

"The unseen majority": heterotrophic bacteria in freshwater, more than just small and non-cultivable

Doctoral Thesis

Author(s):

Wang, Yingying

Publication date:

2008

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005701575>

Rights / license:

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

**“The unseen majority”: heterotrophic bacteria in freshwater,
more than just small and non-cultivable**

A dissertation submitted to
ETH ZÜRICH
for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Yingying Wang

MPhil, The University of Hong Kong
born March 16, 1980 in Tianjin
citizen of China

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Thomas Egli, examiner
Dr. Frederik Hammes, co-examiner
Prof. Dr. Nico Boon, co-examiner
Prof. Dr. Jakob Pernthaler, co-examiner
Prof. Dr. Martin Ackermann, co-examiner

July, 2008

Summary

The majority of bacterial members in the free-living microbial world is not accessible with conventional microbiological tools, such as plating. Members of this “unseen majority” are typically small in size and not easy or even impossible to cultivate. Knowledge on their growth properties is still largely inexistent, although lots of genetic information has been acquired recently using cultivation-independent methods. In this thesis, a novel cultivation approach, with natural freshwater as substrate and flow cytometry (FCM) as monitor tool, was applied to explore this “unseen majority”.

It started with the investigation on filterable bacteria. Micro-filtration is a standard process for sterilization in scientific research, medical and industrial applications, and to remove particles in drinking water or wastewater treatment. It is generally assumed that filters with a 0.1 to 0.45 μm pore size can retain bacteria. In contrast to this assumption, we have regularly observed the passage of a significant fraction of natural freshwater bacterial communities through 0.45, 0.22 and 0.1 μm pore size filters. Here in this thesis, FCM enable us to show for the first time a systematic quantification of microbial filterability, especially their ability to pass through 0.1 μm pore size filters. The filtered bacteria were subsequently able to grow on natural assimilable organic carbon (AOC) with specific growth rates up to 0.47 h^{-1} . Bacterial communities that pass preferentially through all three pore size filters at significantly increased percentages were enriched using successive filtration-regrowth cycles on freshwater AOC. In all instances, the dominant microbial populations comprised slender spirillum-shaped *Hylemonella gracilis* strains, suggesting a shape-dependent selection during filtration.

To further study the factors that determine bacterial filterability, six different bacterial species of various sizes and shapes (*H. gracilis*, *Escherichia coli*, *Sphingopyxis alaskensis*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila* and *Brevundimonas diminuta*) were tested for their filterability through sterile micropore filters. In all cases, the slender spirillum-shaped *H. gracilis* cells showed a superior ability to pass through sterile membrane filters. The results provide solid evidence that the overall shape (including flexibility), instead of biovolume, is the determining factor for the filterability of bacteria, while cultivation conditions also play a crucial role. Based on our findings, we recommend a re-evaluation of the grading system for

sterile filters, and suggest that the species *Hylemonella* should be considered as an alternative filter-testing organism for the quality assessment of micropore filters.

The laboratory research on filterable bacteria was further scaled up to test the quantitative impact of industrial scale micro-filtration on native microbial communities. Two separate groundwater aquifers were tested. Up to 10% of the native microbial community in both aquifers was able to pass through the cartridge filtration units (0.22 μm pore size) installed at both aquifers. In addition, all samples (either with or without 0.22 μm filtration) showed significant growth after bottling and storage, increasing from initially $10^3 - 10^4$ cells/ml to an average final concentrations of $1 - 3 \times 10^5$ cells/ml. However, less growth was observed in carbon-free glassware than in standard PET bottles. Furthermore, our results showed that filtration and bottling can alter the microbial community patterns as observed with FCM. The selection of slender spirillum-shaped bacteria was again observed in one of the studied groundwater aquifers. This industrial scale study further confirmed our laboratory results, which suggested that the presently practiced micro-filtration cannot serve as an absolute barrier for the native microbial community. It also provided significant insight into the impact of filtration and bottling on microbial presence and growth in bottled water.

When investigating filterable bacteria with FCM, two distinctive clusters were observed in natural freshwater and drinking water microbial communities. The two clusters conform to the so-called high (HNA) and low (LNA) nucleic acid content bacteria according to their cell size and fluorescence intensity. To date, most reported studies focused on the relative abundance and *in situ* activities of these two microbial clusters. However, knowledge of their physiological properties does not exist. In this thesis, HNA and LNA bacteria were separated by micro-filtration and their growth properties were investigated. Three LNA bacterial isolates were enriched from different freshwater sources using extinction dilution and fluorescence-activated cell sorting. It is demonstrated here that LNA bacteria can be cultivated and are able to utilize natural AOC at different temperatures, ranging from 12 to 30°C. During growth, the main FCM parameters (i.e., fluorescence intensity and sideward scatter) remain distinct from those of typical HNA bacteria. The three LNA isolates were closely related to the *Polynucleobacter* cluster according to 16S rRNA sequencing results. Furthermore, morphology of the isolates was characterized in detail using electron microscopy and an extremely small cell volume (0.05 μm^3) was observed for all the three

isolates. It is, to our knowledge, the first time that pure cultures of LNA bacteria have been isolated and characterized.

The growth properties of one LNA bacterium (isolate CB) were further compared with that of *S. alaskensis* (the model “oligotrophic ultramicrobacterium”) in low-nutrient environments. Three cultivation media with different carbon quantities and qualities were used for the investigation. In general, the two bacteria displayed quite different growth properties. Isolate CB exhibited a higher maximum specific growth rate and achieved a higher final cell concentration in natural freshwater than in synthetic laboratory medium at a similar carbon concentration. In comparison, *S. alaskensis* reached a higher growth rate and final cell concentration in high nutrient synthetic medium. The cell volume of *S. alaskensis* increased, peaked and decreased during the course of batch cultivation, while such changes were hardly detectable for the isolate CB. Moreover, it was demonstrated how growth rate and final cell number of the two bacteria responded to different media carbon concentration and incubation temperatures. The difference between the growth properties of the environmental isolate and the laboratory model strain suggested that strains adapted to laboratory media and environment may exhibit a significantly different behaviour compared to strains growing in a natural environment.

The “unseen majority” of the microbial world is always referred to by various terms like “oligotrophs”, “ultramicrobacteria”, “uncultivable cells”, etc. The three isolates reported in this thesis have been demonstrated to be both representatives of LNA bacteria, possessing typical “oligotrophic” growth characteristics, and to be very small bacteria ($0.05 \mu\text{m}^3$) with a cell size that falls into the category of “ultramicrobacteria/nanobacteria”. Hence, I think that although the puzzle of “unseen majority” was approached by researchers in different ways, each of them influenced by his/her field, it appears that we are dealing with similar microorganisms but separated previously by different terminology. The cultivation approach employed and solid data reported in this thesis may shed light into the future direction of research on “unseen majority” of the microbial world.

Zusammenfassung

Der Grossteil der frei lebenden mikrobiellen Flora ist nicht zugänglich mit konventionellen mikrobiellen Methoden wie z.B. Plattierung. Diese „unsichtbare Mehrheit“ besteht typischerweise aus sehr kleinen Zellen, die nicht einfach oder sogar unmöglich zu kultivieren sind. Kenntnisse über ihr Wachstumsverhalten sind grösstenteils noch nicht vorhanden, obwohl durch kultivierungsunabhängige Methoden in den letzten Jahren genetische Information über diese Mikroorganismen gesammelt wurde. Um diese „unsichtbare Mehrheit“ zu erforschen, wurde in dieser Doktorarbeit ein neuer Kultivierungsansatz mit natürlichem Süsswasser als Substrat und Durchflusszytometrie (FCM) als Messinstrument angewandt.

Es begann mit der Untersuchung von filtrierbaren Bakterien. Mikrofiltration ist ein Standardprozess für die Sterilisation von Flüssigkeiten in wissenschaftlicher Forschung, medizinischer und industrieller Anwendung, sowie für die Entfernung von Partikeln bei der Trinkwasseraufbereitung oder der Abwasserbehandlung. Es wird allgemein angenommen, dass Filter von 0.1 bis 0.45 μm Porengrösse Bakterien zurückhalten können. Im Gegensatz zu dieser Annahme haben wir regelmässig beobachten können, dass eine signifikante Fraktion der natürlichen bakteriellen Süsswassergemeinschaft Filter mit 0.45, 0.22 und 0.1 μm Porengrösse passieren konnte. In dieser Arbeit zeigen wir zum ersten Mal eine systematische Quantifizierung der Filtrierbarkeit natürlicher bakterieller Flora, besonders ihrer Fähigkeit 0.1 μm Porenfilter zu passieren. Die passierenden Bakterien konnten anschliessend mit spezifischen Wachstumsraten bis zu 0.47 h^{-1} auf assimilierbarem organischem Kohlenstoff wachsen. Wir konnten bakterielle Gemeinschaften, die bevorzugt Filter aller drei Porengrössen passierten anreichern. Hierzu wurden aufeinanderfolgende Filtrations- und Wachstumszyklen eingesetzt. Der Prozentanteil filtrierbarer Bakterien stieg mit jedem Filtrationszyklus signifikant. In allen Fällen bestand die dominante mikrobielle Population aus dem spirillenförmigen Stamm *Hylemonella gracilis*, was darauf hinweist, dass eine formabhängige Selektion während des Filtrationsprozesses stattfand.

Um die Faktoren weiter zu untersuchen, die die Filtrierbarkeit der Bakterien bestimmen, wurden sechs unterschiedlichen Bakterienarten unterschiedlicher Grösse und Form (*H. gracilis*, *Escherichia coli*, *Sphingopyxis alaskensis*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*

und *Brevundimonas diminuta*) auf ihre Filtrierbarkeit durch kommerziell erhältliche sterile Mikroporenfilter getestet. In allen Fällen zeigten die schlanken spirillenförmigen *H. gracilis*-Zellen die beste Fähigkeit sterile Membranfilter zu passieren. Unsere Ergebnisse liefern den soliden Beweis, dass überwiegend die Zellform (eingeschlossen der Flexibilität) und nicht das Biovolumen die Filtrierbarkeit der Bakterien bestimmt. Dabei spielen die Kultivierungsbedingungen ebenfalls eine ausschlaggebende Rolle. Nach unseren Erkenntnissen empfehlen wir eine Neubewertung des Einstufungssystems für Sterilfilter und schlagen die Art *Hylemonella* als alternativen Testorganismus für die Qualitätsbewertung von Mikroporenfiltern vor.

Die Untersuchungen wurden anschliessend auf den quantitativen Einfluss industrieller Mikrofiltration von mikrobieller Flora in Süsswasser erweitert. Zwei verschiedene Grundwasserquellen wurden getestet. Bis zu 10% der mikrobiellen Flora beider Grundwasser passierten Filterpatronen (0.22 µm Porengrösse), die an beiden Grundwasserquellen installiert wurden. Ausserdem zeigten alle Proben (entweder mit oder ohne 0.22 µm Filtration) ein signifikantes Wachstum nach Flaschenabfüllung und Lagerung. Dabei erreichten sie, ausgehend von 10^3 - 10^4 Zellen/ml, durchschnittliche Endkonzentrationen von 1 - 3×10^5 Zellen/ml. Generell wurde weniger Wachstum in kohlenstofffreier Glasware als in Standard - PET - Flaschen beobachtet. Weiterhin zeigen unserer Ergebnisse, dass Filtration und Abfüllung die Zusammensetzung der mikrobiellen Flora verändern können, was wir mit FCM beobachten konnten. Auch hier wurde die Selektion des schmalen, spirillenförmigen Bakteriums aus einem der Grundwasser beobachtet. Diese industrielle Studie bestätigte weitgehend die Resultate der vorangegangenen Laborarbeit d.h., dass Mikrofiltration nicht als absolute Grenze für die mikrobielle Flora gilt. Sie gibt auch einen wichtigen Einblick auf die Auswirkung von Filtration und Flaschenabfüllung auf die Konzentration von Mikroorganismen in flaschenabgefüllten Trinkwasser.

Während der Erforschung von filtrierbaren Bakterien konnten mit FCM zwei unterschiedliche Gruppen von natürlichen mikrobiellen Süss- und Trinkwassergemeinschaften beobachtet werden. Diese beiden Gruppen können nach Anfärbung mit einem DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff aufgrund der Zellgrösse und Fluoreszenzintensität in Bakterien mit hohem (HNA) und niedrigem Nukleinsäureanteil (LNA) unterteilt werden. Die meisten bis jetzt veröffentlichten Studien legten Gewicht auf die relative Häufigkeit und in situ Aktivitäten dieser beiden Gruppen. Das Wissen über ihre physiologischen Eigenschaften ist jedoch sehr

beschränkt. In dieser Arbeit wurden HNA- und LNA- Bakterien durch Mikrofiltration getrennt und anschliessend ihre Wachstumseigenschaften untersucht. Aus unterschiedlichen Süswässern wurden drei LNA- Bakterien angereichert und isoliert, wobei die Technik zur Verdünnung bis zur Extinktion und Zellsortierung durch Fluoreszenzanregung eingesetzt wurden. Wir zeigten, dass LNA- Bakterien kultiviert werden können und fähig sind natürlichen AOC bei unterschiedlichen Temperaturen im Bereich von 12-30°C für das Wachstum zu verwenden. Während des Wachstums blieben die wichtigsten FCM-Parameter (d.h. Fluoreszenzintensität und Seitwärtsstreuung) deutlich unterschiedlich von denen der typischen HNA- Bakterien. Die drei LNA- Isolate waren aufgrund ihrer 16S rRNA Sequenz nah verwandt zur Gruppe *Polynucleobacter*. Weiterhin wurde die Morphologie der Isolate detailliert mit Elektronenmikroskopie charakterisiert; alle drei Isolate wiesen extrem kleine Zellvolumina ($0.05 \mu\text{m}^3$) auf.

Die Eigenschaften eines LNA- Bakteriums (Isolat CB) wurden dann mit *S. alaskensis* (der Stamm gilt als Modellorganismus des Typs „oligotrophes Ultramikrobakterium“) in Nährmedien mit niedrigen Nährstoffkonzentrationen verglichen. Drei Kultivierungsmedien mit unterschiedlicher Kohlenstoffmenge und Qualität wurden für diese Untersuchungen verwendet. Die beiden Bakterien zeigten recht unterschiedliche Wachstumseigenschaften, wobei Isolat CB ein höheres μ_{max} und höhere Endzellkonzentrationen in natürlichem Süswasser als in synthetischem Labormedium bei vergleichbaren Kohlenstoffkonzentrationen erreichte. Das Zellvolumen von *S. alaskensis* nahm in der exponentiellen Wachstumsphase zu, erreichte ein Maximum, und nahm nach Eintreten in die stationäre Phase gegen Ende der Batchkultivierung wieder ab. Solche Veränderungen wurden bei dem Isolat CB nicht detektiert. Zudem wurde untersucht, wie Wachstumsrate und Endzellkonzentration durch unterschiedliche Kohlenstoffkonzentrationen und Inkubationstemperaturen beeinflusst werden. Der Unterschied zwischen den Wachstumseigenschaften des Umweltisolats und des Modellorganismus lassen vermuten, dass Stämme die sich an die Laborumwelt angepasst haben, möglicherweise nicht mehr das ursprüngliche Verhalten in ihrer natürlichen Umgebung aufweisen.

Die „unsichtbare Mehrheit“ der mikrobiellen Welt bezieht sich immer auf verschiedene Begriffe wie „Oligotrophie“, „Ultramikrobakterien“, „nicht kultivierbare Zellen“, etc. Die drei Isolate, die in dieser These beschrieben wurden, zeigten sowohl typische Eigenschaften von LNA- Bakterien mit typischen „oligotrophen“ Wachstumseigenschaften, als auch mit sehr

kleiner Zellgrösse ($0.05 \mu\text{m}^3$). Auf Grund dieser Eigenschaften würden sie in den Bereich von „Ultramikrobakterien/Nanobakterien“ fallen. Forscher haben bisher mit unterschiedlichen Ansätzen, innerhalb ihres Forschungsgebiets, versucht das Puzzle der „unsichtbaren mikrobiellen Welt“ zu enträtseln. Daher denken wir, dass sich die verschiedenen jetzt propagierten Typen stark überschneiden, und dann die Terminologie wohl reduziert werden muss. Der Kultivierungsansatz der angewandt wurde und die soliden Daten dieser Arbeit zeigen wohl eine zukünftige Forschungsrichtung in die Welt der mikrobiellen „unsichtbaren Mehrheit“.