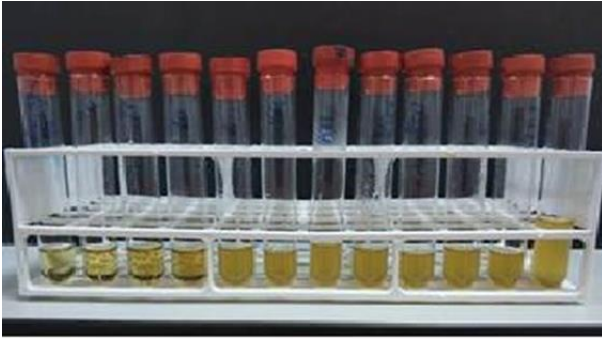


Şekil 2. Log₂ tabanına göre 10 katlı dilusyonu yapılan *S. aureus* (BHIA).

Figure 2. 10 fold dilution of *S. aureus* based on log₂ (BHIA).

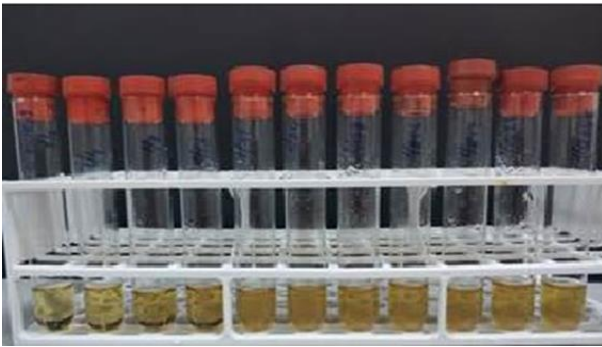
Borik Asidin MİK ve MBK Değerleri

Borik asidin MİK ve MBK konsantrasyonu *L. monocytogenes* için 1/32 (1.93 mg/ml), *S. aureus* için ise 1/16 (3.80 mg/ml) olarak belirlendi (Şekil 3 ve 4) (Tablo 1).



Şekil 3. Borik asidin *L. monocytogenes* üzerine MİK göstergesi.

Figure 3. MIC values of boric acid for *L. Monocytogenes*.



Şekil 4. Borik asidin *S. aureus* üzerine MİK göstergesi

Figure 4. MIC values of boric acid for *S. aureus*

Tablo 1. Borik asidin *L. monocytogenes* ve *S. aureus* üzerine olan MİK değerleri

Table 1. MIC values of boric acid for *L. monocytogenes* and *S. aureus*

Bakteri türü	Sulandırma oranı	Borik asit miktarı (mg/ml)	Molarite	Normalite
<i>L. monocytogenes</i>	1/32	1.93	0.03125	0.09375
<i>S. aureus</i>	1/16	3.80	0.0626	0.1875

TARTIŞMA ve SONUÇ

İlk antibiyotiğin Alexander Fleming tarafından keşfinden itibaren çeşitli bakteriler, farklı antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiştir (Quinn ve ark. 2011). Dünya Sağlık Örgütü yayımladığı bildirilerle yeni antibiyotiklerin keşfedilmemesi durumunda çok önemli sağlık sorunlarının yaşanabileceğine dikkat çekmektedir (WHO 2014). Bu nedenle çalışmamız, bor madeninin Dünya'daki en önemli rezervi konumundaki ülkemize ait bu elementin bir yan ürünü olan borik asidin *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesine yönelik bir ön çalışma olarak gerçekleştirildi.

Bor ve bor ürünleri sağlık alanında antimikrobiyel özelliğinden dolayı antiseptik olarak lens solüsyonlarında, kremlerde, gargara ve göz damlaları gibi birçok tıbbi ürünün bileşiminde bulunmaktadır (Baker ve ark. 2009; Demirci ve ark. 2015b; Kuru ve Yarat 2017).

Diğer yandan kemik ve eklem hastalıklarıyla, alerjik hastalıklar, yanık tedavileri, yara iyileşmesi, psikiyatri ve menopoz tedavileriyle nükleer tıpta borla nötron aranması

gibi oldukça geniş alanlarda kullanılmaktadır (Baker ve ark. 2009; Nielsen ve Meacham 2011; Yakıncı ve Kök 2016; Kuru ve Yarat 2017). Borik asit ise genellikle antiseptik, böcek ilacı ve koku gidericilerde kullanılan, suda çözünen, kokusuz ve beyaz renkli kristallerden oluşan inorganik bir maddedir. Antibakteriyel özelliğe sahip olan borik asit, Wilhelm Holmberg tarafından bulunmuş olup, sülfürik asidin yan ürünü olarak ortaya çıkmıştır (Haesebrouck ve ark. 2009; Yılmaz 2012).

Dünyanın farklı bölgelerinde çeşitli bakterilere karşı yoğun olarak yeni antibakteriyellerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir (Concia ve ark. 2016). Bazı araştırmacılar ise borik asidin aktibakteriyel etkinliğinin belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirmiştir. Haesebrouck ve ark. (2009), %2'lik borik asit ve %2'lik asetik asitin eşit miktarlarda karıştırılmasıyla elde edilen solüsyonun 1/2 ve 1/4'lük sulandırmalarında, 5×10^7 cfu/ml miktarındaki *S. pseudintermedius*'u 30 dakikada inaktive ettiğini, borik asidin söz konusu aktivitesi için asetik asitle birlikte kombine edilmesinin daha etkili sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir. Ülkemizde insanlarda yapılan bir çalışmada, ağıza uygulanan borik asit solüsyonunun *Enterococcus faecalis* üzerine güçlü aktibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (Zan ve ark. 2013). Yılmaz (2012), borik asit ve boraksın *S. aureus*, *Acinetobacter septicus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı MİK ve MBK değerlerini sırayla 3.80 mg/ml, 3.80 mg/ml, 7.60 mg/ml ve 7.60 mg/ml olarak saptadığını bildirmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmada, borik asidin MİK ve MBK değerleri *L. monocytogene* için 1/32 (1.93 mg/ml), *S. aureus* için ise 1/16 (3.80 mg/ml) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen borik asitin *S. aureus* üzerine olan antibakteriyel etki değeriyle, Yılmaz (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmadan elde edilen değer, birbiriyle benzerlik göstermektedir. Bu durum, borik asitin *S. aureus* üzerine olan antibakteriyel etkinliğinin 3.80 mg/ml olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada *L. monocytogenes* için belirlenen antibakteriyel etkinliğin *S. aureus*'a göre düşük değerde bulunması, *L. monocytogenes*'in *S. aureus*'a göre borik asidin antibakteriyel etkinliğine daha duyarlı olması veya *S. aureus*'un hücre yapısının daha güçlü olmasıyla açıklanabilir.

Sonuç olarak, önemli insan ve hayvan patojenleri olan *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı borik asidin antibakteriyel etkinlik bakımından önemli bir potansiyele sahip olduğu, bu nedenle farklı bakteri türlerini içeren daha ayrıntılı *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

- Akbar W, Noor MR, Kowal K, Syed T, Soulimane T, Basim GB (2017).** Characterization and antibacterial properties of nanoboron powders and nanoboron powder coated textiles. *Adv Powder Technol*, 28 (2), 596-610.
- Arda M (1985).** Genel Bakterioloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, 3. Baskı, Ankara.
- Baker SJ, Ding CZ, Akama T, Zhang YK, Hernandez V, Xia Y (2009).** Therapeutic potential of boron-containing compounds. *Future Med Chem*, 1 (7), 1275-1288.
- Concia E, Mazzaferrri F, Cordioli M (2016).** New antibiotic development: Barriers and opportunities. *Ital J Med*, 10, 255-271.
- Demirci S, Doğan A, Karakuş E ve ark. (2015a).** Boron and poloxamer (F68 and F127) containing hydrogel formulation for burn wound healing. *Biol Trace Elem Res*, 168 (1), 169-180.
- Demirci S, Kaya MS, Doğan A ve ark. (2015b).** Antibacterial and cytotoxic properties of boron-containing dental composite. *Turk J Biol*, 39 (3), 417-426.
- Demirtaş A (2010).** Bor'un insan beslenmesi ve sağlığı açısından önemi. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg*, 41 (1), 75-80.

- Evirgen Ö (2005).** *Listeria monocytogenes* infeksiyonu; Kliniği, tanı ve tedavi özellikleri. Van Tıp Derg, 12 (1), 32-35.
- Haesebrouck F, Baele M, De Keyser H, Hermans K, Pasmans F (2009).** Antimicrobial activity of an acetic and boric acid solution against *Staphylococcus pseudintermedius*. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 78 (2), 89-90.
- Kuru R, Yarat A (2017).** Bor ve sağlığımıza olan etkilerine güncel bir bakış. Clin Exper Health Sci, 7 (3), 107-115.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2000).** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved-standard fifth edition, Wayne (PA).
- Nielsen FH, Meacham SL (2011).** Growing evidence for human health benefits of boron. JEBCAM, 16 (3), 169-180.
- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick ES (2011).** Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Wiley-Blackwell, 2nd Edit, Dublin.
- Şen E, Özdemir H (2016).** *Staphylococcus aureus*'un antibiyotik dirençliliği ve halk sağlığı açısından önemi. Elektronik Mikrobiyoloji Derg, TR, 14 (1), 20-35.
- Yakıncı ZD, Kök M (2016).** Borun sağlık alanında kullanımı. İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi, 4 (1), 36-44.
- Yılmaz MT (2012).** Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. Turk J Med Sci, 42 (Sup. 2), 1423-1429.
- World Health Organization (WHO) (2014).** Antimicrobial Resistance Global Report On Surveillance. [www.http://file:///C:/Users/Veteriner/Downloads/9789241564748_eng%20\(1\).pdf](http://file:///C:/Users/Veteriner/Downloads/9789241564748_eng%20(1).pdf) (Erişim: 4 Mart 2019).
- Zan R, Hubbezoglu I, Ozdemir AK, Tunç T, Sumer Z, Alıcı O (2013).** Antibacterial effect of different concentration of boric acid against *Enterococcus faecalis* biofilms in root canal. Marmara Dental J, 1 (2), 76-80.