

DISS. ETH No. 22262

# **INTERACTIONS OF VIRUSES WITH DISSOLVED ORGANIC MATTER ADLAYERS**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by  
**Antonius Armanious**  
Joint European Master in Environmental Studies  
TU Hamburg-Harburg / Universitat Autònoma de Barcelona

born on 28.03.1981  
citizen of  
Egypt

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Kristopher P. McNeill, examiner  
Dr. Michael Sander, co-examiner  
Dr. Timothy R. Julian, co-examiner

2014

# Summary

Waterborne enteric viruses give rise to many human illnesses and diseases, including diarrhea, gastroenteritis, hepatitis, meningitis, and encephalitis. The infection by enteric viruses usually occurs via the fecal oral route, in which viruses released in the feces of infected individuals reside in and are transported with water until reaching a new host. Infection of the new host requires that the viruses retain their viability when in the water. A key process that affects both transport and viability of waterborne viruses is the adsorption of the viruses to dissolved organic matter (DOM), either present in freely dissolved form in the water or in the form of DOM adlayers on particle surfaces. This PhD thesis work aimed at advancing a better mechanistic understanding of virus adsorption to DOM adlayers and of adsorption to positively charged surfaces in the presence of DOM as a co-adsorbate. This understanding is critical to improve our capabilities to predict the transport and the viability of waterborne viruses in natural and engineered systems containing DOM.

In a first thesis sub-project, we developed a novel experimental approach to form and characterize DOM adlayers, which were later needed for virus adsorption experiments. The novel approach centered around forming DOM adlayers on flat and positively charged surfaces of self-assembled monolayers of cysteamine on gold supports. Using this approach, we characterized the physicochemical properties of eight different DOM samples of terrestrial and aquatic origin and including humic and fulvic acids. The DOM adlayers were found to be very thin (i.e., in the low nanometer range), to be relatively rigid, to have high water content, and to have polar surfaces. Furthermore, the DOM adlayers showed dynamic responses to changes in solution chemistry. Adsorption of laccase, an environmentally relevant enzyme, to the DOM

adlayers served to demonstrate that the new approach can be used to study the interactions of (bio-)macromolecules and nanoparticles with DOM adlayers.

In a second sub-project, the adsorption of four closely related bacteriophage viruses to three selected DOM adlayers was systematically investigated as a function of solution chemistry (i.e., pH, ionic strength, and ionic composition). Complementary virus adsorption experiments involved model surfaces that spanned a range of polarity and charge characteristics. The systematic analysis showed that virus-DOM interactions had a number of energetic contributions including electrostatic repulsion of the viruses from like-charged DOM adlayers, steric repulsive forces arising from hydrophilic protein loops on the surfaces of some viruses, attractive contributions from the hydrophobic effect, and, in systems containing dissolved calcium ions, cation bridging between carboxylate groups on the surfaces of the viruses and the DOM adlayers. Each of the viruses showed similar adsorption characteristics to all three tested DOM adlayers. By contrast, the four viruses in comparison to each other showed different adsorption characteristics to the DOM adlayers, which could be explained by modeling the charges and structures of the outer capsid surfaces of the viruses. The results of this sub-project provide a better mechanistic understanding of virus-DOM interactions.

Finally, in the third sub-project, we systematically assessed the effect of DOM as co-adsorbate on virus adsorption to positively charged surfaces. In all co-adsorbate systems, the negatively charged viruses and DOM directly competed for surface adsorption sites. However, direct competition diminished overall virus adsorption only for viruses that were highly negatively charged and hence experienced strong electrostatic repulsion from co-adsorbed DOM adlayers. In contrast, the presence of

DOM as co-adsorbate had much smaller effects on the overall adsorption of less negatively charged viruses that experienced net attractive interactions with DOM adlayers: in these systems, the viruses adsorbed to both the positively charged sorbent surface or, if blocked by DOM, to the surfaces of the DOM adlayers. The results from this work provide an improved conceptual understanding of adsorption in co-adsorbate systems. This understanding can also be applied to understand the adsorption dynamics of other (bio-)macromolecules and nanoparticles in natural and engineered systems containing DOM.

# Zusammenfassung

Wasserbürtige Enteroviren sind die Verursacher vieler menschlichen Erkrankungen wie Durchfall, Gastroenteritis, Hepatitis, Meningitis und Enzephalitis. Die Infektion mit Enteroviren erfolgt in der Regel über den fäkal-oralen Übertragungsweg. Dieser Weg beinhaltet das Einlagern der Viren in Gewässer über die Ausscheidungen infizierter Personen, den Transport und das Verweilen der Viren im Wasser und dem Erreichen eines neuen Wirts. Die Infektion des neuen Wirts setzt voraus, dass die Infektiosität der Viren während der Wasserpassage erhalten bleibt. Ein zentraler Prozess, der sowohl den Transport, als auch die Infektiosität der Viren im Wasser beeinflusst, ist die Adsorption der Viren an gelöste natürliche organische Substanzen (DOM). Diese können sowohl frei gelöst im Wasser, als auch als Molekülschicht auf Partikeloberflächen vorliegen. Diese Dissertationsarbeit hatte zum Ziel, ein besseres mechanistisches Verständnis der Adsorption von Viren an DOM Oberflächen zu erarbeiten und zudem die Dynamik der Virenadsorption an positiv geladene Oberflächen in Gegenwart von DOM zu beschreiben. Dieses Verständnis ist entscheidend, um den Transport und die Überlebensfähigkeit wasserbürtiger Viren in natürlichen und technischen Systemen in Anwesenheit von DOM vorherzusagen.

In einem ersten Teilprojekt dieser Arbeit wurde ein neuartiger experimenteller Ansatz entwickelt mit Hilfe dessen das Entstehen und die Eigenschaften der DOM-Oberflächenschichten charakterisiert werden konnten. Dieser Ansatz war essentiell, um in nachfolgenden Experimenten auch die Adsorption von Viren an eben diesen DOM-Oberflächenschichten zu untersuchen. Der neuartige Ansatz basierte auf der Adsorption von DOM an positiv geladenen Modelloberflächen, die mittels

Selbstassemblierung von 2-Aminethanethiol auf Goldträgern hergestellt wurden. Unter Verwendung dieses Ansatzes wurden die physikalisch-chemischen Eigenschaften von acht verschiedenen DOM-Oberflächenschichten untersucht. Die dazu verwendeten DOM Proben waren sowohl terrestrischen als auch aquatischen Ursprungs und beinhalteten sowohl Humin- als auch Fulvinsäuren. Die DOM-Oberflächenschichten erwiesen sich als sehr dünn (das heißt Schichtdicken im Bereich eines Nanometers), relativ steif, und hatten einen hohen Wassergehalt und eine hohe Oberflächenpolarität. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die DOM-Oberflächenschichten dynamisch auf Änderungen in der Lösungsschemie reagierten. Mittels der Adsorption von Laccase, einem umweltrelevanten Enzym, auf die DOM-Oberflächenschichten, konnte gezeigt werden, dass es der hier entwickelte Ansatz ermöglicht, die Wechselwirkungen von (Bio-)Makromolekülen und Nanopartikeln mit DOM-Oberflächenschichten zu untersuchen.

In einem zweiten Teilprojekt wurde die Adsorption vier nahe verwandter Bakteriophagen an drei ausgewählten DOM-Oberflächenschichten in Abhängigkeit der Lösungsschemie (pH-Wert, Ionenstärke und Ionenzusammensetzung) untersucht. Ergänzt wurden diese Untersuchungen durch Virenadsorptionsstudien an Modelloberflächen mit unterschiedlichen Polaritäts- und Ladungseigenschaften. Die systematischen Untersuchungen zeigten auf, dass die Wechselwirkungen der Viren mit DOM-Oberflächenschichten unterschiedliche energetische Beiträge beinhaltete. Dazu gehörten (i) die elektrostatische Abstoßung der Viren von den gleich geladenen DOM-Oberflächenschichten, (ii) sterische Abstoßungskräfte, die auf das Vorhandensein hydrophiler Proteinschleifen auf den Oberflächen einiger Viren zurückzuführen sind, (iii) anziehende Kräfte aufgrund des hydrophoben Effekts, und, (iv) in Ansätzen mit gelöstem Calciumionen, anziehende Kräfte durch das Bilden von

Kationenbrücken zwischen Carboxylatgruppen auf der Oberfläche der Viren und der DOM-Oberflächenschichten. Jeder der untersuchten vier Viren zeigte vergleichbare Adsorptionseigenschaften an die drei DOM-Oberflächenschichten. Im Gegensatz dazu zeigten die vier verschiedenen Viren untereinander stark unterschiedliche Adsorptionseigenschaften an die DOM-Oberflächenschichten. Diese Differenzen konnten mittels rechnergestützter Modellierung auf Unterschiede in den Ladungs- und Struktureigenschaften der Virenkapside zurückgeführt werden. Die Ergebnisse dieses Teilprojektes resultieren in einem erweiterten mechanistischen Verständnis der Wechselwirkungen von Viren mit gelösten natürlichen organischen Substanzen.

Im dritten Teilprojekt wurde die Auswirkung von DOM als Co-Adsorbat auf die Adsorption von Viren an positiv geladenen Oberflächen systematisch untersucht. In allen experimentellen Ansätzen konkurrierten die negativ geladenen Viren und DOM um Adsorptionsplätze auf der positiven Oberfläche. Diese Konkurrenz führte zu einer Abnahme in der Gesamtadsorption der Viren, die stark negativ geladen waren und somit einer starken elektrostatischen Abstoßung von den co-adsorbierten DOM-Oberflächen ausgesetzt waren. Im Gegensatz dazu, hatte die Anwesenheit von DOM als Co-Adsorbat eine deutlich geringere Auswirkung auf die Gesamtadsorption von Viren mit geringeren negativen Oberflächenladungen. Diese Viren vermochten sowohl an die positiv geladene Oberfläche zu adsorbieren, als auch an die DOM-Oberflächenschichten, die sich auf den positive geladenen Oberflächen durch Co-Adsorption bildeten. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zu einem verbesserten konzeptionellen Verständnis der Virenadsorption in Systemen bei, die ein zweites Adsorbat enthalten. Dieses Verständnis kann auch auf weitere Systeme übertragen werden, um beispielsweise die Adsorptionsdynamiken von (Bio-) Makromolekülen

und Nanopartikeln in natürlichen und technischen Systemen in Anwesenheit von DOM in Lösung zu verstehen.