

Probiyotik Etkili *Bifidobacterium longum* ATCC 15707'nin, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213'e İn-vitro Etkisinin Real-Time PCR Yöntemi ile İncelenmesi

Akın Yiğın^{1*}, Mehmet Demirci²

¹Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik AD, Şanlıurfa, Türkiye.

²Beykent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD. İstanbul, Türkiye.

Geliş Tarihi: 25.10.2018

Kabul Tarihi: 03.12.2018

Özet: *Staphylococcus aureus*, kommensal bir bakteri olarak hem insanla birlikte yaşayan, hem de uygun fırsatı bulduğunda ciddi fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilen önemli bir patojendir. *Bifidobacterium* cinsi bakteriler probiyotik olarak kullanılan ana mikroorganizmalardır. Bu cinslere ait çok sayıda türün, konağın sağlığını iyileştirmede güvenli ve etkili olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızın amacı, probiyotik etkili *Bifidobacterium longum* ATCC 15707'nin, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213'e suşları üzerine etkisinin Real-Time PCR yöntemi ile araştırmaktır. 3 tane brain-heartin fusion broth (Oxoid) besiyeri içeren tüp hazırlandı. Tüm tüplere 10^3 CFU/mL olacak şekilde *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kökeninden ilave edildi. 1. tüp kontrol olarak kalırken, 2. tüpe 10^3 CFU/mL olacak şekilde, 3. tüpe de 10^6 CFU/mL olacak şekilde *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 kökeni ilave edildi. İnkübasyonun 6., 12., 24. saatlerinde tüplerden alınan numunelerden DNA izolasyonu yapıldı ve bu numunelerden LightCycler 480 sisteminde Real-Time PCR ile kantitatif olarak *S. aureus* miktarları saptandı. Birinci tüpte 6. saatte 523.333 ± 8993 kopya/mL düzeyinde saptanan *S. aureus*, farklı tüplerde sırasıyla 10^3 ve 10^6 CFU/mL miktarlarında *B. longum* kökeni ile birlikte inkübe edildiğinde bu miktarların düştüğü olduğu bulundu. Sonuç olarak, çalışmamızda, probiyotik etkili *Bifidobacterium longum*'un, *Staphylococcus aureus*'un in vitro ortamda üremesini etkilediği ve bakteri sayısının etki düzeyini arttırdığı saptanmıştır. Probiyotiklerin etkilerinin gnotobiyotik hayvan modellerinde veya daha kapsamlı çalışmalarla incelenerek, ilaç dirençlerinin çok yoğunlaştığı günümüzde, önemli patojenlere karşı antimikrobiyal olarak yarar sağlayabileceği düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler: *Bifidobacterium longum*, *Staphylococcus aureus*, Real-Time PCR.

Investigation of In vitro Effects of Probiotic *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 on *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 by Real-Time PCR

Abstract: *Staphylococcus aureus* is an important pathogen which is both a commensal bacterium living with humans and can also cause serious infections when it has the opportunity. *Bifidobacterium* species are the main microorganisms used as probiotics. It has been reported that many species of this genus are safe and effective in improving the health of the host. The aim of this study was to investigate the effect of probiotic *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 strain on *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 strain by using with Real-Time PCR method. Three tubes containing brain-heartin fusion broth (Oxoid) were prepared. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was inoculated into two tubes at a concentration of 10^3 CFU/mL while the one of the tubes remained as control. *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 strain was added into the second and third tubes at a concentration of 10^3 CFU/mL and 10^6 CFU/mL respectively. DNA isolation was performed from the samples taken from tubes at 6th, 12th and 24th hours of incubation and quantitative *S. aureus* amounts were determined by Real-Time PCR by using LightCycler 480 system. *S. aureus* amounts were found as 523.333 ± 8993 copies/mL at the 6th hour in the first tube, while we found that the number of *S. aureus* was reduced in the tubes added with *B. longum* strains for 10^3 and 10^6 CFU/mL, respectively. In conclusion, *B. longum*, which is considered as a probiotic, affected the growth of *Staphylococcus aureus* in-vitro and the reducing effect of *B. longum* can increase along with the number. The effects of probiotics can be investigated in gnotobiotic animal models or in more comprehensive studies and we think that using *B. longum* can be beneficial against important pathogens such as *Staphylococcus aureus* in order to prevent antibiotic resistance.

Keywords : *Bifidobacterium longum*, *Staphylococcus aureus*, Real-Time PCR.

Giriş

Staphylococcus aureus, kommensal bir bakteri olarak hem insanla birlikte yaşayan, hem de uygun fırsatı bulduğunda ciddi fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilen önemli bir patojendir (Tong ve ark., 2015). *S. aureus*, toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı bakteriyel enfeksiyonların önde gelen

nedenlerinden birisidir ve enfeksiyonlarda gözlenen bakteriyemilerin en yaygın nedenlerinden biridir. Diğer bakteriyel enfeksiyon etkenlerine göre daha yüksek mortalite oranına sahiptir (Brown ve ark., 2013). *S. aureus*'taki antibiyotik direnci tehdidi birkaç yıldır büyük ölçüde artmış ve bu nedenle tüm

dünyada sağlık maliyetleri önemli ölçüde artmıştır (Reddy ve ark., 2017). Antibiyotik dirençli kökenlerin oluşumu, hem hatalı replikasyona bağlı olarak veya kökenler arasında direnç özelliklerin değişmesinden dolayı ortaya çıkan doğal bir süreçtir. Bu süreç, antibiyotiklerin kötüye kullanımı yoluyla, antibiyotiğe dirençli kökenlerin seçimine yol açabilir. *S. aureus* kökenlerinin çeşitli çevre koşullarına virülans faktörleri ile hızlı uyum yeteneği onu direnç konusunda öne çıkarmaktadır (Bone, 1994; Reddy ve ark., 2017). Probiyotikler, yeterli miktarlarda uygulandığında konakta bir sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanır (Hungin ve ark., 2013). Son on yılda probiyotiklerin artan sıklıkta tüketildiği görülmektedir. Enfeksiyonlara karşı koruyucu önlem olarak, hem gıda ürünlerinde, hem de besin takviyelerinde probiyotiklerin kullanımını destekleyen bildirimler bulunmaktadır (Lenoir ve ark., 2016). Probiyotikler için ticari alanda küresel bir pazar oluşmuş ve bu ürünleri farklı enfeksiyonları olan bireyler iyileşebilmek için veya sağlıklı bireylerde bağışıklık sistemlerini modüle etmek ve bağırsak mikrobiyotasının dengesini sağlamak için sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun sonucunda artan talep nedeniyle probiyotikler için oluşan bu pazar büyümektedir (Toscano ve ark., 2017). *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakteriler probiyotik olarak kullanılan ana mikroorganizmalardır ve gerçekten de, bu cinslere ait çok sayıda türün, konağın sağlığını iyileştirmede güvenli ve etkili olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2018; Toscano ve ark., 2017). *Bifidobacterium longum*, sağlıklı insanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunan gram-pozitif bir bakteridir. Yapılan çalışmalarda, *B. longum* ile ilişkili faydalar nedeniyle, genellikle probiyotik gıdalar ve diyet takviyelerine eklenmektedir. Ayrıca *B. longum*'un ticari ürünlerde probiyotik olarak kullanılan en yaygın *Bifidobacteria* türü olduğu söylenebilir (Wei ve ark., 2018). Tüm bu bilgiler ışığında, bizde çalışmamızda, probiyotik etkili *Bifidobacterium longum* ATCC 15707'nin, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213'e in-vitro etkisinin Real-Time PCR yöntemi ile inceleyerek, farklı zamanlarda yapacağımız kontrollerle, *S. aureus* çoğalmasına kantitatif etkisini incelemeyi amaçladık.

Materyal ve Metot

Çalışmamız için *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kökenleri temin edildi. 3 tane brain-heartinfusionbroth (Oxoid) besiyeri içeren tüp hazırlandı. Tüm tüplere 10^3 CFU/mL olacak şekilde

Staphylococcus aureus ATCC 29213 kökeninden ilave edildi. 1. tüp'e *S. aureus* dışında herhangi bir ekleme yapılmadı. 2. Tüpe 10^3 CFU/mL olacak şekilde, 3. tüpe de 10^6 CFU/mL olacak şekilde *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 kökeni ilave edildi. Böylelikle 2. tüpte (1:1) (*S. aureus*:*B. longum*) ve 3. tüpte (1:2) oranında bakteri karışımı elde edildi. Her 3 tüp etüvde 37°C 'da anaerobik ortamda inkübe edildi. İnkübasyonun 6., 12., 24. saatlerinde tüplerden alınan 200 µl numunelerden *S. aureus* kantitasyonu için High Pure PCR Template kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ile üretici direktifleri doğrultusunda izolasyon gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'lar Real-Time PCR işlemlerine kadar -20°C 'da saklandı. *S. aureus* kantitatif miktarını belirlemek için *Staphylococcus aureus* Genesig Advanced kit (Primer Design, UK) kullanıldı. Real-time PCR protokolü; 95°C 'da 2 dakika denatürasyonu takiben, 95°C 'da 10 sn ve 60°C 'da 60 sn olacak şekilde 50 siklusluk çoğaltma şeklindeydi. Real-time PCR işlemleri LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) sisteminde gerçekleştirildi. Kitte bulunan kantitatif standartlar ile çizilen standart eğri üzerinden numunelerdeki *S. aureus* kantitatif miktarı belirlendi. Tüm Real-Time PCR işlemleri 3 kere tekrar edildi.

Bulgular

Çalışmamızda, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213'un *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 ile birlikte inkübasyonu sonucunda, 6. 12. ve 24. Saatte Real-Time PCR'la saptanan değişimi Tablo 1'de gösterilmiştir. 1. tüpte 6. saatte 523.333 ± 8993 kopya/mL düzeyinde saptanan *S. aureus*, farklı tüplerde sırasıyla 10^3 ve 10^6 CFU/mL miktarlarında *B. longum* kökeni ile birlikte inkübe edildiğinde bu miktarların düştüğü saptandı. *S. aureus* kökenleri daha yüksek konsantrasyonda *B. longum*'la birlikte inkübe edildiğinde üremeye olan negatif etkinin daha da arttığı saptandı. Real-time PCR'la 24. saatte her üç tüpte elde edilen kantitatif *S. aureus* miktarı Şekil 1'de görülmektedir.

Tartışma

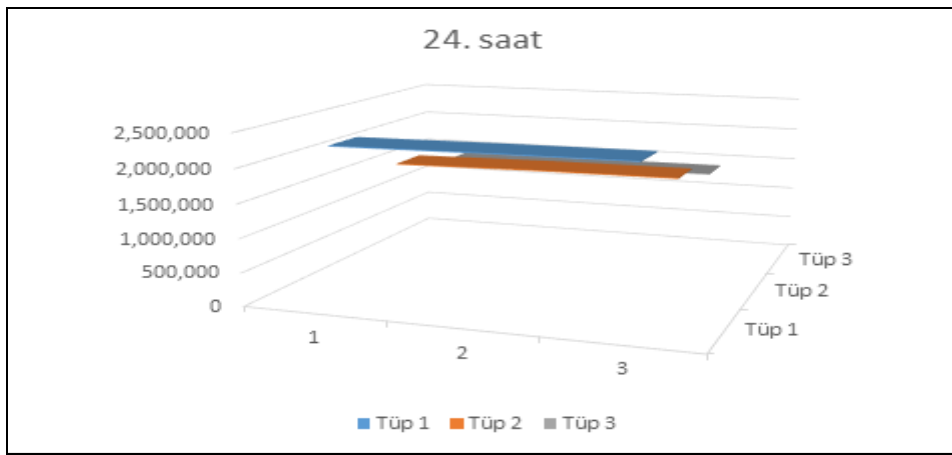
Çeşitli çalışmalarda, probiyotik etkili *Bifidobacterium* cinsi bakteriler tarafından mikrobiyal patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri bildirilmiştir. Buna karşın, bu etkinin altında yatan mekanizma net değildir. Ortam pH'sının azaltılması, beslenme kaynakları için rekabet, organik asitlerin ve bakteriyosin üretimi gibi nedenler kaynaklı olarak multifaktöriyel olduğu kabul edilmektedir (Muñoz-Quezada ve ark., 2013).

Hatta bazı probiyotiklerin, bakteri ve mantarların büyümesini engelleyen metabolitler ürettiği de

bildirilmiştir (Muñoz-Quezada ve ark., 2013; Wang ve ark., 2012).

Tablo 1. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213'ün *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 ile birlikte inkübe edilmesi sonucu alınan Real-Time PCR sonuçlarının (10^3 kopya/mL) dağılımı.

	10^3 CFU/mL <i>S. aureus</i>			10^3 CFU/mL <i>S. aureus</i> ve 10^3 CFU/mL <i>B. longum</i>			10^3 CFU/mL <i>S. aureus</i> ve 10^6 CFU/mL <i>B. longum</i>		
	6. saat	12. saat	24. saat	6. saat	12. saat	24. saat	6. saat	12. saat	24. saat
1	524	2.120	2.280	380	1.420	1.680	275	1.280	1.430
2	512	2.130	2.300	370	1.390	1.710	265	1.290	1.410
3	534	2.150	2.310	365	1.410	1.720	268	1.260	1.420
Ortalama	523.3	2.133	2.296	371.67	1.406	1.703	269	1.276	1.420
SD	89.93	12.47	12.47	62.36	12.47	16.99	41.89	12.47	81.64



Şekil 1. *S. aureus* ve *B. longum* birlikte inkübe edildiğinde 24. saatte alınan örneklerde Real-Time PCR'la saptanan kopya/mL miktarlarının dağılımı.

Yapılan çalışmaları incelediğimizde, Lazarenko ve ark. (2012)'nin, *B. longum* dâhil farklı probiyotik kökenleri *S. aureus* kökenlerine karşı in vitro olarak denemiş ve bunlarda antagonistik bir aktivite gözlemediklerini bildirmişlerdir. Silva ve ark. (2018)'nin yaptıkları bir çalışmada ise *S. aureus* kökenlerinin in vitro ortamda üremelerine karşı farklı *Bifidobacterium* türlerini yine denemişler ve bunlarda en yüksek antagonistik aktivitenin *B. longum*'da olduğunu saptamışlardır. Phoem ve ark. (2015)'nin yaptıkları çalışmada, *B. longum* gibi probiyotiklerin özellikle bakteriyel kirlenmede süt ve tofu gibi ürünlerde yararlı olduğunu ve ürünlere probiyotik katıldığında, bunun ürünün raf ömrünü uzattığını bildirmiştir. Lee ve ark. (2012)'nin, *Bifidobacterium* türlerinin *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesinin olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, ayrıca *Bifidobacterium* türlerinin konaktaki antiinflamatuvar etkileri incelenmiş ve sitokin üretimini, makrofajların aktivasyonunu göstermek için kontrol edilmiştir. *Bifidobacterium* türlerinin makrofaj aktivatörlerinin üretimini arttırdığını ve bununla immun fonksiyonların etkisini değiştirdiğini belirtmişlerdir (Lee ve ark., 2015). Lkhagvadorj ve ark. (2010)'nin *Bifidobacteria*

breve'nin metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonları tedavisinde farelerde kullanımını denemişler ve bu fare modellerinde ölümcül olan MRSA enfeksiyonunu, probiyotikler ile tedavi ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, *Bifidobacterium* kökenlerinin antibakteriyel aktivitesinin, bağışıklık yanıtını artırma yetenekleri ile ilişkili olduğunu saptamışlar ve enfekte olmuş farelerin CD3+ ve/veya CD4+ splenositlerinin sayısının, probiyotik kültürler almayan enfekte olmuş farelere kıyasla 3. günde kontrol seviyesine yükseldiğini ve 9. günde de CD19+ hücrelerinin sayısı arttığını tespit etmişlerdir (Lkhagvadorj ve ark., 2010). Tüm bu çalışmalardaki veriler araştırmamızın verilerini destekler görülmekte ve ortamdaki *Bifidobacterium* miktarında, *S. aureus*'u farklı yollarla etkilediği görülmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda, probiyotik etkili *Bifidobacterium longum*'un, *Staphylococcus aureus* kökenlerini in vitro ortamda etkilediği ve köken sayısının etki düzeyini arttırdığı saptanmıştır. Probiyotiklere olan ilginin artmasına karşın, hastalıklarda karşılaştığımız patojenlere karşı bu kökenlerin etkileri ile ilgili araştırmalar sınırlıdır. Bu çalışmanın bu yönde literatüre katkı sağlayabileceği

ve yeni araştırmalara teşvik edebileceği kanaatindeyiz. Probiyotiklerin etkilerinin gnotobiyotik hayvan modellerinde veya daha kapsamlı çalışmalarla incelenerek, ilaç dirençlerinin çok yoğunlaştığı günümüzde, önemli patojenlere karşı yarar sağlayabileceği düşüncesindeyiz.

Kaynaklar

- Bone RC, 1994: Gram-positive Organisms and Sepsis. *Arch Intern Med*, 154, 26-34.
- Brown AF, Leech JM, Rogers TR, Mc Loughlin RM, 2013: *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design. *Frontiers in Immunology*, 4, 507.
- Hungin APS, Mulligan C, Pot B, P. Whorwell P, Agréus L, Fracasso P, Lionis C, Mendive J, Philippart J.M, Rubin G. Winchester C, Wit N, 2013: Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice—an evidence-based international guide. *Alim Phar&Therap*, 38, 864-886.
- Kim MJ, Ku S, Kim SY, Lee HH, Jin H, Kang S, Li R, Johnston TV, Park MS, Ji Ge, 2018: Safety evaluations of bifidobacterium bifidum bgn4 and bifidobacterium longum bori. *Inter JI of Mol Sci*, 19, 1422.
- Lazarenko L, Babenko L, Sichel LS, Pidgorskyi V, Mokrozub V, Voronkova O, Spivak M, 2012: Antagonistic action of lactobacilli and bifidobacteria in relation to *Staphylococcus aureus* and their influence on the immune response in cases of intravaginal staphylococcosis in mice. *Prob and Antimicr Prot*, 4, 78-89.
- Lee DK, Kim MJ, Ham JW, An HM, Cha MK, Lee SW, Park CI, Shin SH, Lee KO, Kim KJ, Ha NJ, 2012: In-vitro evaluation of antibacterial activities and anti-inflammatory effects of Bifidobacterium spp. Address in *gacnevulgaris*. *Arch Pharm Res*, 35, 1065-71.
- Lenoir-Wijnkoop I, Gerlier L, Roy D, Reid G, 2016: The clinical and economic impact of probiotics consumption on respiratory tract infections: projections for Canada. *Plos One*, 11, 11.
- Lkhagvadorj E, Nagata S, Wada M, Bian L, Wang C, Chiba Y, Yamashiro Y, Shimizu T, Asahara T, Nomoto K, 2010: Anti-infectious activity of synbiotics in a novel mouse model of methicillin-resistant. *Microbiol Immunol*, 54, 265-275.
- Muñoz-Quezada S, Bermudez-Brito M, Chenoll E, Genovés S, Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, Matencio E, Bernal MJ, Romero F, Ramón D, Gil A, 2013: Competitive inhibition of three novel bacteria isolated from faeces of breast milk-fed infants against selected enteropathogens. *Br J Nutr*, 109, 63-69.
- Phoem AN, Chanthachum S, Voravuthikunchai SP, 2015: Applications of micro encapsulated bifidobacterium longum with eleutherine americana in fresh milk tofu and pineapple juice. *Nutrients*, 7, 2469-2484.
- Reddy PN, Srirama K, Dirisala VR, 2017: An update on clinical burden, diagnostic tools, and the rapeutic options of *Staphylococcus aureus*. *Infectious Diseases*, 10, 1-15.
- Silva AKS, Silva TRN, Nicoli JR, Vasquez-Pinto LMC, Martins FS, 2018: In-vitro evaluation of antagonism, modulation of cytokines and extra cellular matrix proteins by bifidobacterium strains. *Lett Appl Microbiol*, 67, 497-505.
- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, 2015: *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Micro Rev*, 28, 603-661.
- Toscano M, De Grandi R, Stronati L, De Vecchi E, Drago L, 2017: Effect of *Lactobacillus rhamnosus* hn001 and *Bifidobacterium longum* bb536 on the healthy gut microbiota composition at phyla and species level: a preliminary study. *World Journal of Gastroenterology*, 23, 2696-2704.
- Wang H, Yan Y, Wang J, Zhang H, Qi W, 2012: Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS ONE*, 7, 29452.
- Wei Y, Yang F, Wu Q, Gao J, Liu W, Liu C, Guo X, Suwal S, Kou Y, Zhang B, Wang Y, Zheng K, Tang R, 2018: Protective effects of Bifidobacterial strains against toxigenic *Clostridium difficile*. *Fron in Micr*, 9, 888.

***Sorumlu Yazar:** Akın YİĞİN,
Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik AD,
Şanlıurfa, Türkiye
E-mail: akinyigin@yahoo.com