

Diss. ETH No. 14641

**Microbial competition and mixed substrate utilisation in  
the laboratory: towards a better understanding of  
microbial behaviour in the environment**

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

presented by  
Hans Peter Füchslin  
Dipl. Umweltnaturwissenschaftler ETH Zürich  
born March 29, 1970, in Brugg, Switzerland

on the recommendation of  
Prof. Dr. A.J.B. Zehnder, examiner  
Prof. Dr. W. Verstraete co-examiner  
PD Dr. T. Egli, co-examiner

Zürich, 2002

## Summary

In the natural environment microorganisms are in constant mutual competition for the uptake and consumption of nutrients. Particularly heterotrophic microbes are exposed to a wide range of compounds that can serve as potential carbon and energy sources. However, environmental concentrations of microbiologically utilisable substrates are usually very low, and in virtually all ecosystems growth of heterotrophs is slow and for most of the time severely limited by the availability of carbon/energy sources. To survive and compete successfully for nutrients in such an environment the kinetic properties and performance of microbial cells are of primary importance. Recent observations suggest that under carbon-energy-limited growth conditions most microbial cells will probably utilise mixtures of carbon/energy sources for growth rather than single compounds. However, little experimental data is still available on the kinetics and competition of microbial strains for mixtures of substrates during slow growth. To better understand and predict the behaviour of microbial strains under complex growth conditions the kinetics of growth and competition for single and defined mixtures of substrates in pure and mixed cultures of three selected bacterial strains with different growth properties was investigated in this thesis under controlled conditions. The strains included the enterobacterium *Escherichia coli*, as a typical r-strategist, and the two environmentally abundant and successful pollutant-degrading gram-negative k-strategists *Chelatobacter heintzii* and *Ralstonia eutropha*.

To study the competition of *E. coli* with *C. heintzii* for glucose in carbon-limited chemostat culture at low dilution rates the kinetic parameters of the two strains, i.e., the maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ , the Monod saturation constant ( $K_s$ ) and the minimum concentration required for growth ( $s_{\min}$ ), were first determined. The specific affinity ( $\mu_{\max} K_s^{-1}$ ) of both strains was very similar ( $0.0094 \text{ h}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{l}$  for *E. coli* and  $0.011 \text{ h}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{l}$  for *C. heintzii*, respectively) but the two strains differed with respect to their  $s_{\min}$  required for growth. Whereas *E. coli* exhibited an enhanced  $s_{\min}$  of ca.  $22 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  at  $30^\circ\text{C}$ ,  $s_{\min}$  was undetectably low for growth of *C. heintzii* with glucose. This advantage of *C. heintzii* to compete for glucose was

confirmed in glucose-limited chemostat cultures at  $D = 0.05$  and  $0.075 \text{ h}^{-1}$  where *E. coli* was out-competed consistently. Using the experimentally determined growth parameters the ability of *E. coli* to compete with *C. heintzii* was modelled in dependence of temperature and for fluctuating glucose concentrations. The results indicate that *E. coli* was able to compete successfully only at temperatures above  $29^\circ\text{C}$ . The model also predicted a successful competition of *E. coli* during fluctuating environmental glucose concentrations. The results suggest the existence of a distinct  $s_{\min}$  as the main competitive disadvantage of *E. coli* under the growth conditions tested.

As a second system the growth of the pesticide (2,4-D) degrading bacterium *Ralstonia eutropha* and a mutant strain harbouring a reporter system was investigated. When the wild type *R. eutropha* was cultivated with fructose only, or with mixtures of fructose and 2,4-D in carbon-limited chemostat culture at  $D = 0.075 \text{ h}^{-1}$ . During growth with fructose only the expression of all *tfd* genes was low. Exposure of the culture to  $0.1 \text{ mM}$  2,4-D resulted in the instantaneous increase in mRNA levels of these genes and in the subsequent simultaneous utilisation of 2,4-D and fructose. Mixed 2,4-D/fructose utilisation occurred independent of the mixture composition and growth yields were additive. During mixed substrate growth the steady-state residual concentrations of the two carbon sources were proportional to their fraction in the feed medium, hence, simultaneous utilisation of fructose and 2,4-D allowed degradation of 2,4-D to lower concentrations at a set dilution rate.

Green-fluorescent protein (GFP) harbouring constructs are frequently used as marker and reporter systems to assess the fate and activity of microbial strains with the ability to degrade xenobiotic chemicals. To evaluate the potential of this tool for tracking pesticide-degrading strains in the environment a GFP reporter system lined to genes coding for the degradation of 2,4-D was integrated into the chromosome of *R. eutropha*. In batch culture with 2,4-D as the only source of carbon and energy  $\mu_{\max}$  of the wild type and GFP clone were identical. However, compared to the wild type, the 2,4-D steady state concentration in a 2,4-D-limited chemostat culture of the GFP clone was higher at all dilution rates tested, demonstrating a reduced affinity for the pollutant. The kinetics of both wild type

and the GFP clone can be described with a Monod model extended by  $s_{\min}$ . The reduced competitiveness of the GFP clone was confirmed in 2,4-D-limited continuous culture at  $D = 0.075 \text{ h}^{-1}$  where the mutant was reproducibly out-competed by the wild type strain. This is the first time that the integration of a GFP reporter system has been shown to lead to a negative impact on the growth kinetics of the construct.

As a third example, the utilisation of mixtures of glucose and lactose by *E. coli* was investigated in carbon-limited chemostat at  $D = 0.075 \text{ h}^{-1}$ , where a short-term and a long-term response was documented. The short-term response of a culture growing with glucose as the primary carbon source was characterised by a threshold concentration of the utilisation of lactose. When the concentration of this sugar remained below  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  no utilisation was observed. Challenging the culture with higher lactose concentrations resulted in the induction of enzymes of the *lac* operon (followed by monitoring the activity of  $\beta$ -galactosidase) and subsequent simultaneous utilisation of glucose and lactose. Long-term exposure to lactose concentrations below the threshold did result in the selection of *lac* constitutive mutants and a segregation of the culture into a lactose- and a glucose-utilising sub-population. The *lac* constitutive mutant population displaced the wild type strain when lactose contributed to a large part of the total sugar mixture. The better competitiveness of the *lac* constitutive mutant population was based on its simultaneous utilisation of glucose and lactose, resulting in the ability to grow at the set dilution rate at lower residual sugar concentrations.

## Zusammenfassung

Mikroorganismen in der Umwelt stehen in dauernder gegenseitiger Konkurrenz bei der Aufnahme von Substraten. Heterotrophe Mikroorganismen sind verschiedensten Substraten ausgesetzt, welche als Kohlenstoff- und Energiequelle dienen können. Die Umweltkonzentrationen dieser Substrate sind sehr tief und in scheinbar allen Ökosystemen ist das Wachstum von heterotrophen Organismen ausserordentlich langsam und für die meiste Zeit limitiert durch die Verfügbarkeit von Kohlenstoff- und Energiequellen. Unter solchen kargen Lebensbedingungen sind die wachstumskinetischen Eigenschaften für die Weiterexistenz von entscheidender Bedeutung. Experimentelle Erfahrungen der letzten Jahre belegen, dass unter kohlenstofflimitierten Bedingungen die meisten Mikroorganismen die Mischsubstratverwertung der Einzelsubstratverwertung vorziehen. Es sind aber nur wenige experimentelle Daten verfügbar über die Kinetik und Competition von auf Einzel- und Substratgemischen langsam wachsenden Mikroorganismen. Um das mikrobiologische Verhalten unter komplexen Umweltbedingungen besser zu verstehen, wurde in dieser Arbeit die Wachstums- und Kompetitionskinetik von reinen und definierten Mischkulturen auf Einzel- und Mischsubstraten wachsend untersucht. In den Experimenten wurden 3 Bakterien mit verschiedenen wachstumskinetischen Eigenschaften verwendet. Das Enterobakterium *Escherichia coli*, als typischer r-Strategie und zwei in der Umwelt häufig vorkommende, Schadstoffabbauer und K-Strategen *Chelatobacter heintzii* und *Ralstonia Eutropha*.

Es wurde die Competition von *E. coli* mit *C. heintzii* für Glukose in kohlenstofflimitierten kontinuierlichen Kulturen studiert. Zuerst wurden die kinetischen Parameter der 2 Stämme experimentell bestimmt (die maximale spezifische Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ), die Affinitätskonstante ( $K_s$ ) und die minimal erforderliche Wachstumskonzentration ( $s_{\min}$ )). Die spezifische Affinität ( $\mu_{\max} \cdot K_s^{-1}$ ) der beiden Stämme war sehr ähnlich ( $0.0094 \text{ h}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{l}$  für *E. coli* und  $0.011 \text{ h}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{l}$  für *C. heintzii*). Sie unterschieden sich aber in der minimal erforderlichen Wachstumskonzentration ( $s_{\min}$ ). Während für *E. coli* ein  $s_{\min}$  von  $22.3 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$  bestimmt werden konnte, war im Falle von *C. heintzii*  $s_{\min}$  so tief für

Glukose, dass er nicht nachgewiesen werden konnte. Entsprechend gewann *C. heintzii* gegenüber *E. coli* deutlich in den Konkurrenzexperimenten in glukoselimitierten kontinuierlichen Kulturen bei einer Verdünnungsrate von  $0.05 \text{ h}^{-1}$  und  $0.075 \text{ h}^{-1}$ . In Computersimulation unter Anwendung der experimentell bestimmten kinetischen Parameter wurde die Möglichkeit der Koexistenz von *E. coli* unter schwankenden Umweltglukosekonzentrationen und Konkurrenz von *C. heintzii* geprüft. Dabei wurde die unterschiedliche Temperaturabhängigkeit der kinetischen Parameter berücksichtigt. Bei einer Temperatur ab  $29^\circ\text{C}$  und höher war *E. coli* im kompetitiven Vorteil, währenddessen bei tiefen Temperaturen *C. heintzii* gewinnen würde. Der wichtigste kompetitive Nachteil von *E. coli* beruht unter den getesteten Wachstumsbedingungen auf dem Vorhandensein eines signifikanten  $s_{\min}$ .

Als ein zweites System wurde das Wachstum von dem 2,4-D Pestizid abbauenden Bakterium *R. eutropha* und dem aus ihm abgeleiteten Konstrukt mit integriertem Reportersystem untersucht. Während Wachstum mit Fruktose alleine in kohlenstofflimitierter kontinuierlicher Kultur war die Expression aller *tfd* Gene tief. Wurde die Kultur  $0.1 \text{ mM}$  2,4-D ausgesetzt, resultierte dies in einem schnellen Anstieg der mRNA-Level der 2,4-D Abbaugene und in der nachfolgenden simultanen Verwertung von 2,4-D und Fruktose. Die simultane Verwertung war unabhängig von der Mischsubstratzusammensetzung (2,4-D/Fruktose) und die Ausnutzungskoeffizienten waren additiv. Die Restkonzentration der zwei Kohlenstoffquellen richteten sich proportional zu ihrem Anteil im zugeführten Medium. Es konnte somit bei einer simultanen Verwertung von 2,4-D/Fruktose und gegebener Verdünnungsrate die Restkonzentrationen gesenkt werden.

Um die Aktivität von Bakterien in der Umwelt zu messen, werden vermehrt Reportersysteme wie das green fluorescent protein (GFP) eingesetzt. In so genannten GFP – Konstrukten werden die Expression der Abbaugene mit der Expression von GFP gekoppelt. Es stellte sich die Frage in wie weit der Einbau von fremden Genen die Abbaukinetik eines Bakteriums beeinträchtigt. Es wurde deshalb die Wachstumskinetik von *Ralstonia eutropha* mit 2,4-D zwischen dem Wildtyp und dem daraus entwickelten GFP-Konstrukt verglichen. In

Wachstumsexperimenten mit Batchkulturen wurden statistisch nicht unterscheidbare spezifische maximale Wachstumsraten für GFP-Konstrukt wie für Wildtyp gemessen, währenddessen in kontinuierlichen Kulturen bei allen Verdünnungsraten der GFP-Konstrukt durchgehend eine höhere 2,4-D Restkonzentration aufwies als der Wildtyp. Die Kinetik des Wildtypus und des GFP Stammes konnte mit der Monodkinetik beschrieben werden, welche mit einem Term für eine minimale Substratkonzentration für das Wachstum ( $s_{\min}$ ) erweitert wurde. In Konkurrenzexperimenten in 2,4-D limitierter kontinuierlicher Kultur konnte bei einer Verdünnungsrate von  $D=0.075 \text{ h}^{-1}$  die kinetische Benachteiligung des GFP- Klonen bestätigt werden. Der GFP-Klon wurde von dem Wildtyp klar verdrängt.

Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der Einbau eines GFP-Gens einen negativen Einfluss auf die Wachstumskinetik eines Bakteriums hat.

Als ein drittes Beispiel wurde die Mischsubstratkinetik von *E. coli* bezüglich Gemischen von Glukose/Laktose in kohlenstofflimitierten kontinuierlichen Kulturen bei einer Verdünnungsrate von  $0.075 \text{ h}^{-1}$  untersucht. Es konnte zwischen einer kurzfristigen und einer langfristigen kinetischen Reaktion unterschieden werden. Wurde eine *E. coli*- Population auf Glukose wachsend kurzfristig Laktose ausgesetzt, so musste ein Schwellenwert von  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  erreicht sein damit das Laktose Operon der ganzen Population induziert wurde (gemäß den  $\beta$ -Galaktosidase-messungen) und Glukose und Laktose gleichzeitig aufgenommen und metabolisiert wurden. Unter dem Schwellenwert war kein Abbau von Laktose zu verzeichnen. Bei einer langfristigen Exposition unterhalb des Schwellenwertes von  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  wurde die Laktose erst metabolisiert, wenn sich Mutanten selektioniert hatten, welche konstitutiv das *lac* Operon exprimierten. Die Population trennte sich in spezialisierte Subpopulation für die Laktose- und Glukosekonsumation. Die *lac* konstitutiven Mutanten verdrängte den Wildtyp bei einem erhöhten Anteil von Laktose im Medium. Der kompetitive Vorteil des *lac* konstitutiven Mutanten lag in der gleichzeitigen Verwertung von Glukose und Laktose, welches ein Wachstum bei tieferen Zuckerrestkonzentrationen bei der gegebenen Verdünnungsrate ermöglichte.