หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

อะซีแนพธิลีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งในกลุ่มสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง และวงไซโคลเพนทีน 1 วงเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม อะซีแนพธิลีนเป็นสารประกอบที่พบได้ในน้ำมันดิบ น้ำมันดำจากถ่านหิน (coal tar) ครีโอโสท (creosote) (Fieser, 1961) ควันบุหรี่ (Mattox และ Humennick, 1980) และพบเป็นสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำใต้ดิน (Neurath, 1972) นอกจากนี้ยังพบว่าอะซีแนพธิลีนและสาร PAHs ส่วนใหญ่เกิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิล ผลพลอยได้จากกระบวนการอุตสาหกรรม และระหว่างการทำอาหาร (Lijinsky, 1991) ซึ่งกระจายเข้าสู่สิ่งแวดล้อมโดยการปล่อยออกสู่อากาศโดยตรง การรั่วไหลของระบบอุตสาหกรรมหรือน้ำทิ้ง การใช้และทิ้งผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม หรือจากแหล่งธรรมชาติ เช่น การเผาไหม้ของป่าและทุ่งหญ้า (LaFlamme และ Hites, 1978) เป็นต้น สาร PAHs ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อมนุษย์เนื่องจากมีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) (Keith และ Telliard, 1979) ยังพบว่าอะซีแนพธิลีนมีความเป็นพิษ (toxicity) ต่อสัตว์น้ำจืดและน้ำเค็มในการทำให้เกิดพิษเฉียบพลัน ส่วนความเป็นพิษในมนุษย์ยังไม่มีข้อมูลเพียงพอ แต่อาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและระบบหายใจ (Lederer, 1985) นอกจากนี้สารอนุพันธ์บางตัวของอะซีแนพธิลีนสามารถก่อให้เกิดมะเร็งและการกลายพันธุ์ได้ (LaVoie และ Rice, 1988)

การบำบัดสาร PAHs ที่มีประสิทธิภาพในปัจจุบันมักจะใช้วิธีการบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) แทนวิธีการดั้งเดิม เช่น การเผา (incineration) ซึ่งจะมีผลกระทบตามมา (Ellis และคณะ, 1991) ได้มีรายงานการบำบัดตะกอนและดินที่มีการปนเปื้อนสาร PAHs โดยวิธีทางชีวภาพแล้ว (Sims และคณะ, 1990) และมีรายงานถึงจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งสายพันธุ์เดี่ยวหรือกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สามารถใช้สาร PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญเติบโต ซึ่งทำให้ความเป็นพิษของ PAHs หมดไปเนื่องจากการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (mineralization) หรือการลดพิษลงบางส่วนเนื่องจากการเปลี่ยน PAHs ให้เป็นสารอื่น (transformation) (Gibson และ Subramanian, 1984; Cerniglia, 1992)

จนถึงปัจจุบันมีรายงานวิถีการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดต่างๆเพิ่มมากขึ้น เช่น วิถีการย่อยสลายแนพธาลีนโดย *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 (Yen และ Serdar, 1988) วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama,

1997) วิถีการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 (Kim และคณะ, 1997) วิถีการย่อยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ CH1 (Churchill และคณะ, 1999) เป็นต้น ซึ่งวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนโดย *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 และ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB 9816-4 (Ensley และคณะ, 1982; Ensley และ Gibson, 1983; Yen และ Serdar, 1988) เป็นวิถีการย่อยสลาย PAH ชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาค่อนข้างสมบูรณ์รวมทั้งมีการศึกษาถึงยีนที่เกี่ยวข้องมากที่สุด

ศรัลยา แพงไตร (2543) ได้คัดแยก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 จากแหล่งดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องในเขตกรุงเทพมหานคร สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและแนพธาลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และยังสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และอะซีแนพธีนร่วมกับอะซีแนพธิลีน เชื้อสายพันธุ์นี้ไม่สามารถเปลี่ยนสีของอินโดล (indole) เป็นอินดิโก (indigo) ที่มีสีฟ้าน้ำเงินได้ ทำให้ไม่สามารถทำการคัดเลือกโคลนจากห้องสมุดยีนตามวิธีการที่ได้เคยมีรายงานไว้แล้ว (Ensley และคณะ, 1983) ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ (2544) จึงได้ทำการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn*5* จนได้สายพันธุ์กลายต่างๆที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

การศึกษาวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนรวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องจะเป็นประโยชน์ในการเข้าใจถึงความต้องการสารอาหารของจุลินทรีย์ ปัจจัยกระตุ้นที่สำคัญต่อความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและปรับปรุงสายพันธุ์ให้เหมาะสมเพื่อนำจุลินทรีย์รวมทั้งยีนที่สำคัญในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนไปใช้งานในอนาคต

จนถึงปัจจุบันยังไม่พบรายงานการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* รวมทั้งการศึกษาถึงยีนที่เกี่ยวข้องการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยเชื้อใดมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการนำสายพันธุ์กลายชนิดต่างๆของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่เกิดจากการสอดแทรกด้วยทรานสโปซอน Tn*5* และมีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนมาศึกษาหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ด้วยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันโดยมีทรานสโปซอน Tn*5* เป็นตัวติดตาม จากนั้นทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าว ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการทำนายวิถีการย่อยสลายสารอะซีแนพธิลีนและปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีการทางพันธุศาสตร์ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เพื่อประโยชน์ในการทำนายวิถีการย่อยสลายสารอะซีแนพธิลีนโดยแบคทีเรีย และปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไปในอนาคต