ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47210

การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่หน่อหัวฟ้าละลายอินทรีย์

นางสาวอธิราภรณ์ คงผล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปกใน
b00259114
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47210

การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์

นางสาว อจิราภรณ์ คงผล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4872531623

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ORGANIC-SOLVENT TOLERANT BACTERIA

Miss Ajiraporn Kongpol

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ORGANIC-SOLVENT TOLERANT BACTERIA**
By	**Miss Ajiraporn Kongpol**
Filed of study	**Biotechnology**
Thesis Advisor	**Assistant Professor Alisa Vangnai, Ph.D.**

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

S. Hannongbua ..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Aran Incharoensakdi ..... Chairman
(Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

Alisa Vangnai ..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Alisa Vangnai, Ph.D.)

Warawut Chulalaksananukul ..... Member
(Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.)

Kanoktip Packdibamrung ..... Member
(Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

อจิราภรณ์ คงผล : การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์. (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ORGANIC-SOLVENT TOLERANT BACTERIA) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. อลิสา วังใน, 150 หน้า.

E47210

การคัดแยกแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากแหล่งดิน 13 แหล่ง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 36 สายพันธุ์ ซึ่งมีความสามารถในการทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้แตกต่างกัน โดยแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P_{ow} ในช่วงกว้าง ได้แก่ *Deinococcus geothermalis* T27 และ *Bacillus cereus* 4/1 โดยเฉพาะ *D. geothermalis* T27 สามารถทนต่อเอทิลอะซิเตทได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นในความเข้มข้น 20% (v/v) และพบว่าเมื่อเลี้ยงภายใต้ภาวะที่มีเอทิลอะซิเตทจะมีผลทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของชนิดและปริมาณกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะเดียวกัน *D. geothermalis* T27 ยังสามารถใช้เอทิลอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ โดยตรวจพบว่ามีการเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตเอสเทอเรสขึ้น ในขณะที่แบคทีเรีย *B. cereus* 4/1 สามารถทนต่อโทลูอีนซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษสูงได้ที่ความเข้มข้นสูงถึง 20% (v/v) และยังสามารถใช้โทลูอีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ 2) กลุ่มที่สามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P_{ow} สูงกว่า 3 คือ *Bacillus subtilis* 45 เมื่อเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่มีเอ็นเดคเคนไม่พบการเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์และชนิดของกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถทนต่อเอ็นเดคเคน และ ไซโคลเฮกเซนได้ในความเข้มข้นสูงถึง 20% (v/v) และยังใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้อีกด้วย 3) กลุ่มที่ทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P_{ow} ต่ำกว่า 2 เช่น บิวทิลอะซิเตท บิวทานอล และ เอทิลอะซิเตท ได้แก่ *Brevibacillus agri* 13 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ในภาวะที่มีเอทิลอะซิเตท พบว่าขนาดของเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแต่มีการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถใช้บิวทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พร้อมทั้งตรวจพบแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเมื่อเลี้ยงในภาวะที่มีบิวทานอล นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อ เอทิลอะซิเตท ได้ที่ความเข้มข้น 20% (v/v) แต่ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหรือพลังงานได้ ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้ แสดงถึงศักยภาพในการนำไปใช้ในกระบวนการผลิตสารผลิตภัณฑ์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....อจิราภรณ์ คงผล.....

ปีการศึกษา 2550 .....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4772550423: MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: ORGANIC-SOLVENT TOLERANT BACTERIA/ SCREENING/ ISOLATION

AJIRAPORN KONGPOL: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ORGANIC-SOLVENT TOLERANT BACTERIA. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. ALISA VANGNAI, Ph.D., 150 pp.

E47210

Thirty six organic solvent tolerant bacteria were isolated at 45°C from 13 soil samples. The bacterial isolates could be divided into 3 groups. 1) Bacteria which tolerate to organic solvents with a broad rang of log P_{ow} value consist of *Deinococcus geothermalis* T27 and *Bacillus cereus* 4/1. *D. geothermalis* T27 demonstrated high tolerance to 20% (v/v) ethyl acetate. *D. geothermalis* T27 cells in a direct contact to ethyl acetate appeared to have a smaller size but no significant change in the level of fatty acid composition. Cells could also degrade ethyl acetate and induce esterase when exposed to ethyl acetate. For *B. cereus* 4/1, it had high tolerance to 20% (v/v) toluene and could degrade toluene. 2) Bacteria which tolerate to organic solvents with log $P_{ow} \geq 3.0$ is *Bacillus subtilis* 45. *B. subtilis* 45 cells changed neither cell size nor the concentration of fatty acid composition in *n*-decane exposure. *B. subtilis* 45 tolerated to 20% (v/v) of *n*-decane and cyclohexane and could degrade both of them. 3) Bacteria which tolerate to organic solvents with log $P_{ow} \leq 2.0$ is *Brevibacillus agri* 13. Cells of *Brevibacillus agri* 13 did not change cell size after ethyl acetate exposure. However, there is a change in a fatty acid composition. It could degrade *n*-butanol and induced alcohol dehydrogenase when exposed to with *n*-butanol. *Brevibacillus agri* 13 could tolerate to 20% (v/v) ethyl acetate but could not degrade ethyl acetate. Intriguing characteristics of organic solvent tolerant bacteria may demonstrate their potential use in biotechnological processes.

Field of Study: Biotechnology.....Student's Signature: ...Ajiraporn Kongpol...
Academic Year: 2007.....Advisor's Signature: ...Alisa Vangnai...

ACKNKOWLEDGEMENTS

I would to express my deepest gratitude to my advisor, Assistant Professor Alisa Vangnai for her excellent instruction, guidance, encouragement, attention and support throughout this thesis. Without her kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Professor Aran Incharoensakdi, Associate Professor Warawut Chulaluksananukul and Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung for serving as thesis committee, for valuable comments and also for useful suggestiions.

There are so many friends to mention from so little space to fill. I would like to give a deep thank to all staff members of room 604 and friends in the Department of Biochemistry and Program in Biotechnology for their friendsphip, kind assistance and support. I would like to express thanks to Miss Kanokwan Chodchey and Professor Cornelis Verduyn for FAME analysis.

Finally, the greastest gratitude is expressed to my lovely family for their infinite love, willpower, support, understanding, encouragement and everything giving to my life.

This work was financially supported by 90th aniversary of Chulalongkorn University Fund, Graduate School, and Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI)	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	xiv
LIST OF FIGURES	xvi
NOMENCLATURE	xix
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Statement of problem	1
1.2 Objectives and expected results	3
1.3 Hypotheses	4
1.4 Scopes of the study	4
1.5 The organization	5
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	6
2.1 Organic solvent	6
2.2 Use of organic solvent	7
2.3 Organic solvent tolerant bacteria	8

Page

2.4 Physiological basis of organic solvent toxicity and the concept of organic solvent tolerance 9

2.5 Isolation of organic solvent tolerant bacteria 10

2.6 Adaptive mechanisms of organic-solvent tolerance 14

2.6.1 Morphological adaptation 15

2.6.2 Changes of the energetic status 15

2.6.3 Adaptation of the cell membrane 16

2.6.4 Changes in the cell wall and outer membrane..... 17

2.6.5 Modifying surface properties (charge and hydrophobicity) 17

2.6.6 Transformation or degradation of the organic solvent..... 18

2.6.7 Active transport of solvents from the membrane into the environment by energy-consuming efflux systems 18

2.6.8 Modifying membrane proteins..... 19

2.7 Application of organic solvent-tolerant bacteria..... 19

2.7.1 Biotechnology application 20

2.7.2 Bioremediation 21

Page

CHAPTER III METHODOLOGY 23

3.1 Laboratory equipments, chemicals 23

3.1.1 Laboratory equipments 23

3.1.2 Laboratory chemicals 24

3.2 Culture medium 27

3.3 Methodologies 29

3.3.1 Screening and isolation of organic solvent tolerant bacteria using enrichment technique with toluene and cyclohexane vapor 30

3.3.2 Primary test of the isolates for solvent utilization and tolerance 30

3.3.3 Secondary test of the isolates for solvent utilization and tolerance 31

3.3.4 Identification of the organic solvent-tolerant bacteria 31

3.3.5 Characterization of the organic solvent-tolerant bacteria 33

3.3.5.1 Effect of types and concentrations of organic solvent on cell growth and tolerance 33

3.3.5.2 Effect of organic solvent on cell morphology ... 34

3.3.5.3 Determination of cell fatty acid composition 36

3.3.5.4 Organic solvent utilization using resting cell technique 37

Page

3.3.5.5 Determination of enzymatic activity involving organic solvent utilization 38

3.3.6 Factors involving organic solvent tolerance of the bacteria 42

3.3.6.1 Effect of divalent ion on cell growth and organic solvent tolerant 42

3.3.6.2 Effect of nutrient on cell growth and organic solvent tolerance 42

CHAPTER IV RESULTS 43

4.1 Screening, isolation and identification of organic solvent-tolerant bacteria 44

4.1.1 Primary test of the isolates for organic solvent utilization and tolerance..... 44

4.1.2 Secondary test of the isolates for organic solvent utilization and tolerance 45

4.1.3 Identification of organic solvent-tolerant bacteria 59

4.1.3.1 The morphological characteristics 59

4.1.3.2 The biochemical test 59

4.1.3.3 16S ribosomal DNA gene 59

Page

4.2 *Deinococcus geothermalis* T27 65

4.2.1 Characterization of organic-solvent tolerant bacteria..... 65

4.2.1.1 Effect of type and concentration of organic solvent on growth and tolerance..... 65

4.2.1.2 Effect of organic solvent on cell morphology 68

4.2.1.3 Effect of organic solvent on fatty acid composition 70

4.2.1.4 Organic solvent utilization..... 71

4.2.1.5 Enzymatic activity involving organic solvent utilization 75

4.2.2 Factors involving of organic-solvent tolerance 73

4.2.2.1 Effect of ions on growth and tolerance..... 73

4.2.2.2 Effect of nutrient on growth and tolerance 76

4.3 *Bacillus cereus* strain 4/1 79

4.3.1 Characterization of organic-solvent tolerant bacteria 79

4.3.1.1 Effect of type and concentration of organic solvent on growth and tolerance..... 79

4.3.1.2 Effect of organic solvent on cell morphology ... 80

4.3.1.3 Effect of organic solvent on fatty acid composition..... 82

4.3.1.4 Organic solvent utilization..... 83

4.3.2 Factors involving of organic-solvent tolerance 84

4.3.2.1 Effect of ions on growth and tolerance 84

Page

4.3.2.2 Effect of nutrient on growth and tolerance 87

4.4 *Bacillus subtilis* strain 45 89

4.4.1 Characterization of organic-solvent tolerant bacteria 89

4.4.1.1 Effect of type and concentration of organic solvent on growth and tolerance..... 89

4.4.1.2 Effect of organic solvent on cell morphology 91

4.4.1.3 Effect of organic solvent on fatty acid composition 92

4.4.1.4 Organic solvent utilization 93

4.4.2 Factors involving of organic-solvent tolerance 94

4.4.2.1 Effect of ions on growth and tolerance 94

4.4.2.2 Effect of nutrient on growth and tolerance 98

4.5 *Brevibacillus agri* strain 13 101

4.5.1 Characterization of organic-solvent tolerant bacteria ... 101

4.5.1.1 Effect of type and concentration of organic solvent on growth and tolerance 101

4.5.1.2 Effect of organic solvent on cell morphology ... 102

4.5.1.3 Effect of organic solvent on fatty acid composition 104

4.5.1.4 Organic solvent utilization 104

4.5.1.5 Enzymatic activity involving organic solvent utilization..... 106

Page

4.5.2 Factors involving of organic-solvent tolerance 108

4.5.2.1 Effect of ions on growth and tolerance 108

4.5.2.2 Effect of nutrient on growth and tolerance..... 112

CHAPTER V DISCUSSION..... 114

Discussion 114

CHAPTER VI CONCLUSIONS..... 124

Conclusions..... 124

REFERENCES..... 126

APPENDICES..... 135

Appendix A..... 135

Appendix B 146

Appendix C 148

BIOGRAPHY..... 149

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1	Chemical classification of organic solvents	6
2.2	Popular solvents in solvent-containing products	8
2.3	Organic solvents and their log P_{ow} values	10
2.4	Examples of organic solvent tolerant bacteria	12
2.5	Solvent tolerance of Gram-negative bacteria	13
2.6	Solvent tolerance of Gram-positive bacteria	13
4.1	Source of soil sample used for screening and bacterial isolates obtained	46
4.2	Primary test for solvent tolerance and solvent utilization on agar overlaid with solvent	47
4.3	Organic solvent tolerant bacterial isolates chosen for further study	52
4.4	Morphological characteristic of bacteria	61
4.5	The biochemical test results of four bacterial isolates were chosen	63
4.6	Comparison of 16S ribosomal DNA gene for bacterial identification	64
4.7	Cell size of *D. geothermalis* T27 exposed and not exposed ethyl acetate	68
4.8	Fatty acid composition of *D. geothermalis* T27 non-exposed and exposed to ethyl acetate	70
4.9	Esterase activity of *D. geothermalis* T27	72
4.10	Cell size of *B. cereus* strain 4/1 exposed and not exposed to chloroform	81
4.11	Fatty acid composition of *B. cereus* strain 4/1 non-exposed and exposed to chloroform	82
4.12	Cell size of *B. subtilis* strain 45 grown with and without *n*-decane	91

Page

4.13 Fatty acid composition of *B. subtilis* strain 45 non-exposed and exposed to *n*-decane 93

4.14 Cell size of *Brevibacillus agri* strain 13 exposed with ethyl acetate..... 103

4.15 Fatty acid composition of *Brevibacillus agri* strain 13 non-exposed and exposed to ethyl acetate 104

4.16 Esterase activity of *Brevibacillus agri* strain 13 106

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1	Adaptive mechanisms protecting cells against toxic effects of organic solvents	14
3.1	A flow chart of experimental methods of the thesis	29
3.2	Characteristics of colonies	32
4.1	Secondary test of bacterial isolates in group I	53
4.2	Secondary tests of bacterial isolates in group II	55
4.3	Secondary tests of bacterial isolates in group IV	57
4.4	Growth inhibitions of *D. geothemalis* T27	67
4.5	Cell morphology of *D. geothermalis* T27	69
4.6	Utilization of ethyl acetate by *D. geothermalis* T27	71
4.7	Effect of divalent ion on toluene tolerance in *D. geothermalis* T27	74
4.8	Effect of divalent ion on ethyl acetate tolerance in *D. geothermalis* T27	75
4.9	Growth of *D. geothermalis* T27 in various types of nutrients.	77
4.10	Effect of nutrient on cyclohexane; toluene; benzene; ethyl acetate tolerance in *D. geothermalis* T27	78
4.11	Growth inhibition of *B. cereus* strain 4/1	80
4.12	Cell morphology of *B. cereus* strain 4/1	81

Page

4.13 Utilization of toluene by *B. cereus* strain 4/1 83

4.14 Effect of divalent ion on styrene tolerance in *B. cereus* strain 4/1 85

4.15 Effect of divalent ion on toluene tolerance in *B. cereus* strain 4/1 86

4.16 Growth of *B. cereus* strain 4/1 in various types of nutrients..... 87

4.17 Effect of nutrient on styrene; toluene; chloroform tolerance in *B. cereus* strain 4/1 88

4.18 Growth inhibition of *B. subtilis* strain 45 90

4.19 Cell morphology of *B. subtilis* strain 45 92

4.20 Utilization of *n*-decane by *B. subtilis* strain 45 93

4.21 Utilization of cyclohexane by *B. subtilis* strain 45 94

4.22 Effect of divalent ion on *n*-heptane tolerance in *B. subtilis* strain 45 95

4.23 Effect of divalent ion on cyclohexane tolerance in *B. subtilis* strain 45 96

4.24 Effect of divalent ion on ethylbenzene tolerance in *B. subtilis* strain 45 97

4.25 Growth of *B. subtilis* strain 45 in varies type of nutrients 98

4.26 Effect of nutrient on *n*-decane; *n*-heptane; *n*-hexane; cyclohexane; ethylbenzene tolerance in *B. subtilis* strain 45 99

4.27 Growth inhibition of *Brevibacillus agri* strain 13 102

4.28 Cell morphologies of *Brevibacillus agri* strain 13 103

Page

4.29 Utilization of *n*-butanol by *Brevibacillus agri* strain 13 105

4.30 Utilization of ethyl acetate by *Brevibacillus agri* strain 13 105

4.31 Native- polyacrylamind gel electrophorsis with activity staining of butanol dehydrogenase 107

4.32 Effect of divalent ion on butyl acetate tolerance in *Brevibacillus agri* strain 13 109

4.33 Effect of divalent ion on *n*-butanol tolerance in *Brevibacillus agri* strain 13 110

4.34 Effect of divalent ion on ethyl acetate tolerance in *Brevibacillus agri* strain 13 111

4.35 Growth of *Brevibacillus agri* strain 13 in various types of nutrients. Symbols of organic solvents 112

4.36 Effect of nutrient on butyl acetate; *n*-butanol; ethyl acetate tolerance in *Brevibacillus agri* strain 13 113

NOMENCLATURE

CFU	=	Colony forming unit
ml	=	Milliliter
µl	=	Microliter
µg	=	microgram
O.D.	=	Optical density
rpm	=	Revolution per minut
min	=	Minute
^{o}C	=	Degree of Celsius
cm	=	centimeter
et al.	=	ET. Alii (latin), and others
g	=	Gravitation acceleration
h	=	hour
l	=	liter
M	=	molar
mM	=	millimolar
mg	=	milligram
min	=	minute
MW	=	molecular weight