บทที่ 1

บทนำ

อะซีแนพธิลีนเป็นสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) ประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง และวงไซโคลเพนทีน 1 วงเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม สามารถพบอะซีแนพธิลีนได้ในน้ำมันดิบ ผลิตภัณฑ์จากน้ำมันปิโตรเลียม ถ่านหิน น้ำมันดำจากถ่านหิน (coal tar) ครีโอโสท (creosote) (Wilson และ Jones, 1993) สารประกอบ PAHs ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อมนุษย์เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) (Keith และ Telliard, 1979) และพบว่าอะซีแนพธิลีนมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำในการทำให้เกิดพิษเฉียบพลัน ส่วนความเป็นพิษในมนุษย์ยังไม่มีข้อมูลเพียงพอ แต่อาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและระบบหายใจ (Lederer, 1985)

งานวิจัยที่ผ่านมามีรายงานวิถีการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ เช่น วิถีการย่อยสลายแนพธาลีนโดย *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 (Yen และ Serdar, 1988) วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) วิถีการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Pseudomonas aeruginosa* (Sutherland และคณะ, 1995) วิถีการย่อยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 (Khan และคณะ, 2001) เป็นต้น ซึ่งวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนโดย *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 และ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Ensley และคณะ, 1982; Ensley และ Gibson, 1983; Yen และ Serdar, 1988) มีการศึกษาค่อนข้างสมบูรณ์ รวมทั้งมีการศึกษายีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสและยีนที่เกี่ยวข้องมากที่สุด

สำหรับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ได้มีรายงานเป็นครั้งแรกโดย Schocken และ Gibson (1984) ซึ่งรายงานการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนแบบโคออกซิเดชันร่วมกับอะซีแนพธีนโดยมีไบฟีนิลเป็นตัวเหนี่ยวนำของ *Beijerinckia* sp. สายพันธุ์ B1 (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ B1; Khan *et al.*, 1996) พบว่าเกิดการเร่งปฏิกิริยาของไดออกซิจีเนสได้เป็นซิส-1,2-อะซีแนพธีนไดออล (*cis*-1,2-acenaphthenediol) 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธิลีน (1,2-dihydroyacenaphthylene) และอะซีแนพธีนควิโนน (acenaphthene-quinone) ตามลำดับ แต่ยังไม่เกิดการแตกวงไซโคลเพนทีนของอะซีแนพธิลีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน Komatsu และคณะ (1993) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4

(ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4; Komatsu, 1994) สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และพบกรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิก (1,8-naphthalene dicarboxylic acid) เป็นสารมัธยันตร์สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Selifonov และคณะ (1996) วิเคราะห์สารมัธยันตร์สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ลูกผสม *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) ที่ได้รับยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสจากพลาสมิด NAH7 พบว่าในขั้นแรกอะซีแนพธิลีนจะถูกออกซิไดซ์โดยไดออกซิจีเนสได้เป็น ซิส-อะซีแนพธีน-1,2-ไดออล และถูกเปลี่ยนต่อเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธิลีน และ 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพธีน สารมัธยันตร์ทั้งสองชนิดจะถูกออกซิไดซ์ต่อเป็น อะซีแนพโธ-1,2-ควิโนน และกรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ ศรัลยา แพงไตร (2543) ได้คัดแยกเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและแนพธาลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และยังสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และอะซีแนพธีนร่วมกับอะซีแนพธิลีน เพื่อศึกษาวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ (2544) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn*5* ได้สายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน Poonthrigpun และคณะ (2006) ได้ทำนายวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน โดยศึกษาสารมัธยันตร์ที่สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์กลาย พบว่าอะซีแนพธิลีนจะถูกย่อยสลายเป็น อะซีแนพธีนควิโนน กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และจะถูกย่อยสลายต่อเป็น กรดแนพโธอิก กรดซาลิไซลิก และกรดเจนทิสิก ตามลำดับ โดยรายงานนี้เป็นรายงานแรกที่กล่าวถึงการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสมบูรณ์ในแบคทีเรีย

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสมบูรณ์ มีเพียง Pinyakong และคณะ (2004) รายงานว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีน พบยีนประมวลรหัส α-subunit ของไดออกซิจีเนส และ β-subunit ของไดออกซิจีเนส ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายวงอะโรมาติก ให้ชื่อว่า *arhA1* และ *arhA2* Kouzuma และคณะ (2006) ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีน และอะซีแนพธิลีนเพิ่มเติมใน *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 โดยพบยีน *arhA3* และ *arhA4* ที่ประมวลรหัสเป็นเฟอร์รีดอกซิน และเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสในกลุ่มเอนไซม์ไดออกซิจีเนส ดวงกมล ธูปมงคล (2546) ได้ศึกษายีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน จากสายพันธุ์กลาย D2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเทคนิคเซาท์เธิร์นไฮบริไดเซชันโดยมีทรานสโปซอน Tn*5* เป็นตัวติดตาม หาลำดับนิวคลีโอไทด์ข้างเคียง

Tn*5* เพื่อนำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 จากนั้นจึงโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *Eco*RI ขนาดประมาณ 5.9 กิโลเบส ซึ่งให้สัญญาณจากการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามเข้าในพลาสมิด pBluescript K/S ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดว่า pDE จากการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนพบว่า ORF1 (*acnAc*) มีลำดับกรดอะมิโนเหมือน α-subunit ของไดออกซิจีเนส ORF2 (*acnAd*) มีลำดับกรดอะมิโนเหมือน β-subunit ของไดออกซิจีเนส ORF3 (*acnAb*) มีลำดับกรดอะมิโนเหมือน เฟอร์รีดอกซินของไดออกซิจีเนส ORF4 (*acnB*) มีลำดับกรดอะมิโนเหมือน ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส และ ORF5 ที่มีกรอบอ่านรหัสเปิดยังไม่สมบูรณ์ กล่าวคือ ยังไม่พบรหัสหยุด (stop codon) โดยมีลำดับกรดอะมิโนเหมือน อัลดีไฮดีไฮโดรจีเนส

เนื่องจากมีรายงานว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs มักเรียงตัวกันเป็นโอเปอรอน เช่น *nah* จาก *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 (Yen และ Gunsalus, 1982) *dox* จาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C18 (Denome และคณะ, 1993) *nah* จาก *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Simon และคณะ, 1993) *pah* จาก *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 (Takizawa และคณะ, 1999) *nag* จาก *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) และ *phn* จาก *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เป็นต้น จึงเป็นไปได้ว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 อาจเรียงตัวเป็นโอเปอรอนเช่นเดียวกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

วัตถุประสงค์

เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน