

DISS. ETH NO. 22228

LEAD BIOAVAILABILITY AND EFFECTS TO PERIPHYTON

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

presented by

THEODORA JANINA STEWART

MSc ETH Umweltnaturwissenschaften, ETH Zürich

Born on 13.09.1985

Citizen of the United States of America

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Laura Sigg, examiner
Dr. Renata Behra, co-examiner
Dr. Maarten Nachtegaal, co-examiner
Prof. Dr. Bernhard Wehrli, co-examiner
Prof. Dr. Vera Slaveykova, co-examiner

2014

Summary

To understand toxic biological effects of non-essential trace metals to organisms in the aqueous environment, one must be able to follow a series of complex metal interactions, both abiotic and biotic in nature, which ultimately lead to the internalization of a metal and its binding to sensitive cellular targets. We chose to work with periphyton, natural biofilm communities composed of algae, bacteria, fungi and protozoa held together in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS). Periphyton is an important primary producer in freshwater ecosystems, which contribute to nutrient cycling and also accumulate both essential and non-essential trace metals, often reflecting dynamic fluctuations of metals in the overlying water. Using natural communities colonized with water from a small Swiss stream, the goal of this doctoral work was to understand the relationship between lead (Pb) accumulation and distribution in periphyton and the subsequent biological effects to overall community functions, as well as to understand intracellular Pb speciation upon internalization.

As the EPS is thought to have a protective mechanism against toxicity to periphytic organisms, it was of interest to develop both an EPS extraction technique and characterization method to analyze the EPS composition, as well as to determine if this composition significantly varied with season, thus possessing potentially different metal binding capacities. An extraction technique was developed that targeted the more loosely bound EPS, prevented cell lysis, and which would be amenable to later metal distribution studies. The extracted EPS from seven different communities were analyzed using liquid chromatography – organic carbon detection – organic nitrogen detection (LC-OCD-OND), a method based on size exclusion chromatography coupled with detection and quantification of organic carbon and nitrogen in the separated fractions. Four fractions were observed in all extracts: high molecular weight (M_r) biopolymers, building blocks of humic acids, low M_r acids, and low M_r neutral compounds, however no humic substances were detected. Low C/N ratios of the biopolymer fraction indicated the presence of high M_r proteins, which can provide additional functional groups (i.e. amines and thiols) for Pb binding. Small variations were observed in the relative amounts of these fractions in the different communities, but no clear seasonal trends were observed. Therefore, large seasonal variations in the Pb - EPS binding capacity would not be expected.

To assess the link between Pb distribution and impacts to important community functions such as photosynthesis, respiration and extracellular enzymatic activities, three-week chronic microcosm exposure studies to 210 nM Pb²⁺ were carried out on two different periphyton communities. Average total accumulation normalized to dry weight (DW) ($11 \pm 4 \mu\text{mol Pb/g DW}$) was approximately three orders of magnitude higher than controls ($60 \pm 20 \text{ nmol Pb/g DW}$). Distribution results showed that little Pb was associated with EPS loosely associated to biomass ($9\% \pm 3\%$). The majority of Pb was either sorbed to biomass (EDTA-exchangeable) ($60\% \pm 7\%$) or intracellularly accumulated (non-EDTA exchangeable) ($30\% \pm 6\%$). However, no significant biological effects were observed in any of the endpoints measured, indicating low bioavailability of Pb to periphytic organisms. High ratios of Fe:C and Mn:C of the operationally defined intracellular fraction indicated the presence of Fe and Mn inorganic material, which have been shown to scavenge Pb in periphyton. It is plausible that Pb toxicity is mitigated in periphyton through its binding to inorganic Fe and Mn precipitates. However, it is likely that Pb is also taken up into organisms, whereby intracellular defense mechanisms may also explain the lack of toxic effects observed.

To gain insight into the question intracellular defense responses, we moved from distribution of Pb within the periphyton community to the chemical distribution of Pb at the cellular level to better understand what intracellular processes take place to mitigate Pb toxicity. Temporal dynamics of intracellular Pb speciation were measured using synchrotron resonant x-ray emission spectroscopy (RXES) in model green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, upon exposure to 0.1 nM and 25 nM Pb²⁺ for up to 24 hours. Intracellular Pb speciation changes were detected at 3, 5, 10 and 24 hours of exposure. Initial inorganic precipitation in the form of PbO_(s) and Pb₃(PO₄)_{2(s)} shifted towards complexation with organic phosphate and formation of tridentate thiol complexes upon longer exposure times to 0.1 nM Pb²⁺. Upon 25 nM Pb²⁺ exposure, formation of PbS_(s) was also observed. These results indicate that, although Pb is initially sequestered in intracellular precipitates, over time redistribution may occur to either phytochelatins (PCs) and other thiol based peptides involved in detoxification, or to sensitive cellular targets such as proteins, ATP, nucleic acids, and sugar phosphates, which could lead to toxic effects upon longer exposure times.

Interference in periphyton community functions as a result of Pb toxicity would be detrimental to the role of periphyton as a primary producer in freshwater ecosystems.

However, the results from this doctoral work suggest that what is of ecological concern is not the direct toxicity of Pb to periphytic organisms and community structure and function. Rather, with its ability to accumulate and sequester Pb, periphyton can act as a concentrated source of Pb to grazers and may contribute to biological effects in these organisms through chronic dietary exposure.

Zusammenfassung

Um biologisch-toxische Auswirkungen von nicht-essentiellen Spurenmetallen auf Organismen (Lebewesen) in der aquatischen Umwelt zu verstehen, ist es wichtig komplexe abiotische und biotische Wechselwirkungen von Metallen nachzuvollziehen, die zur Aufnahme von Metallen und ihrer Bindung an sensitiven zellulären Targets (Zielobjekten) führen. Periphyton, eine Biofilmgemeinschaft, welche aus Algen, Bakterien, Pilzen und Protozoen in einer Matrix aus extrazellulärer polymerer Substanz (EPS) besteht, wurde für diese Untersuchung ausgewählt. Periphyton ist ein wichtiger Primärproduzent in Süßwasser-Ökosystemen, das zum Nährstoffkreislauf beiträgt und ebenfalls grosse Mengen essentielle und nicht-essentielle Spurenmetalle akkumulieren kann, und dadurch oft Schwankungen der Metallkonzentrationen im darüberliegenden Wasser widerspiegelt. Das Ziel dieser Dissertation war es, den Zusammenhang zwischen der Akkumulation und der Verteilung von Blei (Pb) in Periphyton sowie die biologischen Auswirkungen anhand natürlicher Gemeinschaften zu verstehen. Dafür wurden Biofilme mit Wasser eines Schweizer Baches gezüchtet, um die intrazelluläre Pb-Speziierung durch die Aufnahme von Pb und die nachfolgenden Auswirkungen bis zu generellen Funktionen der Biofilmgemeinschaft zu verstehen.

Da die EPS eine schützende Funktion von periphytischen Organismen vor Toxizität haben soll, war es von Interesse eine Methode zur EPS Extraktion und Charakterisierung zur Analyse der Zusammensetzung zu entwickeln sowie nachzuweisen, ob sich die Zusammensetzung wesentlich mit den Jahreszeiten verändert und sie dadurch potentiell andere Metallbindungskapazitäten aufweist. Eine Extraktionsmethode, die Zellauflösung verhindert und dadurch für Metallverteilungsstudien anwendbar ist, wurde für die schwach gebundene EPS entwickelt.

Die von sieben verschiedenen Biofilmgemeinschaften extrahierte EPS wurde mit Flüssigchromatographie – organischer Kohlenstoff Detektor – organischer Stickstoff Detektor (LC-OCD-OND) analysiert. Diese Methode basiert auf Gel-Permeations-Chromatographie gekoppelt mit dem Nachweis und der Quantifizierung von organischem Kohlenstoff und Stickstoff in getrennten Fraktionen. Vier Fraktionen wurden in allen Extrakten betrachtet: Biopolymere mit grossem Molekulargewicht (M_r), Bausteine der Huminsäuren, low M_r acids, and low M_r neutral compounds.

Huminstoffe wurden nicht gefunden. Kleine C/N-Verhältnisse in der Biopolymerfraktion wiesen auf die Anwesenheit von Proteinen mit hohem M_r hin, welche zusätzliche funktionelle Gruppen (d.h. Amine und Thiole) zur Bindung von Pb bereitstellen können. Kleine Veränderungen wurden in den relativen Mengen dieser Fraktionen für die verschiedenen Biofilmgemeinschaften gefunden, aber keine klaren jahreszeitlichen Trends beobachtet. Aus diesem Grund werden keine grossen jahreszeitlichen Veränderungen in der Pb-EPS-Bindungskapazität erwartet.

Um die Verbindung zwischen der Pb-Verteilung und dem Einfluss auf wichtige Funktionen der Biofilmgemeinschaft, wie z.B. Photosynthese, Atmung und extrazelluläre enzymatische Aktivitäten zu untersuchen, wurden zwei Biofilmgemeinschaften drei Wochen lang in Mikrokosmen 210 nM Pb^{2+} ausgesetzt. Die durchschnittliche, auf das Trockengewicht (DW) normalisierte, Gesamtakkumulation ($11 \pm 4 \mu\text{mol Pb/g DW}$) war ungefähr drei Grössenordnungen höher als die Kontrollen ($60 \pm 20 \text{ nmol Pb/g DW}$). Die Ergebnisse der Pb-Verteilung zeigten, dass wenig Pb an der EPS an schwach gebundener Biomasse gebunden war ($9\% \pm 3\%$). Der grösste Teil des Pb war entweder an der Biomasse sorbiert (EDTA austauschbar) ($60\% \pm 7\%$) oder intrazellulär akkumuliert (nicht EDTA austauschbar) ($30\% \pm 6\%$). Dennoch wurden keine wesentlichen biologischen Auswirkungen an den gemessenen Endpunkten beobachtet. Dies deutet auf eine geringe Bioverfügbarkeit des Pb für periphytische Organismen hin. Hohe Fe:C- und Mn:C-Verhältnisse in der als intrazellulär definierten Fraktion deuteten auf das Vorhandensein von anorganischen Fe- und Mn-Phasen hin, für die eine Pb-Festlegung in Periphyton gezeigt wurde. Es ist daher möglich, dass die Pb-Toxizität in Periphyton durch die Bindung an anorganischen Fe- und Mn-Präzipitaten abgeschwächt wird. Trotzdem wird Pb wahrscheinlich in Organismen aufgenommen, wodurch intrazelluläre Abwehrmechanismen erklären können, dass keine toxischen Auswirkungen nachgewiesen werden konnten.

Um dieser Frage nachzugehen haben wir, anstatt der Verteilung von Pb innerhalb der Biofilmgemeinschaft, die chemische Verteilung von Pb auf zellulärer Ebene angeschaut, um die auftretenden intrazellulären Prozesse zur Abschwächung der Pb-Toxizität besser zu verstehen. Die zeitliche Dynamik der intrazellulären Pb-Speziierung wurde mittels Synchrotron Resonanz-Röntgenemissionsspektroskopie (RXES) anhand des Modellorganismus der Grünalge, *Chlamydomonas reinhardtii*, bei Exposition von 0.1 nM bis 25 nM Pb^{2+} für 24 Stunden gemessen. Veränderungen

der intrazellulären Pb-Speziierung wurden über eine Zeitreihe von 3, 5, 10 und 24 Stunden gemessen. Anfängliche anorganische Präzipitate in Form von $\text{PbO}_{(s)}$ and $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_{2(s)}$ wurden über längere 0.1 nM Pb^{2+} Exposition zu Pb komplexiert an organischem Phosphat und tridentaten Thiolkomplexen. Bei Konzentrationen von 25 nM Pb^{2+} wurde die Bildung von $\text{PbS}_{(s)}$ beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass obwohl Pb zuerst in intrazellulären Präzipitaten gebunden war, es über die Zeit zu einer Neuverteilung des Pb kommen kann. Dort wird Pb an Phytochelatinen (PC) und anderen thiol-basierten Peptiden gebunden, welche an der Detoxifizierung beteiligt sind oder an sensitiven zellulären Zielen wie Proteinen, ATP, Nukleinsäuren und Zuckerphosphaten, so dass es bei langer Exposition zu toxischen Effekten kommen kann.

Eine Beeinträchtigung der Funktionen der Biofilmgemeinschaft durch Pb-Toxizität wäre für die Aufgabe des Periphytons als Primärproduzent in Süßwasser-Ökosystemen schädlich. Allerdings deuten die Ergebnisse dieser Dissertation darauf hin, dass nicht die direkte Pb-Toxizität auf periphytische Organismen und Struktur und Funktion der Gemeinschaft bedenklich sind, sondern vielmehr die Fähigkeit Pb zu akkumulieren und sequestrieren. Dadurch kann Periphyton eine Quelle von Pb für Weidegänger darstellen und zu biologischen Auswirkungen auf diese Organismen durch chronische Exposition während der Nahrungsaufnahme führen.