

Der protektive Effekt von D₂O bei Bakterien (*E. coli*)

The Protective Effect of Heavy Water (D₂O) on Bacteria (*E. coli*)

C. Papadimitriou und M. Wenzel

Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin, Berlin-Dahlem, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **44c**, 1053–1057 (1989); received March 4/August 11, 1989

Heavy Water, Bacteria, Protective Effect

E. coli suspended in D₂O showed a better survival than in H₂O when the bacteria were treated with various damaging agents like UV, heat and freezing. On the contrary *E. coli* grown in D₂O-containing media – therefore being fully deuterated – were more sensitive than normally grown bacteria.

Einleitung

Schweres Wasser (D₂O) schützt Proteine [1, 2], Erythrozyten und Tumorzellen gegen thermische oder osmotische Schädigungen sowie Organe gegen die Auswirkungen einer Ischämie [3–6].

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob auch bei Bakterien ein Schutzeffekt von D₂O nachweisbar ist. Als Modell dienten *E. coli*-Bakterien, die durch UV-Bestrahlung, Einfrieren, Lyophilisierung und Hyperthermie geschädigt wurden.

Material und Methoden

Bakterien

E. coli ATCC 25922 (Institut für med. Mikrobiologie der Freien Universität Berlin).

Nähragar

Endo-C-Agar (Merck, Nr. 4044). 39 g Endo-C-Agar wurde in 1 l Aqua bidest. gegeben und autoklaviert. Sterile Petrischalen wurden mit 15 ml frisch autoklaviertem Agar gefüllt.

Nährbouillon

Fuchsin-Lactose-Bouillon (FLB) (Nr. 4045, Merck, Darmstadt). 13 g FLB Trockenpulver wurde in 1 l Aqua bidest. gelöst und steril filtriert.

Abkürzungen: ATCC, American Type Culture Collection; ÜNK, Über-Nacht-Kultur; D₂O, Deuterium-Oxid (Schweres Wasser); FLB, Fuchsin-Lactose-Bouillon.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Wenzel.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/89/1100–1053 \$ 01.30/0

Schweres Wasser

Deuteriumoxid 1607-F: 99,7% Merck, Sharp und Dohme, München.

Bakterienkultur und Bakterienschädigung

Die Bakterien wurden in FLB bei 37 °C im Schüttelwasserbad (V 85, Thermomix 1420: Braun Melsungen AG, Melsungen) über Nacht kultiviert.

Für die Durchführung der Versuche wurden gleiche Bakteriensuspensionsvolumina aus der Über-Nacht-Kultur (ÜNK), entnommen, in Zentrifugenplastikröhrchen einpipettiert, zentrifugiert ($4 \cdot 10^3$ U/min, 10 min, Labofuge I: Heraeus-Christ GmbH, Osterode) und der Überstand dekantiert. Danach wurden den Bakteriensedimenten gleiche Volumina Medien mit verschiedenen D₂O-Konzentrationen (jedes Sediment eine andere D₂O-Konz.) zugegeben und diese geschüttelt. Jede dieser neuen Bakteriensuspensionen wurde je nach Bedarf in kleinere Portionen aufgeteilt und den verschiedenen Schädigungen ausgesetzt. Vor und nach der Schädigung wurden von jeder Probe Aliquote entnommen und nach Verdünnung in H₂O-Medien mittels Ausplattieren die Überlebensrate der Bakterien bestimmt. Als Kontrolle diente immer eine H₂O-Bakteriensuspension.

Für die Durchführung von Versuchen mit deuterierten Bakterien wurden die Mikroorganismen über Nacht in 99,7% D₂O-haltigen Medien gezüchtet. Ansonsten wurden die Experimente wie oben beschrieben durchgeführt.

Bei der Hitzedenaturierung (52 °C) und der UV-Bestrahlung (UV-Strahler 880722, Camag, Berlin, 220 V, 254 nm, 0,04 A, 8 cm Abstand, 11,1 Wm⁻²) wurden in fünfminütigen Zeitintervallen aus allen



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Proben Aliquote entnommen und die Überlebensrate der Bakterien mittels Ausplattieren bestimmt. Bei der Gefrierkonservierung wurden die Bakterien-suspensionen bei -45°C (Kühltruhe) eingefroren und gelagert. Nach 48 Stunden wurden die Proben wieder aufgetaut und die Bakterienüberlebensrate bestimmt.

Bei der Gefriertrocknung wurden 1 ml Bakterien-suspensionen in Plastikreagenzröhrchen (Eppendorf) zuerst bei -196°C (flüssiger Stickstoff) eingefroren und danach lyophilisiert (Gefriertrockner T. 318 Martin-Christ, Aichach, Oberbernbach). Anschließend wurden die trockenen Präparate in 1 ml frische H₂O-FLB aufgenommen und die Bakterienüberlebensrate bestimmt.

Bestimmung der Keimzahl von *E. coli* durch Ausplattieren

Die Bakterien-suspensionen, deren Keimzahl bestimmt werden sollte, wurden in Zehnerschritten ($1:10$) bis 10^{-8} mit frischer FLB verdünnt. Danach wurden von den Verdünnungen 10^{-5} bis 10^{-8} Aliquote ($5 \cdot 100 \mu\text{l}$) entnommen und auf Petrischalen, beschichtet mit 15 ml Endo-C-Agar, ausplattiert. Die beimpften Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Trockenschrank T 5042 E Heraeus GmbH, Hanau) inkubiert. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien (Platten mit 30–300 Kolonien) ausgezählt und die Bakterienzahl in den Suspensionen berechnet.

Ergebnisse

In Vorversuchen konnten die Literaturbefunde [7] bestätigt werden, daß die Anwesenheit von D₂O in Nährmedien eine Wachstumshemmung von Bakterien bewirkt, die mit zunehmender D₂O-Konzentration größer wird. Jedoch wird bei *E. coli* die Vermehrung selbst bei 99,7% D₂O nicht vollkommen unterdrückt.

Um den Schutzeffekt des D₂O von dem hemmenden Einfluß auf das Bakterien-Wachstum deutlich trennen zu können, wurden in der Regel die Bakterien nur während der Schädigungsperiode in D₂O-haltigem Medium suspendiert. Anschließend wurde das Wachstum der von D₂O befreiten Bakterien im D₂O-freien Medium durch Kolonie-Bildung oder photometrisch bestimmt.

Resistenz von *E. coli* gegen UV-Bestrahlung in D₂O

Bestrahlt man eine Bakteriensuspension mit ultravioletem Licht, so stirbt ein hoher Prozentsatz der Zellen ab. Die Anwesenheit von D₂O in Suspensionen von *E. coli*-Bakterien vermindert die letale Wirkung der UV-Bestrahlung (vgl. Abb. 1). Je höher die Konzentration des Schweren Wassers ist, desto höher ist die Überlebensrate der Bakterien. Der D₂O-Schutzeffekt erhöht sich mit der Verlängerung der Bestrahlungsdauer. Diese Ergebnisse stimmen in ihrer Tendenz mit Untersuchungen bei Hefen überein [8].

Kryokonservierung von *E. coli* in D₂O

Die Gefrierkonservierung führt zu einem Kälteschock, der bei einigen Organismen, besonders bei gramnegativen Bakterien, zu einem Vitalitätsverlust führen kann. Man vermeidet ihn durch Zusatz von Gefrierschutzmitteln wie Glycerin oder Dimethylsulfoxid [6a, 6b]. Jedoch ist Dimethylsulfoxid toxisch

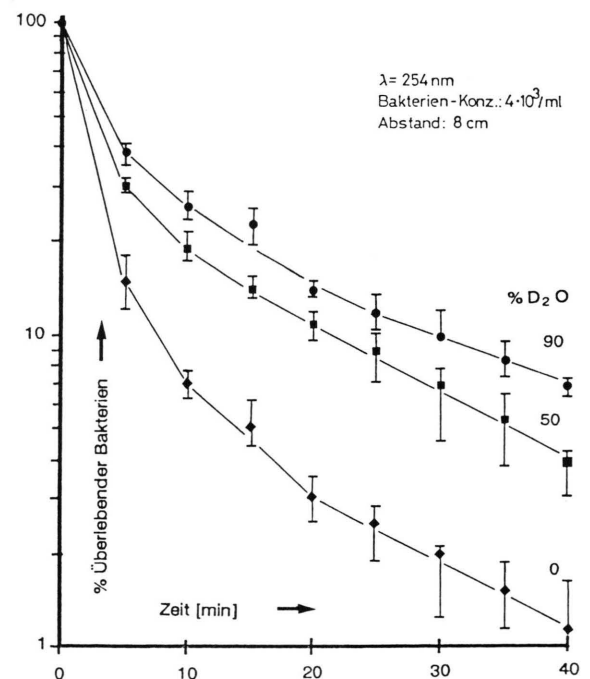


Abb. 1. UV-Bestrahlung von *E. coli* in D₂O. Es wurden $150 \mu\text{l}$ Bakterien-Suspensionen mit 4×10^3 Bakterien/ml in Fuchsin-Laktose-Buillon und verschiedenen D₂O-Konzentrationen mit UV (220 V, 0,04 A, 254 nm, 8 cm Abstand) bestrahlt. Die Bestimmung der Bakterien-Überlebensrate erfolgte in zehnminütigen Zeitintervallen mittels Ausplattieren auf D₂O-freiem Agar. Angaben als $\bar{x} \pm \sigma$ aus 6 Proben.

und muß nach dem Auftauen umgehend entfernt werden. Glycerin wird von einigen Zellen nur sehr langsam aufgenommen und wieder abgegeben. Es muß daher vor dem Einfrieren länger auf die Zellen einwirken. Angesichts dieser Nachteile wurde daher geprüft, ob D₂O ebenfalls als Kryoprotektivum verwendet werden kann.

Abb. 2 zeigt einen D₂O-Schutzeffekt auf Bakterien während des Gefrierprozesses. Das Ausmaß des Schutzes ist von der D₂O-Konzentration im Kulturmedium abhängig. Analog zu früheren Ergebnissen mit anderen Modellen [2–6], ist der Anstieg des Schutzeffektes bei niedrigen D₂O-Konzentrationen stärker, als bei hohen Konzentrationen.

Hyperthermietoleranz von *E. coli* in D₂O

E. coli-Bakterien sind resistenter gegen thermische Denaturierung bei 52 °C, wenn sie von H₂O-

Medien (ÜNK) in D₂O-Medien übertragen werden (Abb. 3). Diese Thermoresistenz erhöht sich mit steigender D₂O-Konzentration. Der durch D₂O verursachte Schutzeffekt erhöht sich auch mit steigender Denaturierungszeit bis zu einer Denaturierungsdauer von 30 min. Bei längeren Denaturierungszeiten kann D₂O nicht die Thermotoleranz aufrecht erhalten. Ein ähnliches Bild tritt beim Variieren der Temperatur auf. Im Temperaturbereich 40–55 °C ist in D₂O ein Schutzeffekt nachweisbar, setzt man aber die Bakterien einer Temperatur von 60 °C aus, so sind sie sowohl in H₂O- als auch in D₂O-Medien innerhalb von fünf Minuten abgestorben. Dies bestätigt frühere Befunde, daß ein Schutzeffekt nur bei mittlerer Schädigungsintensität erwartet werden kann [2, 5]. Bei sehr geringer Schädigung ist keine Schutzwirkung von D₂O erkennbar und bei extrem hoher Schädigung wird alles biologische Material auch in D₂O zerstört.

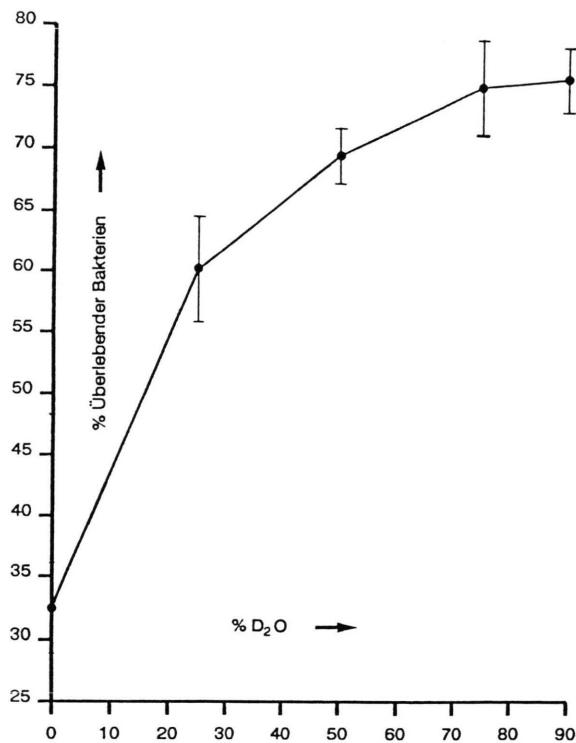


Abb. 2. Einfrieren von *E. coli* in D₂O. Es wurden 1 ml Proben mit ca. 5×10^3 Bakterien/ml in Fuchsin-Laktose-Buillon und verschiedenen D₂O-Konzentrationen bei -45 °C eingefroren und nach zwei Stunden wieder aufgetaut. Anschließend erfolgte die Bestimmung der überlebenden Bakterien. Angaben als $\bar{x} \pm \sigma$ aus 7 Proben.

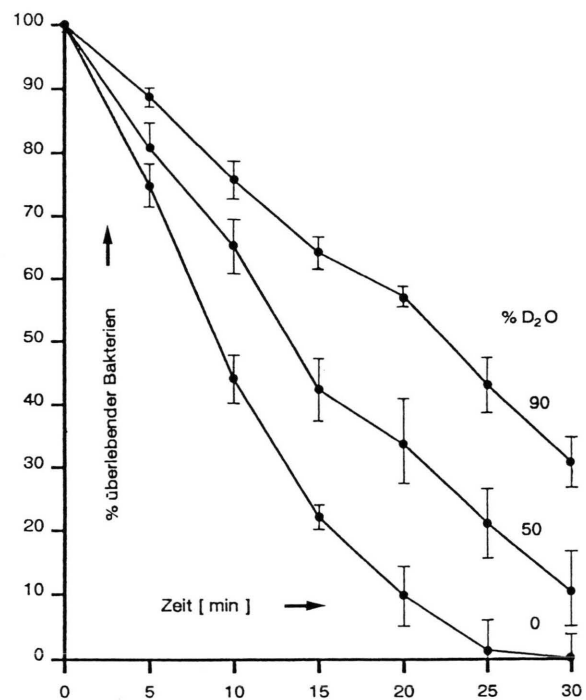


Abb. 3. Hyperthermie von *E. coli* in D₂O. Bakterienkonzentration: 3×10^6 /ml, Temperatur: 52 °C. Die Bestimmung der Bakterien-Überlebensrate erfolgte in fünfminütigen Zeitintervallen mittels Ausplattieren. Angaben als $\bar{x} \pm \sigma$ aus 6 Proben.

Hyperthermie-Sensitivität von deuterierten *E. coli* in H₂O

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen führt die vorherige fast vollständige Deuterierung von *E. coli*-Bakterien durch Wachstum in 99,7% D₂O-enthaltenen Medien zu deren nachfolgender Destabilisierung in bezug auf ihre thermische Denaturierung in H₂O.

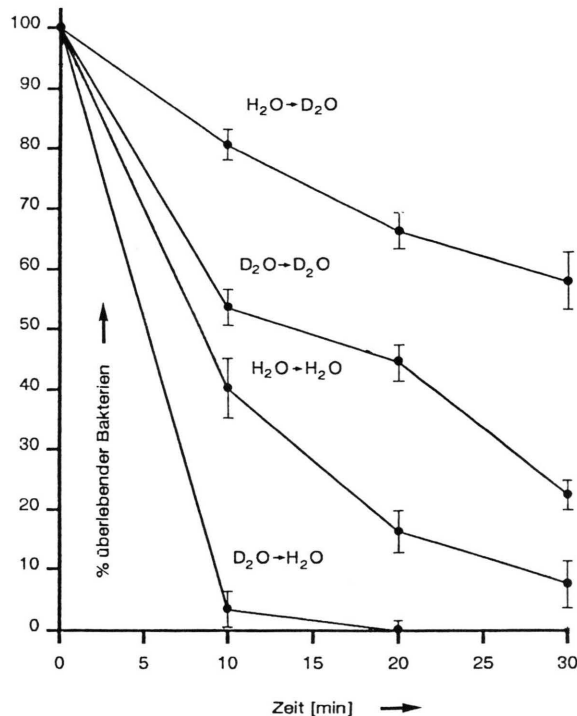


Abb. 4. Hyperthermievvergleich von in H₂O- bzw. in D₂O-Medium gezüchteten *E. coli*. Bakterienkonzentration: $1,9 \times 10^5$ /ml, Temperatur: 50 °C, Zeitintervalle für die Bestimmung der Überlebensrate: 10 min.

H₂O → D₂O: Bakt. Wachstum in H₂O, Denaturierung in D₂O
 H₂O → H₂O: Bakt. Wachstum in H₂O, Denaturierung in H₂O
 D₂O → D₂O: Bakt. Wachstum in D₂O, Denaturierung in D₂O
 D₂O → H₂O: Bakt. Wachstum in D₂O, Denaturierung in H₂O
 Angaben als $\bar{x} \pm \sigma$ aus 8 Proben.

Nach Abb. 4 sind deuterierte Bakterien (vorher in D₂O gezüchtet), die einer Temperatur von 52 °C in H₂O ausgesetzt wurden, empfindlicher als die unter gleichen Bedingungen in H₂O-Medien gezüchteten Bakterien. Wird ihre Denaturierung in D₂O vorgenommen, sind sie jedoch resistenter als in H₂O gezüchtete und in H₂O denaturierte Bakterien.

Diskussion

Eigene Experimente bestätigen frühere Befunde, daß D₂O eine Hemmung des Bakterienwachstums bewirkt. Da diese Ergebnisse nicht neu sind, wurde auf eine Wiedergabe verzichtet.

Als Ursache für die Wachstums-Hemmung ist die Verlangsamung aller enzymatischen Stoffwechselreaktionen anzusehen, an denen Wasser direkt als Reaktionspartner beteiligt ist. Dies führt zur Verzögerung des Metabolismus, wodurch eine Verlängerung der *Lag-Phase* des Bakterienwachstums auftritt. Eine weitere Erklärung für die Proliferationshemmung liefert die Inhibition der Proteinbiosynthese durch D₂O [9]. Auch die Deuterierung der H-Brücken der DNA, die zur verzögerten Trennung der Einzelstränge der Doppelhelix bei der Zellteilung führt [10], kann als Erklärung herangezogen werden.

Das wesentliche Ergebnis dieser Arbeit ist die erhöhte Resistenz von *E. coli* gegen thermische Schäden und UV-Strahlung in Schwerem Wasser. Als Erklärung für die Thermotoleranz der Bakterien durch D₂O können folgende Möglichkeiten herangezogen werden:

Die durch D₂O bedingte Stabilisierung von Zellmakromolekülen wie Nukleinsäuren, Proteinen oder Zellorganellen wie Mikrotubuli und Zellmembranen [11, 12]. Die gemeinsame Ursache für die Stabilisierung dieser Makromoleküle dürfte im Austausch dissoziabler H-Atome gegen Deuterium liegen. Da Deuterium-Brücken thermodynamisch etwas stabiler als Wasserstoff-Brücken sind, erklärt sich – wegen der Vielzahl von Wasserstoff-Brücken – leicht eine erhöhte Stabilität des Makromoleküls in D₂O [10]. Ein Nebeneffekt könnte die Erhöhung der Protein-Protein-Aggregation sein, die zur Erhöhung der eigenen Thermostabilität führt [13, 14].

Ferner kann die durch D₂O bedingte Verminderung der Enzymaktivität (besonders bei Enzymen, die an der Autolyse beteiligt sind) eine Rolle spielen [15].

Der D₂O-Schutzeffekt ist demnach wahrscheinlich die Summe von mehreren kleineren Einzeleffekten innerhalb des Mikroorganismus.

Die Bakterien-Deuterierung während der Züchtung in D₂O-Medien (über 95%) führt nicht nur zum Austausch von dissoziablen Wasserstoff gegen D sondern zum fast vollständigen Ersatz von H durch Deuterium in allen neu gebildeten Molekülen, z. B.

sind statt CH₃-Gruppen nunmehr CD₃-Gruppen vorhanden. Dies führt zu einer höheren Empfindlichkeit gegen thermische Denaturierung, da deuterierte Seitengruppen z.B. die Stabilität der α -Helix von Proteinen vermindern [16, 17].

Um das Absterben einer zu großen Zellzahl bei der üblichen Gefrierkonservierung zu vermeiden, setzt man den Zellen vor dem Einfrieren Protektiva wie Glycerin oder Dimethylsulfoxyd zu.

Wie Abb. 4 zeigt, kann auch hierbei D₂O als Schutzstoff eingesetzt werden. Deuterium-Oxid kann danach eine Alternative zu herkömmlichen Kryoprotektiva sein. Es zeigt die gewünschte, aber

keine toxische Wirkung; die Bildung von stabileren Deuteriumbrücken in den Makromolekülen findet relativ schnell statt, außerdem ist D₂O sehr leicht durch Waschung zu entfernen.

Eine Erklärung für die Resistenz gegen UV kann darin liegen, daß in D₂O der Anteil sich teilender und damit strahlenempfindlicher Zellen geringer ist, da D₂O Metabolismus und Zellteilung inhibiert. Ferner ist Sauerstoff in D₂O etwas weniger löslich als in H₂O. Folglich sind Organismen resistenter gegen eine Strahlungswirkung, die bekanntlich bei Hypoxie geringer ist [18].

- [1] R. H. Maybury und J. J. Katz, *Nature* **177**, 629 (1956).
- [2] U. Lemm und M. Wenzel, *Eur. J. Biochem.* **116**, 441 (1981).
- [3] M. Wenzel, *Naturwissenschaften* **64**, 411 (1977).
- [4] M. Wenzel und W. Stöhr, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **351**, 737 (1970).
- [5] M. Wenzel, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **14**, 185 (1976).
- [6] M. Wenzel und J. H. Fischer, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **21**, 83 (1983).
 - a) M. Karow und A. H. Jeske, *Cryobiology* **13**, 448 (1976).
 - b) J. F. Back, D. Oakenfull und M. B. Biochemistry **18**, 5191 (1979).
- [7] H. L. Cespi, S. M. Archer und J. J. Katz, *Nature* **184**, 729 (1959).
- [8] R. T. O'Brien, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **117**, 555–558 (1964).
- [9] E. Borek und D. Rittenberg, *Proc. N.A.S.* **46**, 777 (1960).
- [10] M. Calvin, J. Hermans, Scheraga Jr. und J. H. A., *Am. Chem. Soc.* **81**, 5048 (1966).
- [11] A. Tuena de Gomez-Puyou, Gomez-Puyou und J. Cerbon, *Arch. Biochem. Biophys.* **187**, 72 (1978).
- [12] W. G. Hanstein, K. A. Davis und Y. Hatefi, *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 482 (1974).
- [13] J. J. Lee und D. S. Berns, *Biochem. J.* **110**, 465 (1968).
- [14] J. W. Donovan und R. A. Beardslee, *J. Biol. Chem.* **250**, 1966 (1975).
- [15] K. Jung und G. Hübner, *Naturwissenschaften* **53**, 144 (1966).
- [16] K. Tomita, A. Rich, C. De Loze und E. R. Blout, *J. Mol. Biol.* **4**, 83 (1962).
- [17] A. Hattori, H. L. Crespi und J. J. Katz, *Biochemistry* **4**, 1213 (1965).
- [18] H. Laser, *Nature* **174**, 753 (1954).