

BİYOFİLMDE SÜLFAT İNDİRGEYEN ANAEROP BAKTERİLER*

Ayşın ÇOTUK*, Esra İLHAN-SUNGUR*, Nurhan CANSEVER**

* İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Vezneciler, İSTANBUL

** Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, Davutpaşa Kampüsü, Esenler, İSTANBUL

ÖZET

Anaerop sülfat indirgeyen bakteriler (SRB), insan barsak sisteminde oluşan biyofilm tabakası içinde yaşayabilmekte ve kükürt bileşiklerini sitotoksik bir ürün olan hidrojen sülfür (H₂S) indirgemektedirler. H₂S, insanlarda ülseratif kolite neden olurken, SRB sepsisemiye ve karaciğer absesine yol açmaktadır. H₂S'e ek olarak, SRB'in ürettiği ekstraselüler polimerik maddelerden O-antijeni, genetik olarak yatkın bireylerde immün yanıtı neden olabilmekte ve ülseratif kolitin karakteristik özelliği olan iltihaplanma sürecini başlatabilmektedir.

Su deposu malzemesi olarak çoğunlukla galvaniz çelik kullanılmaktadır ve su depoları mikroorganizmaların özellikle de SRB'in üremesine uygun ortamlara sahiptir. Bu çalışmada SRB'in galvanizli çelik üzerinde biyofilm oluşturabilme ve varlıklarını sürdürebilme yetenekleri incelenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) mikrografları ile SRB'in galvanizli çelik yüzeye tutunabildikleri ve kolonize olabildikleri gösterilmiştir. Hem kültürdeki (planktonik) hem de biyofilmdeki (sessil) SRB, maksimum sayıya 72. saatte ulaşmışlar ve sırasıyla 9.6 hücre/ml ve 8.04 hücre/cm² olarak saptanmışlardır.

Anahtar sözcükler: biyofilm, galvanizli çelik, kolit, sülfat indirgeyen bakteriler

SUMMARY

Sulphate Reducing Anaerobic Bacteria in Biofilm

Anaerobic sulphate reducing bacteria (SRB) can live in biofilm layer formed within the human gastrointestinal system and reduce sulfur compounds to hydrogen sulfide (H₂S) that is a cytotoxic product. While H₂S causes ulcerative colitis in human, SRB trigger liver abscess and septicemia. In addition to the effect of H₂S, extracellular polymeric substances produced by SRB may contain highly immunogenic O-antigen. Such antigens may cause an immune response in genetically predisposed individuals and initiate to the inflammatory process characteristic of ulcerative colitis.

Galvanized steel is frequently used in construction of water containers which have good conditions for growing of microorganisms especially SRB. In this study we investigated SRB's abilities of biofilm formation and surviving on surfaces of galvanized steel. SEM shows that SRB could attach to galvanized steel surface and colonize on the surface. The cell concentrations of planktonic and sessile SRB increased to a maximum of 9.6 cells/ml and 8.04 cells/cm² after 72 hours of incubation, respectively.

Keywords: biofilm, colitis, galvanized steel, sulphate reducing bacteria

Yazışma adresi: Esra İlhan-Sungur. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Vezneciler, İSTANBUL
Tel.: (0212) 455 57 00/15074

e-posta: esungur@istanbul.edu.tr

Alındığı tarih: 03.08.2005; revizyon kabulü: 22.11.2005

* 20. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi'nde sunulmuştur (22-26 Mayıs 2005, Antalya).

GİRİŞ

Sülfat indirgeyen bakteriler (SRB) çok farklı habitatlardan izole edilebilmektedir. Bu durum onların doğada oldukça yaygın olduklarını göstermektedir. Deniz, nehir veya göl sedimentleri bu bakterilerin tipik habitatlarıdır⁽²¹⁾. Ayrıca petrol yatakları, çeltik tarlaları, maden atık suları, soğutma kuleleri ve atık arıtım tesisleri gibi tarımsal ve endüstriyel su sistemlerinde de yaşayabildikleri belirtilmiştir^(7,10,14,15,18). Bunların dışında yüksek ve aşağı organizasyonlu hayvanlar ile, insanların bağırsaklarından da izole edilmektedirler^(8,12). Sülfat indirgeyen bakteriler, ortamda bulunan sülfat (SO₄) iyonlarını son elektron alıcısı olarak kullanarak bunları asidik bir ürün olan hidrojen sülfüre (H₂S) indirgemektedirler^(9,21). Oluşan H₂S'ün çelik, karbon çelik gibi metallerde çok ciddi korozyon hasarlarına neden olması birçok endüstriyel çevreyi olumsuz etkilemektedir. Ayrıca H₂S'ün toksik etkisi, çalışanların sağlığı ve güvenliği açısından da büyük bir tehlike oluşturmaktadır^(11,15).

Endüstriyel çevre ve dolayısıyla ekonomik açıdan önemli olan SRB, aynı zamanda insan sağlığına önemli ölçüde zarar verebilmektedirler. Anaerop SRB, insan barsak sisteminde oluşan biyofilm tabakası içinde yaşayabilmekte ve kükürt bileşiklerini sitotoksik bir ürün olan H₂S'e indirgemektedirler. H₂S, insanlarda ülseratif kolite neden olurken, SRB septisemiye ve karaciğer absesine yol açmaktadır^(12,13,19). H₂S'e ek olarak, SRB ürettiği ekstraselüler polimerik maddelerden O-antijeni, bireylerde immün yanıtı neden olabilmekte ve ülseratif kolitin karakteristik özelliği olan iltihaplanma sürecini başlatabilmektedir^(16,17). Doğal yaşama alanı su olan SRB, insan vücuduna içme veya deniz suyunun ağız yolu ile alınmasıyla girmektedir. Galvanizli çelik sac, antifauling özelliği ve korozyona dirençli olması nedeniyle su depolarının ve borularının yapımında tercih edilen bir malzemedir. Su depoları ve boruları bazen durağan, bazen ise çok hareketli olduklarından, mikroorganizmaların özellikle SRB'lerin üremesine ve yayılmasına uygun ortamlardır⁽⁶⁾. Bu bağlamda çalışmada SRB'lerin galvanizli çelik sac üzerinde biyofilm oluşturabilme ve varlıklarını sürdürebilme yetenekleri incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

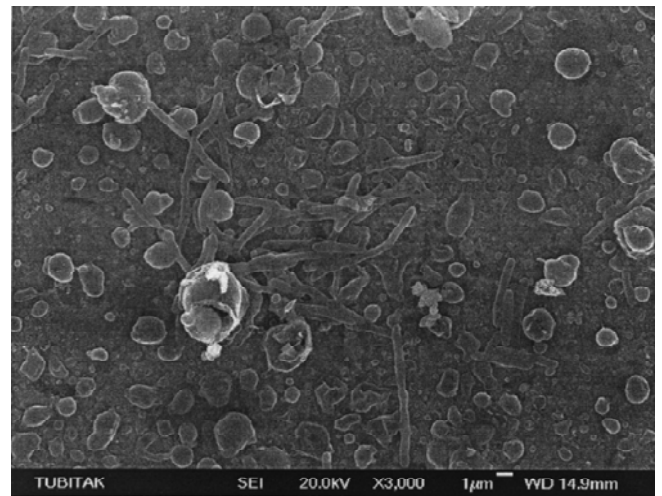
Deneylerde, soğutma kulesi yapımında kullanılan galvanizli çelik sac kullanılmıştır. Galvanizli çelik, piyasadan levha halinde alınmış ve 20 x 20 x 0.5 mm boyutlarında kesilerek deney kuponları elde edilmiştir. Deneyler, anaerop kavanoz içine yerleştirilmiş olan 1 litre hacimli cam beherde gerçekleştirilmiştir. American Society for Testing Materials standartlarına (ASTM-G1) göre hazırlanan kuponlar, soğutma

kulesi suyundan izole edilen *Desulfovibrio* cinsi sülfat indirgeyen bakteri suşunu içeren besiyeri ortamına yerleştirilmiş ve belirli sürelerde (4, 8, 24, 72, 96, 168, 360 ve 744 saat) sistemden alınmıştır^(1,10). Metal kuponlar üzerinde oluşan biyofilm tabakasındaki ve deney ortamındaki mevcut SRB sayısı saptanmıştır. Biyofilimli galvaniz çelik sac kuponlar taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelenmiştir⁽⁴⁾.

Yüzeye tutunmuş SRB sayısının tespiti için, galvaniz çelik kuponun her iki yüzeyindeki biyofilm tabakası steril pamuk eküvyon çubuğu ile alınmış ve 4 ml Postgate C besiyerinde [sodyum laktat (6.0 g/l), KH₂PO₄ (0.5 g/l), NH₄Cl (1.0 g/l), Na₂SO₄ (4.5 g/l), CaCl₂·6H₂O (0.06 g/l), MgSO₄ (0.06 g/l), maya özeti (1.0 g/l), FeSO₄ (0.004 g/l), C₆H₅O₇Na₃ (0.3 g/l), pH: 7.2] süspansiyon edilmiştir. Daha sonra bakteri süspansiyonundan 10⁻¹'den 10⁻¹⁰'a kadar dilüsyon serileri hazırlanmıştır. Sessil ve planktonik SRB'in tespiti ve sayısı, Postgate B besiyerinde [sodyum laktat (3.5 g/l), KH₂PO₄ (0.5 g/l), NH₄Cl (1.0 g/l), CaSO₄ (1.0 g/l), MgSO₄·7H₂O (2.0 g/l), maya özeti (1.0 g/l), C₆H₇O₆Na (0.1 g/l), C₂H₃O₂SN_a (0.1 g/l), FeSO₄ (0.5 g/l), pH: 7.2] çoklu tüp yöntemine göre saptanmıştır. Ekim yapılan tüpler, anaerop ortam (anaerojen) içeren kavanozlarda 37°C'de 28 gün bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Postgate B besiyerinin renginin siyahlaşması, ortamda sülfat indirgeyen bakterilerin ürediğini göstermektedir⁽²⁰⁾.

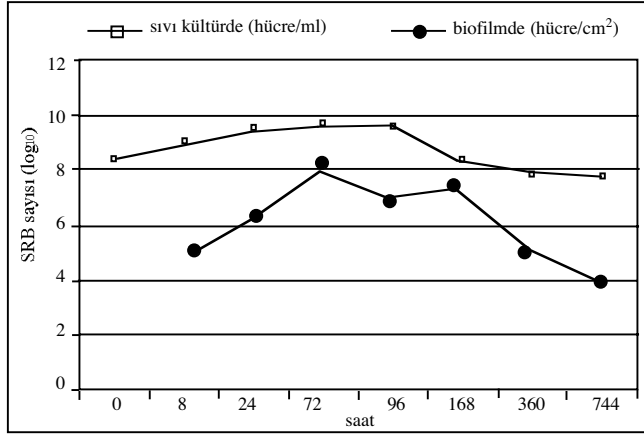
BULGULAR

Bu çalışmada SRB'in galvanizli çelik sac üzerinde biyofilm oluşturma ve varlıklarını sürdürebilme yetenekleri incelenmiştir. SEM mikrografı SRB'in galvanizli çelik sacların yüzeyine tutunabildiklerini ve kolonize olabildiklerini göstermektedir (Şekil 1).



Şekil 1: Galvaniz çelik sac yüzeyine tutunmuş sülfat indirgeyen *Desulfovibrio* spp. bakterilerin SEM fotoğrafı.

Sıvı kültürdeki serbest ve yüzeye tutunmuş olan SRB'in üreme eğrisi şekil 2'de gösterilmiştir. Hem kültürdeki hem de biyofilmdeki SRB, maksimum sayıya 72. saatte ulaşmışlardır. 72. saatten sonra hem kültürdeki hem de biyofilmdeki SRB sayısı düşmeye başlamıştır.



Şekil 2: Sıvı kültürdeki serbest ve yüzeye tutunmuş olan sülfat indirgeyen *Desulfovibrio* spp. bakterilerin üreme eğrisi.

TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında SRB'in galvanizli çelik üzerinde biyofilm oluşturma ve varlıklarını sürdürebilme yetenekleri incelenmiştir. SRB'in (*Desulfovibrio* spp.) galvanizli çelik üzerinde 8 saat gibi kısa bir sürede sayıca artarak bir biyofilm tabakası oluşturduğu saptanmıştır. Ayrıca 8. ve 72. saatler arasında biyofilmdeki SRB'in çoğalma hızının planktonik fazdaki hücrelerden daha fazla olduğu görülmüştür. Beech ve ark.⁽³⁾'da benzer sonuçlar bildirmişlerdir. 72. saatten sonra hem kültürdeki hem de biyofilmdeki SRB sayısı düşmeye başlamıştır. Bunun nedeni, deneylerin kapalı bir laboratuvar sisteminde yapılmış olmasıdır. Böyle kapalı bir sistemde, bakteriler tarafından üretilen H₂S oksitlenememekte ve dolayısıyla bakteriler H₂S'in toksik konsantrasyonlarına maruz kaldıkları için ölmektedirler. Fakat açık bir çevrede bunun tam aksine H₂S oksitlendiği için bakterilerin çoğalmasını engelleyici etki gösterememekte ve SRB'in sayısı hızlı bir şekilde artmaya devam edebilmektedir. Nitekim model bir su sisteminde gerçekleştirilen ön denemelerde, 6 ay süresince her ay yapılan örneklemelerde galvanizli çelik sac üzerindeki SRB sayısının gittikçe arttığı gözlenmiştir.

Galvanizli çelik sac, hem antifauling, hem de korozyona karşı dirençli ve paslanmaz çeliklere göre de nispeten ucuz olması nedenleri ile su depolarının yapımında tercih edilen bir malzemedir. Su depoları zaman zaman durağan, zaman zaman ise çok hareketli olduklarından, mikroorganizmaların özellikle de SRB'in üremesine ve yayılmasına uygun

ortamlardır⁽⁶⁾. Ayrıca su depolarının temizliği, düzenli ve konusunda uzman kişiler tarafından da yapılmamaktadır. Bu durum galvanizli çelik saclar üzerinde kolay bir şekilde kolonize olabilen SRB'in ileride insan sağlığı için bir risk oluşturabileceğini göstermektedir.

Çalışma süresince yapılan literatür taramalarında SRB'in galvanizli çelik sac yüzeylerdeki varlıklarının saptanması ile ilgili bu tarz bir çalışmaya rastlanmamıştır. Özellikle ülkemizde bu konuda bilimsel bir çalışma bulunamamıştır. Bununla birlikte SRB'in karbon çelik, paslanmaz çelik, bakır vb. metallerin yüzeylerine kolayca tutunabildiklerini ve hızlı bir şekilde kolonize olabildiklerini gösteren çalışmalar mevcuttur (2,5,15).

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, su boru sistemine sahip tüm cihazlarda bu problemin oluşabileceğini ve ayrıca konum itibarı ile gözden uzak bulunan ve ihmal edilen su depolarının ve sistemlerinin düzenli temizliğinin ne derece önemli olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. American Society for Testing Materials: Standard recommended practice for preparing, cleaning and evaluating corrosion test specimens, Designation: G1-72, American Society for Testing Materials, Philadelphia (1975).
2. Angell P, Urbanic K: Sulphate-reducing bacterial activity as a parameter to predict localized corrosion of stainless alloys, *Corros Sci* 2000;42:897-912.
3. Beech IB, Sunny Cheung CW, Patrick Chan CS, Hill MA, Franco R, Lino AR: Study of parameters implicated in the biodeterioration of mild steel in the presence of different species of sulphate-reducing bacteria, *Int Biodeter Biodegr* 1994;34:289-303.
4. Campanac C, Pineau L, Payard A, Baziard-Mouysset G, Roques C: Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms, *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(5):1469-74.
5. Chamberlain AHL, Simmonds SE, Garner, BJ: Marine "copper-tolerant" sulphate reducing bacteria and their effects on 90/10 copper-nickel (CA 706), *Int Biodeterior* 1988;24:213-9.
6. Choudhary SG: Emerging microbial control issues in cooling water, *Systems Hydrocarb Process* 1998;77(5):91-102.
7. Dang PN, Dang TCH, Lai TH, Stan-Lotter H: *Desulfovibrio vietnamensis* sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium from Vietnamese oil fields, *Anaerobe* 1996;2:385-92.
8. Fröhlich J, Sass H, Babenzien HD et al: Isolation of *Desulfovibrio intestinalis* sp. nov. from the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis*, *Can J Microbiol* 1999;45(2):145-52.
9. Hamilton WA: Sulphate reducing bacteria and anaerobic corrosion, *Ann Rev Microbiol* 1985;39:195-217.
10. İlhan-Sungur E, Çotuk A: Characterization of sulfate reducing bacteria isolated from cooling towers, *Environ Monit Assess* 2005;104:211-9.

11. Jayaraman A, Hallock PJ, Carson RM, Lee CC, Mansfeld FB, Wood TK: Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generated in situ, *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;52(2):267-75.
12. Jimmy Levine MD, Ellis CJ, Julie K, Furne BS, John Springfield MA, Michael D, Levitt MD: Fecal hydrogen sulfide production in ulcerative colitis, *Am J Gastroenterol* 1998;93(1):83-7.
13. McDougall R, Robson J, Paterson D, Tee W: Bacteremia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species, *J Clin Microbiol* 1997; 35(7):1805-8.
14. Postgate JR: *The Sulphate Reducing Bacteria*, Cambridge University Press, Cambridge (1984).
15. Rao TS, Sairam TN, Viswanathan B, Nair KVK: Carbon steel corrosion by iron oxidising and sulphate reducing bacteria in a freshwater cooling system, *Corros Sci* 2000;42(8):1417-31.
16. Sartor RB: Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases, *Am J Gastroenterol* 1997;92(12 Suppl):S5-11.
17. Sutherland IW: Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides, *Ann Rev Microbiol* 1985;39:243-70.
18. Tardy-Jacquenod C, Caumette P, Matheron C, Lanau C, Arnault O, Magot M: Characterization of sulfate reducing bacteria isolated from oil field waters, *Can J Microbiol* 1996;42(3):259-66.
19. Tee W, Dyall-Smith M, Woods W, Eisen D: Probable new species of *Desulfovibrio* isolated from a pyogenic liver abscess, *J Clin Microbiol* 1996;34(7):1760-4.
20. The Institute of Petroleum: Determination of the Viable Microbial Content of Fuels and Fuel Components Boiling Below 390°C - Filtration and Culture Method, IP Method Number 385/95 (1995).
21. Widdel F, Pfennig N: Dissimilatory sulfate reducing bacteria, "Krieg NR, Holt JG (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" kitabında s.663-79, Williams & Wilkins, Baltimore MD (1984).