



Doctoral Thesis

Physiology and fitness of *Escherichia coli* during growth in carbon-excess and carbon-limited environments

Author(s):

Franchini, Alessandro Guido

Publication Date:

2006

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005207486> →

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. 16585

**Physiology and fitness of *Escherichia coli* during growth in
carbon-excess and carbon-limited environments**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Alessandro Guido Franchini
Dipl. Natw. ETH
born January 3, 1976 in Lugano, Switzerland
Citizen of Montagnola (TI), Switzerland

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Thomas Egli, examiner
Prof. Dr. Alexander J. B. Zehnder, co-examiner
Prof. Dr. Paolo Landini, co-examiner

Zürich, 2006

Summary

Escherichia coli occupies two different habitats: the primary habitat is the intestine of warm-blooded animals and human, and secondary habitat is water and soil. The primary habitat is characterized by copiotrophic conditions with an excess of carbonaceous nutrients but limited oxygen availability, whereas the secondary habitats are oligotrophic environments where cells need to adapt to nutrient-poor and mostly oxic conditions. Of particular interest to drinking water microbiology is the ability of *E. coli* to survive and proliferate in aqueous environments because this bacterium is generally used as an indicator for faecal contamination.

The preferred method used here to study growth under nutrient-limited conditions was carbon/energy-limited continuous culture. Populations of *E. coli* cultivated in glucose-limited continuous culture exhibit a two-step adaptation to such conditions: A short-term adaptation (10-50 generations), which is characterized by a constant affinity to glucose ($K_s \sim 400 \mu\text{g l}^{-1}$), and a long-term adaptation (> 200 generations), which is characterized by the selection of a population of mutants with increased affinity to glucose ($K_s \sim 30\text{-}50 \mu\text{g l}^{-1}$). Transcriptome analysis of short- and long-term glucose-adapted populations reveals an up-regulation of many transport genes and a rearrangement of the central metabolism. Generally, in long-term adapted cells the same pattern of gene expression is observed as that monitored in the short-term response, except that genes belonging to the general (RpoS-dependent) stress response regulon are down-regulated. This down-regulation is due to attenuation of RpoS. Increased glucose affinity in long-term adapted cells results from a massive up-regulation of the maltose and galactose high affinity systems.

Because both RpoS and CRP-cAMP are known to be global regulators under carbon/energy-limited conditions, the influence of both was tested. Mutants lacking either *rpoS* or adenylate cyclase were compared at the transcriptome level with the wild-type strain during adaptation to glucose-limited conditions. For the cAMP mutant a strong down-regulation of the phosphotransferase uptake system for glucose and of the central metabolism was monitored, explaining the reduced specific growth rate of this mutant in glucose-excess batch culture. In comparison to the wild-type the cAMP mutant exhibits

also an extensive down-regulation of genes involved in the uptake and metabolism of alternative carbon sources. The results confirm the central role of cAMP for the catabolic ability during oligotrophic growth. The RpoS mutant exhibited only a limited impact on gene expression under glucose limitation. The presence of RpoS was disadvantageous during growth at low glucose concentrations, because it led to a considerable down-regulation of the central metabolism and of many uptake systems were down-regulated.

To date, studies on adaptation to carbon-limited conditions have concentrated on glucose as a carbon/energy source. Therefore, we have investigated whether this behaviour is also found during growth with other sugars. The adaptation pattern monitored with arabinose-, galactose- and N-acetyl-D-glucosamine-limited continuous cultures was similar to the process observed with glucose, including the short-term and the long-term adaptation period. However, for arabinose and galactose a faster adaptation was observed. Populations adapted to these substrates also exhibited a lower K_s for the carbon source than the wild-type population. Surprisingly, the high affinity acquired during the adaptation process was stable for long periods of time during carbon-limited cultivation and selection.

The adaptive ability and their competitiveness of two environmental strains of *E. coli* isolated from drinking water were also studied in glucose-limited continuous culture. Both strains exhibited a faster adaptation to low glucose concentrations than the laboratory strain K12. Also here an RpoS-attenuated phenotype was selected for. Environmental strains did out-compete the laboratory strain in glucose-limited continuous culture, demonstrating their high competitiveness under oligotrophic conditions.

Equivalency of cell composition was tested in *E. coli* cells when cultivated in complex medium and harvested from the same specific growth rate. The results demonstrate that the physiological state of cells harvested from identical specific growth rates was distinctly different with respect to catabolic properties, DNA content and proteome. Generally, chemostat cultured cells exhibited a more homogeneous composition than batch-cultured cells. The results indicate that it is difficult to compare batch-grown populations with continuous culture-grown-populations, even when harvested from the same specific growth rate.

Riassunto

L'*Escherichia coli* occupa due differenti habitat; l'habitat primario è l'intestino di animali a sangue caldo, tra cui gli uomini, e l'habitat secondario è l'acqua e il suolo. L'habitat primario è caratterizzato da condizioni copiotrofiche con un eccesso di nutrienti carbonacei, ma limitato in ossigenazione, invece gli habitat secondari sono ambienti oligotrofici dove le cellule devono adattarsi ad ambienti poveri in nutrienti ma nella maggior parte dei casi ossigenati. Secondo i microbiologi, specializzati in acqua potabile, l'abilità dell'*E. coli* di sopravvivere e proliferare in ambienti acquiferi è di particolare interesse, perché questo batterio è generalmente utilizzato come indicatore per contaminazioni fecali.

Il metodo preferito per studiarne la sua crescita in laboratorio, in cui le condizioni dei nutrienti sono limitati, è con culture continuate, limitate con carbonio/energia. Le culture di *E. coli* coltivate con limitazione di glucosio in culture continuate dimostrano un adattamento diviso in due parti; un adattamento a breve termine (10-50 generazioni), il quale è caratterizzato da una costante affinità per il glucosio ($K_s \sim 400 \mu\text{g l}^{-1}$), e un adattamento a lungo termine (> 200 generazioni), il quale è caratterizzato da una selezione di mutanti dimostranti una migliore affinità al glucosio ($K_s \sim 30-50 \mu\text{g l}^{-1}$). L'analisi del trascrittoma dell'adattamento delle popolazioni al glucosio a breve e lungo termine rivela una regolazione verso l'alto di molti geni che codificano proteine per il trasporto e un nuovo arrangiamento del metabolismo centrale. Generalmente lo stesso modello di espressione di geni osservato nell'adattamento a breve termine è monitorato anche in quello a lungo termine, con l'unica eccezione che i geni appartenenti alla risposta generale dello stress (RpoS dipendenti) sono repressi. La repressione di questi geni è dovuta all'attenuazione di RpoS. L'aumento di affinità nei confronti del glucosio nelle cellule adattate a lungo termine risulta da un massiccio incremento dei sistemi di trasporto ad alta affinità del maltosio e del galattosio.

L'influenza di RpoS e cAMP è studiata per il fatto che quest'ultimi sono riconosciuti come regolatori globali in condizioni in cui carbonio e energia sono limitati. Ceppi mutanti, in cui mancano i geni *rpoS* oppure l'adenilato ciclasi sono paragonati con *E. coli* di tipo selvaggio in base ai livelli di trascrittoma espressi durante l'adattamento a

condizioni in cui il glucosio è limitato. Una forte repressione del sistema di trasporto del glucosio attraverso la specifica fosfotransferasi e del metabolismo centrale è monitorata con il mutante di adenilato ciclasi, spiegando la ridotta velocità di crescita di questo mutante alla presenza di glucosio in eccesso. Un'estensiva repressione dei geni coinvolti nel trasporto e nel metabolismo di alternative risorse di carbonio è monitorata nel mutante di cAMP se comparato con *E. coli* di tipo selvaggio.

I risultati confermano il ruolo centrale di cAMP nell'abilità catabolica nella crescita in concentrazioni oligotrofiche. Il mutante in RpoS ha mostrato solo un impatto limitato nell'espressione genetica in condizioni in cui il glucosio è limitato. La presenza di RpoS è uno svantaggio durante la crescita in basse concentrazioni di glucosio, perché esso induce una considerevole repressione del metabolismo centrale e di molti sistemi di trasporto.

Ad oggi, le ricerche riguardanti l'adattamento batteriologico a condizioni in cui il carbonio è il fattore limitante, si sono concentrate sul glucosio come risorsa di carbonio ed energia. Per questo motivo abbiamo investigato se il comportamento è lo stesso analizzato durante la crescita alla presenza di altri zuccheri. Il modello di adattamento monitorato in culture continuate limitanti in carbonio, nelle quali arabinosio, galattosio e N-acetil-D-glucosamina sono utilizzati, è simile al processo osservato alla presenza di glucosio, includendo i periodi di adattamento a breve e lungo termine. Tuttavia, per l'arabinosio e il galattosio, un adattamento più veloce è stato osservato. Le popolazioni adattate a questi nutrienti dimostrano anch'esse un basso K_s per la risorsa di carbonio rispetto alla popolazione iniziale. Sorprendentemente la alta affinità acquisita durante il processo di adattamento è stabile per lunghi periodi di coltivazione e selezione in culture limitate in carbonio.

L'abilità di adattamento e la competitività di due ceppi ambientali di *E. coli*, isolate dall'acqua potabile, sono state studiate in culture continuate in cui il glucosio è limitante. Entrambi i ceppi hanno dimostrato un adattamento più veloce rispetto al ceppo K12 di laboratorio a basse concentrazioni di glucosio. Anche per questi ceppi ambientali un fenotipo caratterizzato da un'attenuazione di RpoS è stato selezionato. I ceppi ambientali dominano il ceppo di laboratorio in culture continuate in presenza di glucosio come fattore limitante, dimostrando un'alta competitività in condizioni oligotrofiche.

L'equivalenza della composizione cellulare è stata studiata per le cellule di *E. coli*, quando esse sono coltivate in nutrimenti complessi e centrifugate alla stessa velocità specifica di crescita. I risultati dimostrano che lo stato fisiologico delle cellule isolate ad un'identica velocità specifica di crescita è chiaramente diverso rispetto alle proprietà cataboliche, al contenuto di DNA e al proteoma. Generalmente, le cellule isolate dalle culture continuate dimostrano una composizione più omogenea rispetto alle cellule coltivate in presenza di un eccesso di nutrimenti alle stesse velocità specifiche di crescita. I risultati indicano che è difficile comparare le cellule cresciute in presenza di nutrimenti in eccesso con quelle cresciute in culture continuate, perfino quando sono isolate alla stessa velocità specifica di crescita.