



Doctoral Thesis

Growth kinetics of *Escherichia coli* effect of temperature, mixed substrate utilization and adaptation to carbon-limited growth

Author(s):

Kovářová, Karin

Publication Date:

1996

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001732273> →

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](#).

Diss. ETH No. 11727

**Growth Kinetics of *Escherichia coli*:
Effect of Temperature, Mixed Substrate Utilization and Adaptation
to Carbon-Limited Growth.**

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

presented by

Karin Kovářová (Kovar)

M.Eng. (University of Chemical Technology, Prague)

and

M.Sc. (Charles University, Prague)

born on 22 May, 1967

citizen of Czech Republic and Federal Republic of Germany



accepted on the recommendation of

Prof. Dr. A. J. B. Zehnder, examiner

PD Dr. T. Egli, co-examiner

Prof. Dr. B. Witholt, co-examiner

Summary

The influence of selected environmental factors on the kinetics of microbial growth, i.e., the relationship between growth rate and the concentration of growth-limiting substrates, exhibited by *Escherichia coli* ML 30 was investigated. In particular, the effect of (i) temperature, (ii) mixed substrate utilization, and (iii) adaptation to low substrate concentrations, on the kinetic properties of the cells grown in continuous culture was studied. The laboratory observations presented here have important implications for our understanding of bacterial activities in the environment and particular attention is given to the degradation of pollutants.

(i) A detailed comparison of growth kinetics at temperatures below (17.4, 28.4, 37°C) and above (40°C) the optimum temperature (38.4°C) was carried out with *E. coli* growing in continuous culture with glucose as the sole carbon/energy source. An extended form of Monod model that predicts a finite substrate concentration at zero growth rate (s_{\min}), provided a good fit for the steady-state glucose concentrations as a function of the dilution rate. The two parameters μ_{\max} (maximum specific growth rate) and s_{\min} were temperature dependent, whereas, surprisingly, virtually identical K_s values (substrate saturation constant) were obtained at all temperatures examined. The temperature dependence of s_{\min} was astonishingly similar to those reported for maintenance energy requirements and the rate of synthesis of β -galactosidase in *E. coli*.

(ii) Despite the fact that the microorganisms in nature grow with substrate mixtures and under conditions of changing substrate availability, both with respect to the concentration and the 'abundance' of particular substrates, the present concepts on microbial growth kinetics are based on utilization of single carbon/energy sources. Therefore, it is essential to extend these kinetic models to mixed substrate growth. This is especially relevant for the case of the degradation of pollutants in the presence of mixtures of natural substrates.

Particular aspects of growth dynamics, steady-state growth kinetics, and inducibility of a catabolic pathway have been studied using a model system where *E. coli* was grown with mixtures of glucose (an easily degradable substrate that is present in all ecosystems) and 3-phenylpropionic acid (3ppa, here the "pollutant"). Although, 3ppa and glucose are metabolized via completely different pathways, the 'general' pattern of reduced steady-state substrate concentrations reported recently for the simultaneous utilization of mixtures of sugars, was shown to hold also in this case. The experiments performed in continuous culture with glucose and additional 'low' concentrations of 3ppa indicated that a threshold concentration of 3ppa exists (ca. 3 mg L⁻¹) below which induction of the catabolic pathway for 3ppa was not triggered and 3ppa was not utilized. However, once induced by higher concentration, *E. coli* was able to utilize 3ppa down to concentrations lower than the 'threshold' concentration.

(iii) During long-term cultivation of *E. coli* in a glucose-limited chemostat it was observed that, although the cultures were apparently in steady-state with respect to biomass concentration, the residual glucose concentration decreased in a hyperbolic-like fashion until it became finally constant. This implies that also the apparent affinity of the cells for glucose continuously increased during adaptation to the low substrate concentrations in carbon-limited continuous culture. Reproducible adaptation patterns were obtained by standardizing the treatment of inocula and the cultivation conditions during the adaptation process. It was clearly demonstrated for the first time that adaptation to low substrate concentrations proceeded faster (fewer generations required) at low than high growth rates.

Zusammenfassung

Untersucht wurde der Einfluß einiger ausgewählter Umweltfaktoren auf die mikrobielle Wachstumskinetik von *Escherichia coli* ML 30. Genauer betrachtet wurde zum Beispiel die Beziehung zwischen der Wachstumsrate und der Konzentration des wachstumslimitierenden Substrates. Spezielle Aufmerksamkeit galt dem Einfluß (i) der Temperatur, (ii) der Verwendung von Substratgemischen und (iii) der Adaptation an niedrige Substratkonzentrationen, auf die kinetischen Eigenschaften von kontinuierlich wachsenden Zellen. Die Beobachtungen aus dem Labor, die hier präsentiert werden, stellen einen wichtigen Beitrag für unser Verständnis der bakteriellen Aktivität in der Umwelt dar. Besondere Aufmerksamkeit muß diesen Vorgängen beim Abbau von Schadstoffen beigemessen werden.

(i) Es wurde ein detaillierter Vergleich der Wachstumskinetik von *E. coli* bei Temperaturen unter (17.4, 28.4, 37°C) und über (40°C) der optimalen Wachstumstemperatur (38.4°C) gemacht. Verwendet wurden *E. coli*-Zellen aus einer kontinuierlichen Kultur mit Glucose als einziger C- und Energiequelle. Eine erweiterte Form des Monod-Modells, welches eine endliche (finite) Substratkonzentration bei einer Wachstumsrate von null vorhersagt (s_{\min}), ist eine gute Annäherung für die Gleichgewichtskonzentration für Glucose als Funktion der Verdünnungsrate. Die zwei Parameter μ_{\max} (maximale spezifische Wachstumsrate) und s_{\min} sind temperaturabhängig. Überraschenderweise wurden bei allen Temperaturen praktisch identische K_s Werte (Substratsättigungskonstante) gefunden. Der Verlauf der Temperaturabhängigkeit von s_{\min} war erstaunlicherweise sehr ähnlich zu dem der Erhaltungsenergie und dem für die Rate der β -Galactosidase-Synthese in *E. coli*.

(ii) Mikroorganismen wachsen in der Natur mit Substratgemischen und unter Bedingungen von ständig wechselnder Substratverfügbarkeit. Trotzdem basieren die heutigen Konzepte der mikrobiellen Wachstumskinetik auf dem

Prinzip der Verwendung einzelner C-/Energie-Quellen. Die Erweiterung dieser Kinetikmodelle auf das Wachstum mit Substratgemischen ist aus diesem Grund nötig. Besonders wichtig ist dies für den Schadstoffabbau in Gegenwart von natürlichen Substratgemischen. Die verschiedenen Aspekte der Wachstumsdynamik, der 'steady-state' Wachstumskinetik und der Induzierbarkeit von Abbauwegen wurden anhand eines Modellsystems studiert. *E. coli* wuchs mit Gemischen von Glucose und 3-Phenylpropionsäure (3ppa). Dabei ist Glucose ein leicht abbaubares Substrat das in allen Ökosystemen vorkommt, und 3ppa repräsentiert einen 'Schadstoff'. Obwohl 3ppa und Glucose über zwei komplett verschiedene Wege metabolisiert werden, gilt das allgemeine Muster von verringerten steady-state Substratkonzentrationen, welches für den gleichzeitigen Gebrauch von Zuckergemischen gefunden wurde. Die Experimente, welche in kontinuierlicher Kultur mit Glucose und einer zusätzlichen 'kleinen' Konzentration an 3ppa durchgeführt wurden, zeigen, daß für 3ppa eine Schwellenkonzentration von 3 mg L^{-1} existiert. Unterhalb dieser Schwellenkonzentration werden die Abbauwege für 3ppa nicht induziert. 3ppa wird daher bei niedrigeren Konzentrationen nicht verwendet. Wird das Enzymsystem aber einmal durch höhere Konzentrationen induziert, kann *E. coli* 3ppa bis zu Konzentrationen unterhalb des Schwellenwertes verwerten.

(iii) *E. coli* wurde einen langen Zeitraum in einem Glucose-limitierten Chemostaten kultiviert. Obwohl die Kultur bezüglich der Biomassekonzentration in einem steady-state Zustand war, wurde beobachtet, daß die Restglucosekonzentration weiterhin in Form einer hyperbolischen Funktion abnahm. Schließlich erreichte auch sie einen konstanten Wert. Dies deutet darauf hin, daß die Glucoseaffinität der Zellen während der Adaptation an tiefe Substratkonzentrationen in C-limitierter kontinuierlicher Kultur ständig zunimmt. Wurden die Behandlung des Inokulums und die Kultivationsbedingungen während des Adaptationsprozesses standardisiert, erhielt man reproduzierbare Adaptationsmuster. Dabei konnte zum ersten Mal klar gezeigt

werden, daß die Adaptation an niedrige Substratkonzentrationen bei kleinen Wachstumsraten schneller stattfindet als bei großen, da weniger Generationszeiten für die Anpassung benötigt werden.