บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนด้วยสารพิษมากมาย เนื่องจากการพัฒนาทางเศรษฐกิจของประเทศจากระบบเกษตรกรรมสู่ระบบอุตสาหกรรม การขยายตัวของอุตสาหกรรมเพื่อความมั่นคงทางเศรษฐกิจ ทำให้เกิดการสร้างงานในชุมชนและทำให้มีการพัฒนาคุณภาพชีวิตของประชาชนที่ดีขึ้น แต่ผลเสียของการขยายโครงสร้างทางอุตสาหกรรม คือ ปัญหาทางสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน น้ำ อากาศ อันเนื่องจากการปล่อยของเสียมีพิษจากแหล่งต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมปิโตรเลียม อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมพลาสติก อุตสาหกรรมแบตเตอรี่ อุตสาหกรรมถลุงโลหะ อุตสาหกรรมกำจัดศัตรูพืช เป็นต้น และของเสียจากโรงงานดังกล่าวออกสู่สิ่งแวดล้อมโดยขาดการบำบัดและควบคุมที่ถูกต้องทำให้เกิดการสะสมมลพิษในสิ่งแวดล้อม และจากจำนวนของเสียที่ลงสู่สิ่งแวดล้อม มีการปนเปื้อนของเสียอันตรายประเภทน้ำมันและปิโตรเลียมด้วย โดยของเสียประเภทนี้มีส่วนประกอบสารอินทรีย์หลายชนิด ที่สำคัญคือ สารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)

อะซีแนพธีน (acenaphthene) เป็นสารประกอบในกลุ่ม PAHs ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง และวงไซโคลเพนเทน 1 วง เชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม จัดเป็นสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ พบอะซีแนพธีนในน้ำมันดินจากถ่านหิน และน้ำมันดิบจากปิโตรเลียม สามารถนำอะซีแนพธีนมาใช้ในการผลิตสารเคมี เช่น แนพธาลิกแอนไฮไดรด์ หรือใช้ผลิตสี เมื่อศึกษาความเป็นพิษไม่พบการก่อมะเร็ง (IARC, 1999) แต่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ในสัตว์เพศเมีย (U.S.EPA, 1989)

การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อน PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ (bioremediation) มีบทบาทมากขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีที่ประหยัดและสามารถกำจัดสารพิษได้ค่อนข้างสมบูรณ์ จึงมีการศึกษาวิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยจุลินทรีย์ และการศึกษาในระดับพันธุศาสตร์ของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs เพื่อช่วยในการตรวจติดตามและควบคุมภาวะการย่อยสลายให้มีประสิทธิภาพการบำบัดมากขึ้น และอาจเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยปรับปรุงสมบัติในระดับยีนของจุลินทรีย์นั้น และนำองค์ความรู้เกี่ยวกับยีนในการย่อยสลายไปใช้ในการควบคุม หรือปรับภาวะให้เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ท้องถิ่นให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ในปัจจุบัน sphingomonad เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการย่อยสารสลายยาก (xenobiotics) หลายชนิดโดย *Sphingomonas* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่พบได้ทุกแหล่งใน

สิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน น้ำ ตะกอนหรือบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารพิษ ทั้งนี้แบคทีเรียในกลุ่ม sphingomonad สามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ซึ่งมีรายงานมากมายเกี่ยวกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ เช่น *Sphingomonas* sp. P2 สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน แนพธาลีน และไบฟีนิล (Supaka และคณะ, 2001) *Sphingomonas* sp. ยังสามารถย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลสูงได้ เช่น *Sphingomonas* sp. CHY-1 ซึ่งสามารถย่อยสลายไครซีน (Demaneche และคณะ, 2004) นอกจากนี้ยังย่อยสลายสารอื่น เช่น ไดเบนโซฟูแรน (Fukuda และคณะ, 2002) เททราลิน (Hernaez และคณะ, 1999) คาร์บาโซล (Shepherd และคณะ, 1998) และยาปราบวัชพืช (Zipper และคณะ, 1996) เป็นต้น มีรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนน้อยมาก และส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม sphingomonad เช่น *Pseudomonas* sp. A4 (Komatsu และคณะ, 1993) (ในภายหลังเปลี่ยนชื่อเป็น *Sphingomonas* sp. A4 (Pinyakong และคณะ, 2004)) และ *Sphingomonas aromaticivoran* B0695 (Shi และคณะ, 2001) และถึงแม้มีรายงานว่า *Alcaligenes* sp. สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนได้ (Selifonov และคณะ, 1993) แต่จนถึงปัจจุบันมีเพียงรายงานการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีนของสายพันธุ์ A4 เท่านั้น (Pinyakong และคณะ, 2004)

การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในภาวะที่มีออกซิเจนโดยจุลินทรีย์ เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่มออกซิจีเนส (oxygenase) และดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ซึ่งทำกิจกรรมในการเปลี่ยนโครงสร้างของ PAHs (transformation) ให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษลดลง โดยการทำให้โครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติกเป็นสารมัธยันตร์ที่สามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายขึ้นโดยเอนไซม์อื่น จนเข้าสู่วัฏจักรกรดไทรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญต่อไป (Habe และ Omori, 2003)

การศึกษายีนประมวลรหัสเอนไซม์ในวิถีการย่อยสลาย PAHs ของ *Sphingomonas* sp. มีการจัดเรียงตัวอยู่ห่างกันเนื่องจากถูกคั่นด้วยยีนจากวิถีการย่อยสลาย PAHs ต่างชนิดกัน และส่วนใหญ่ในหนึ่งสายพันธุ์มียีนในการย่อยสลาย PAHs หลายชุดเพื่อย่อยสลายสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน (Pinyakong และคณะ, 2003a) เช่น *Sphingobium yanoikuyae* B1 สามารถย่อยสลายไบฟีนิล ไซลีน และซาลิไซเลต (Gibson, 1999) และพบยีนเทอร์มินัลริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (terminal ring-hydroxylating dioxygenase) ถึง 5 ชุด (*bphA1*[a-e] และ *bphA2*[a-e]) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวกระจัดกระจาย แต่พบยีนเฟอร์รีดอกซิน (*bphA3*) และเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (*bphA4*) เพียง 1 ชุด (Kim และ Zylstra, 1999) มีรายงานเกี่ยวกับ *Sphingomonas*

aromaticivorans F199 (ภายหลังเปลี่ยนชื่อเป็น *Novosphingomonas aromaticivorans* F199 (Takeuchi และคณะ, 2001) พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs บนพลาสมิดขนาด 184 กิโลเบส ซึ่งมียีนเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสทั้ง 5 ชุด เช่นเดียวกับในสายพันธุ์ B1 และมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ดังกล่าวถึง 61-90% นอกจากนี้พบยีนชุดที่ 6 (*bphA1fA2f*) เรียงตัวอยู่ไกลจากยีนกลุ่มเดิม (Romine และคณะ, 1999) มีการทำนายว่าเป็นไบฟีนิล/แนพธาลีนไดออกซิจีเนสแต่ยังไม่มีการทดลองยืนยัน ต่อมามีการพบยีนเทอร์มินัลออกซิจีเนสทั้ง 5 ชุด (*ahdA1*[a-e] และ *ahdA2*[a-e]) ของ *Sphingomobium* sp. P2 และพบยีนเฟอร์รีดอกซิน (*ahdA3*) และเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (*ahdA4*) เพียงชุดเดียว จากการศึกษาหน้าที่ของเทอร์มินัลออกซิจีเนส 3 ชุด (*ahdA1*[c-e] และ *ahdA2*[c-e]) ซึ่งแสดงออกใน *Escherichia coli* JM109 พบเอนไซม์ 3 ชนิด (AhdA2cA1c, AhdA1dA2d และ AhdA1A2e) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซาลิไซเลตซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ในวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนให้เป็นแคทีคอล เรียกว่าเอนไซม์ซาลิไซเลต 1-ไฮดรอกซิเลส ซึ่งทั้ง 3 เอนไซม์ทำงานร่วมกับเฟอร์รีดอกซินและเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (AhdA3A4) ชุดเดียวกัน (Pinyakong และคณะ, 2003b)

การศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีนของ *Sphingomonas* sp. A4 พบว่าสามารถย่อยสลายสารทั้ง 2 ได้ แต่ไม่สามารถใช้ PAHs ชนิดอื่น และมีการย่อยสลายอะซีแนพธีน โดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ โดยกิจกรรมของออกซิจีเนสได้ 1-อะซีแนพธีนอล และ 1-อะซีแนพธีโนน (Komatsu และคณะ, 1993) ในปี 2004 เริ่มมีรายงานการแยกและศึกษาหน้าที่ของยีนเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีนเป็นครั้งแรกใน *Sphingomonas* sp. A4 โดยพบยีน *arhA1* และ *arhA2* ซึ่งทำหน้าที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของไดออกซิจีเนส ตามลำดับ แต่ไม่พบยีนเฟอร์รีดอกซินและเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสในยีนกลุ่มเดียวกัน (Pinyakong และคณะ, 2004) แสดงว่ายีนทั้ง 2 อาจอยู่ในบริเวณอื่น จึงมีการใช้พลาสมิด pSA3A4 ซึ่งบรรจุยีนเฟอร์รีดอกซิน (*ahd*A3) และเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (*ahd*A4) ของ *Sphingobium* sp. P2 (Pinyakong และคณะ, 2003b) ในการตรวจสอบหน้าที่ของไดออกซิจีเนสจากสายพันธุ์ A4 ใน *E.coli* พบว่าสามารถย่อยสลายอะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน แนพธาลีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน และฟลูออแรนธีน แต่ไม่ย่อยสลายไพรีน และในปี 2006 พบยีนเฟอร์รีดอกซิน (*arhA3*) ยีนเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (*arhA4*) และยีนควบคุม (*arhR*) ของวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีนในสายพันธุ์ A4 (Kouzuma และคณะ, 2006)

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้คัดแยก *Sphingomonas* sp. SP2 ซึ่งมีความสามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้แต่ไม่สามารถใช้อะซีแนพธิลีนได้ (Saiphet และคณะ, 2006) จึงมีการศึกษาโดยใช้เทคนิคเซาเธิร์นไฮบริไดเซชัน (Southern hybridization) เปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอทั้งหมดที่ถูกตัดด้วย *Eco*RI อย่างสมบูรณ์ของสายพันธุ์ A4 กับสายพันธุ์ SP2 โดยใช้ยีนไดออกซิจีเนสของสายพันธุ์ A4 เป็นตัวติดตาม สามารถตรวจพบสัญญาณของยีนไดออกซิจีเนสในทั้ง 2 สายพันธุ์ อย่างไรก็ตามพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ให้สัญญาณแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ A4 ปรากฏ 2 แถบ ขนาดประมาณ 2.6 และ 5.0 กิโลเบส แต่สายพันธุ์ SP2 ปรากฏเพียง 1 แถบ ขนาดประมาณ 5.0 กิโลเบส (Pinyakong และคณะ, ยังไม่ตีพิมพ์) จึงคาดว่าทั้ง 2 สายพันธุ์น่าจะมียีนไดออกซิจีเนสที่คล้ายคลึงกัน เนื่องจากปรากฏแถบขนาด 5.0 กิโลเบส และสามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนได้เหมือนกัน จากการที่สายพันธุ์ A4 สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีน แต่สายพันธุ์ SP2 ไม่สามารถใช้อะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน การศึกษายีนของสายพันธุ์ SP2 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ A4 จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่ง งานวิจัยนี้จึงสนใจค้นหายีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีนในสายพันธุ์ SP2 โดยมุ่งเน้นการคัดแยกยีนอะซีแนพธีนออกซิจีเนส เพื่อจัดกลุ่มและศึกษาหน้าที่ของยีนดังกล่าว

วัตถุประสงค์

แยกยีนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะซีแนพธีนไดออกซิจีเนสจาก *Sphingomonas* sp. SP2 เพื่อจัดกลุ่มเอนไซม์และศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์ดังกล่าว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถแยกยีนอะซีแนพธีนไดออกซิจีเนสจาก *Sphingomonas* sp. SP2 และทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะซีแนพธีนไดออกซิจีเนส รวมทั้งทราบความสามารถในการย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ของยีนอะซีแนพธีนไดออกซิจีเนสที่แสดงออกใน *E.coli*