LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

9 AUG 1998

DEGRADATION OF 3-CHLOROBENZOATE BY *PSEUDOMONAS PUTIDA* 10.2

WIMOL THANGSUNUNTHUM

With compliments
of

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1996

Copyright by Mahidol University

TH
W754d
1996

35859 c.2

ชื่อวิทยานิพนธ์ การย่อยสลาย 3-chlorobenzoate โดย *Pseudomonas putida* 10.2

ผู้วิจัย วิมล ตั้งสุนันท์ธรรม

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุม วิทยานิพนธ์

อมเรศ ภูมิรัตน, Ph. D.

ศกรณ์ มงคลสุข, Ph. D.

ยอดหทัย เทพธรานนท์, Ph. D.

วิทยา มีวุฒิสม, Ph. D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 4 เมษายน พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร 3-chlorobenzoate (3CBa) จากตัวอย่างดินและน้ำจากแหล่งต่างๆ โดยวิธี batch culture enrichment และสามารถพบจุลินทรีย์ที่เจริญพันธุ์โดยใช้ 3CBa เป็นแหล่งคาร์บอน ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง คือ สายพันธุ์ 10.2 พบว่าการย่อยสลาย 3CBa โดย cell suspension ที่มีความเข้มข้นของเชื้อเป็น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีอัตราการย่อยสลาย 3CBa เท่ากับ 93.3 นาโน โมลต่อมิลลิลิตร ต่อชั่วโมง และสามารถย่อยสลาย 3CBa ได้ร้อยละ 48 หลังจากได้เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 3CBa เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และจากการดำเนินการ ตรวจสอบเพื่อบ่งชี้ชนิดของสายพันธุ์ 10.2 พบว่าเป็นบักเตรีชนิด *Pseudomonas putida*

อัตราการเจริญพันธุ์ของ *P. putida* 10.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MM9 ที่มีความเข้มข้นของ 3CBa เป็น 1 มิลลิโมลาร์ เมื่อบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยวางบนที่เขย่า แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของการเจริญพันธุ์ (μ) เป็น 0.27 ต่อชั่วโมงและมีปริมาณเชื้อ (yield) เป็น

Copyright by Mahidol University

0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการย่อยสลาย 3CBa ในขณะที่เชื้อกำลังเจริญเติบโตมีค่า 32.5 นาโนโมลต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมงและมีร้อยละการย่อยสลาย 3CBa เป็น 48 พบว่ามี การเพิ่มขึ้นของคลอไรด์อิออนในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอัตรา 16.7 นาโนโมลต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ในภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนอื่น เช่น น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลแลคโตส, ไพรูเวท และซัคซิเนต พบว่าอัตรา และร้อยละการย่อยสลาย 3CBa ลดลง

จากการตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลาย 3CBa โดย resting cell suspension ของ *P. putida* 10.2 พบว่าระยะการเจริญเติบโต (growth phase) ของเชื้อมีผลต่อการย่อยสลาย โดยพบว่าเซลซึ่งอยู่ในระยะ early stationary แสดงอัตราและร้อยละการย่อยสลาย 3CBa หลังจากบ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมงได้สูงสุดและเมื่อตรวจสอบการย่อยสลาย 3CBa โดย resting cell suspension พบว่าอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างของ สารละลายบัพเฟอร์ ที่เหมาะสม สำหรับการย่อยสลาย 3CBa คือ อุณหภูมิ 28 ถึง 30 องศาเซลเซียส และเมื่ออยู่ในสารละลายบัพเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6 ถึง 7 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ การเตรียม resting cell suspension มีผลต่อการย่อยสลาย 3CBa โดยพบว่า resting cell suspension ที่เตรียมจากเซลที่ถูก เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MM9 ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นนอกเหนือจาก 3CBa มีอัตรา การย่อยสลาย 3CBa ลดลงเมื่อเทียบกับอัตราการย่อยสลาย 3CBa โดย resting cell suspension ที่เตรียมจากเซลที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MM9 ที่มีเฉพาะ3CBa เป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่าอัตราการย่อยสลาย 3CBa นั้นลดลงจาก 93.3 เป็น 8.3, 13.3 และ 20.3 นาโนโมล ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง สำหรับร้อยละการย่อยสลายของ 3CBa โดย resting cell suspension เหล่านี้ลดลงจาก 48 เป็น 5, 16 และ 24 หากเปรียบเทียบจากสภาวะที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนอื่น เช่น การเติมน้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลแลคโตส, หรือซัคซิเนต ตามลำดับ

Copyright by Mahidol University

จากผลการดำเนินการวิเคราะห์ชนิดของ metabolites ที่เกิดขึ้นในขบวนการย่อยสลาย 3 CBa โดยเชื้อ *P. putida* 10.2 ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี 3CBa และจากสารส่วนใส (supernatant) ของ

ปฏิกิริยาที่มี cell suspension กับ 3CBa พบว่าเป็น 3-chlorocatechol (3CC), catechol (CAT) และ muconic acid (MUC) โดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีในการทดสอบ 3CC, เทคนิค HPLC ในการทดสอบ 3CC, CAT และ MUC

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย 3CBa ใน crude enzyme extract พบว่ามีค่าเป็น 4.2 หน่วยต่อมิลลิกรัม นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย 3CBa ต้องการ $MgSO_4$, $CaCl_2$ และ reduced NAD

ดำเนินการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิด 3CC degrading enzymeใน crude extract โดยการตรวจวัดปริมาณ CAT ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาและดำเนินการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธี ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, DEAE sephadex A50 anion exchange และ gel filtration ชนิด sephadex G200 พบว่า ค่ากิจกรรมเฉพาะ ของเอนไซม์ที่แยกหลังจากผ่าน gel filtration ชนิด sephadex G200 มีค่าเป็น 19.3 หน่วยต่อมิลลิกรัม โดยมีปริมาณโปรตีน (yield) ร้อยละ 0.3 และมีค่าความบริสุทธิ์เป็น 10.2 เท่า จากการศึกษาโปรตีนที่บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ชนิด 3CC degrading enzyme มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65 กิโลดาลตัน โดยจะแสดงค่ากิจกรรมเฉพาะสูงสุด เมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0, ทำปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียสและต้องการ $MgSO_4$ และ reduced NADP สำหรับการเกิดปฏิกิริยา นอกจากนี้ จากการตรวจสอบเพื่อชี้บ่งชนิดของสารผลิตภัณฑ์ ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาของ 3CC degrading enzyme เมื่อเติม 3CC เป็นสารตั้งต้น ด้วยวิธี liquid chromatography/mass spectrometry พบว่าเป็น CAT

จากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิด catechol 1,2-dioxygenase (C12OI) ใน crude extract โดยใช้ CAT เป็นสารตั้งต้น และตรวจวัดปริมาณของ MUC ซึ่งเป็น สารผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี high presssure liquid chromatography พบว่าเอนไซม์ C12OI มีค่ากิจกรรมเฉพาะเป็น 0.7 หน่วยต่อมิลลิกรัม

Copyright by Mahidol University

จากการวิเคราะห์สารที่เกิดขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อและการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในขบวนการย่อยสลาย 3CBa โดย *P. putida* 10.2 คาดว่าขบวนการย่อยสลาย 3CBa โดย *P. putida* 10.2 น่าเริ่มจากการที่ 3CBa ถูกย่อยเป็น 3CC โดยเอนไซม์ชนิด benzoate dioxygenase และ dihydroxy chlorobenzoate dehydrogenase และ 3CC ถูกย่อยเป็น CAT ด้วยปฏิกิริยา reductive dechlorination โดยเอนไซม์ 3CC degrading enzyme จากนั้น CAT จะถูกย่อยต่อไปเป็น MUC ด้วยเอนไซม์ C12OI ตามลำดับ

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Biodegradation of 3-Chlorobenzoate by *Pseudomonas putida* 10.2
Name	Wimol Thangsununthum
Degree	Doctor of Philosophy (Microbiology)
Thesis Supervisory Committee	
	Amaret Bhumiratana, Ph.D.
	Skorn Mongkolsuk, Ph.D.
	Yodhathai Thebtaranonth, Ph.D.
	Vithaya Meevootisom, Ph.D.
Date of Graduation	4 April B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

By using 3CBa enrichment in batch culture technique, a bacterium with high capability in degrading 3CBa strain was isolated. This bacterium was identified as *Pseudomonas putida* and was designated as strain 10.2. It was found through the use of cell suspension that *P. putida* 10.2 could degrade 3CBa at the rate of 93.3 nmole ml^{-1} hr^{-1} by using 1 mg ml^{-1} of cell suspension. This strain could remove 48% of 3CBa after 24 hours of incubation.

When *P. putida* 10.2 was cultured in MM9 supplemented with 1 mM 3CBa and incubated with shaking at 30 °C the specific growth rate (μ) and growth yield (y) were found to be at 0.27 hr^{-1} and 0.08 mg ml^{-1}, respectively. The rate of 3CBa degradation by *P. putida* 10.2 during the cells being grown in MM9 supplemented with 3CBa were found to be at 32.5 nmole ml^{-1} hr^{-1} with percentage of 3CBa utilization after 24 hr of incubation at 48.0 %. It was further found that chloride ions were released into the growth media at the rate of 16.7 nmole ml^{-1} hr^{-1} during the reduction of 3CBa. And it was found that the rate and percentage of 3CBa utilization by the cells being grown in MM9

Copyright by Mahidol University

supplemented with 3CBa were reduced when the isolate was grown in the presence of glucose, pyruvate, lactose, or succinate.

When the resting cell suspensions were used to investigate the degradation of 3CBa, it was found that preincubation conditions were important, the cells harvested from early stationary phase showed the highest rate as well as the total amount of 3CBa degradation. The optimal temperature and pH range for 3CBa degradation by resting cell suspensions were 28to 30 °C and 6 to 7, respectively. Preculturing conditions were also found to have effect on the 3CBa degradation by resting cell suspension. The rates of 3CBa degradation by the cell suspension which were precultured in media supplemented with glucose, lactose or succinate was found to reduced to 8.3, 13.3 and 20.3 nmole ml^{-1} hr^{-1} , respectively. The rate of 3CBa degradation without other carbon source supplementation was at 93.3 nmole ml^{-1} hr^{-1}. The percentage of 3CBa utilization after 24 hr incubation were also found to be reduced when cells were precultured in the presence of glucose, lactosed or succinate to the level of 5, 16, and 24 %, respectively. The percentage of reduction of 3CBa without other carbon supplementation was at 48%.

Analyses of metabolites produced by *P. putida* 10.2 either from culture broth in presence of 3CBa or from supernatant of cell suspension containing 3CBa were identified as 3-chlorocatechol (3CC), catechol (CAT) and muconic acid (MUC). The techniques used for identification of these metabolites were colorimetric test for analysis of 3CC, HPLC for analysis of 3CC, CAT and MUC.

The specific activities of 3CBa degrading enzyme in crude enzyme extract were studied and it was found to be 4.2 units mg^{-1}. $MgSO_4$, $CaCl_2$ and reduced NAD were required for the activities of 3CBa degrading enzyme in crude extract.

Copyright by Mahidol University

Since 3CC was identified as one of the metabolites, studies were conducted to investigate the presence of 3CC degrading enzyme in crude extract of *P. putida* 10.2. The activities of enzyme were determined from the production of CAT. 3CC degrading enzyme from *P. putida* 10.2 was partially purified using ammonium sulphate precipitation, DEAE anion exchange and G200 sephadex gel filtration techniques. The enzyme was purified by 10.2 folds with the yield of 0.3 %. The enzyme activity in the final preparation had the specific activity at 19.3 units mg^{-1}. Some characteristics of 3CC degrading enzyme were studied and it was found that the molecular weight of this enzyme was approximately 65 kDa with the optimal pH of 7.0, the optimal temperature at 37 °C and the enzyme required $MgSO_4$ and reduced NADP for activities. The analysis of CAT produced in reactions contained 3CC and partial purified protein was confirmed by using LC/MS.

The presence of catechol 1,2 dioxygenase (C12OI) in the crude enzyme extract was also confirmed. This enzyme converted CAT to MUC with the specificity in the crude extract of 0.7 units mg^{-1}.

From the studies of metabolites analysis in culture broth and presence of key enzymes involved in 3CBa degradation, the biodegradative pathway of 3CBa of *P. putida* 10.2 was proposed. Firstly, 3CBa was metabolized to be 3CC by the activities of benzoate dioxygenase and dihydroxy chlorobenzoated dehydrogenase. Secondly, 3CC was metabolized to be CAT by reductive dechlorination activities of 3CC degrading enzyme. Thirdly, CAT was metabolized to MUC by the activity of C12OI.

Copyright by Mahidol University