

Diss. ETH No. 15985

**PHYTOCHELATIN INDUCTION BY METALS IN
FRESHWATER ALGAE**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by

Séverine Le Faucheur

Dipl. DEA Chimie Marine, Université de Bretagne Occidentale (France)

born September 30, 1977

Citizen of France

Accepted on the recommendation of
Prof. Laura Sigg, examiner
Prof. Emmanuel Frossard, co-examiner
Prof. Beth A. Ahner, co-examiner
Dr. Renata Behra, co-examiner

Zürich 2005

Summary

Essential (Cu, Zn, Fe..) and nonessential (Cd, Pb,...) metals are naturally present at low concentrations in the environment. However, human activities have increased their concentrations so that toxic levels may be reached at contaminated sites. To respond to metal-induced toxicities, algae possess several mechanisms. One of them is to control the intracellular metal speciation by producing intracellular metal ligands such as phytochelatins. Phytochelatins (PC_n) are small metal-binding polypeptides with the amino acid composition (γ-Glu-Cys)_n-Gly where n=2-11, enzymatically produced from glutathione. Due to their high affinity with metals, phytochelatins are believed to play a role in metal detoxification as well as in metal homeostasis by intracellular complexation of metals.

Laboratory studies with algal cultures and field studies with the natural periphyton assemblage have been carried out to examine phytochelatin induction upon metal exposure in freshwaters. A unicellular green alga, *Scenedesmus vacuolatus*, was exposed to a range of free Cd²⁺ concentrations, from 10⁻¹⁴ M to 10⁻⁷ M, and examined for its growth rate, phytochelatin concentration and bioaccumulated metal. The algal growth rate was optimal up to a free Cd²⁺ concentration of 10⁻⁹ M, and then decreased by 40% at higher concentrations. The intracellular Cd content increased sharply from 0.22 to 746 amol/cell over this free Cd²⁺ range. At the lowest Cd²⁺ concentration (control), glutathione was the only detectable thiol (127 amol/cell). With increasing Cd²⁺, formation of γGluCys and phytochelatins from PC₂ to PC₆ were observed. By maintaining an optimal value of the ratio of total thiol groups concentration (GSH + γGluCys + PC_n) to intracellular Cd (4 for *S. vacuolatus*), the inhibitory effects of Cd were avoided. In contrast, even if PC_n were found to react sensitively to Cd exposure, the thiol groups from phytochelatins were never measured to be in excess of the intracellular Cd content.

To further examine Cd complexation in *S. vacuolatus*, PC_n-Cd complexes were characterized using size-exclusion chromatography coupled off-line to reversed phase HPLC (RP HPLC) and atomic absorption spectrometry (AAS). In algae exposed to a Cd concentration that was not inhibitory for algal growth, Cd was found to be bound to PC₂ in one main complex with a ratio around 2 between thiol groups and Cd. Upon exposure to a Cd concentration inhibitory for growth, Cd was sequestered in an additional complex composed of PC₃, PC₄ and PY₁ (an unidentified thiol) and Cd. The ratio of thiol groups to Cd in this complex was found to be around 1. No sulfide was detected in the complexes.

VIII

In freshwater ecosystems, algae are exposed to a wide range of metals. To examine PC_n induction by a range of metals and metalloids, algal growth rate and PC_n formation in *S. vacuolatus* were investigated upon exposure to several concentrations of Cu, Zn, Ni, Pb and Ag, as well as As(III), As(V), Sb(III) and Sb(V). Among the tested metals, only Pb was found to inhibit growth in the applied concentration range. Phytochelatins seemed to participate only in Cu and Pb detoxification, whereas Zn, Ni and Ag did not induce PC_n production. Glutathione varied in different manner upon exposure to each metal. As(III) was less toxic than As(V), and Sb(III) and Sb(V) did not affect algal growth. Arsenite, As(V) and Sb(III) induced PC_n. As observed with the metals, GSH changed upon As(III), As(V) and Sb(V) exposure. This study is the first one to report PC_n induction in freshwater algae upon metalloid exposure.

Phytochelatin occurrence was then examined in natural freshwater communities by studying the PC_n response of periphyton. Periphyton, a natural algal community, is known to rapidly accumulate metals, as a function of metal speciation. Two field campaigns were conducted in a stream subject to increase of dissolved metals (particularly Cu and Zn) during rain events. At background metal concentrations, several thiols were detectable in periphyton, namely glutathione, γ GluCys, phytochelatins and some unknown thiols, P₁ and P₂. Glutathione and γ GluCys were found to vary independently of the rain, as well as P₁ and P₂, whereas phytochelatins were found to increase with the increase of metals during the rain. To investigate which metals may be responsible for this increase, microcosm experiments were carried out with natural water enriched with Cu, Zn and Cd separately and Cu and Zn in combination. In this study, GSH, PC₂ and P₁ were also detected but not γ GluCys. Increase in accumulated Cu did not induce any changes in thiol content, whereas an increase of Zn induced a decrease in GSH and an increase in phytochelatin content. In contrast to the results obtained with *S. vacuolatus*, Zn rather than Cu was inducing phytochelatin increase in periphyton in the field studies. Addition of Cu and Zn in combination also induced an increase in phytochelatin content. Cadmium was found to be the most effective inducer with the production of larger phytochelatins PC₃₋₄. This study is the first one to report changes in thiol content in periphyton in response to increase of metals in natural freshwaters.

Induction of PC_n appears to respond very sensitively to metal and metalloid exposure, and to occur under conditions which do not affect algal growth rate. Furthermore, PC_n are produced by periphyton upon exposure to environmental metal concentrations.

Résumé

Les métaux essentiels (Cu, Zn, Fe) et non essentiels (Cd, Pb) sont naturellement présents dans l'environnement à de très faibles concentrations. Cependant, les activités humaines ont augmenté leurs concentrations dans certains sites, où des niveaux toxiques pour les organismes peuvent être atteints. En réponse à cette toxicité, les algues possèdent différents mécanismes de défense. L'un d'entre eux est de contrôler la spéciation intracellulaire des métaux en produisant des ligands métalliques tels que les phytochélatines. Les phytochélatines (PC_n) sont de petits polypeptides intracellulaires formés par la séquence d'acides aminés $(\gamma\text{GluCys})_n\text{Gly}$ où $n = 2-11$ et enzymatiquement produits à partir du glutathion. De part leur grande affinité avec les métaux, les phytochélatines semblent jouer un rôle dans la détoxification des métaux ainsi que dans leur homéostasie. Durant cette thèse, des études ont été menées, en laboratoire avec des algues de culture et sur le terrain avec du périphyton, pour examiner l'induction des PC_n dans les algues exposées aux métaux.

Une algue verte unicellulaire, *Scenedesmus vacuolatus*, a été exposée à une large gamme de concentrations en Cd^{2+} libre, de 10^{-14} M à 10^{-7} M, afin d'étudier sa croissance et son contenu en PC_n et en Cd. Le taux de croissance de l'algue est optimal jusqu'à une concentration en Cd^{2+} libre de 10^{-9} M, mais diminue jusqu'à 40% aux concentrations les plus élevées. Le contenu en Cd intracellulaire augmente fortement de 0.22 à 746 amol/cellule dans cette gamme de concentration. Seul le glutathion est détecté (127 amol/cellule) aux très faibles concentrations en Cd^{2+} libre (contrôle). Avec l'augmentation du Cd^{2+} libre, du γGluCys et des phytochélatines (PC_{2-6}) sont également détectés. Le maintien à une valeur optimale du rapport entre les thiols totaux ($\text{GSH} + \gamma\text{GluCys} + PC_n$) et le Cd semble important pour éviter les effets inhibiteurs du Cd. Au contraire, même si les PC_n réagissent sensiblement à l'exposition au Cd, les groupements thiol des PC_n ne sont jamais en excès par rapport au Cd intracellulaire.

Afin d'étudier la complexation du Cd dans *S. vacuolatus*, les complexes Cd- PC_n produits par l'algue ont été séparés par chromatographie d'exclusion puis analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) et par spectrométrie d'absorption atomique (AAS). Dans les algues exposées à des concentrations non inhibitrices en Cd, le Cd est lié à PC_2 en formant un complexe ayant un rapport entre les thiols et le Cd de 2. Lors de l'exposition à des concentrations inhibitrices en Cd, un complexe additionnel est détecté, formé principalement de PC_3 , PC_4 , PY_1 (thiol non identifié) et de Cd. Il a été calculé que le rapport entre les thiols et le Cd se situe autour de 1. Aucun sulfure n'a été observé dans les complexes.

Dans les écosystèmes d'eau douce, les algues sont exposées à une large gamme de métaux. Pour étudier l'induction des PC_n par différents métaux et métalloïdes, *S. vacuolatus* a été exposée à différentes concentrations en Cu, Zn, Ni, Pb et Ag, ainsi qu'en As(III), As(V), Sb(III) et Sb(V). Le taux de croissance de l'algue ainsi que son contenu en phytochélatines ont été déterminés. Parmi les métaux testés, seul le Pb inhibe la croissance de l'algue dans la gamme de concentrations étudiées. Les phytochélatines semblent participer à la détoxification du Cu et du Pb mais non à celle du Zn, Ni et Ag. La concentration en glutathion varie aussi avec l'exposition aux métaux. L'exposition à As(V) est toxique pour *S. vacuolatus* tandis que As(III), Sb(III) et Sb(V) n'affectent pas sa croissance. L'arsenite, As(V) and Sb(III) induisent la production de PC_n, et comme il a été observé avec les métaux, GSH varie aussi à l'exposition de As(III), As(V) et Sb(III). Cette étude est la première à rapporter l'induction des PC_n dans les algues d'eau douce exposées aux métalloïdes.

La présence des PC_n dans des communautés d'algues d'eau douce a été étudiée dans du périphyton exposé à des changements de concentration en métaux de niveau environnemental. Deux campagnes de terrain ont été menées dans un ruisseau sujet à une augmentation de métaux dissous, particulièrement le Cu et le Zn, pendant des événements de pluie. A des concentrations de niveau naturel en métaux, plusieurs thiols ont été détectés, tels que la GSH, le γ GluCys, les PC_n ainsi que des thiols inconnus appelés P₁ et P₂. Le glutathion et le γ GluCys varient indépendamment de la pluie, tandis que les PC_n augmentent avec l'augmentation de la concentration en métaux pendant la pluie. Afin de déterminer quels métaux sont responsables de cette augmentation, des expériences en microcosme ont été menées avec de l'eau naturelle enrichie en Cu, Zn et Cd séparément et avec un mélange de Cu et de Zn. Dans cette étude, GSH, PC₂ et P₁ ont été détectés mais aucun γ GluCys. L'augmentation en Cu accumulé dans le periphyton n'induit aucun changement dans le contenu en PC_n, tandis que l'augmentation en Zn induit une diminution du GSH et une augmentation des PC_n. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus avec *S. vacuolatus* car dans cette étude, le Zn induit préférentiellement les PC_n par rapport au Cu. L'addition du mélange Cu et Zn induit également une augmentation en PC_n. Le cadmium est l'inducteur le plus efficace avec une production en PC_n à des degrés de polymérisation plus élevés. Cette étude est la première à rapporter des changements dans les thiols contenus dans du périphyton en réponse à l'augmentation en métaux dans les eaux naturelles.

L'induction des phytochélatines réagit donc très sensiblement à l'exposition aux métaux et métalloïdes, et se produit sous des conditions où la croissance de l'algue n'est pas affectée. De

plus, les PC_n sont produites dans du periphyton exposé à des concentrations environnementales en métaux.