

Dual (C,N) nutrient limited growth of *Pseudomonas oleovorans*

Doctoral Thesis

Author(s):

Zinn, Manfred Stephan

Publication date:

1998

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-002044951>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Diss. ETH No. 12987

**DUAL (C,N) NUTRIENT LIMITED GROWTH OF
*PSEUDOMONAS OLEOVORANS***

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

presented by
Manfred Stephan Zinn
Dipl. Natw. ETH
born June 28, 1967
in Bern, Switzerland
citizen of Lützelflüh, BE

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. B. Witholt, examiner
PD Dr. H. Brandl, co-examiner
PD Dr. Th. Egli, co-examiner

Zürich 1998

SUMMARY

Physiological studies of bacteria are usually carried out in liquid cultures. These cultures are then often exposed to cultivation conditions where one specific nutrient is limiting growth. Therefore synthetic media are used to adjust the nutrient composition such that only one nutrient limits growth and all others are in excess. However, it has been shown that microbial growth need not be limited by one particular nutrient only (as formulated in the concept of the “law of the minimum” by Justus von Liebig 1840) but that several nutrients may limit growth at the same time. Two basic theories have been at the basis of numerous relevant experiments: the kinetic aspect focuses on the microbial growth rate and its restriction by nutrients, whereas the stoichiometric aspect aims to describe the relationship between the biomass and its production on growth limiting nutrient concentrations (Chapter 2).

A suitable organism to study the stoichiometric aspect and the consequences of simultaneous multiple nutrient limited growth is *Pseudomonas oleovorans*. This Gram negative bacterium is especially of interest as it intracellularly accumulates medium chain length (C6 to C12) poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (mclPHAs) when grown on mcl alkanes, alkanols, or alkanolic acids and is exposed to growth limiting nutrients such as N, P, Mg, or S. MclPHA can be chemically extracted from the cells at high purity. This isolate has the properties of a flexible plastic but is in addition biodegradable and may therefore replace petroleum based plastic in future.

We investigated whether mclPHA can be produced in continuous cultures under dual carbon-nitrogen limited growth conditions with octanoic acid and ammonium as sole carbon and nitrogen sources, respectively (Chapter 3). In a chemostat culture three distinct and stable growth regimes could be detected when the carbon to nitrogen ratio in the feed medium (C_f/N_f) was stepwisely increased by the increase of the octanoate concentration: a carbon limitation for $C_f/N_f < 6.4 \text{ g g}^{-1}$, a dual (C,N) limitation for $6.4 \text{ g g}^{-1} < C_f/N_f < 9.6 \text{ g g}^{-1}$, and a nitrogen limitation for $C_f/N_f > 9.6 \text{ g g}^{-1}$. The accurate determination of the boundaries of the dual (C,N) limited growth regime is a rather tedious process because many data points are needed. An alternate method was developed where the C_f/N_f ratio was continuously changed by either increase or decrease of the carbon or nitrogen source, respectively. It was found that the dual (C,N) limited growth regime was shifted towards higher C_f/N_f ratios in the case where C_f was increased over time. In contrast, a shift towards lower C_f/N_f ratios was observed when C_f was reduced or N_f was increased. These observations were interpreted as time delays and could be corrected to some extent mathematically. The remaining deviation was related to a biological delay, presumably caused by the need to adapt to ever changing

growth conditions (e.g. change from carbon excess to carbon limitation) and could not be corrected mathematically.

Since the best results were obtained with a medium gradient where the carbon supply was continuously reduced thereby reducing the C_f/N_f ratio. This process raised questions about the PHA degradation.

In batch experiments where the cells were initially starved for carbon or carbon and nitrogen simultaneously, *P. oleovorans* degraded intracellular mclPHA exponentially at a high rate. The PHA C8 and C6 monomers were degraded at identical degradation rates, whereas the C10 monomer remained almost constant. As a result, the polymer composition changed continuously over time. This indicated that the C10 monomer is an artefact caused by the methanolysis procedure of freeze dried cells. Further, it was found that the degradation of PHA occurred, although protein synthesis was blocked by rifampicin. This observation indicated that intracellular PHA was continuously and simultaneously accumulated and degraded in *P. oleovorans*.

Chemostat experiments were performed to assess whether *P. oleovorans* was able to accumulate PHA to a larger amount under triple nutrient limited growth conditions. In a series of chemostat experiments it was shown for the first time that a triple limitation can be established when carbon, nitrogen, and phosphorus are limiting growth simultaneously (Chapter 5). Under these stringent growth conditions PHA was accumulated in large amounts but did not exceed the amount accumulated under single phosphorus limitation. The triple limited growth regime was found to be predictable for a given growth rate and could be expressed as ranges of C_f/N_f and C_f/P_f ratios of the feed medium.

A black-box model was developed to predict the dual (C,N) limited growth regime for the whole growth rate range of *P. oleovorans* (Chapter 6). Thus, an optimal PHA production under dual (C,N) limited growth could be postulated for a $C_f/N_f = 12.4 \text{ g g}^{-1}$ and a dilution rate of 0.21 h^{-1} .

The results obtained in this work indicate that multiple nutrient limited growth can be established in continuous cultures. *P. oleovorans* was found to be a microorganism that quickly adapts to environmental changes and is able to grow and synthesize PHA under stringent growth conditions such as triple (C,N,P) limitation.

ZUSAMMENFASSUNG

Physiologische Untersuchungen von Bakterien werden im allgemeinen mit Flüssigkulturen durchgeführt. Die Wachstumsbedingungen, bei denen spezifisch ein Nährstoff wachstums-limitierend ist und alle anderen im Überschuss sind, werden durch die Anwendung von synthetischen Medien bewerkstelligt. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass das mikrobielle Wachstum nicht unbedingt nur von einem Nährstoff limitiert sein muss (wie es Justus von Liebig im "Gesetz des Minimums" 1840 formulierte), sondern dass mehrere Nährstoffe das Wachstum gleichzeitig limitieren können. Zwei Theorien stellten die Grundlage für zahlreiche massgebende Experimente dar: der kinetische Aspekt untersucht den Einfluss von limitierenden Nährstoffen auf die mikrobielle Wachstumsrate, der stöchiometrische Aspekt hingegen hat zum Ziel, das Verhältnis zwischen limitierendem Nährstoff und der Biomassenproduktion zu beschreiben (Kapitel 2).

Pseudomonas oleovorans ist ein passender Organismus, um den stöchiometrischen Aspekt und die Auswirkungen des vielfach limitierten Wachstums zu studieren. Dieses Gram negative Bakterium ist von speziellem Interesse, denn es akkumuliert intrazellulär Poly[(R)-3-hydroxyalkanoat] aus mittellangen (C6 bis C12) Monomeren (mclPHAs), wenn es auf mcl Alkanen, Alkanolen oder Alkansäuren gezüchtet wird und einer gleichzeitigen Nährstofflimitation von N, P, Mg oder S ausgesetzt ist. MclPHA kann mit hohem Reinheitsgrad chemisch aus den Zellen extrahiert werden. Dieses Extrakt besitzt die Eigenschaften eines flexiblen Kunststoffes, ist aber zusätzlich biologisch abbaubar und könnte deshalb den aus Erdöl gewonnenen Kunststoff zukünftig ersetzen.

Wir untersuchten, ob *P. oleovorans* mclPHA in kontinuierlicher Kultur unter simultaner C- und N-Limitation, mit Oktansäure als einziger C- und Ammonium als einziger N-Quelle, mclPHA produzieren kann (Kapitel 3). In einer Chemostatkultur konnten drei zu unterscheidende und stabile Wachstumsbereiche detektiert werden, wenn das Kohlenstoff zu Stickstoff-Verhältnis im Mediumzufluss (C_f/N_f) schrittweise durch die Zunahme der Oktansäurekonzentration erhöht wurde: eine Kohlenstofflimitation für $C_f/N_f < 6.4 \text{ g g}^{-1}$, eine (C,N)-Doppellimitation für $6.4 \text{ g g}^{-1} < C_f/N_f < 9.6 \text{ g g}^{-1}$ und eine Stickstofflimitation für $C_f/N_f > 9.6 \text{ g g}^{-1}$. Die genaue Bestimmung der Grenzen der (C,N)-Doppellimitation ist wegen der vielen dazu benötigten Datenpunkte ein umständliches Verfahren. Wir entwickelten eine alternative Methode, bei der das C_f/N_f Verhältnis während des Experimentes kontinuierlich durch die Erhöhung oder Erniedrigung der C- oder N-Quelle verändert wurde. Bei kontinuierlicher Erhöhung von C_f konnte eine Verschiebung des doppelt-limitierten Wachstumsbereiches zu erhöhten C_f/N_f Verhältnissen festgestellt werden. Im Gegensatz

dazu, wurde bei einer kontinuierlichen Erhöhung von N_f oder einer Verringerung von C_f eine Verschiebung der (C,N)-Doppellimitation zu kleineren C_f/N_f Verhältnissen gemessen. Diese Beobachtungen wurden als Zeitverzögerungen interpretiert und konnten bis zu einem gewissen Masse mathematisch korrigiert werden. Die verbleibenden Abweichungen wurden einer zusätzlichen biologischen Verzögerung zugeordnet, deren Ursache wahrscheinlich in der nötigen Anpassung der Zellen an die andauernde Veränderung der Wachstumsbedingungen (z.B. Wechsel von C-Überschuss zu C-Limitation) zu suchen wäre.

Die beste Annäherung an die Chemostat Daten wurden mit einem Mediumsgradienten erzielt, bei dem die C-Zufuhr kontinuierlich reduziert wurde (C_f/N_f abnehmend), was allerdings Fragen bezüglich des PHA-Abbaues aufwarf. Satzkulturen von *P. oleovorans*, die zu Beginn C-oder (C,N)-limitiert waren, bauten intrazelluläres mclPHA exponentiell mit hoher Rate ab (Kapitel 4). Die C8 und C6 Monomere des PHAs wurden mit gleicher Rate abgebaut. Im Gegensatz dazu blieb die Menge von C10 Monomeren praktisch konstant. Die Polymerzusammensetzung veränderte sich kontinuierlich, was darauf hinwies, dass die C10 Monomere ein Artefakt des Methanolyseprozesses von gefriergetrockneten Zellen waren. Im weiteren wurde festgestellt, dass sich der Abbau von PHA trotz Blockierung der Proteinsynthese durch Rifampicin fortsetzte. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass *P. oleovorans* das intrazelluläre PHA gleichzeitig ein- und abbaut.

Es wurden Chemostatexperimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob *P. oleovorans* fähig ist, grössere Mengen an PHA unter dreifacher Nährstofflimitation zu synthetisieren. Dabei konnte zum ersten Mal eine Dreifachlimitation eingestellt werden, bei der die Nährstoffe C, N und P das Wachstum gleichzeitig limitierten (Kapitel 5). Unter diesen Wachstumsbedingungen wurde PHA in grossen Mengen eingelagert; der PHA-Gehalt unter P-Limitation konnte dabei jedoch nicht übertroffen werden. Die dreifach limitierte Wachstumszone konnte für die Wachstumsrate $\mu = 0.2 \text{ h}^{-1}$ und für die dazu einzustellenden C_f/N_f und C_f/P_f Verhältnisse bestimmt werden.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen wurde ein "black-box" Modell entwickelt, das die (C,N)-Doppellimitation für den ganzen Wachstumsgeschwindigkeitsbereich von *P. oleovorans* voraussagen kann (Kapitel 6). Dies führte zu einer theoretisch optimalen PHA-Produktion unter (C,N)-Doppellimitation mit $C_f/N_f = 12.4 \text{ g g}^{-1}$ und $\mu = 0.21 \text{ h}^{-1}$.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass Vielfachlimitationen in kontinuierlichen Kulturen erstellt werden können. Es konnte der Nachweis gebracht werden, dass *P. oleovorans* ein Mikroorganismus ist, der sich schnell den Umweltbedingungen anpasst und fähig ist, unter bestimmten Wachstumsbedingungen, wie der (C,N,P)-Dreifachlimitation, zu wachsen und PHA zu synthetisieren.