



Doctoral Thesis

Role of environmental stress and regulatory genes in survival and cell culturability of biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* CHA0

Author(s):

Mascher, Fabio

Publication Date:

2001

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004286388> →

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](#).

Dissertation ETH No. 14260

**Role of environmental stress and regulatory genes
in survival and cell culturability of biocontrol
bacterium
Pseudomonas fluorescens CHA0**

A dissertation for the degree of Doctor of Technical Sciences submitted to the Swiss
Federal Institute of Technology, Zürich

Presented by **Fabio Mascher**
Dipl. Sci. Agr., University of Bologna
born 12 November 1967
citizen of Arco (TN), Italy

Accepted on the recommendation of:
Prof. Dr Geneviève Défago, referent (Zürich)
Prof. Dr Yvan Moënne-Loccoz, co-referent (Lyon)
Prof. Dr Bruce McDonald, co-referent (Zürich)

2001

Summary

Bacterial inoculants for environmental applications, such as bioremediation, biofertilization of crops or biocontrol of soil borne plant diseases, receive increasing attention. Since commercial application of beneficial bacteria requires the release of large numbers of cells it is necessary to understand how these released bacteria persist and survive in the environment. When the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 is introduced into field soil, an important fraction of CHA0 cells may enter a non-culturable state, which means that bacterial cells lose their ability to grow on agar plates, but nevertheless are not dead. A proportion of these non-culturable cells respond positively to Kogure's substrate responsiveness test, and they constitute the viable-but-nonculturable (VBNC) fraction of the inoculant population. It is postulated that the VBNC state is a physiological response of non-spore forming bacteria to endure adverse environmental conditions. The objective of the present thesis is to study the role of stressful environmental conditions and genetic regulatory systems in the entry of cells into the VBNC state and their persistence in soil.

In the first part, the effect of abiotic stresses *in vitro* on strain CHA0 and its subsequent survival in soil was assessed by counting CFUs on selective agar plates, viable cells using Kogure's DVC (substrate responsiveness) test in combination with total cells counts using immunofluorescence microscopy. Strain CHA0 was incubated in low oxygen conditions, low oxygen in combination with a low redox potential conditions, or NaCl. The VBNC state was observed when low oxygen and low redox conditions were combined or when the concentration of NaCl was sufficiently high. These results suggest that the stress level is a key factor for the entry into the VBNC state. However, the VBNC state has not enhanced the persistence of the strain in soil.

Low oxygen conditions in combination with a low redox potential are often found at the plough pan level in many agricultural soils. In the second part, a plough pan microcosm system was developed using native field soil. In these microcosms, strain CHA0 lost ability to grow on agar plates but persisted as non culturable cells, of which a large part was in the VBNC state. This was correlated with the decrease of the redox potential in the soil system. The induction of the VBNC state was not modulated by the *anr* gene, which codes for the adaptation of the strain to low oxygen conditions. A novel staining technique, which combines the nucleic acid stain propidium iodide (a constituent of the BacLight Viability kit) and immunofluorescence microscopy, allows to discriminate intact from membrane injured cells in soil. Only 1% of injured cells were found among both culturable and non-culturable cells and therefore cell injury was not associated with non-culturability of cells. In conclusion, the results obtained in this section are in accordance with those of the previous section and with observations in a former field release experiment.

Several regulatory elements have been identified in *P. fluorescens* strain CHA0. The global activator complex GacA/GacS controls the production of antimicrobial and other secondary metabolites. The sigma factor RpoE (σ^E) encoded by the *algU* gene is involved in the adaptation to environmental stress. In the third part, influence of these regulatory systems upon the persistence in soil and the entry into the VBNC state were monitored in

two field soils of different texture and in a conifer forest soil. The *gacA* deficient mutant displayed reduced culturability leading to VBNC cells in both field soils and in acidic conifer forest soil. The *rpoE* mutant lost culturability in acidic conifer forest soil, but was normally culturable in field soil. Therefore, *gacA* is required for survival and persistence of the strain in soil, and *algU* only in acidic forest soil. Indeed, GacA as well as RpoE, in contrast to the anaerobic regulator ANR, are known to play major roles in stress resistance mechanisms in bacteria, in accordance with the observation that the VBNC state is induced when environmental stress is sufficiently high.

In conclusion, the results evidence that the entry of strain CHA0 into the VBNC state took place when cells were unfit to their environment, either because the environment was too stressful or as a result of the loss of regulatory systems involved in stress adaptation. Whether this VBNC state is reversible and if so under which conditions, remain to be assessed.

Zusammenfassung

Der Einsatz von Bakterien für spezielle Anwendungen in der Umwelt, wie zum Beispiel zur Sanierung von verseuchten Böden, zur Verbesserung der Bodenfruchtbarkeit oder für den biologischen Pflanzenschutz gegen bodenbürtige Krankheiten, erfährt steigendes Interesse. Da bei der kommerziellen Anwendung grosse Mengen nützlicher Bakterien in den Boden freigesetzt werden, gilt es abzuklären wie sie in der Umwelt überleben. Nachdem das pflanzenschützende Bakterium *Pseudomonas fluorescens* Stamm CHA0 in Feldboden ausgebracht wurde, ging ein grosser Teil des Inokulums in einen nicht kultivierbaren Zustand über, d.h. die Zellen wuchsen nicht mehr auf Nährboden, waren jedoch nicht tot. Ein Teil dieser nicht kultivierbaren Zellen sprach noch auf 'Kogures Viability Test' an und wurden daher als lebensfähige aber nicht kultivierbare Zellen (englisch: viable but non-culturable, VBNC) angesprochen. Es wird vermutet, dass der VBNC Zustand eine physiologische Anpassung der Zellen ist, um schädlichen Umweltbedingungen zu widerstehen. In der vorliegenden Dissertation soll der Einfluss von widrigen Umweltbedingungen und genetischen Regulationsmechanismen auf den Übergang der Zellen vom kultivierbaren Zustand in den VBNC Zustand sowie das Überleben dieser Zellen im Boden untersucht werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Stamm CHA0 zuerst abiotischem Stress *in vitro* ausgesetzt und danach in natürlichen Feldboden inokuliert. Das Überleben von Stamm CHA0 wurde (a) als kultivierbare Zellen durch das Zählen der Kolonie bildenden Einheiten (KbE), (b) als lebensfähige Zellen mit Hilfe des Kogure Tests zusammen mit (c) der Gesamtanzahl Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Abiotische Stressbedingungen bestanden aus Sauerstofflimitation, niedrigem Redoxpotential und der Kombination der beiden Bedingungen, sowie aus verschiedenen Kochsalzkonzentrationen. Der VBNC Zustand wurde im Zusammenhang mit der Kombination aus sauerstofflimitierenden und niedrigen Redoxpotentialbedingungen beobachtet sowie bei sehr hohen Kochsalzkonzentrationen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein hohes abiotisches Stressniveau eine Schlüsselrolle für den Übergang von kultivierbaren Zellen in den VBNC Zustand darstellt. Der VBNC Zustand der Zellen hat jedoch nicht das Überdauern des Stammes im Boden verbessert.

Die Kombination von Sauerstofflimitation und niedrigem Redoxpotential wird häufig im Bereich der Pflugsohle in vielen Feldböden beobachtet. Im zweiten Teil der Arbeit wurden ein Pflugsohlen-Mikrokosmos System entwickelt. In diesen Mikrokosmen ging ein grosser Teil der CHA0 Zellen in den nicht kultivierbaren Zustand über; ein grosser Teil davon war im VBNC Zustand. Das Aufkommen des VBNC Zustandes war korreliert mit dem Absinken des Redoxpotentials. Das Eintreten in den VBNC Zustand wurde jedoch nicht durch das *anr* Gen beeinflusst, dem anaeroben Regulator, welcher die physiologische Anpassung der Zelle unter sauerstofflimitierenden Bedingungen steuert. Mit Hilfe einer neuartigen Färbemethode, welche das Färbemittel für Nukleinsäuren Propidium Jodid (ein Teil des BacLight Viability Kit) mit der Immunfluoreszenzmethode verbindet, war es möglich intakte von verletzten Zellen im Boden zu unterscheiden. In allen Mikrokosmen wurden ca. 1% verletzte Zellen gefunden. Dies deutete darauf hin, dass in einer Population nicht kultivierbarer Zellen, die Anzahl verletzter Zellen nicht höher ist als in einer

Population kultivierbarer Zellen. Daraus folgt, dass nicht Kultivierbarkeit nicht aus der physischen Verletzung der Zellen resultiert.

Verschiedene genetische Regulationselemente sind in *P. fluorescens* CHA0 beschrieben. Der Globale Aktivator Komplex GacA/GacS steuert die Produktion von antimikrobiellen und anderen Sekundärmetaboliten. Der Sigmafaktor RpoE, welcher in Stamm CHA0 durch das *algU* Gen kodiert wird, ist involviert in der physiologischen Anpassung des Stammes an Stressbedingungen. Im dritten Teil der Dissertation wurde der Einfluss dieser Regulationssysteme auf das Überdauern des Stammes im Boden und auf den Übergang in den VBNC Zustand untersucht. Dazu wurden *gacA* und *algU* Mutanten in zwei Feldeböden mit unterschiedlicher Textur und in einen Nadelwaldboden inokuliert. Der *gacA* Mutant zeigte eine verringerte Kultivierbarkeit auf Agarplatten, und das Aufkommen von VBNC Zellen in allen drei Böden. Der *algU* Mutant verlor die Kultivierbarkeit nur im sauren Nadelwaldboden, jedoch nicht im Feldeboden. Es ist bekannt, dass GacA wie auch RpoE, im Gegensatz zu ANR, eine wichtige Rolle in der Stressresistenz der Bakterien spielen, dies ist kongruent mit der Beobachtung, dass der VBNC Zustand durch Stresssituationen in der Umwelt hervorgerufen wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dass der Eintritt des Stammes CHA0 in den VBNC Zustand mit der Untauglichkeit des Stammes zusammenhängt Stresssituationen zu bewältigen, entweder weil das Stressniveau in der Umwelt zu gross war oder weil die genetischen Regulatoren für die Stressadaptation fehlten. Die Frage ob der VBNC Zustand rückgängig gemacht werden kann und wenn ja unter welchen Umständen muss in einer zukünftigen Studie untersucht werden.