# การย่อยสลายสารเพนทาคลอโรฟีนอลโดยสายพันธุ์กลายของ *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723

นางสาวพนารัตน์ อรุณรัติยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-083-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19065984

# DEGRADATION OF PENTACHLOROPHENOL BY MUTANT STRAINS OF *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723

MISS PANARAT ARUNRATTIYAKORN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biochemistry

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-333-083-6

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Degradation of pentachlorophenol by mutant strains of *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723 |
| By | Miss Panarat Arunrattiyakorn |
| Department | Biochemistry |
| Thesis Advisor | Suchart Chanama, Ph.D. |

---

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

..... Dean of Graduate School

(Associate Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

Thesis Committee

..... Chairman

(Assist. Prof. Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Suchart Chanama, Ph. D.)

..... Member

(Assist. Prof. Vichien Rimphanichayakit, Ph.D.)

..... Member

(Piyasak Chumpluk, Ph.D.)

พนารัตน์ อรุณรัติยากร: การย่อยสลายสารเพนทาคลอโรฟีนอลโดยสายพันธุ์กลายของ *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723. (DEGRADATION OF PENTACHLOROPHENOL BY MUTANT STRAINS OF *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723 ) อ.ที่ปรึกษา: ดร. สุชาติ ชะนะมา, 70 หน้า, ISBN 974-333-083-6

การกลายพันธุ์โดยการสอดแทรกที่บริเวณจำเพาะในจีโนม (Site-directed insertion mutagenesis) ถูกนำมาใช้ในการศึกษาถึงบทบาทของยีน *pcpD* ต่อการย่อยสลายสารเพนทาคลอโรฟีนอล ใน *Shpingomonas chlorophenolica* ATCC 39723 โดยสร้างเวคเตอร์เป้าหมายสำหรับขัดขวางการทำงานของยีน *pcpD* (ในจีโนม ของ *S. chlorophenolica*) ซึ่งเป็นพลาสมิดลูกผสมของ pUC 19 ที่มีชิ้นส่วนของยีน *pcpD* ที่ถูกสอดแทรกด้วยยีนต้านยาคานามัยซิน เมื่อทำการถ่ายโอนเวคเตอร์เป้าหมายเข้าไปในเซลล์ของ *S. chlorophenolica* ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนสายดีเอนเอระหว่างจีโนมและเวคเตอร์เป้าหมายในบริเวณที่มีลำดับเบสเหมือนกัน (homologous recombination) ซึ่งเป็นบริเวณยีน *pcpD* ทำให้เกิดการสอดแทรกของชิ้นยีนต้านยาคานามัยซินเข้าไปในจีโนม เกิดเป็นสายพันธุ์กลายที่มีการกลายของยีน *pcpD* และสามารถต้านยาคานามัยซินได้

จากผลการทดลอง หลังจากทำการถ่ายโอนเวคเตอร์เป้าหมายเข้าไปในเซลล์ ของ *S. chlorophenolica* และทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายในอาหารที่มียาคานามัยซิน สามารถพบโคโลนีได้หลังจากทำการบ่มไว้ 3 วัน นำโคโลนีที่สามารถต้านยาคานามัยซินได้ 27 โคโลนีมาทำการศึกษาต่อ จากการวิเคราะห์ดีเอนเอด้วย Southern blot พบว่าให้แถบสัญญาณกับตัวติดตามที่เป็นชิ้นส่วนของยีน *pcpD* แต่ไม่แสดงแถบสัญญาณกับตัวติดตามที่เป็นชิ้นส่วนของยีนต้านยาคานามัยซิน ดังนั้นทุกโคโลนีเป็นสายพันธุ์กลายของ *S. chlorophenolica* ที่ไม่มีการสอดแทรกของชิ้นยีนต้านยาเข้าไปในจีโนมแต่สามารถต้านยาคานามัยซินได้ และไม่พบเวคเตอร์เป้าหมายหลังจากทำการสกัดแยกพลาสมิดในสายพันธุ์กลาย เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารเพนทาคลอโรฟีนอลพบว่า ภายในเวลา 2 ชั่วโมงสามารถลดปริมาณเพนทาคลอโรฟีนอลได้ 25-99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สายพันธุ์ปกติสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์

ภาควิชา ชีวเคมี ..... ลายมือชื่อนิสิต พนารัตน์ อรุณรัติยากร .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

การศึกษา 2542 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

3971114223 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD : *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723 / pentachlorophenol / *pcpD gene* / site-directed insertion mutagenesis / homologous recombination. PANARAT ARUNRATTIYAKORN: DEGRADATION OF PENTACHLOROPHENOL BY MUTANT STRAINS OF *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723 . THESIS ADVISOR: MR. SUCHART CHANAMA, Ph.D., 70 p, ISBN 974-333-083-6

The site-directed insertion mutagenesis of *pcpD* can be obtained via allelic exchange with the corresponding mutated gene for the study of the role of *pcpD* gene in pentachlorophenol degradation in *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723. The targeting vector was constructed by cloning the *pcpD* open reading frame into pUC 19 and interrupting the open reading frame by insertion of kanamycin resistance gene. This targeting vector was transformed into *S. chlorophenolica*. Homologous recombination between *pcpD* locus in genome and mutated *pcpD* fragment in targeting vector could be occurred and *pcpD* locus in genome could be replaced by mutated *pcpD* fragment in targeting. Transforments containing mutated *pcpD* gene could be selected in medium containing kanamycin.

In this work, after transformation of this targeting vector into *S. chlorophenolica*, kanamycin resistance colonies became visible after incubation for three days. Southern blot analysis of genomic DNAs isolated from twenty-seven kanamycin resistance clones showed that all of them gave signal bands with *pcpD* gene probe but not with kanamycin resistance gene probe. Therefore, *S. chlorophenolica* did not have kanamycin resistance gene inserted into their genomic DNAs. All of which were mutant strains of *S.chlorophenolica* which did not contain disrupted *pcpD* gene. Extraction of plasmid DNA in mutant strains did not give the targeting vector. Analysis of pentachlorophenol degradation ability by mutant strains showed that these mutants could degrade pentachlorophenol 25-99% in two hours as compared to the wild type strain.

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต พนารัตน์ อรุณรัตยากร

สาขาวิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

การศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude to Dr. Suchart Chanama, my advisor for his guidance, suggestion and discussion throughout this research.

The special thank are also extended to Assist. Prof. Dr. Vichien Rimphanichayakit and Dr. Piyasak Chumpuk for their help in supporting the plasmids and suggestions.

My appreciation is also expressed to Asst. Prof. Dr. Tipaporn Limpaseni for serving as thesis committee.

I wish to express my sincere thanks to all teachers and friends in the Department of Biochemistry and Biotechnology for their help and friendship.

I wish to extend my deepest gratitude to my whole family for their encouragement and understanding throughout my study.

# CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....x

ABBREVIATIONS.....xii

CHAPTER 1 INTRODUCTION.....1

1.1 Nature of pentachlorophenol.....3

1.2 Methods of manufacture of pentachlorophenol.....4

1.3 Chemical properties of pentachlorophenol.....6

1.4 Physical property of pentachlorophenol.....7

1.5 Biological uptake and transformation of pentachlorophenol.....9

1.6 Pentachlorophenol degradation by .....10

*Sphingomanas chlorophenolica* ATCC 39723.....14

1.7 Gene replacement mediated by homologous recombination.....16

CHAPTER 2.MATERIALS AND METHODS.....16

2.1 Equipment.....17

2.2 Inventory supplies.....17

2.3 Chemicals.....18

2.4 Bacterial strains and plasmids.....19

2.5 Enzymes.....19

Page

2.6 DNA isolation..... 19

2.7 Measurement of DNA concentration..... .....21

2.8 Amplification of *pcpD* open reading frame (ORF) from *S..chlorophenolica* ATCC 39723 by Polymerase Chain Reaction..... 21

2.9 DNA manipulation for gene cloning.....22

2.10 Gene cloning.....24

2.11 Transformation of plasmid DNA into bacterial cells by electroporation ..... .....25

2.12 Southern-blot hybridization analysis.....27

CHAPTER 3. RESULTS..... .....29

3.1 Construction of plasmid carring *pcpD* open reading frame.....29

3.2 Construction of targeting vector for disruption of genomic *pcpD*..... 30

3.3 Gene targeting disruption of *pcpD* in genomic DNA of *S. chlorophenolica*..... 34

3.4 Pentachlorophenol degradation by mutant strains of *S. chlorophenolica*..... 38

CHAPTER 4. DISCUSSION..... 44

CHAPTER 5. CONCLUSION..... .....55

REFERENCES..... .....56

APPENDIXS..... . 64

BIOGRAPHY..... 70

# LIST OF TABLES

**Table** **Page**

1.1 Major registered used of pentachlorophenol in Unitied State of America.....2

1.2 Non-agriculture used of pentachlorophenol in Great Britain.....2

1.3 Some physical properties pentachlorophenol.....8

3.1 Restricted fragment size generated from digestion of plasmid containing *pcpD* ORF with some restriction endonucleases.....31

3.2 Restricted fragment size generated from digestion of targeting vector with some restriction endonucleases .....32

3.3 Pentachlorophenol degradation activity of mutant strains of *S. chlorophenolica* and their wild type.....38

## LIST OF FIGURES

**Figure** **Page**

1.1 Chemical structure of pentachlorophenol..... 1

1.2 Formation of pentachlorophenol and its impurities in pentachlorophenol production process..... 5

1.3 Photolysis of pentachlorophenol..... 7

1.4 Biodegradation of pentachlorophenol..... 9

1.5 The organization of pentachlorophenol degradation..... 12

1.6 Degradation pathway for bacterial catabolism of pentachlorophenol as determined for identification of pathway intermediates..... 13

1.7 Depiction of possible crossover events between plasmid and genome..... 15

3.1 Several steps for cloning of *pcpD* gene fragment into pUC 19..... 30

3.2 Ethidium bromide staining of DNA from various original sources: chromosomal DNA of *S. chlorophenolica*, PCR products (*pcpD*) and restriction endonuclease digested plasmid containing *pcpD*..... 31

3.3 Several steps for insertion of kanamycin resistance gene into plasmid carring *pcpD* ORF..... 32

3.4 Ethidium bromide staining of targeting vector digested with various restriction endonucleases..... 33

3.5 Southern blot analysis in mutant strains of *S. chlorophenolica* no. 1-9..... 35

3.6 Southern blot analysis in mutant strains of *S. chlorophenolica* no. 10-18..... 36

3.7 Southern blot analysis in mutant strains of *S. chlorophenolica* no. 19-27..... 37

**Figure** **Page**

3.8 Degradation of pentachlorophenol by mutant strains of *S. chlorophenolica* no.1-6 as monitored by UV-spectrophotometric method at wavelength of 318nm.....39

3.9 Degradation of pentachlorophenol by mutant strains of *S. chlorophenolica* no.7-12 as monitored by UV-spectrophotometric method at wavelength of 318 nm.....40

3.10 Degradation of pentachlorophenol by mutant strains of S. *chlorophenolica* no.13-18 as monitored by UV-spectrophotometric method at wavelength of 318 nm.....41

3.11 Degradation of pentachlorophenol by mutant strains of S. *chlorophenolica* no.19-24 as monitored by UV-spectrophotometric method at wavelength of 318 nm.....42

3.12 Degradation of pentachlorophenol by mutant strains of S. *chlorophenolica* no.25-27 and their wild type as monitored by UV-spectrophotometric method at wavelength of 318 nm.....43

## ABBREVIATIONS

| | |
|---|---|
| $Amp^r$ | Ampicillin resistance |
| AntiDIG-AP | Antidigoxigenin conjugated alkaline phosphatase |
| Bp | Boiling point |
| bp | Base pair |
| °C | Degree Celsius |
| dATP | 2′-deoxyadenisine 5′-triphosphate |
| dCTP | 2′-deoxycytidine 5′-triphosphate |
| dGTP | 2′-deoxyguanosine 5′-triphosphate |
| dTTP | 2′-deoxythymidine 5′-triphosphate |
| DIG | Digoxigenin |
| DNA | Deoxyribonuclease |
| EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid |
| EtOH | Ethyl alcohol |
| HCl | Hydrocloric acid |
| IPTG | Isopropyl-thiogalactoside |
| $Kan^r$ | Kanamycin resistance |
| $kan^r$ gene | Kanamycin resistance gene |
| kb | Kilobase |
| l | Litre |
| LB | Luria-Bertani |
| µg | Microgram |
| µl | Microlitre |
| mg | Miligram |
| min | Minute |

| | |
|---|---|
| ml | Millilitre |
| mM | Millimolar |
| Mp | Melting point |
| ng | Nanogram |
| nm | Nanometre |
| PCP | Pentachlorophenol |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PEG | Polyethylene glycol |
| rpm | Revolution per minute |
| sec | second |
| SDS | Sodium dodecyl sulphate |
| TBE | Tris/borate electrophoresis (buffer) |
| TE | Tris/EDTA (buffer) |
| Tris-HCl | Tris hydrochloride buffer |
| UV | Ultraviolet |
| X-gal | 4-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside |