

The consequences of nitrite reactivity on the ecology and evolution of denitrifying microorganisms

Doctoral Thesis

Author(s):

Lilja, Elin Elisabeth

Publication date:

2015

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010598764>

Rights / license:

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

DISS. ETH NO 22822

**The consequences of nitrite reactivity on the ecology
and evolution of denitrifying microorganisms**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
Elin Elisabeth Lilja

M.sc, University of Gothenburg

Born on 28.06.1984

citizen of
Sweden

accepted on the recommendation of

Prof. Martin Ackermann
Prof. Paul B. Rainey

2015

D. Summary (English)

Chemical reactivity of metabolic intermediates is important in shaping the organization of metabolic processes within microbial cells and communities. Chemical reactivity will influence which processes can take place at the same time by the same cell and which processes must be distributed among different cells. Thus microbial cells have different solutions to separate different metabolic processes in time and space. In Chapters 3-5, I investigate the consequences of chemical reactivity using the bacterium *Pseudomonas stutzeri*, a facultative anaerobe that uses N-oxides as terminal electron acceptors under anaerobic conditions. *P. stutzeri* can reduce nitrate via nitrite, nitric oxide and nitrous oxide into di-nitrogen gas. The intermediate nitrite becomes increasingly reactive as the pH decreases, resulting in severe growth-inhibiting effects. I exploited this feature to experimentally manipulate the reactivity of this single intermediate by lowering the pH of the media. Throughout this dissertation I use pH 7.5 (low reactivity) and pH 6.5 (high reactivity) to investigate the consequences of nitrite reactivity on ecological and evolutionary processes. Furthermore, I use isogenic mutants that cross-feed nitrite in co-culture to measure the consequences of spatially segregating different metabolic processes across different cell-types. My experiments generated three key findings. First, the chemical reactivity of a metabolic intermediate determines whether substrate cross-feeding (and thus dividing metabolic labor) accelerates substrate consumption (Chapter 3). This result emerges because different steps of the denitrification pathway compete with each other for intracellular resources, resulting in the accumulation of the intermediate nitrite. Dividing metabolic labor between two nitrite cross-feeding cell-types eliminates intra-enzyme competition, thus reducing the accumulation of the intermediate and accelerating substrate consumption when the intermediate has growth-inhibiting effects. This reflects a potentially general mechanism for how the increased reactivity of a single metabolite could promote the division of metabolic labor and the evolution of metabolically specialized cell-types. Second, chemical reactivity may accelerate evolution (Chapter 4). I used experimental evolution to determine how increased nitrite reactivity affects the pace of evolution of the completely-consuming cell-type. After 700 generations of experimental evolution, clones from populations evolved at high nitrite reactivity accumulated significantly more mutations than clones from populations evolved at low nitrite reactivity, and also increased more in fitness relative to the ancestor. The increase in mutations after evolution at high nitrite reactivity were most likely due to increased selection pressure and an increased availability of mutations with large beneficial effects rather than a change in the mutation rate in response to stressful conditions. Third, I describe how the evolution of nitrite cross-feeders at high nitrite reactivity leads to different genetic changes than evolution of completely-consuming cell-types (Chapter 5). My results demonstrate that dividing metabolic labor creates novel solutions to adapt to the growth-inhibiting effects of nitrite. Together, my results illustrate how chemical reactivity can affect both ecological and evolutionary processes, and thus have profound impacts on the structure and functioning of microbial populations.

E. Zusammenfassung (Deutsch)

Die chemische Reaktivität von Metaboliten (Stoffwechsel-Zwischenprodukte) trägt wesentlich dazu bei, Stoffwechselprozesse innerhalb einer mikrobiellen Zelle, aber auch innerhalb mikrobieller Gemeinschaften zu formen. Diese Reaktivität beeinflusst, welche Prozesse gleichzeitig innerhalb einer Zelle ablaufen können, und welche auf verschiedene Zellen verteilt werden müssen. Um Stoffwechselprozesse räumlich und zeitlich zu trennen, haben Mikroben verschiedene Lösungen entwickelt. In den Kapiteln 3-5 untersuche ich die Konsequenzen (mögliche Konsequenzen) der chemischen Reaktivität mit Hilfe des Bakteriums *Pseudomonas stutzeri*. *P. stutzeri* ist ein fakultativ-anaerobes Bakterium, das unter anaeroben Bedingungen N-Oxidasen als terminale Elektronen-Akzeptoren verwendet. *P. stutzeri* kann Nitrat via Nitrit, Stickstoffmonoxid und Di-Stickstoffmonoxid zu Stickstoff reduzieren. Mit abnehmenden pH nimmt die Reaktivität des Metaboliten Nitrit zu, was zur Wachstumshemmung führt. Ich habe diese Eigenschaft ausgenutzt, um die Reaktivität dieses Zwischenproduktes über den pH-Wert des Mediums zu manipulieren. Im Verlauf dieser Doktorarbeit verwende ich pH 7.5 (niedrige Reaktivität) und pH 6.5 (hohe Reaktivität), um die Folgen der Reaktivität von Nitrit auf ökologische und evolutionäre Prozesse zu untersuchen. Des Weiteren benutze ich isogene Mutanten, die Nitrit in Co-Kultur verwerten können (Cross-Feeder, d.h. die komplette Reduktion kann nur in Co-Kultur mit einem anderen Zelltyp erfolgen), um die Konsequenzen der räumlichen Trennung von metabolischen Prozessen zwischen verschiedenen Zelltypen zu messen. Meine Ergebnisse führen zu drei Haupterkennnissen:

1. Die chemische Reaktivität eines Metaboliten bestimmt, ob cross-feeding (und damit Arbeitsteilung in Bezug auf einen Stoffwechselweg) den Substratverbrauch beschleunigt (Kapitel 3). Dieses Ergebnis entsteht, da die verschiedenen Schritte der Denitrifikation miteinander um intrazelluläre Ressourcen konkurrieren, wodurch Nitrit angereichert wird. Arbeitsteilung zwischen zwei Zelltypen, die Nitrit-Co-feeding betreiben, eliminiert diese Konkurrenz und beschleunigt den Substratverbrauch, wenn Nitrit wachstumshemmend wirkt. Diese Art der Arbeitsteilung spiegelt möglicherweise einen generellen Mechanismus wieder, der beschreibt, wie die Reaktivität eines einzelnen Metaboliten eine Arbeitsteilung in Bezug auf den Stoffwechsel sowie die Evolution spezialisierter Zelltypen fördern könnte.

2. Die chemische Reaktivität könnte Evolution beschleunigen (Kapitel 4). Ich habe mittels experimenteller Evolution bestimmt, wie eine erhöhte Reaktivität die Evolutionsgeschwindigkeit von Zellen beeinflusst, die in der Lage sind, Nitrit vollständig zu reduzieren. Nach 700 Generationen hatten Klone in denjenigen Populationen, die sich bei hoher Nitrit-Reaktivität entwickelten, signifikant mehr Mutationen angereichert als Klone von Populationen bei niedriger Reaktivität. Des Weiteren zeigten diese Klone eine grössere Fitnesszunahme relativ zum Vorläufer. Die erhöhte Anzahl an Mutationen bei hoher Nitrit-Reaktivität ist höchstwahrscheinlich auf die Erhöhung des Selektionsdruckes und das vermehrte Verfügbarkeit von Mutationen mit vorteilhaften Auswirkungen zurückzuführen, statt auf eine veränderte Mutationsrate.

3. Ich beschreibe, wie die Evolution von Nitrit-Cross-Feeders bei hohem Nitrit-Reaktionsvermögen zu anderen genetischen Veränderungen führt als die Evolution von Zellen, die Nitrit vollständig selbst reduzieren können (Kapitel 5). Meine Ergebnisse zeigen, dass Arbeitsteilung in Bezug auf Stoffwechselwege neue Lösungen hervorbringen, die die Anpassung an die wachstumshemmenden Effekte von Nitrit ermöglichen.

Insgesamt illustrieren meine Ergebnisse, wie die chemische Reaktivität von Metaboliten sowohl ökologische als auch evolutionäre Prozesse beeinflussen kann, und damit einen signifikanten Einfluss auf Struktur und Funktion mikrobieller Populationen ausübt.