

การย่อยสลายสารเพนทาคลอโรฟีนอลโดยสายพันธุ์กลายของ  
*Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723

นางสาวพนารัตน์ อรุณรัตติยากร



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-083-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**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

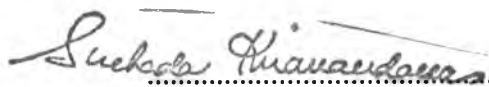
By                         Miss Panarat Arunrattiyakorn

Department            Biochemistry

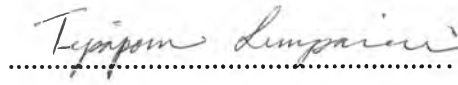
Thesis Advisor        Suchart Chanama, Ph.D.

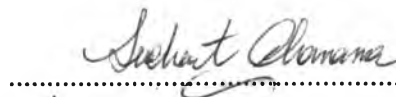
---

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

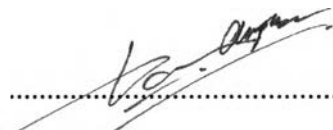
..... Dean of Graduate School  
(Associate Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

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 อรุณรัதியากร: 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 *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723 โดยสร้างเวกเตอร์เป้าหมายสำหรับขัดขวางการทำงานของยีน *pcpD* (ในจีโนม ของ *S. chlorophenolica*) ซึ่งเป็นพลาสมิดลูกผสมของ pUC 19 ที่มีชิ้นส่วนของยีน *pcpD* ที่ถูกสอดแทรกด้วยชิ้นด้านยาคานามัยซิน เมื่อทำการถ่ายโอนเวกเตอร์เป้าหมายเข้าไปในเซลล์ของ *S. chlorophenolica* ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนสายดีเอ็นเอระหว่างจีโนมและเวกเตอร์เป้าหมายในบริเวณที่มีลำดับเบสเหมือนกัน (homologous recombination) ซึ่งเป็นบริเวณยีน *pcpD* ทำให้เกิดการสอดแทรกของชิ้นยีนด้านยาคานามัยซินเข้าไปในจีโนม เกิดเป็นสายพันธุ์กลายที่มีการกลายของยีน *pcpD* และสามารถต้านยาคานามัยซินได้

จากผลการทดลอง หลังจากทำการถ่ายโอนเวกเตอร์เป้าหมายเข้าไปในเซลล์ ของ *S. chlorophenolica* และทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายในอาหารที่มียาคานามัยซิน สามารถพบโคโลนีได้หลังจากทำการบ่มไว้ 3 วัน นำโคโลนีที่สามารถต้านยาคานามัยซินได้ 27 โคโลนีมาทำการศึกษาต่อ จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย Southern blot พบว่าให้แถบสัญญาณกับตัวติดตามที่เป็นชิ้นส่วนของยีน *pcpD* แต่ไม่แสดงแถบสัญญาณกับตัวติดตามที่เป็นชิ้นส่วนของยีนด้านยาคานามัยซิน ดังนั้นทุกโคโลนีเป็นสายพันธุ์กลายของ *S. chlorophenolica* ที่ไม่มีการสอดแทรกของชิ้นยีนด้านยาคานามัยซินเข้าไปในจีโนมแต่สามารถต้านยาคานามัยซินได้ และไม่พบเวกเตอร์เป้าหมายหลังจากทำการสกัดแยกพลาสมิดในสายพันธุ์กลาย เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารเพนทาคลอโรฟีนอลพบว่า ภายในเวลา 2 ชั่วโมงสามารถลดปริมาณเพนทาคลอโรฟีนอลได้ 25-99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สายพันธุ์ปกติสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต..... พนารัตน์ อรุณรัதியากร.....  
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. Transformants 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..... วิชาเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต..... พงษ์ภรณ์ อภิรัตน์พงศ์.....  
 สาขาวิชา..... จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ. สุทธิรักษ์.....  
 การศึกษา..... ๑๕๕๑..... 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
<i>Sphingomanas chlorophenolica</i> 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 <i>pcpD</i> open reading frame (ORF) from <i>S. chlorophenolica</i> 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 carrying <i>pcpD</i> open reading frame.....	29
3.2 Construction of targeting vector for disruption of genomic <i>pcpD</i> .....	30
3.3 Gene targeting disruption of <i>pcpD</i> in genomic DNA of <i>S. chlorophenolica</i> .....	34
3.4 Pentachlorophenol degradation by mutant strains of <i>S. chlorophenolica</i> .....	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 United 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 <i>pcpD</i> 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 <i>S. chlorophenolica</i> 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 <i>pcpD</i> gene fragment into pUC 19.....	30
3.2 Ethidium bromide staining of DNA from various original sources: chromosomal DNA of <i>S. chlorophenolica</i> , PCR products ( <i>pcpD</i> ) and restriction endonuclease digested plasmid containing <i>pcpD</i> .....	31
3.3 Several steps for insertion of kanamycin resistance gene into plasmid carring <i>pcpD</i> 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 <i>S. chlorophenolica</i> no. 1-9.....	35
3.6 Southern blot analysis in mutant strains of <i>S. chlorophenolica</i> no. 10-18.....	36
3.7 Southern blot analysis in mutant strains of <i>S. chlorophenolica</i> no. 19-27.....	37

Figure	Page
3.8 Degradation of pentachlorophenol by mutant strains of <i>S. chlorophenolica</i> no.1-6 as monitored by UV-spectrophotometric method at wavelength of 318nm.....	39
3.9 Degradation of pentachlorophenol by mutant strains of <i>S. chlorophenolica</i> no.7-12 as monitored by UV-spectrophotometric method at wavelength of 318 nm.....	40
3.10 Degradation of pentachlorophenol by mutant strains of <i>S. chlorophenolica</i> no.13-18 as monitored by UV-spectrophotometric method at wavelength of 318 nm.....	41
3.11 Degradation of pentachlorophenol by mutant strains of <i>S. chlorophenolica</i> no.19-24 as monitored by UV-spectrophotometric method at wavelength of 318 nm.....	42
3.12 Degradation of pentachlorophenol by mutant strains of <i>S. chlorophenolica</i> no.25-27 and their wild type as monitored by UV-spectrophotometric method at wavelength of 318 nm.....	43

## ABBREVIATIONS

Amp <sup>r</sup>	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	Hydrochloric acid
IPTG	Isopropyl-thiogalactoside
Kan <sup>r</sup>	Kanamycin resistance
kan <sup>r</sup> 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- $\beta$ -D-galactopyranoside