



Doctoral Thesis

Physiology and ecology of nitrilotriacetate degrading bacteria in pure culture, activated sludge and surface waters

Author(s):

Bally, Matthias

Publication Date:

1994

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001377414> →

Rights / License:

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**PHYSIOLOGY AND ECOLOGY OF
NITRILOTRIACETATE DEGRADING
BACTERIA IN PURE CULTURE,
ACTIVATED SLUDGE
AND SURFACE WATERS**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
MATTHIAS BALLY
Dipl. Natw. ETH
born on 22 November 1963 in Basel (BS)



accepted on the recommendation of
Prof. Dr. A. Zehnder, examiner
Prof. Dr. Th. Leisinger, co-examiner
PD Dr. T. Egli, co-examiner

Zürich, 1994

SUMMARY

In the aerobic bacterium *Chelatobacter heintzii*, growth and regulation of enzymes involved in nitrilotriacetic acid (NTA) degradation have been investigated in chemostat culture during cultivation with glucose, NTA or mixtures thereof. Growth yield for both substrates was reduced at low dilution rates. During growth with NTA specific activity of the NTA monooxygenase (NTA-MO) exhibited a maximum at $D = 0.03 \text{ h}^{-1}$ and it gradually decreased with increasing dilution rates. In glucose-grown cells the specific activity as well as immunologically detectable NTA-MO protein was always close to the detection limit. During cultivation with different mixtures of NTA and glucose at a dilution rate of 0.06 h^{-1} , both substrates were utilised simultaneously, irrespective of the NTA/glucose ratio and the presence of excess ammonia. Synthesis of both NTA-MO and iminodiacetic acid dehydrogenase became induced when NTA contributed to more than approximately 1-3 % of the total carbon in the substrate mixture supplied. However, NTA was also degraded when the proportion of NTA in the mixture was lower than 1 %, which is consistent with the low constitutive level of expression for NTA-MO observed. Expression of NTA-MO is controlled rather by the ratio NTA / glucose in the feed than by the concentrations in the inflowing medium.

Regulation of NTA degradation and expression of NTA-MO in *Cb. heintzii* ATCC 29600 was investigated in chemostat culture at a dilution rate of 0.06 h^{-1} under transient growth conditions when the feed was switched either from a medium containing NTA as a carbon and energy source to one containing glucose. Similarly, induction of NTA-MO was followed during transients from glucose to different mixtures of NTA and glucose as substrates. Additionally, regulation of NTA-MO expression during starvation of glucose-grown as well as NTA-grown cultures of this strain were studied. A transient change from NTA to glucose as the sole carbon and energy source was accompanied by a rapid loss of NTA-MO. A transient change from glucose to NTA as the only carbon and energy source resulted in a lag period of some 25 hours until NTA-MO expression started and approximately 100 hours were needed until a steady-state for NTA-MO specific activity was reached. This transient lag phase was markedly shortened when mixtures of NTA plus glucose were supplied instead of NTA only. This suggests a strong positive influence of alternative carbon substrates on the expression of other enzymes under natural environmental conditions. Starvation of NTA grown cells led to a loss of NTA-MO expression; the expression could not be stimulated when glucose grown cells were starved.

High specificity polyclonal antibodies against outer membrane fragments of the two NTA-degrading bacteria *Cb. heintzii* ATCC 29600 and *Chelatococcus asaccharovorans* were prepared. Applying the indirect immunofluorescence labelling method the antibodies were used to study the distribution of the two genospecies in several aquatic environments differing in their exposure to NTA. Both bacteria were present in wastewater treatment

plants and eutrophic rivers in which the average NTA concentration was in the range of $10 \mu\text{g L}^{-1}$, as well as in rivers where NTA was not detectable ($<0.2 \mu\text{g L}^{-1}$). In a pristine stream one of the genospecies (*Cc. asaccharovorans*) was not detected. Both genera were enriched by nearly one order of magnitude in wastewater treatment plants compared to eutrophic river water.

Regulation of NTA degradation in activated sludge has been investigated in laboratory batch cultures, porous pots and wastewater treatment plants by immuno-enumeration of two NTA-degrading bacteria *Cb. heintzii* and *Cc. asaccharovorans*, and by following NTA-degradation efficiency and expression of NTA-MO. When 1 g L^{-1} NTA was added to activated sludge NTA-MO became detectable after 80 hours but no significant enrichment of NTA-degrading strains was observed. When mineral medium containing NTA as the only carbon source was inoculated with activated sludge the amount of NTA-MO per cell dry weight increased but the percentage of detected NTA-degraders exhibited only a marginal increase. In continuously operated activated sludge porous pot plants fed with NTA-containing synthetic sewage acclimation of the plant to a medium containing more than 1 % carbon from NTA led to a better NTA degradation efficiency during sudden increases of NTA in the inflowing medium. Plants run at higher sludge retention times exhibited both an improved adaptation capacity after an increase in the feed NTA concentration and during a transient in the operation temperature from 20 to 8°C. NTA-MO could be detected in activated sludge from porous pot plants as well as in a wastewater treatment plant when the inflowing NTA contributed to approximately 5 respectively 10 % of the total carbon. The results suggest that in natural environments regulation of NTA degradation at the level of enzyme synthesis is a short term response whereas regulation at the level of enrichment of NTA-degrading cells is rather a long term response.

ZUSAMMENFASSUNG

Wachstum des aeroben Bakteriums *Chelatobacter heintzii* und Regulation seiner am Abbau von NTA beteiligten Enzyme wurden während kontinuierlicher Chemostat-Kultur mit NTA, Glukose und Mischungen der beiden Substrate untersucht. Bei tiefen Verdünnungsraten war die Ausbeute für beide Substrate reduziert. Während des Wachstums mit NTA erreichte die spezifische Aktivität der NTA-Monooxygenase (NTA-MO) ein Maximum bei einer Verdünnungsrate von 0.03 h^{-1} und sank mit steigender Verdünnungsrate langsam auf tiefere Werte. In Glukose-gewachsenen Zellen lagen sowohl die spezifische NTA-MO Aktivität wie auch die immunologisch nachweisbare NTA-MO-Proteinmenge auf einem tiefen Niveau in der Nähe der Nachweisgrenze. Während der Kultivierung mit verschiedenen Mischungen von NTA und Glukose bei einer Verdünnungsrate von 0.06 h^{-1} wurden beide Substrate gleichzeitig verwendet, unabhängig vom verwendeten NTA/Glukose Verhältnis und vom im Überschuss vorhandenen Ammonium in der Mediumzufuhr. NTA-MO- und Iminodiacetat-Dehydrogenase-Synthese wurden induziert, wenn NTA mindestens 1-3% Kohlenstoff zur gesamten Kohlenstoffmenge im zugeführten Medium beitrug. Das zugeführte NTA wurde aber auch abgebaut, wenn der Anteil NTA-Kohlenstoff kleiner als 1% war. Dies steht in Übereinstimmung mit einer beobachteten (tiefen) konstitutiven Expression der NTA-MO. Die NTA-MO-Expression scheint über das NTA / Glukose -Verhältnis des Substratgemisches und nicht über die effektiven Konzentrationen im zugeführten Medium kontrolliert zu werden.

Die Regulation des NTA-Abbaus sowie die NTA-MO-Expression in *Cb. heintzii* wurde unter transienten Bedingungen im Chemostat bei einer Verdünnungsrate von 0.06 h^{-1} untersucht, indem von einem Medium, das NTA als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle enthielt, zu einem Medium mit lediglich Glukose gewechselt wurde. Ebenso wurde die NTA-MO-Induktion während des Übergangs von Glukose-haltigem Medium zu Medien, die verschiedene Mischungen von NTA und Glukose als Substrat enthielten, verfolgt. Weiterhin wurde die Regulation der NTA-MO-Expression in Glukose- sowie NTA-gewachsenen *Cb. heintzii*-Zellen untersucht, welche durch Unterbruch der Substratzufuhr ausgehungert wurden. Der Übergang von NTA zu Glukose als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wurde von einer schnellen Reduktion der NTA-MO-Menge begleitet, und der umgekehrte Fall hatte eine etwa 25 Stunden andauernde Adaptionsphase zur Folge, nach deren Ablauf die NTA-MO-Expression einsetzte; ungefähr 100 Stunden wurden im letzteren Fall benötigt, bis ein Fließgleichgewicht für die spezifische Aktivität der NTA-MO erreicht wurde. Diese Übergangsadaptionsphase konnte markant verkürzt werden, wenn Mischungen von NTA und Glukose anstelle von NTA alleine zugefüttert wurden. Dies lässt auf einen starken positiven Einfluss zusätzlicher Kohlenstoffsubstrate auf die Enzymexpression auch unter umweltrelevanten Bedingungen schließen. Ein Aushungern NTA-gewachsener Zellen führte zu einem

Verlust der NTA-MO-Expression, und diese konnte auch nicht durch Aushungern von Glukose-gewachsenen Zellen ausgelöst werden.

Gegen Fragmente der äusseren Membran von *Cb. heintzii* ATCC 29600 und *Chelotococcus asaccharovorans*, zweier NTA-abbauender Bakterien, wurden polyclonale Antikörper hoher Spezifität hergestellt. Diese wurden unter Anwendung indirekter Fluoreszenzmarkierung verwendet, um die Verteilung der zwei Bakterienarten in verschiedenen Gewässern unterschiedlicher NTA-Belastung zu untersuchen. Beide Arten wurden in Abwasserreinigungsanlagen, in eutrophen Flüssen, in welchen die durchschnittliche NTA-Konzentration etwa bei $10 \mu\text{g L}^{-1}$ lag, sowie in Flüssen, in welchen kein NTA gemessen werden konnte ($<0.2 \mu\text{g L}^{-1}$), detektiert. In einem unberührten, NTA-freien Bach konnte eine der beiden Bakterienarten (*Cc. asaccharovorans*) nicht nachgewiesen werden. Für beide Arten konnte eine nahezu zehnfache Anreicherung in Abwasserreinigungsanlagen gegenüber eutrophem Flusswasser aufgezeigt werden.

Die Regulation des NTA-Abbaus in Belebtschlamm wurde in Labor-Satzkulturen, in "Porous Pot"-Reaktoren und Abwasserreinigungsanlagen untersucht, indem einerseits die beiden Bakterienarten *Cb. heintzii* und *Cc. asaccharovorans* gezählt und andererseits NTA-Abbaueffizienz und NTA-MO-Expression verfolgt wurden. Wenn Belebtschlamm mit 1 g L^{-1} NTA versetzt wurde, konnte NTA-MO nach 80 Stunden beobachtet werden, nicht aber eine Anreicherung NTA-abbauender Bakterien. Wenn ein Mineralmedium mit NTA als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle mit Belebtschlamm angeimpft wurde, stieg die Menge NTA-MO pro Zellrockengewicht; doch der prozentuale Anteil der detektierten NTA-Abbauer stieg nur unwesentlich an. In kontinuierlich betriebenen "porous pot" Belebtschlamm-Reaktoren, denen NTA-haltiges künstliches Abwasser zugeführt wurde, bewirkte die Akklimatisation an ein Medium mit über 1% Anteil von NTA-Kohlenstoff eine bessere NTA-Abbaueffizienz nach einer plötzlichen Erhöhung der NTA-Konzentration im zugeführten Medium. Reaktoren, welche mit einem höheren Schlammalter betrieben wurden, zeigten eine verbesserte Adaptationsfähigkeit sowohl nach einer Erhöhung der NTA-Konzentration im zugeführten Medium als auch nach einem Übergang der Betriebstemperatur von 20°C zu 8°C . NTA-MO konnte im Belebtschlamm der "porous pot" Reaktoren sowie auch in Abwasserreinigungsanlagen nachgewiesen werden, solange NTA etwa 5%, respektive 10% zum zugeführten Geamtkohlenstoff beitrug. Die Resultate lassen vermuten, dass unter umweltrelevanten Bedingungen die Regulation des NTA-Abbaus auf der enzymatischen Ebene eine schnelle Reaktion der NTA-Abbauer auf ein verändertes Substratangebot darstellt, eine Regulation via die Anreicherung zum NTA-Abbau befähigter Zellen jedoch eher als eine langfristige Reaktion auftritt.