

Prom. Nr. 3625

B.

Diss ETH

Untersuchungen zu Systematik und Stoffwechsel der Essigsäurebakterien

Von der
**EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE IN ZÜRICH**
zur Erlangung
der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften
genehmigte
PROMOTIONSARBEIT

Vorgelegt von
Thomas Leisinger
dipl. Ing.-Agr. ETH
von Davos (GR)

Referent: Herr Professor Dr. L. ETTLINGER

Korreferent: Herr Professor Dr. C. MARTIUS



Buchdruckerei F. Mülaff KG / Rudolstadt (Thür.)

1965

D. Zusammenfassung

Eine Betrachtung der neueren Literatur über Systematik und Nomenklatur der Essigsäurebakterien führt zur Ansicht, daß die von LEIFSON (1954) vorgeschlagene Einteilung der Essigsäurebakterien in die beiden Gattungen *Acetobacter* und *Acetomonas* gerechtfertigt ist. Auf Grund der durchgeführten Wachstums- und Stoffwechselversuche können zur Frage der Arteeinteilung der Essigsäurebakterien folgende Aussagen gemacht werden:

1. Sowohl die Einteilungsmerkmale der Systematik nach FRATEUR (1950) als auch die zusätzlich geprüften Ernährungsansprüche von 19 Stämmen von Essigsäurebakterien blieben während 80 Passagen und über einen Zeitraum von zwei Jahren konstant.
2. In der Verwendung von zusätzlichen, in der Frateurschen Systematik nicht gebrauchten Eigenschaften zur Charakterisierung der Stämme zeigen sich Möglichkeiten, eine Art durch Merkmale zu beschreiben, die nicht in der An- oder Abwesenheit von einem einzigen, sondern von mehreren Enzymen begründet liegen. In diesem Zusammenhang wurden zellfreie Extrakte der verschiedenen Stämme auf die Aktivität der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus, des Entner-Doudoroff-Weges, einiger Enzyme der Glykolyse und der Kinasen für Glucose und Gluconsäure geprüft. Isocitratase und Malatsynthetase konnten nur bei denjenigen Stämmen nachgewiesen werden, die befähigt sind, auf Hoyers Medium zu wachsen. Die Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges wurden in der Gattung *Acetobacter* stets bei *Ab. xylinus* und nur bei *Ab. xylinus* festgestellt.
3. Es wurde eine Einteilung der Stämme in Ernährungsgruppen durchgeführt, die auf ihrer Fähigkeit, Äthanol als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten, gründet. Ernährungsgruppe 1 (Glyoxylsäurezyklus +, Zitronensäurezyklus +) und Ernährungsgruppe 3 (Glyoxylsäurezyklus —, Zitronensäurezyklus —) bilden zwei homogene Gruppen. Ernährungsgruppe 2 (Glyoxylsäurezyklus —, Zitronensäurezyklus +) umfaßt Stämme aus der *Mesoxydans*- und *Oxydans*-Gruppe nach FRATEUR (1950) und ist sehr heterogen. Die Verwendung des Kriteriums der Glucoseverwertung zur weiteren Unterteilung von Ernährungsgruppe 2 zeigte keine Vorteile gegenüber dem von FRATEUR (1950) verwendeten Merkmal der Ketogenität.

In bezug auf den Stoffwechsel der Essigsäurebakterien interessierten vor allem die Gründe des verschiedenartigen Verhaltens der untersuchten Stämme gegenüber den beiden Kohlenstoffquellen Äthanol und Glucose:

1. Die drei Ernährungsgruppen verwerten Äthanol auf verschiedene Weise. Die Stämme der Ernährungsgruppe 1, Organismen mit Isocitratase- und Malatsynthetase-Aktivität, verwerten Äthanol bei Wachstum auf Hoyers Medium über die Reaktionen des Glyoxylsäurezyklus. Bei Wachstum auf einem komplexen Äthanolmedium scheinen sie einen ähnlichen Stoffwechselweg wie die Stämme der Ernährungsgruppe 2 einzuschlagen. Bilanzversuche mit Äthanol-¹⁴C und Hemmversuche mit Fluorazetat sprechen dafür, daß die Stämme der Ernährungsgruppe 2 aus Aminosäuren und Bestandteile des Hefeextraktes C-4-Verbindungen gewinnen, welche den

Ablauf des Zitronensäurezyklus und damit die Verwertung von Äthanol ermöglichen. Das Fehlen des Zitronensäurezyklus bei den *Acetomonas*-Stämmen der Ernährungsgruppe 3 erklärt die Tatsache, daß bei diesen Stämmen kein Einbau von Äthanolkohlenstoff in die Zellsubstanz beobachtet werden konnte, diese Stämme also Äthanol wohl als Energie-, nicht aber als Kohlenstoffquelle verwenden können.

2. Bei Wachstum auf Glucose wurden bei verschiedenen Stämmen unterschiedliche Ausbeuten an Zellmaterial festgestellt. Diese Unterschiede in der Glucoseverwertung konnten weder auf den Abbauweg der Glucose noch auf die Glucokinase- oder Gluconokinase-Aktivität der Stämme, noch auf unterschiedliche Zellpermeabilität der Stämme für Gluconsäure zurückgeführt werden.

Summary

The present paper deals with taxonomy and physiology of the acetic acid bacteria. The work on differentiation of species of acetic acid bacteria resulted in the following conclusions:

1. Not only the criteria for classification according to FRATEUR (1950) but also the nutritional characteristics remained stable over a period of two years for the 19 strains investigated.
2. Strains which are able to grow on Hoyer's medium (ethanol as the only carbon source, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as the only nitrogen source) possess the enzymes of the glyoxylate-cycle. In the genus *Acetobacter* the enzymes of the Entner-Doudoroff pathway were demonstrated only in the species *Ab. xylinus* and in all strains of this species which were examined.
3. Growth experiments revealed marked differences in the utilization of carbon sources (glucose or ethanol) by different strains. As a result of these observations three nutritional groups were distinguished, which differ with respect to their ability to utilize ethanol as the only carbon source. Nutritional group 1 (glyoxylate-cycle present, citric acid-cycle present) and nutritional group 3 (glyoxylate-cycle absent, citric acid-cycle absent) are homogeneous. Nutritional group 2 (glyoxylate-cycle absent, citric acid-cycle present) is heterogeneous and comprises strains of FRATEUR's (1950) *Mesoxydans*- and *Oxydans*-group. An attempt was made to differentiate within group 2 by the ability of its strains to utilize glucose as the only carbon source. This approach, however, showed no advantages over the classification based on ketogenic capacity used by FRATEUR to discern between the *Mesoxydans*-group and the *Oxydans*-group.

With respect to the physiology of the acetic acid bacteria the dissimilar behaviour of different strains towards ethanol and glucose was investigated.

1. The strains of the three nutritional groups differ in their ethanol-metabolism. When grown on Hoyer's medium the strains of group 1 utilize ethanol by the reactions of the glyoxylate-cycle. If they are grown on a complex ethanol-medium they seem to catabolize ethanol by a pathway similar to the one found in the strains of group 2. The results of experi-

ments with ethanol-¹⁴C and with fluoroacetate indicate that the strains of group 2 transform the amino acids and part of the yeast extract of the medium into compounds which allow the operation of the citric acid-cycle and thereby the utilization of ethanol.

The *Acetomonas*-strains of nutritional group 3 are not able to incorporate the carbon bound in ethanol into cellular material. This can be explained by the lack of an active citric acid-cycle in the strains of the genus *Acetomonas*. Such strains utilize ethanol as a source of energy but not as carbon source.

2. When grown on a glucose-medium, the strains showed different growth yields. These dissimilarities in the ability to utilize glucose could not be attributed to the enzymatic capacities of the strains (glucose-catabolism, kinases for glucose and gluconate) nor to differences in the permeability for gluconate among the strains.

Literatur

- ALDOUS, J. G., and K. R. ROZEE, *Biochem. J.* **62**, 605—610 (1956). — ARCUS, A. C., and N. L. EDSON, *Biochem. J.* **64**, 385—394 (1956). — ASAI, T., *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **11**, 686—696 (1935). — ASAI, T., and K. SHODA, *J. gen. appl. Microbiol.* **4**, 289—311 (1958). — BERGMAYER, H. U., *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim 1962. — BROWN, G. D., and C. RAINBOW, *J. Gen. Microbiol.* **15**, 61—69 (1956). — BUCHANAN, R. E., R. ST. JOHN-BROOKS, and R. S. BREED (Editors), *J. Bact.* **55**, 287—306 (1948). — COLOWICK, S. P., and H. M. KALCKAR, *J. biol. Chem.* **148**, 117—126 (1943). — COLOWICK, S. P., and N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York 1955. — CONWAY, E. J., and M. DOWNEY, *Biochem. J.* **47**, 347—355 (1950). — COOKSEY, K. E., and C. RAINBOW, *J. Gen. Microbiol.* **27**, 135—142 (1962). — CRANE, R. K., and A. SOLS, in: COLOWICK, S. P., and N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, I, p. 277 (1955). — DE LEY, J., *Antonie van Leeuwenhoek* **24**, 281—297 (1958). — Ders., *J. Gen. Microbiol.* **24**, 31—50 (1961). — DE LEY, J., and R. DOCHY, *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 538—541 (1960). — DE LEY, J., and J. SCHELL, *J. Bact.* **77**, 445—451 (1959 a). — Ders., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 154—165 (1959 b). — Ders., *J. Gen. Microbiol.* **33**, 243—253 (1963). — DIXON, A. H., and H. L. KORNBERG, *Biochem. J.* **72**, 3P (1959). — DUDMANN, W. F., *J. Gen. Microbiol.* **22**, 25—39 (1960). — FEWSTER, J. A., *Biochem. J.* **69**, 582—595 (1958). — FODA, O., and R. H. VAUGHN, *J. Bact.* **65**, 78—82 (1953). — FRATEUR, J., *La Cellule* **53**, 287—392 (1950). — FRIEDEMANN, T. E., and G. E. HAUGE, *J. biol. Chem.* **147**, 415—442 (1943). — GLOCK, G. E., and P. MCLEAN, *Biochem. J.* **55**, 400—408 (1955). — GOLDMAN, C. L., W. LITSKY, M. MANDEL, and H. N. LITTLE, *Can. J. Microbiol.* **4**, 463—468 (1958). — GRAY, C. H., and E. L. TATUM, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **30**, 404—410 (1944). — GROMET-ELHANAN, Z., and S. HESTRIN, *J. Bact.* **85**, 284—292 (1963). — GROMET-ELHANAN, Z., M. SCHRAMM, and S. HESTRIN, *Biochem. J.* **67**, 679—689 (1957). — HALL, A. N., G. A. THOMAS, K. S. TIWARI, and T. K. WALKER, *Arch. Biochem. and Biophysics* **46**, 485—487 (1953). — HAUGE, J. G., T. E. KING, and V. H. CHELDELIN, *J. biol. Chem.* **214**, 1—26 (1955). — HENNEBERG, W., *Zbl. Bakt.* **3**, 223—228 (1897). — HODGKISS, W., J. L. SHIMWELL, and J. G. CARR, *Antonie van Leeuwenhoek* **28**, 357—364 (1962). — HOLLMANN, S., *Nicht-glykolytische Stoffwechselwege der Glucose*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1961. — HUGHES, D. E., *Brit. J. Exper. Path.* **32**, 97—109 (1951). — JANKE, A., *Arch. Mikrobiol.* **41**, 79—114 (1962). — JANKE, A. und M. RÖHR, *Arch. Mikrobiol.* **31**, 106—113 (1958). — JOUBERT, J. J., W. BAYENS, and J. DE LEY, *Antonie van Leeuwenhoek* **27**, 151—160 (1961). — KALBERER, F. und J. RUTSCHMANN, *Helv. Chim. Acta* **44**, 1956—1966 (1961). — KATZNELSON, H., *Canad. J. Microbiol.* **4**, 25—34 (1958). — KRIMIT, M. R., and P. J. LE B. WILLIAMS, *J. Gen. Microbiol.* **31**, 447—449 (1963). — KITOS, P. A., C. H. WANG, B. A. MOHLER, T. E. KING, and V. H. CHELDELIN, *J. biol. Chem.* **233**, 1295—1298 (1958). — KOVACHEVICH, R.,

and W. A. WOOD, *J. biol. Chem.* **213**, 745—767 (1955). — LEIFSON, E., *Antonie van Leeuwenhoek* **20**, 102—110 (1954). — McDONALD, M. R., in: COLOWICK, S. P., and N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, I, p. 269 (1955). — McILWAIN, H., *J. Gen. Microbiol.* **2**, 288—291 (1948). — McINTOSH, A. F., *Antonie van Leeuwenhoek* **28**, 49—62 (1962). — MARMUR, J., E. SEAMEN, and J. LEVINE, *J. Bact.* **85**, 461—467 (1963). — MÜLLER, J., Diplomarbeit, ETH., Zürich 1962. — NEUBERG, C. und E. SIMON, *Biochem. Z.* **197**, 259—260 (1928 a). — Dies., *Biochem. Z.* **199**, 232—247 (1928 b). — PASTEUR, L., *Ann. Sci. de l'École Normale Supérieure* **1**, 113—158 (1864). — PETERS, R. A., *Proc. Roy. Soc., B.* **189**, 143—170 (1952). — Ders., *Adv. in Enzymol.* **18**, 113—159 (1957). — PRIEUR, P., *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **244**, 253—255 (1957). — Ders., *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **250**, 1733—1735 (1960). — RAINBOW, C., and G. W. MITSON, *J. Gen. Microbiol.* **9**, 371—375 (1953). — RAO, M. R. R., and J. L. STOKES, *J. Bact.* **65**, 405—412 (1953 a). — Dies., *J. Bact.* **66**, 634—638 (1953 b). — RAO, M. R. R., Ph. D. Thesis, Univ. of Illinois (1955). — RAUEN, H. M., *Biochemisches Taschenbuch*. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956. — REEVES, H. C., and S. J. AJL, *J. Bact.* **79**, 341—345 (1960). — SCHELL, J., Diss. Univ. Gent (1960). — SCHELL, J., and J. DE LEY, *Antonie van Leeuwenhoek* **28**, 445—465 (1962). — SCHRAMM, M., and S. HESTRIN, *J. Gen. Microbiol.* **11**, 123—129 (1954). — SCHRAMM, M., V. KLYBAS, and E. RACKER, *J. biol. Chem.* **233**, 1283—1288 (1958). — SHIMWELL, J. L., *Antonie van Leeuwenhoek* **24**, 187—192 (1958). — Ders., *Antonie van Leeuwenhoek* **25**, 49—67 (1959). — SHIMWELL, J. L., and J. G. CARR, *Antonie van Leeuwenhoek* **25**, 353—368 (1959). — Dies., *Antonie van Leeuwenhoek* **26**, 169—181 (1960). — Dies., *Antonie van Leeuwenhoek* **27**, 65—75 (1961). — SHIMWELL, J. L., J. G. CARR, and M. E. RHODES, *J. Gen. Microbiol.* **23**, 283—286 (1960). — SIBLEY, J. A., and A. L. LEHNINGER, *J. biol. Chem.* **177**, 859—872 (1949). — STERN, J. R., in: COLOWICK, S. P., and N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, III, p. 426 (1957). — STOKES, J. L., and A. LARSEN, *J. Bact.* **49**, 495—501 (1945). — STOUTHAMER, A. H., *Antonie van Leeuwenhoek* **25**, 241—264 (1959). — Ders., Diss. Univ. Utrecht (1960). — Ders., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 484—500 (1961). — STOUTHAMER, A. H., J. H. VAN BOOM, and A. J. BASTIAANSE, *Antonie van Leeuwenhoek* **29**, 393—406 (1963). — UNDERKOFER, L. A., A. C. BANTZ, and W. H. PETERSON, *J. Bact.* **45**, 183—190 (1943). — VAUGHN, R. H., in: BERGEY'S *Manual of Determinative Bacteriology*, 7th Edition, Baillière, Tindall and Co., London 1957. — WHITE, G. A., and C. H. WANG, *Biochem. J.* **90**, 408—433 (1964).

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. L. ETTLINGER, Vorstand des Mikrobiologischen Instituts ETH, danke ich herzlich für die tatkräftige Förderung dieser Arbeit. Allen Mitgliedern des Instituts, die mir behilflich waren, spreche ich meinen besten Dank aus.