

Mechanisms of cell damage in enteric bacteria during solar disinfection (SODIS)

Doctoral Thesis

Author(s):

Bosshard, Franziska Sara

Publication date:

2010

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006092493>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 18872

**Mechanisms of Cell Damage in Enteric Bacteria
during Solar Disinfection (SODIS)**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

FRANZISKA SARA BOSSHARD

Dipl. Biol. ETHZ

born February 12, 1977

citizen of Dübendorf, Zürich

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Thomas Egli, examiner

Prof. Dr. Kristopher McNeill, co-examiner

PD Dr. Kathrin Riedel, co-examiner

Dipl. Umwelt-Natw. Regula Meierhofer, co-examiner

Zürich, 2010

Summary

The availability of drinking water is a key health issue in developing countries. Over 1.2 billion people lack access to safe drinking water today. They are using contaminated surface water from rivers, ponds and unprotected wells. This causes a high frequency of diarrhoeal diseases, which are life-threatening, especially for children under the age of five. About 4000 young children die from diarrhoea every day. The World Health Organization (WHO) has recognized the problem and promotes low-cost and effective home-based water treatment methods. Solar disinfection (SODIS) is one of these methods. In many parts of the world the UVA part of sunlight can be employed for disinfection purposes: 6 hours of exposure of unsafe drinking water to the sun in plastic PET bottles results in an inactivation of enteric pathogens (bacteria, protozoa and viruses) of several orders of magnitude. Over 3 million people in 33 countries are currently using SODIS in daily life. Although the method is widely used in practice, the cellular mechanisms leading to bacterial death during solar UVA irradiation still leaves many open questions. This thesis addresses some of these questions.

Cultivation on solid agar substrates has been used to demonstrate the efficacy of SODIS for many different organisms. However, the validity of this traditional method has been questioned in recent years since it was shown that the effectiveness of disinfection processes has often been overestimated when tested on this basis. In this thesis, the disinfection process during SODIS was analyzed with the latest culture-independent methods (multi-parameter flow cytometry and others) at the single cell level for the two important enteric pathogens *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium*. Parameters investigated included cellular ATP levels, efflux pump activity, glucose uptake ability, polarization and integrity of the cytoplasmic membrane. The sequential break-down of the measured viability indicators was very well comparable to earlier results from *Escherichia coli*, a fact that allowed us to use this organism as a model organism for further mechanistic studies in this thesis. All viability

Summary

indicators used here suggest that membrane functions play a very critical role in SODIS inactivation of bacterial cells and the respiratory chain of enteric bacteria was identified to be a likely target of sunlight and UVA irradiation. Furthermore, during dark storage after irradiation, the physiological state of the cells continued to deteriorate even in the absence of irradiation: apparently bacterial cells were unable to repair the damage. This strongly suggests that a relatively small light dose is already sufficient to irreversibly damage the cells and that storage of treated water in bottles after irradiation does not allow re-growth of inactivated bacterial cells. Moreover, it was shown that light dose reciprocity is an important issue when using simulated sunlight. At high irradiation intensities, light dose reciprocity failed and resulted in an overestimation of the effect whereas reciprocity applied well around natural sunlight intensity.

Since membrane functions seem to play a crucial role during SODIS and the respiratory chain was identified as a possible vital first target during UVA irradiation, enzymes of different cellular compartments were tested for their activity. Strikingly, most membrane enzymes were damaged much earlier than enzymes of the cytoplasm. The respiratory chain and the F_1F_0 -ATPase were confirmed to be the very first targets on the way to cell death. Already slightly irradiated cells (after less than one hour of sunlight) were very much affected in their ability to keep up essential parts of the energy metabolism. Protein damages are therefore a likely cause for membrane dysfunction during UVA irradiation. The underlying mechanism most probably is the enhanced generation of reactive oxygen species (ROS) during irradiation in biological membranes via Fenton reactions.

A broader investigation of protein damages in irradiated cells was therefore performed. Using up-to-date molecular methods, the changes in the proteome of irradiated *E. coli* cells were analyzed. Proteins were confirmed as important targets during SODIS. Oxidative damage to specific proteins was detectable by an immunoblot method for carbonylated proteins at very low fluences already. A

consequence of these oxidative damages was aggregation of proteins. An advanced semi-quantitative proteomic approach was used to analyze proteins affected by aggregation. Aggregation was shown to target structural proteins and enzymes of many different cellular pathways at fluences achieved with light exposition corresponding to about two hours of natural sunlight. Targets included vital cellular functions like the transcription and translation apparatus, transport systems, amino acid synthesis and degradation, respiration, ATP synthesis, glycolysis, the TCA cycle, chaperone functions and catalase. The protein damage pattern caused by SODIS strongly resembles the pattern caused by reactive oxygen stress. Hence, sunlight probably accelerates cellular senescence and leads to the inactivation and finally death of cells.

Zusammenfassung

Die Gesundheit der Bevölkerung in Entwicklungsländern hängt stark von der ausreichenden Versorgung mit Trinkwasser ab. Über 1.2 Milliarden Menschen haben heute keinen Zugang zu sicherem Trinkwasser. Sie benützen meistens Oberflächenwasser von fragwürdiger Qualität aus Flüssen, Teichen und ungeschützten Brunnen. Dies verursacht ein häufiges Auftreten von Durchfallerkrankungen, die vor allem für Kinder unter fünf Jahren lebensgefährlich sein können. Täglich sterben etwa 4000 Kinder in diesem Alter an Durchfall. Um diesen Problemen zu begegnen, fördert die Weltgesundheitsorganisation WHO günstige und effiziente Wasserbehandlungsmethoden für einzelne Haushalte. Dazu gehört auch die Solare Desinfektion (SODIS). Der UV-Anteil des Sonnenlichts wird dabei für Desinfektionszwecke ausgenützt. Krankheitserreger (Bakterien, Protozoen und Viren) im fragwürdigen Trinkwasser werden innerhalb von 6 Stunden in PET-Plastikflaschen an der Sonne um mehrere Zehnerpotenzen reduziert. SODIS wird heute von 3 Millionen Menschen in 33 Ländern täglich genutzt. Obwohl die Methode in der Praxis so grossen Anklang findet, weiss man noch wenig über die zellulären Inaktivierungsmechanismen während der UVA-Desinfektion. Diese Dissertation beantwortet einige Fragen, die in diesem Zusammenhang gestellt werden können.

Die klassische Kultivierungstechnik auf Agar-Nährböden hat gezeigt, dass SODIS für viele verschiedene Organismen eine zuverlässige Desinfektionswirkung hat. Diese traditionelle Methode ist in den letzten Jahren allerdings vermehrt in Kritik geraten, weil aufgrund ihrer Ergebnisse die Desinfektionswirkung verschiedener Wasserbehandlungsmethoden überschätzt wurde. Darum wurde der SODIS-Desinfektionsprozess mit den neusten kulturunabhängigen Methoden auf Einzelzellebene für die zwei wichtigen Krankheitserreger *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium* analysiert. Die untersuchten Parameter umfassten den zellulären ATP-Gehalt, die Aktivität der

Zusammenfassung

Effluxpumpen, die Fähigkeit zur Glukoseaufnahme, ein intaktes Membranpotential und die Integrität der zytoplasmatischen Membran. Die Abfolge der Inaktivierung dieser Vitalitäts-Indikatoren während der Desinfektion entsprach weitgehend früheren Ergebnissen für *Escherichia coli*. Deshalb wurde dieser Organismus als Modellorganismus für weitere mechanistische Untersuchungen verwendet. Die Ergebnisse weisen auch darauf hin, dass Membranfunktionen sehr wichtig für die Inaktivierung von Bakterien sind und dass die Atmungskette wahrscheinlich ein empfindliches Angriffsziel während UVA- und Sonnenlichtbestrahlung darstellt. Der physiologische Zustand von einmal bestrahlten Zellen verschlechterte sich ausserdem danach bei Lagerung im Dunkeln zusehends. Die Zellen waren nicht fähig, die ihnen zugefügten Schäden wieder zu reparieren. Dies weist darauf hin, dass schon eine relativ niedrige Lichtdosis ausreicht um Zellen irreversibel zu schädigen und dass in der Praxis die Lagerung von Flaschen nach der Bestrahlung das Wiederaufwachsen von SODIS-behandelten Keimen nicht erlaubt.

Da Membranfunktionen während SODIS eine wichtige Rolle spielen und die Atmungskette schon als mögliche primäre Schadstelle vermutet wurde, haben wir Enzyme aus verschiedenen Zellkompartimenten während der Bestrahlung getestet. Tatsächlich wurden Membranenzyme wesentlich früher geschädigt als zytoplasmatische Enzyme. Die Atmungskette und die F_1F_0 -ATPase konnten als früheste Angriffspunkte während des Inaktivierungsprozesses bestätigt werden. Schon sehr schwach bestrahlten Zellen (nach weniger als einer halben Stunde Sonnenlicht) können wichtige Teile ihres Energiemetabolismus nicht mehr aufrechterhalten. Dies weist darauf hin, dass Proteinschäden der Grund für den Zusammenbruch verschiedener Membranfunktionen während UVA-Bestrahlung sind. Die Bestrahlung bewirkt dabei wahrscheinlich eine verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies über Fentonreaktionen, die dann Schäden an Membranproteinen verursachen.

In diesem Kontext hat sich eine genauere Untersuchung der Proteinschäden in bestrahlten Zellen aufgedrängt. Neueste molekulare Methoden wurden verwendet um Veränderungen von Proteinen in bestrahlten *E. coli* Zellen nachzuweisen. Dabei konnte bestätigt werden, dass sehr viele Proteine durch SODIS empfindlich geschädigt werden. Manche Proteine wurden spezifisch oxidiert, was mit einer Immunoblotmethode für carbonylierte Proteine nachgewiesen werden konnte. Als eine Folge der oxidativen Veränderungen können betroffene Proteine aggregieren. Eine semi-quantitative Messmethode wurde verwendet, um aggregierte Proteine zu finden. Aggregation wurde sowohl bei Strukturproteinen als auch bei verschiedenen wichtigen Enzymen nachgewiesen. Wichtige Lebensfunktionen der Zelle, wie Transkription und Translation, Transportsysteme, Aminosäuresynthese und -abbau, Atmung, ATP-Synthese, Glykolyse, der Krebszyklus, Chaperonfunktionen und Katalaseaktivität wurden dabei empfindlich getroffen. Der Proteinschaden durch UVA glich dabei verblüffend jenem, der durch oxidativen Stress verursacht wird. Somit liegt die Vermutung nahe, dass Sonnenlicht zelluläre Alterungsprozesse beschleunigt und dabei zu Inaktivierung und Tod der bestrahlten Zellen führt.