การคัดกรองและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียผลิตเซลลูเลสจากดิน ในจังหวัดน่าน

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวธนวรรณ ท่าพริก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4872305123

SCREENING AND IDENTIFICATION OF CELLULASE-PRODUCING BACTERIA FROM SOIL IN NAN PROVINCE

Miss Thanawan Taprig

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 Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492301

Thesis Title	SCREENING AND IDENTIFICATION OF CELLULASE-PRODUCING BACTERIA FROM SOIL IN NAN PROVINCE
By	Miss Thanawan Taprig
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

..... Chairman

(Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Ancharida Akaracharanya, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Kanchana Juntongjin, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Vichien Kitpreechavanich, Ph.D.)

ธนวรรณ ท่าพริก : การคัดกรองและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียผลิตเซลลูเลสจากดินในจังหวัดน่าน (SCREENING AND IDENTIFICATION OF CELLULASE-PRODUCING BACTERIA FROM SOIL IN NAN PROVINCE)
อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. อัญชริดา อัครจรัสญา อ.ที่ปรึกษาร่วม :,รศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 115 หน้า

การคัดแยกและคัดกรองแบคทีเรียผลิตเซลลูเลสจากตัวอย่างดินในจังหวัดน่านที่เก็บจากอำเภอปัว 80 ตัวอย่าง และ อำเภอสันติสุข 40 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวน 65 สายพันธุ์จากดินอำเภอปัว และแยกได้จำนวน10สายพันธุ์จากดินอำเภอสันติสุข ผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และอนุกรมวิธานเคมี รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียเหล่านี้ได้เป็น *Brevibacillus* 2 สายพันธุ์, *Paenibacillus* 20 สายพันธุ์ และ *Bacillus* 53 สายพันธุ์ ผลการศึกษาความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNAของสายพันธุ์ที่เป็นตัวแทน พบว่าP5-5 (กลุ่มที่ 1) คล้ายคลึงกับ *Brevibacillus agri* DSM 6348^T (97.2%) P2-1 (กลุ่มที่ 2) และ S10-4 (กลุ่มที่ 3) คล้ายคลึงกับ *Paenibacillus cineris* 3998^T (96.1, 99.1% ตามลำดับ) P2-3 และ P4-7 (กลุ่มที่4) S9-2 (กลุ่มที่ 5) P6-8 (กลุ่มที่ 6), P4-8, P5-2, P7-1 และ P7-3 (กลุ่มที่ 7) P1-5 (กลุ่มที่ 8) P6-7 (กลุ่มที่ 9) คล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* KCTC 3135^T (95.5, 97.3, 95.6, 94.3, 96.1, 96.8, 94.5, 98.3, 99.3 และ 99.9% ตามลำดับ) ผลการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทดสอบของสกุล *Brevibacillus*, *Paenibacillus* และ *Bacillus* มีกรด *meso*-diaminopimelic เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ และ menaquinones เป็น MK-7 นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ตัวแทนของ *Brevibacillus* มีปริมาณ G+C ของ DNA เป็น 54.2 โมล% สายพันธุ์ตัวแทนของ *Paenibacillus* อยู่ในช่วง 52.7-53.5 โมล% และ *Bacillus* อยู่ในช่วง 35.5-47.8 โมล% ตามลำดับ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า P5-5 เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Brevibacillus* P2-1 เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล*Paenibacillus* สายพันธุ์ P2-3, S9-2, P6-8, P4-8, P5-2 และ P7-1 เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ ใหม่ในสกุล *Bacillus* โดยพบว่าลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียดังกล่าวมีความแตกต่างจาก type strains ส่วน P4-7, P7-3, P1-5, P6-7 ซึ่งมีความคล้ายคลึงของลำดับเบส 97.8-99.9% กับ *Bacillus subtilis* KCTC 3135^T จำเป็นต้องศึกษาความคล้ายคลึงของDNA

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (carboxylmethyl cellulase) พบว่าทั้ง 75 สายพันธุ์ ให้ค่า hydrolysis capacity (HC, เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส/เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี) ขนาดกว้างมากที่สุด 8.5 ซม. โดย 52 สายพันธุ์ มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส 0-0.005 U/ml และ 20 สายพันธุ์ มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส 0.005-0.1 U/ml และพบว่า 3 สายพันธุ์ได้แก่ P4-6, P3-1 P4-8 มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสมากกว่า 0.01 U/ml จากการคัดเลือกสายพันธุ์ P2-1, P2-3, P7-7 ที่มีค่า HC สูงสุดและ P4-6, P3-1 ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ได้มากที่สุดในอาหารCMCที่ 50 °C, pH 7 และ สายพันธุ์ P4-6 และ P3-1 มีสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์แอคติวิตีที่ 50 °C, pH 7

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต ธนวรรณ ท่าพริก
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา	2549	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4872305123 : MAJOR : INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORDS : SCREENING/ IDENTIFICATION/ CELLULASE/ BACTERIA/ SOIL

THANAWAN TAPRIG : SCREENING AND IDENTIFICATION OF CELLULASE-PRODUCING BACTERIA FROM SOIL IN NAN PROVINCE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ANCHARIDA AKARACHARANYA, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMBOON TANASUPAWAT, Ph.D., 115 pp.

In the isolation and screening of cellulase-producing bacteria from soil samples collected in Pua district (80 samples) and Santisuk district (40 samples), NAN provinces. Sixty-five strains were isolated from soil collected in Pua district and 10 strains from soil in Santisuk district. On the basis of their phenotypic and chemotaxonomic characteristics including the phylogenetic analysis using 16S rDNA sequences, 2 strains were identified as *Brevibacillus*, 20 as *Paenibacillus* and 53 as *Bacillus*. The similarity of 16S rDNA sequences revealed that strains P5-5 (Group 1) was closely related to *Brevibacillus agri* DSM 6348^T (97.2%). P2-1 (Group 2) and S10-4 (Group3) showed 96.1 and 99.1% similarity to *Paenibacillus cineris* 3998^T, respectively. P2-3 and P4-7 (Group 4), S9-2 (Group 5) P6-8 (Group 6), P4-8, P5-2, P7-1 and P7-3 (Group 7) P1-5 (Group 8) P6-7 (Group 9) were closely related to *Bacillus subtilis* KCTC 3135^T (95.5, 97.8, 95.6, 94.3, 96.1, 96.8, 94.5, 98.3, 99.3 and 99.9%, respectively). The tested strains of *Brevibacillus*, *Paenibacillus* and *Bacillus* contained *meso*-diaminopimelic in cell wall peptidoglycan. The DNA G+C contents of *Brevibacillus* strain was 54.2 mol%. The DNA G+C contents of *Paenibacillus* strains were 52.7 to 53.5 mol% and *Bacillus* strains were 35.5-47.8 mol%. Predominanant menaquinones of the tested strains in *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, and *Bacillus* were 7 isoprene units (MK-7). In this study, strain P5-5 was the new species in *Brevibacillus*. Strains P2-3, S9-2, P6-8, P4-8, P5-2, and P7-1 were found to be the novel *Bacillus* species and P2-1 was the new species in *Paenibacillus*. Their phenotypic characteristics were differentiated from the tested type strains. The strains P4-7, P7-3, P1-5, P6-7 that showed 97.3-99.9% sequence similarity to *Bacillus subtilis* KCTC 3135^T were required the DNA-DNA hybridization experiments to make clear their taxonomic position.

Among 75 strains screened, a maximum hydrolysis capacity (HC, clear zone diameter/colony diameter) exhibited to be 8.5 cm. Fifty-two strains could produce cellulase ranged from 0-0.005 U/ml and 20 strains did from 0.005-0.1 U/ml. Furthermore, 3 strains (P4-6, P3-1 and P4-8) could produce cellulase from 0.0127-0.0153 U/ml. The selected strains, P2-1, P2-3, P7-7 that showed the high HC value and P3-1 and P4-6 that exhibited the highest carboxymethyl cellulase activity, produced the enzyme optimally at 50° C and pH 7.0.

Department	Microbiology	Student's Signature.....
Field of Study	Industrial Microbiology	Advisor's Signature.....
Academic Year	2006	Co-Advisor's Signature.....

ACKNOWLEDGMENTS

The 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 sincere and profound gradtitude:

Associate Professor Dr. Ancharida Akaracharanya, my thesis advisor, for her excellent advice, proper scientific guidance and supervision throughout research work.

Associate Professor Dr. Somboon Tanasupawat, my thesis co-advisor, for his excellent advice and kindness throughout the research study.

Associate Professor Dr. Pairoh Pinphanichakarn for serving as the thesis committee chairperson and Associate Professor Dr. Kanchana Juntongjin, Ph.D. and Associate Professor Dr. Vichien Kitpreechavanich, Ph.D. for serving as thesis committee members and their recommendations for the research.

Special thanks are given to student members in laboratory 405, all friends, and all staff members in the Department of Microbiology for their help and friendship during my study.

The last, but most important, is my sincere and deepest gratitude to my parents and everyone in my family for their great love, constant support, understanding and heartfelt encouragement extended throughout my study.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (Thai) iv

ABSTRACT (English).....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENTS.....vii

CONTENT OF FIGURES.....ix

CONTENT OF TABLES.....x

ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I. INTRODUCTION.....1

II. LITERATURE REVIEW.....3

Cellulase.....3

1. Classification of cellulase.....4

2. Source of cellulase from microorganism.....5

3. Cellulase-producing bacteria.....9

4. Industrial application.....13

III. MATERIAL AND METHODS.....14

1. Screening of cellulase-producing bacteria.....14

1.1 Screening of cellulase-producing bacteria on agar plate.....14

1.2 Quantitative cellulase producing assay 15

2. Identification method.....15

2.1 Cell morphological and cultural characteristics.....15

2.2 Physiological and biochemical characteristics.....16

2.3 Chemotaxonomic characteristics.....19

2.4 16S rDNA sequence analysis and phylogenetic tree analysis....21

3. Effect of pH and temperature on cellulase production.....22

4. Effect of pH and temperature on cellulase activity.....22

IV. RESULTS AND DISCUSSION.....23

1. Screening of cellulase-producing bacteria.....23

1.1 Screening of cellulase-producing bacteria on agar plate 23

Page

1.3 Cellulase activity.....24
2. Identification of strains.....24
2.1 Cell morphological and cultural characteristics.....24
2.2 Physiological and biochemical characteristics.....38
2.3 Chemotaxonomic characteristics.....42
2.4 16S rDNA sequence and phylogenetic tree analysis.....44
3. Effect of pH and temperature on cellulase production.....55
4. Effect of pH and temperature on cellulase activity.....58
V. CONCLUSIONS.....60
REFERENCES.....62
APPENDIX.....74
Appendix A: Instruments and chemical reagents.....75
Appendix B: Culture Media.....79
Appendix C: Reagents and Buffers.....84
Appendix D: Physiological and biochemical characteristics of isolates.....91
Primers, 16S rDNA nucleotide sequences and DNA G+C contents....106
Appendix E: Standard curve of glucose.....113
BIOGRAPHY.....115

CONTENTS OF FIGURES

Figure **Page**

2.1 The upper diagram represents a cellulose chain. The lower diagram represents the hydrogen bonding within and between the chains in a cellulose crystal.....3

2.2 Structure and enzymic breakdown of cellulose.....4

4.1 Photomicrograph of cells (a) and SEM (b) of P4-6 grown on carboxymethyl cellulose medium at 37 ^{o} C for 2 day.....33

4.2 Cellulase production of the isolates in Group1, 2, and 3.....34

4.3 Cellulase production of the isolates in Group 4 and 5.....35

4.4 Cellulase production of the isolates in Group 6.....36

4.5 Cellulase production of the isolates in Group7, 8, and 9.....37

4.6 Cell wall analysis of representative strains of each 9 different groups.....43

4.7 Neighbour-joining-tree showing phylogenetic position of strains P2-1, P5-5, S10-4 and representatives of some other related taxa based on 16S rDNA sequences. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position. Bootstrap values expressed as percentages of 1000 replications.....44

4.8 Neighbour-joining-tree showing phylogenetic position of strains P1-5, P2-3, P4-7, P4-8, P5-2, P6-7, P6-8, P7-1, P7-3, S9-2 and representatives of some other related taxa based on 16S rDNA sequences. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. Bootstrap values expressed as percentages of 1000 replications.....46

4.9 Effect of pH on cellulase production of strains P2-1, P2-3, P3-1, P4-6 and P7-7 (A – E).....56

4.10 Effect of temperature on cellulase production of strains P2-1, P2-3, P3-1, P4-6 and P7-7 (A – E).....57

4.11 Optimum pH for cellulase of P3-1 and P4-6.....58

4.12 Optimum temperature for cellulase of P3-1 and P4-6.....58

CONTENTS OF TABLES

Table **Page**

2.1 List of cellulolytic bacteria.....5

2.2 Major morphological features of cellulolytic bacteria.....11

3.1 HPLC conditions for DNA base composition analysis.....21

4.1 Sample location , sample number, and number of isolates obtained.....23

4.2 Cell morphology and cultural characteristics of the isolates.....25

4.3 Cellulolytic activity of the isolates on agar medium.....29

4.4 Physiological and biochemical characteristics of the isolates.....39

4.5 Acid from carbohydrates.....41

4.6 DNA G+C contents of the representative strains in 9 Groups.....42

4.7 Percentage similarities of P2-1, P5-5, S10-4 and related *Brevibacillus*, *Paenibacillus* species.....45

4.8 Percentage similarities of P1-5, P2-3, P4-7, P4-8, P5-2, P6-7, P6-8, P7-1, P7-3, S9-2 and related *Bacillus*, *Planococcus* species.....47

4.9 Differential characteristics of P5-5 in Group 1 and *Brevibacillus agri* 48

4.10. Differential characteristics of isolate in Group 2, 3 and *P. cineris*.....49

4.11 Differential characteristics of isolate in Group 4, 5, 6 and *B.subtilis*.....51

4.12 Differential characteristics of isolate in Group 7, 8, 9 and *B.subtilis* 53

4.13 Distribution and identification of the representative strains.....54