

การคัดกรองและพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ที่แยกจากแหล่งต่างๆ



นางสาว จินตนา คำมณี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 8 7 2 2 4 1 6 2 3

SCREENING AND IDENTIFICATION OF *Acetobacter* AND *Gluconobacter*
ISOLATED FROM VARIOUS SOURCES

Miss Jintana Kommanee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492281

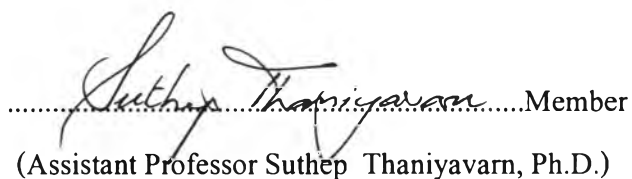
Thesis Title SCREENING AND IDENTIFICATION OF *Acetobacter*
AND *Gluconobacter* ISOLATED FROM VARIOUS
SOURCES
By Miss Jintana Kommanee
Field of Study Industrial Microbiology
Thesis Advisor Associate Professor Ancharida Akaracharanya, Ph.D.
Thesis Co-advisor Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment
of the Requirements for the Master's Degree

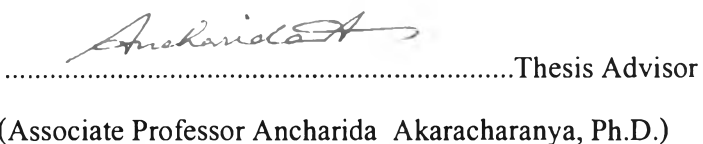


..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

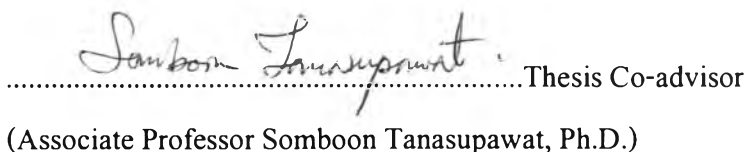
THESIS COMMITTEE



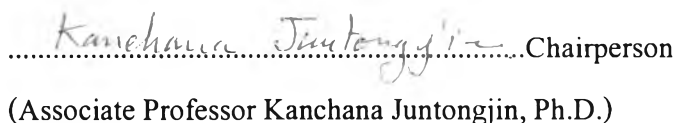
.....Member
(Assistant Professor Suthep Thaniyavarn, Ph.D.)



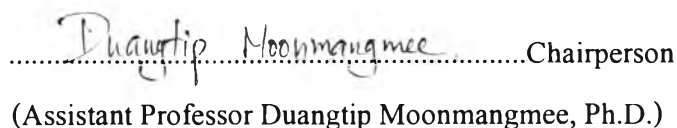
.....Thesis Advisor
(Associate Professor Ancharida Akaracharanya, Ph.D.)



.....Thesis Co-advisor
(Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.)



.....Chairperson
(Associate Professor Kanchana Juntongjin, Ph.D.)



.....Chairperson
(Assistant Professor Duangtip Moonmangmee, Ph.D.)

จินตนา คำมณี : การคัดกรองและพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ที่แยกจากแหล่งต่างๆ (SCREENING AND IDENTIFICATION OF *Acetobacter* AND *Gluconobacter* ISOLATED FROM VARIOUS SOURCES) อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. อัญชริดา อัครจรัสญา, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์, 134 หน้า.

การคัดกรองและพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ที่แยกจากผลไม้ คอกไม้ และวัสดุอื่น พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวน 181 ไอโซเลต จากผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ อนุกรมวิธานเคมี และรูปแบบของการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA สามารถจัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียเหล่านี้ได้เป็น *A. pasteurianus* 53 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 1), *A. orientalis* 42 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 2), *A. lovaniensis* 2 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 3), *G. oxydans* 17 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 4), *G. cerinus* 12 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 5), *G. frateurii* 9 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 6), *G. thailandicus* 7 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 7), *Asaia* 21 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 8), *Gluconacetobacter* 14 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 9), *Swaminatania* 2 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 10) และ *Kozakia* 2 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 11) ผลการศึกษานุกรมวิธานเคมี พบว่าแบคทีเรีย *Acetobacter* มี ubiquinone-9 และกลุ่มอื่นมี ubiquinone-10 ปริมาณ DNA G+C ของแบคทีเรียที่ทดสอบอยู่ในช่วง 52 ถึง 63 โมล% พบว่า PA 3-3 (กลุ่ม 1) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA เป็น 99.8% เมื่อเทียบกับ *A. pasteurianus* TISTR 1056^T KLM13-1, MHM10-1, FBM4-3 และ BBM91-1 (กลุ่ม 2) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA เป็น 99.5, 99.4, 99.7 และ 99.6% ตามลำดับเมื่อเทียบกับ *A. orientalis* NRIC 0481^T LBM3-1 (กลุ่ม 3) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเป็น 99.8% เมื่อเทียบกับ *A. lovaniensis* IFO 13753^T JR70-1 (กลุ่ม 4) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเป็น 99.8% เมื่อเทียบกับ *G. oxydans* NBRC 14819^T AK33-2 (กลุ่ม 5) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเป็น 99.7% เมื่อเทียบกับ *G. cerinus* NBRC 3267^T LD51-1 (กลุ่ม 6) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเป็น 99.6% เมื่อเทียบกับ *G. frateurii* NBRC 3264^T MG71-2 (กลุ่ม 7) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเป็น 99.8% เมื่อเทียบกับ *G. thailandicus* NBRC 100600^T MG71-1 (กลุ่ม 8) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเป็น 99.7% เมื่อเทียบกับ *As. bogorensis* NBRC 12264^T นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Swaminatania* และ *Kozakia* ซึ่งมีความแตกต่างจากสายพันธุ์มาตรฐานของแต่ละสกุลทั้งทางด้านลักษณะทางฟีโนไทป์และความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA (97.3-99.8%) โดยพบว่า ANI-1 (กลุ่ม 7) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA เป็น 98.7% เมื่อเทียบกับ *G. frateurii* NBRC 3264^T SIS32-2 (กลุ่ม 9) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA เป็น 97.8% เมื่อเทียบกับ *Ga. liquefaciens* IFO12388^T SI15-1 (กลุ่ม 10) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA เป็น 97.7% เมื่อเทียบกับ *Sw. salitolerans* PA51^T และ CT8-1 (กลุ่ม 11) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA เป็น 96.4% เมื่อเทียบกับ *K. baliensis* NRIC 0488^T

จากแบคทีเรีย *A. pasteurianus* 53 ไอโซเลต พบว่า PA 3-3 มีกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสสูงสุด ในการผลิตกรดแอสिटิกจากเอธานอล โดยผลิตกรดแอสिटิกสูงสุด 28.87 กรัมต่อลิตร ในน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อเจริญในอาหารที่ประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล 4 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสिटิก 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่อัตรา 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 วัน

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4872241623: MAJOR: INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORDS: SCREENING / IDENTIFICATION / ACETIC ACID BACTERIA/ ALCOHOL DEHYDROGENASE

JINTANA KOMMANEE: SCREENING AND IDENTIFICATION OF *Acetobacter* AND *Gluconobacter* ISOLATED FROM VARIOUS SOURCES. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. ANCHARIDA AKARACHARANYA, PH. D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMBOON TANASUPAWAT, PH. D. 134 pp.

Screening and identification of acetic acid bacteria isolated from various sources were carried out. One hundred eighty-one isolates were isolated from fruits, flowers, and other materials collected in Thailand. On the basis of their phenotypic and chemotaxonomic characteristics including 16S-23S rDNA restriction pattern analysis and the phylogenetic analysis using 16S rDNA sequences, 53 isolates were identified as *A. pasteurianus*, 42 as *A. orientalis*, 2 as *A. lovaniensis*, 17 as *G. oxydans*, 12 as *G. cerinus*, 9 as *G. frateurii*, 7 as *G. thailandicus*, 21 as *Asaia*, 14 as *Gluconacetobacter*, 2 as *Swaminatania* and 2 as *Kozakia*. The tested strains of *Acetobacter* contained ubiquinone-9 as the major quinone while the rests contained ubiquinone-10. The DNA G+C contents of the tested isolates ranged from 52 to 63 mol%. PA 3-3 (Group 1) showed 99.8% similarity of 16S rDNA nucleotide with *A. pasteurianus* TISTR 1056^T. KLM13-1, MHM10-1, FBM4-3 and BBM91-1 (Group 2) showed 99.5, 99.4, 99.7, and 99.6% sequence similarities with *A. orientalis* NRIC 0481^T, respectively. Strains LBM3-1 (Group 3) showed 99.8% similarity with *A. lovaniensis* IFO 13753^T. Strain JR70-1 (Group 4) showed 99.8% similarity with *G. oxydans* NBRC 14819^T. Strain AK33-2 (Group 5) showed 99.7% similarity with *G. cerinus* NBRC 3267^T. Strain LD51-1 (Group 6) showed 99.6% similarity with *G. frateurii* NBRC 3264^T. Strain MG71-2 (Group 7) showed 99.8% similarity with *G. thailandicus* NBRC 100600^T. Strain MG71-1 (Group 8) showed 99.7% similarity with *As. bogorensis* NBRC 12264^T. In addition, the novel species were found in *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Swaminatania* and *Kozakia*. They were differentiated from the type strains by several phenotypic characteristics and 16S rDNA sequence similarity. AN1-1 (Group 7) showed 98.7% similarity with *G. frateurii* NBRC 3264^T. Strain SIS32-2 (Group 9) showed 97.8% similarity with *Ga. liquefaciens* IFO 12388^T. Strain SI15-1 (Group 10) showed 97.7% similarity with *Sw. salitolerans* PA51^T. CT8-1 (Group 11) showed 96.4% similarity with *K. baliensis* NRIC 0488^T.

From *A. pasteurianus* (Group 1) 53 isolates, PA 3-3 exhibited a maximum alcohol dehydrogenase activity in acetic acid production from ethanol. This isolate produced high acetic acid 28.87 g/l in the culture broth when grown in medium containing (w/v) 0.5 % yeast extract, 4% ethanol and 1% acetic acid at 30 °C for 3 days.

Department Microbiology
Field of study Industrial Microbiology
Academic year 2006

Student's signature..... *Jintana Kommanee*
Advisor's signature..... *Ancharida Akaracharanya*
Co-Advisor's signature..... *Somboon Tanasupawat*

ACKNOWLEDGMENTS

To success of this research would not be realized without the support and assistance of some persons and various institutions to whom I would like to express my grateful appreciation as followed:

To Associate professor Dr. Ancharida Akaracharanya, my advisor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Chulalongkorn University, for her guidance, kindly assistance and valuable advice.

To Associate professor Dr. Somboon Tanasupawat my co-advisor, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his guidance, kindly assistance and valuable advice.

To thank assistant Professor Dr. Duangtip Moonmangmee, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, King Mongkut's University of Technology Thonburi, for his guidance, kindly assistance and valuable advice.

To thank Dr. Somporn Moonmangmee, TISTR, Thailand Institute Scientific and Technological , for his guidance, kindly assistance and valuable advice.

To thank professor Dr. Yuzo Yamada, Professor Emerites, Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, for his suggestion and kindness throughout the research study.

To Dr. Pattaraporn Yukphan and Mr. Taweesak Malimas, BIOTEC Culture Collection, BIOTEC Central Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, for their helpful suggestion, encouragement and kindness throughout the research study.

Finally, I wish to express my infinite gratitude to my family (Mr. Suranart Kommanee, Mrs. Ting Kommanee, Miss Nartiya Kommanee and Mr. Yodphao Suwannarin) for their love, understanding, encouragement and mortal support.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai)	iv
ABSTRACT (English).....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
CONTENT OF TABLES.....	x
CONTENT OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. LITERATURE REVIEWS.....	4
1. Characterization of acetic acid bacteria	4
1.1 <i>Acetobacter</i>	4
1.2 <i>Gluconobacter</i>	5
1.3 <i>Acidomonas</i>	6
1.4 <i>Gluconacetobacter</i>	7
1.5 <i>Asaia</i>	7
1.6 <i>Kozakia</i>	8
2. Molecular Analysis.....	9
2.1 Polymerase chain reaction (PCR)	9
2.2 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)	10
2.3 DNA sequencing analysis.....	12
2.4 DNA-DNA hybridization.....	14
3. Alcohol dehydrogenase (ADH)	16
III. EXPERIMENTAL.....	18
1. Isolation of acetic acid bacteria	18
2. Identification methods.....	18
2.1 Cell morphological and cultural characteristics.....	18
2.1.1 Gram staining	18
2.1.2 Flagella staining.....	19

2.2 Physiological and biochemical characteristics.....	19
2.2.1 Oxidation/Fermentation catabolism test	19
2.2.2 Catalase test	19
2.2.3 Growth at different pH	19
2.2.4 Oxidation of acetate and lactate	19
2.2.5 Growth in the media containing 0.3% acetic acid at pH3.5	20
2.2.6 Growth in the media containing 30% D-Glucose	20
2.2.7 Formation of water-soluble brown pigment	20
2.2.8 Dihydroxyacetone from glycerol	20
2.2.9 Growth and acid production from different kind of Carbohydrates	20
2.3 Chemotaxonomic characteristics.....	20
2.3.1 Ubiquinone analysis	20
2.3.2 DNA base composition analysis.....	21
2.4 Molecular characteristics.....	22
2.4.1 The 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region restriction fragments length polymorphism (RFLP) analyses	22
2.4.2 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis.....	25
3. Screening of high acetic acid-producing thermotolerant strains.....	26
3.1 Culture medium and growth condition.....	26
3.2 Preparation of crude enzyme ADH solution.....	26
3.3 Alcohol dehydrogenase assay.....	27
4. Acetic acid production of the selected strains.....	27
4.1 Effects of ethanol concentration.....	27
4.2 Effects of acetic acid concentration	27
4.3 Effects of temperature.....	27
IV. RESULTS AND DISCUSSION.....	28
1. Isolation of acetic acid bacteria	28
2. Identification of isolates.....	31
2.1 Cell morphological and cultural characteristics.....	31

2.2 Physiological and biochemical characteristics.....	32
2.3 Chemotaxonomic characteristics.....	71
2.3.1 Ubiquinone analysis.....	71
2.3.2 DNA base composition.....	71
2.4 Molecular characteristics.....	72
2.4.1 The 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region restriction fragments length polymorphism (RFLP) analyses.....	72
2.4.2 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis.....	76
3. Screening of high acetic acid-producing thermotolerant strains.....	93
4. Acetic acid production of selected strains.....	97
4.1 Effects of ethanol and acetic acid concentration of PA3-3.....	98
4.2 Effects of temperature of PA3-3.....	98
V. CONCLUSION.....	100
REFERENCES.....	102
APPENDICES.....	111
Appendix A : Instruments, materials, chemical reagents and glassware.....	112
Appendix B : Culture Media.....	115
Appendix C : Instruments, materials, chemical reagents and glassware.....	119
Appendix D : 16S rDNA nucleotide sequences.....	124
Appendix E : Standard curve of Bovine serum albumin (BSA) and Total acid.....	132
Appendix F : Restriction size of <i>Acetobacter</i> and <i>Gluconobacter</i> type strains.....	133
BIOGRAPHY.....	134

CONTENT OF TABLES

Table	Page
2.1 Differential characteristics of <i>Acetobacter</i> species.....	5
2.2 Differential characteristics of <i>Gluconobacter</i> species.	6
3.1 HPLC conditions for DNA base composition analysis	22
3.2 Determination of optimal condition of PCR.....	23
3.3 Large scale PCR.....	23
3.4 Condition of 16S-23S rDNA ITS PCR-RFLP for restriction enzyme	25
4.1 Source and date of sample that isolated	28
4.2 Physiological and biochemical characteristic of 181 isolates	33
4.3 Acid from carbohydrates	52
4.4 Restriction pattern digested by restriction endonucleases of isolates.....	72
4.5 Restriction pattern digested by restriction endonucleases of isolates	74
4.6 Differential characteristics of <i>Acetobacter</i> strains.....	87
4.7 Differential characteristics of <i>Gluconobacter</i> strains.....	90
4.8 Differential characteristics of SI15-1.....	92
4.9 Alcohol dehydrogenase (ADH) activity of isolates at 30°C	93
4.10 Alcohol dehydrogenase (ADH) activity of isolates at 40°C	95
4.11 Effect of ethanol concentration on PA3-3.....	98
4.12 Effect of acetic acid concentration on PA3-3.....	98

CONTENT OF FIGURES

Figure	Page
2.1 The 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions.....	10
2.2 Alcohol-oxidizing systems in acetic acid bacteria.	17
4.1 Ubiquinone of representative strains	71
4.2 Restriction patterns of 16S-23S rDNA ITS region PCR products of type strains of <i>Acetobacter</i> species by digestion with <i>Hpa</i> II (a) and <i>Hae</i> III (b) restriction endonucleases.....	73
4.3 Restriction patterns of 16S-23S rDNA ITS region PCR products of type strains of <i>Gluconobacter</i> species by digestion with <i>Bsp</i> 1286I (a) and <i>Mbo</i> II (b) restriction endonucleases	75
4.4 Neighbour-joining-tree showing the phylogenetic position of strain PA 3-3 based on 16S rDNA sequences. Bar, 0.005 substitution per nucleotide position. Bootstrap values expressed as 1,000 replications.	78
4.5 Neighbour-joining-tree showing the phylogenetic position of strains KLM 13-1, BBM 91-1, FBM 4-3 and MHM 10-1 based on 16S rDNA sequences. Bar, 0.005 substitution per nucleotide position. Bootstrap values expressed as 1,000 replications.	79
4.6 Neighbour-joining-tree showing the phylogenetic position of strain LBM3-1 based on 16S rDNA sequences. Bar, 0.005 substitution per nucleotide position. Bootstrap values expressed as 1,000 replications.....	80
4.7 Neighbour-joining-tree showing the phylogenetic position of strains JR70-1, AK33-2, LD51-1, MG71-2 and AN1-1 based on 16S rDNA sequences. Bar, 0.005 substitution per nucleotide position. Bootstrap values expressed as 1,000 replications.....	81
4.8 Neighbour-joining-tree showing the phylogenetic position of strains MG71-1 based on 16S rDNA sequences. Bar, 0.005 substitution per nucleotide position. Bootstrap values expressed as 1,000 replications.....	82
4.9 Neighbour-joining-tree showing the phylogenetic position of strain SIS32-2 based on 16S rDNA sequences. Bar, 0.005 substitution per nucleotide position. Bootstrap values expressed as 1,000 replications.	83

Figure	Page
4.10 Neighbour-joining-tree showing the phylogenetic position of strain SI15-1 based on 16S rDNA sequences. Bar, 0.005 substitution per nucleotide position. Bootstrap values expressed as 1,000 replications	84
4.11 Neighbour-joining-tree showing the phylogenetic position of strain CT8-1 based on 16S rDNA sequences. Bar, 0.005 substitution per nucleotide position. Bootstrap values expressed as 1,000 replications.....	85
4.12 Effect of temperature on ADH specific activity of the top 4 strains.....	97
4.13 Growth curve of PA 3-3 at 30°C.....	97
4.14 Species of acetic acid bacteria found in fruits, flowers and other materials.....	99

ABBREVIATIONS

ADH	=	Alcohol dehydrogenase
ALDH	=	Aldehyde dehydrogenase
bp	=	base pair
BCC	=	BIOTEC Culture Collection
°C	=	Degree Celsius
cm	=	Centimeter
EDTA	=	Disodiummethylenediamine tetraacetate
EtoAc	=	Ethyl acetate
g/l	=	gram/litter
g	=	gram
GenBank	=	National Institute of Health genetic sequence database
hr.	=	hour
HPLC	=	High performance liquid chromatography
HCl	=	hydrochloric acid
ITS	=	Internal transcribes spacer region
JCM	=	Japan Collection of Microorganisms
mg	=	Milligram
l	=	liter
M	=	Molar
MEGA	=	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
ml	=	mililiter
mm	=	milimeter
MeOH	=	Methanol
nm	=	nanometer
NBRC	=	NITE Biological Resource Center
PCR	=	Polymerase chain reaction
Q	=	Quinone
rDNA	=	Ribisomal deoxynucleic acid
rpm	=	Round per minutes
Si Gel	=	Silica gel

Sp.	=	Species
TLC	=	Thin layer chromatography
UV	=	Ultraviolet
μl	=	microliter
μg	=	microgram
U	=	Unit
v/v	=	volume/volume
w/v	=	weight/ volume
%	=	Percent