# บทที่ 2

# วารสารปริทัศน์

สารประกอบ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ เกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิง น้ำมัน หรือถ่านหิน (Volkering และคณะ, 1992) หรืออาจเกิดได้เองโดยธรรมชาติ เช่น ไฟไหม้ป่า หรือภูเขาไฟระเบิด เป็นต้น (Cerniglia, 1992) สารประกอบ PAHs ส่งผลอันตรายร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) และเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) (Wilson และ Jones, 1993)

## 2.1 การบำบัดสารประกอบ PAHs

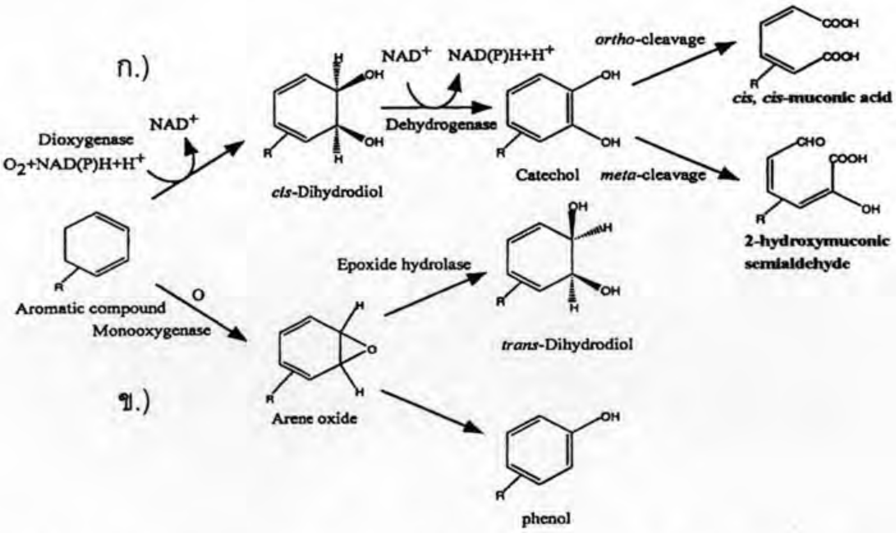
การบำบัดสารประกอบ PAHs มีหลายวิธีคือ การบำบัดด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น การกรอง การทำให้แห้ง การใช้ผงถ่านกัมมันต์ในการดูดซับ (Manahan, 1993) การบำบัดด้วยวิธีทางเคมี (John และ Cookson, 1995) การเผาที่อุณหภูมิสูง (incineration) การฝังกลบ (landfill) และการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioremediation) โดยใช้จุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย และรา ซึ่งทำให้ได้สารที่มีความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป (Mueller และคณะ, 1989) การย่อยสลายโดยวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีอื่น เนื่องจากส่งผลดีต่อสิ่งแวดล้อม และมีค่าใช้จ่ายต่ำ (Lee และ Cutright, 1996) โดยจุลินทรีย์จะใช้สารประกอบ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยสามารถย่อยสลาย PAHs บางชนิดได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) จนได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ (Wilson และ Jones, 1993) หรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้ได้สารที่มีความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## 2.2 กระบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ

จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรียและรามีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียจะใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ในขณะที่รามีผลทำให้ PAHs มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีขึ้นเพื่อง่ายต่อการกำจัด ทั้งแบคทีเรียและราใช้วิถีการย่อยสลาย PAHs ที่ต่างกันดังแสดงในรูปที่ 2.1 (Cerniglia, 1984; Cerniglia, 1992) จากรูปจะเห็นว่าราจะออกซิไดซ์สาร PAHs โดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มไซโตโครม P450 โมโนออกซิจีเนสซึ่งจะเติมออกซิเจน 1 อะตอมเข้าไปยังวงอะโรมาติกได้เป็นแอรีนออกไซด์ จากนั้นเติมไฮโดรเจนและหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลโดยอีพอกไซด์ไฮโดรเลส ได้เป็น ทรานส-ไดไฮโดรไดออล หรืออีกวิถีหนึ่งมีการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ได้เป็นฟีนอล ส่วนการย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียเริ่มจากการเติมออกซิเจน 2 อะตอมเข้ายังวงอะโรมาติกได้เป็น ซิส-ไดไฮโดรไดออล โดยใช้เอนไซม์ในระบบไดออกซิจีเนส (multicomponent dioxygenase) ซึ่งประกอบด้วย รีดักเทส เฟอร์รีดอกซิน และเทอร์มินอลออกซิเดส จากนั้นเร่งปฏิกิริยาต่อโดย ซิส-ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส ได้เป็นสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) สองหมู่ที่คล้ายกับคะทีคอล จากนั้นจะถูกย่อยสลายต่อโดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนสแบบออโธ (intradiol pathway) ที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมที่มีกลุ่มไฮดรอกซิล 2 อะตอมที่อยู่ติดกัน ได้เป็นกรด ซิส,ซิส-มิวโคนิก หรืออีกวิถีหนึ่งผ่านทางการแตกวงเบนซีนแบบ *เมตา* (extradiol pathway) ที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิลกับอะตอมคาร์บอนที่อยู่ถัดมาได้เป็น สอง-ไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ (Cerniglia, 1992)




**รูปที่** 2.1 **วิถีการย่อยสลายสาร** PAHs **ทั่วไปใน ก.) แบคทีเรีย และ ข.) รา** (Cerniglia, 1992)

จนถึงปัจจุบัน ได้มีรายงานการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆโดยจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งจะยกตัวอย่างดังต่อไปนี้

### 2.2.1 **การย่อยสลายแนพธาลีน**

แนพธาลีนเป็นสาร PAHs ที่มีโครงสร้างง่าย คือ ประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วงประกอบกัน มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี และสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้ง่าย ดังนั้นจึงมีการใช้แนพธาลีนเป็นต้นแบบเพื่อศึกษาวิถีการย่อยสลาย จากรายงานแรกของ Davies และ Evans (1964) ที่กล่าวถึงการย่อยสลายแนพธาลีนโดย *Pseudomonas* sp. ซึ่งจะถูกย่อยสลายเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีแนพธาลีน และจะถูกย่อยสลายต่อจนได้กรดซาลิไซลิก (salicylic acid) และรายงานของ Yen และ Serdar (1988) ที่กล่าวว่า *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาลีนแบบไดออกซิจีเนชัน (dioxygenation) จนได้เป็นกรดซาลิไซลิก Kelly และคณะ, (1990) รายงานว่า *Mycobacterium* sp. สามารถย่อยสลายแนพธาลีนได้ทั้งแบบโมโนออกซิจีเนชัน (monooxygenation) และไดออกซิจีเนชัน จนได้เป็นกรดซาลิไซลิก Annweiler และคณะ (2000) รายงานว่า *Bacillus thermoleovolans* สายพันธุ์ Humburg2 สามารถย่อยสลายแนพธาลีนได้ทั้งแบบโมโนออกซิจีเนชัน และไดออกซิจีเนชันผ่านกรดซาลิไซลิกเช่นเดียวกับ *P. putida* สายพันธุ์ G7 นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายแนพธาลีนในวิถีที่ต่างไปคือ สามารถย่อยสลายแนพธาลีนผ่าน กรดพธาลิก (phthalic acid) ได้เป็นกรดเบนโซอิก (benzoic acid) ตามลำดับ

กรดซาลิไซลิกที่เกิดขึ้นเป็นสารมัธยันตร์ที่จะถูกเปลี่ยนเป็นคะทีคอล (catechol) จากนั้นคะทีคอลถูกแตกวงเบนซีนโดยวิถี *meta* clevage หรือวิถี *ortho* clevage จนได้เป็นอะซีทิลโคเอ (acetyl CoA) หรือซัคซินิลโคเอ (succinyl CoA) และเข้าสู่วัฏจักรของกรดไตรคาร์บอกซิลิกต่อไป (Yen และ Gunsalus,1982)

นอกจากนี้แบคทีเรียยังแตกวงเบนซีนของกรดซาลิไซลิกผ่านทางกรดเจนทิสิกได้ เช่น การย่อยสลายโดย *Pseudomona fluorescens* (Starovoitov, 1975) *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TA-2 (Ohmoto และคณะ, 1991) *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ B4 (Grund และคณะ, 1992) และ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) เป็นต้น กรดเจนทิสิกจะถูกออกซิไดซ์ต่อจนได้เป็นไพรูเวท และฟูมาเลท (Zhou และคณะ, 2001)

### 2.2.2 การย่อยสลายฟลูออรีน

ฟลูออรีนเป็นสาร PAHs ที่ประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วงและวงไซโคลเพนทีน 1 วง เช่น การย่อยสลายฟลูออรีนในแบคทีเรียแต่ละชนิดจะได้สารมัธยันตร์ที่แตกต่างกันออกไป Grifoll และคณะ (1994) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ F247 สามารถย่อยสลายฟลูออรีนได้โดยการเติมออกซิเจน 1 อะตอม (monooxygenase) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 ได้เป็น 9-ฟลูออรีนอล (9-fluorenol) จากนั้นจะถูกย่อยสลายต่อจนได้สารมัธยันตร์ตัวสุดท้ายคือกรดพธาลิกซึ่งจะถูกย่อยสลายผ่านกรดโปรโตคาทีคูอิกต่อไป โดยพบว่ามีการแตกวงไซโคลเพนทีนและวงเบนซีน Trenz และคณะ (1994) รายงานว่า *Brevibacterium* sp. สายพันธุ์ DPO1361 ย่อยสลายฟลูอรีนจนได้สารมัธยันตร์ตัวสุดท้ายคือ 1,10-ไดไฮโดร-1,10-ไดไฮดรอกซีฟลูออรีน-9-โอน (1,10-dihydro-1,10-dihydroxyfluorene-9-one) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นไบฟีนิล Neilson และ Allard (1998) รายงานว่า *Pseudomonas cepacia* สายพันธุ์ F297 ย่อยสลายฟลูออรีนได้โดยขั้นแรกจะเติมออกซิเจน 2 อะตอมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 (dioxygenase) ได้เป็น ซิส-3,4-ไดไฮดรอกซี-3,4-ไดไฮโดรฟลูออรีน (*cis*-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrofluorene) และจะถูกย่อยสลายต่อไปจนได้สารมัธยันตร์ตัวสุดท้ายคือ 1-อินดาโนน (1-indanone)

### 2.2.3 การย่อยสลายฟีแนนทรีนและแอนทราซีน

ฟีแนนทรีนและแอนทราซีนเป็นสาร PAHs ที่ประกอบด้วยวงเบนซีน 3 วง ซึ่งแพร่กระจายทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยมีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนและแอนทราซีนได้ เช่น Evans และคณะ (1965) รายงานว่า *Mycobacterium* sp. สามารถย่อยสลายแอนทราซีนโดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส โดยเติมออกซิเจน 2 อะตอมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1,2 ได้เป็น *ซิส*-1,2-ไดไฮดรอกซี-1,2-ไดไฮโดรแอนทราซีน (*cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydroanthracene) และจะถูกย่อยสลายต่อไปจนได้คะทีคอล (catecol) Houghton และ Shanley (1994) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้โดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส โดยเติมออกซิเจน 2 อะตอมตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 1,2 หรือ 3,4 และถูกย่อยสลายต่อจนได้คะทีคอลหรือกรดเจนทิสิก จากนั้นจะถูกย่อยสลายต่อไปจนได้สารมัธยันตร์ที่เข้าสู่วัฏจักร TCA (TCA cycle) Pinyakong และคณะ (2000) รายงานว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ P2 ย่อยสลายฟีแนนทรีนจนได้สารมัธยันตร์ตัวสุดท้ายคือ คูมาริน (coumarin)

### 2.2.4 การย่อยสลายฟลูออแรนธีน

ฟลูออแรนธีนเป็นสาร PAHs ที่ประกอบด้วยวงเบนซีน 3 วงและวงไซโคลเพนทีน 1 วง โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนธีนได้มักจะอยู่ในกลุ่ม *Mycobacterium* sp. และ *Alcaligenes* sp. เช่น Kelly และคณะ (1993) รายงานว่า *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 สามารถย่อยสลายฟลูออแรนธีนโดยการเติมออกซิเจน 2 อะตอมตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 1,2 หรือ 7,8 โดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนสจนได้สารมัธยันตร์ตัวสุดท้ายคือกรดอดิพิค (adipic acid) Rehmann และคณะ (2001) รายงานว่า *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ KR20 สามารถย่อยสลายฟลูออแรนธีนจนได้สารมัธยันตร์ตัวสุดท้ายคือ กรดเบนซีน-1,2,3-ไตรคาร์บอกซิลิก (benzene-1,2,3-tricarboxylic acid)

### 2.2.5 การย่อยสลายไพรีน

ไพรีนเป็นสาร PAHs ที่ประกอบด้วยวงเบนซีน 4 วง Heitkamp และ Cerniglia (1989) รายงานว่า *Mycobacterium* sp. สามารถย่อยสลายไพรีนโดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส โดยการเติมออกซิเจนตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 4,5 จากนั้นจะถูกย่อยสลายต่อจนได้สารมัธยันตร์ตัวสุดท้ายคือกรดซินนามิค (cinnamic acid) และยังมี *Mycobacterium* sp. อีกหลายสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายไพรีนได้ เช่น *Mycobacterium flavescens* (Dean-Ross และ Cerniglia, 1996) และ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ KR2 (Rehmann และคณะ, 1998)

ราไวท์รอท (white rot fungi) เป็นกลุ่มราชนิดหนึ่งอยู่ตามเนื้อไม้ สามารถย่อยสลาย PAHs ได้ โดยราจะปล่อย extra cellular enzyme ในการย่อยสลายลิกนิน (lignin) ในเนื้อไม้ ซึ่งเอนไซม์นี้ไม่มีความจำเพาะ ทำให้สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ตัวอื่นได้รวมถึง PAHs (Bumpus และคณะ, 1985) ซึ่ง PAHs จะถูกเปลี่ยนรูปเป็นควิโนน (quinone) (Cerniglia, 1997) หรือมีการแตกวงอะโรมาติกและถูกย่อยสลายต่อได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ เช่น *Pleurotus ostratus* และ *Phanerochaete chrysosporium* (Hammel และคณะ, 1992; Bezalel และคณะ, 1996)

## 2.3 การศึกษาวิถีการย่อยสลาย PAHs ในระดับพันธุศาสตร์

Yen และ Gunsalus (1982) รายงานว่า พลาสมิด NAH7 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 มีการจัดเรียงตัวของยีนเป็น 2 โอเปอรอน (operon) คือ โอเปอรอน *nah* ประกอบด้วย *nahABFCED* ประมวลรหัสเอนไซม์ในส่วนวิถีบน (upper pathway) ทำหน้าที่ย่อยสลายแนพธาลีนไปเป็นซาลิไซเลท และโอเปอรอน *sal* ประกอบด้วย *nahGHINLJK* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ในส่วนวิถีล่าง (lower pathway) ทำหน้าที่ย่อยสลายซาลิไซเลทผ่านทางคะทีคอล และย่อยสลายต่อจนกระทั่งได้เป็นไพรูเวทและอะซีทัลดีไฮด์ซึ่ง NAH7 เป็นพลาสมิดใน *Pseudomonas putida* PpG7 ที่สามารถถ่ายทอดไปยังจุลินทรีย์ต่างๆได้ (Dunn and Gunsalus, 1973)

Kurkela และคณะ (1988) รายงานว่าพลาสมิด pWWW60-1 ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 มี *ndo* (*ndoABC*) ประมวลรหัสเอนไซม์แนพธาลีนไดออกซิจีเนสในส่วน เฟอร์รีดอกซิน $\alpha$- subunit และ $\beta$-subunit

Denome และคณะ (1993) รายงานว่าพลาสมิดของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C18 มี*dox* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไดเบนโซไทโอฟีนและแนพธาลีนในวิถีบน โดยมีการจัดเรียงตัวเป็น *doxABDEFGHIJ* โดย *doxABD* ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนส

Goyal และ Zylstra (1996) รายงานว่า *Comamonas testoteroni* สายพันธุ์ GZ42 มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาลีน แต่เมื่อนำมาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม *nah* พบว่าไม่เกิดสัญญาณ แสดงว่ายีนของจุลินทรีย์ตัวนี้ต่างจาก *nah* เมื่อนำมาศึกษารายละเอียดพบว่ามีความแตกต่างจาก *nah* คือ *nahAc* และ *nahAd2* ที่ประมวลรหัส $\alpha$ และ $\beta$ subunit แทรกอยู่ระหว่าง *nahAa* และ *nahAb* ตามลำดับ

Laurie และ Lloyd-Jones (1999) รายงานว่า *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 สามารถย่อยสลายแนพธาลีนและฟีแนนทรีนได้ มี *phn* ที่มีลำดับนิวคลีไทด์และการจัดเรียงตัวต่างจากกลุ่มของยีนในกลุ่มคล้าย *nah* โดย *phn* มีการเรียงตัวของยีนดังนี้ *phnFECDAcAdB* ในขณะที่ยีนในกลุ่มคล้าย *nah* มีการจัดเรียงตัวของยีนดังนี้ *nahAaAbAcAdBFCQED* ตามลำดับ โดยพบ *phnAcAd* ซึ่งประมวลรหัสสำหรับไดออกซิจีเนสในส่วน $\alpha$ และ $\beta$ subunit แต่ขาดยีนที่ประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซินและรีดักเทส นอกจากนี้ยังพบว่า PhnB (ดีไฮโดรจีเนส) มีความคล้ายกับดีไฮโดรจีเนสในวิถีการย่อยสลายไบฟีนิลมากกว่าวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนหรือฟีแนนทรีน ส่วน PhnC จัดอยู่ในคลาส III extradiol dioxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มใหม่และมียีนควบคุมเป็น *phnR* และ *phnS* แทน *nahR* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7

Romine และคณะ(1999) รายงานว่า *Sphingomonas aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199, Takeuchi และคณะ, 2001) มีพลาสมิด pNL1 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะโรมาติกหลายชนิด โดยพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไบฟีนิล แนพธาลีน เมตา-ไซลีน พารา-ครีซอล กระจายอยู่บนพลาสมิด จากการระบุตำแหน่งของยีนพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีน ได้แก่ *nahE nahD* และ *nahF* กระจายอยู่ห่างกันและถูกคั่นด้วยยีนจากการย่อยสลายสารอื่น เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนในระดับกรดอะมิโนของยีนทั้ง 3 ตัวกับยีนในกลุ่มคล้าย *nah* พบว่ามีเปอร์เซนต์ความเหมือนค่อนข้างต่ำ แต่เนื่องจากจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้สามารถย่อยสลายแนพธาลีนเป็นซาลิไซเลทได้ แสดงว่ายีนในส่วนวิถีบนที่ขาดหายไปน่าจะเกิดการทดแทนจากยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ในวิถีการย่อยสลายสารอื่น เช่น วิถีการย่อยสลายไบฟีนิล ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้กับสับสเตรทตัวอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายกัน ส่วนในวิถีล่างไม่พบ *nahG* ที่จำเป็นสำหรับการย่อยสลายแนพธาลีนผ่านทางคะทีคอล แสดงว่าการย่อยสลายแนพธาลีนในส่วนวิถีล่างของสายพันธุ์นี้ไม่ผ่านทางวิถีคะทีคอล หรืออาจมีการใช้เอนไซม์ใหม่ที่เกี่ยวกับวิถีการย่อยสลายคะทีคอล

Takizawa และคณะ (1999) รายงานว่า *pah* ของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1 ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนและแนพธาลีน โดยมีการจัดเรียงตัวเป็นกลุ่มบนโครโมโซม ดังนี้คือ *pahABFCQED*

Saito และคณะ (2000) รายงานว่า *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 มี *phd* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนผ่านพธาเลท โดย *phd* ประกอบด้วยยีน 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย *phdEFABGHCD* ประมวลรหัสเอนไซม์ในการย่อยสลายฟีแนนทรีนไปเป็น 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธาโนเอท (1-hydroxy-2-naphthoate) และ *phdIJK* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ในการย่อยสลาย 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธาโนเอท ไปเป็นพธาเลท (phthalate)

Kasuga และคณะ (2001) รายงานว่า *Terrabacter* sp. สายพันธุ์ DBF63 มี *dbf* ซึ่งมีการเรียงตัวเป็น *dbfA1A2* ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสในส่วน $\alpha$ และ $\beta$ subunit ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไดเบนโซฟูแรน และฟลูออรีน

Khan และคณะ (2001) รายงานว่า *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 สามารถย่อยสลายไพรีน ฟลูออแรนทรีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน เบนโซ(เอ)ไพรีน มี *nid* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์และการเรียงตัวของยีนต่างจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* โดยมีการเรียงตัวเป็น *nidDBA* ซึ่ง *nidD* ประมวลรหัสเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส ส่วน *nidBA* ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสในส่วน $\alpha$ และ $\beta$

subunit ซึ่งขาดยีนในส่วนที่ประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซินและเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส นอกจากนี้ยังพบว่า *nidAB* แตกต่างจากยีนกลุ่มคล้าย *nah* มากกว่า 60%

Zhou และคณะ (2001) รายงานว่า *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 มี *nag* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนผ่านเจนทิเสต ที่ประกอบด้วยยีน 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกประกอบด้วย *nagAaGHAbAcAdBFCQED* ซึ่งคล้ายกับยีนในส่วนวิถีบนของพลาสมิด NAH7 ยกเว้น *nagGH* ที่ประมวลรหัสเป็น ซาลิไซเลท-5-ไฮดรอกซิเลส และบริเวณถัดลงมาจาก *nagD* มียีนอีก 1 กลุ่มที่ประกอบด้วย *nagJIKLMN* ที่ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายเจนทิเสต โดยคาดว่ายีนทั้งสองกลุ่มแปลรหัสร่วมกัน (cotranscribe) เป็นโอเปอรอน

Kasai และคณะ (2003) รายงานว่า *Cycloclasticus* sp. สายพันธุ์ A5 มี *phn* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีน แนพธาลีน และเมธิลแนพธาลีน โดยมีการเรียงตัวเป็น *phnA1A2A3A4* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ในกลุ่มไดออกซิจีเนส ซึ่งประกอบด้วย $\alpha$ subunit $\beta$ subunit เฟอร์รีดอกซิน และเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส ตามลำดับ

Michiei และคณะ (2004) รายงานว่า *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ SP6 สามารถย่อยสลายไพรีน ฟีแนนทรีน และฟลูออแรนธีน เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยพบยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสในส่วน $\alpha$ subunit 4 ชุด คือ [*pdoA/X* และ *nidA/X*] แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส 4 ชุด คือ [*pdoC/H* และ nid*C/H*]

จากรายงานการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ในกลุ่มไดออกซิจีเนสมีผู้ศึกษากันเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความสำคัญต่อการย่อยสลายสารประกอบ PAHs หลายชนิดในขั้นตอนเริ่มต้น

## 2.4 การย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและการศึกษาวิถีการย่อยสลายในระดับพันธุศาสตร์

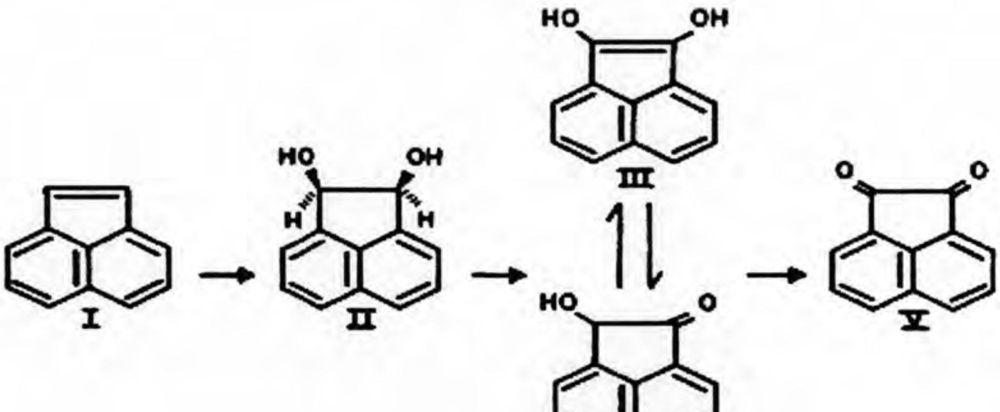
อะซีแนพธิลีนมีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนกว่าแนพธาลีน โดยประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วงและวงไซโคลเพนทีน 1 วงเชื่อมต่อกัน มีการศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนมาเป็นเวลานานทั้งในแบคทีเรีย รา และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Hopskins และคณะ (1962) รายงานวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าอะซีแนพธิลีนจะถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์ไซโตโครม P450 ได้เป็นอะซีแนพธิลีนอีพอกไซด์ จากนั้นอีพอกไซด์ไฮโดรเลสจะทำหน้าที่เติมไฮโดรเจนและหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลได้เป็น ซิส และ ทรานส-อะซีแนพธีน-1,2-ไดออล อะซีแนพธีนควิโนน และกรดแนพธาลิก ตามลำดับ

Dean-Raymond และ Bartha (1975) คัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหารที่มีแนพธาลีนและอะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถโคออกซิไดซ์อะซีแนพธิลีนเป็นสารมัธยันตร์ประเภทควิโนน (quinone) ซึ่งยังไม่ทราบโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอน

Chapman (1979) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแนพธาลีน ซึ่งสามารถออกซิไดซ์อะซีแนพธิลีนไปเป็น ซิส-อะซีแนพธีน-1,2-ไดออล (cis-1,2-acenaphthenediol) และสารมัธยันตร์อื่นๆ ที่ยังไม่มีการศึกษารายละเอียดของโครงสร้าง

Schocken และ Gibson (1984) รายงานว่า *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนร่วมกับอะซีแนพธิลีนแบบโคออกซิเดชันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไบฟีนิล(biphenyl) เป็นแหล่งคาร์บอน การติดตามการสะสมสารมัธยันตร์โดยมีไบฟีนิลเป็นสารเหนี่ยวนำ พบว่ามีการเติมออกซิเจนเข้ายังวงไซโคลเพนทีนของอะซีแนพธิลีนโดยไดออกซิจีเนสได้เป็น ซิส-อะซีแนพธีน-1,2-ไดออล 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธิลีน และอะซีแนพธีนควิโนนตามลำดับ รายงานดังกล่าวยังไม่ได้แสดงการแตกวงไซโคลเพนทีนของอะซีแนพธิลีน ดังแสดงในรูปที่ 2.2




**รูปที่** 2.2 **วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน** *Sphingomonas yanoikuyae* **สายพันธุ์** B1 I **คือ** Acenaphthylene ,II **คือ** cis-1,2-Acenaphthenediol, III **คือ** 1,2-Dihydroxyacenaphthylene, IV **คือ** 1-Hydroxy-2-ketoacenaphthene **และ** V **คือ** Acenaphthenequinone (Schocken **และ** Gibson, 1984)

Komatsu และคณะ (1993) รายงานว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีน และพบสารมัธยันตร์กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก (naphthalene-1,8-dicarboylic acid) สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยยังไม่มีรายงานสารมัธยันตร์ที่ได้จากการออกซิไดซ์กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก (Komatsu *et al.*, 1993; Pinyakong *et al.*, 2004)

Selifonov และคณะ (1996) ทำนายวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน โดยวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ลูกผสม *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01 (pRE695) ที่ได้รับยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสจากพลาสมิด NAH7 พบว่าขั้นแรก อะซีแนพธิลีนจะถูกออกซิไดซ์โดยไดออกซิจีเนสได้เป็น ซิส-อะซีแนพธีน-1,2-ไดออล ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซิแนพธิลีน และ 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพธีน ซึ่งสารมัธยันตร์ทั้งสองชนิดจะถูกออกซิไดซ์ต่อเป็น อะซีแนพโธ-1,2-ควิโนน และกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.3

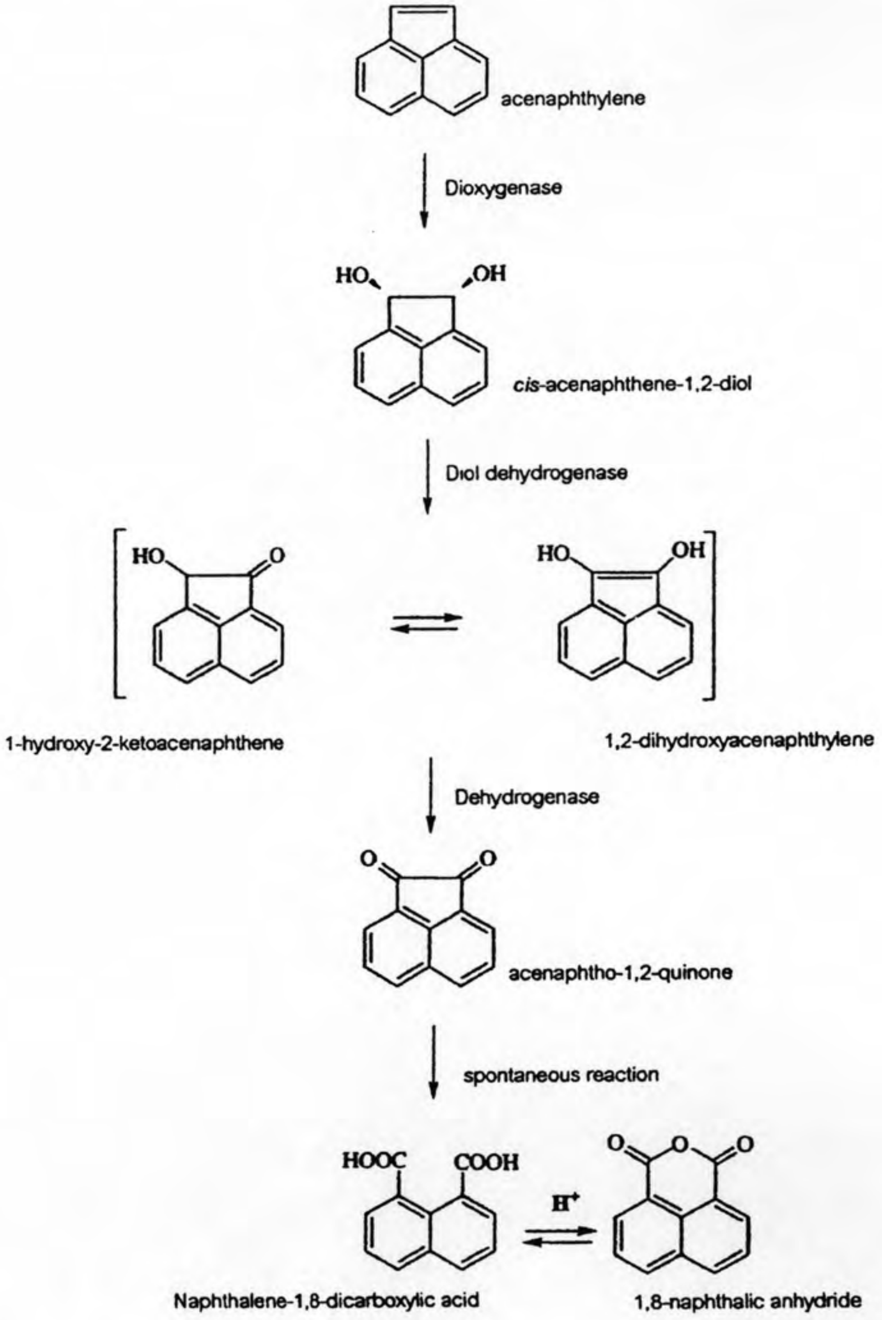
Johannes และคณะ (1998) ศึกษาวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในราไวท์รอท *Trametes versicolor* โดยพบว่า อะซีแนพธิลีนจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นอะซีแนพธีน-1-โอน และเปลี่ยนเป็น 1-ไฮดรอกซี-2-อะซีแนพธีโนน หรืออะซีแนพธิลีนจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็น ซิส-1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธีน และเปลี่ยนไอโซเมอร์ไปเป็น ทรานส-1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธีน และจะถูกเปลี่ยนเป็น 1,8-แนพธาลิกอัลดีไฮด์ (1,8-naphthalic aldehyde) จากนั้นผลิตภัณฑ์เหล่านี้รวมทั้ง 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธิลีนซึ่งเป็นไอโซเมอร์ จะถูกออกซิไดซ์เป็นอะซีแนพธีนไดโอน และกรด 1,8-แนพธอลดีไฮดริก ซึ่งสกัดออกมาได้ในรูปกรด 1,8-แนพธาลิกแอนไฮไดรด์

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธีนร่วมกับอะซีแนพธิลีน เช่น

Selifonov และคณะ (1993) รายงานว่า *Alcaligenes eutrophus* และ *Alcaligenes paradoxus* สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีน เมื่อศึกษาสารมัธยันตร์พบว่า สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนได้เป็นกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก กรด 7,8-ไดคีโตแนพธาลิก (7,8-diketonaphthalic acid) และกรด 3-ไฮดรอกซีพธาลิก (3-hydroxyphthalic acid) นอกจากนี้ยังรายงานว่าอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีนถูกออกซิไดซ์ไปเป็น อะซีแนพโธ-1,2-ควิโนน เหมือนกัน แต่ใช้วิถีการย่อยสลายต่างกัน จากนั้นจะถูกย่อยสลายต่อเป็นกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 3- ไฮดรอกซีพธาลิก ตามลำดับ

Grifoll และคณะ (1995) รายงานว่า *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ F297 สามารถย่อยสลายฟลูออรีน สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีนแบบโคออกซิเดชันกับ

ฟลูออรีนได้เป็น 1-อะซีแนพธีนอล (1-acenaphthenol) 1-อะซีแนพธิโนน (1-acenaphthenone) อะซีแนพโธ-1,2-ควิโนน 1,2-แนพธาลิกแอนไฮไดรด์ (1,2-naphthalic anhydride) และกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ




**รูปที่ 2.3 วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์ลูกผสมของ** ***Pseudomonas aeruginosa*** **สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) (Selifonov และคณะ, 1996)**

จนถึงปัจจุบันได้มีรายงานยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบางส่วน โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนส เช่น

Pinyakong และคณะ (2004) ที่รายงานว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 สามารถเจริญได้ในอะซีแนพธีน และอะซีแนพธิลีน โดยพบยีน *arhA1* และ *arhA2* ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือน $\alpha$-subunit และ $\beta$-subunit ของไดออกซิจีเนส 56% และ 45% กับ *phnAc* และ *phnAd* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ตามลำดับ

Kouzuma และคณะ (2006) ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีน และอะซีแนพธิลีนเพิ่มเติมใน *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 โดยพบยีน *arhA3* และ *arhA4* ที่ประมวลรหัสเป็นเฟอร์รีดอกซิน และเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสในกลุ่มเอนไซม์ไดออกซิจีเนส และยังพบยีนในกลุ่มอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีนอีกด้วย นอกจากนี้ยังศึกษาหน้าที่ของยีน *arhA3* และ *arhA4* โดยนำยีนที่ต้องการศึกษาใส่เข้าไปใน *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4-PCM1 ที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธีน จากการทดลองพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4-PCM1 ที่ได้รับยีน *arhA3* และ *arhA4* สามารถเปลี่ยนอินโดลไปเป็นอินดิโกได้ดี จึงกล่าวได้ว่า *arhA3* และ *arhA4* ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ไดออกซิจีเนส มีหน้าที่ขนส่งอิเลคตรอนเพื่อใช้เติมออกซิเจนสองอะตอมเข้ายังวงอะโรมาติก

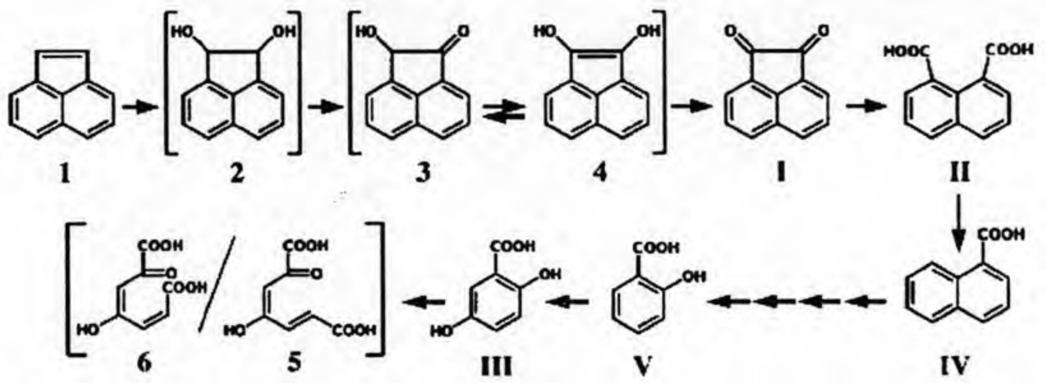
## 2.5 การย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และยีนที่เกี่ยวข้อง

ศรัลยา แพงไตร (2543) ได้คัดแยก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องในเขตกรุงเทพมหานคร สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและแนพธาลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และยังสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และอะซีแนพธีนร่วมกับอะซีแนพธิลีน ซึ่ง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตรจนสมบูรณ์ภายใน 3 วัน

ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ (2544) ได้กลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn5 ได้สายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

Poonthrigpun และคณะ (2006) ศึกษาวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยศึกษาสารมัธยันตร์ที่สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่กลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 พบว่า อะซีแนพธิลีนจะถูกย่อยสลายเป็น อะซีแนพธีนควิโนน กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งจะถูกย่อยสลาย

ต่อไปจนได้ กรดแนพโธอิก กรดซาลิไซลิก และกรดเจนทิสิก ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.4 โดยรายงานฉบับนี้เป็นรายงานแรกที่กล่าวถึงการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยแบคทีเรียอย่างสมบูรณ์ โดยพบสารมัธยันตร์ที่อยู่ถัดลงมาจากกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และพบการแตกวงของเบนซีน




**รูปที่** 2.4 **วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน** *Rhizobium* sp. CU-A1 **โดยโครงสร้างที่อยู่นอกกล่องคือสารมัธยันตร์ที่ได้ศึกษาโดย Poonthrigpun และคณะ (2006) 1 คือ Acenaphthylene, 2 คือ cis-1,2-Acenaphthenediol, 3 คือ 1-Hydroxy-2-ketoacenaphthene, 4คือ 1,2-Dihydroxyacenaphthylene, 5 คือ Maleyl pyruvate, 6 คือ Fumaryl pyruvate, I คือ Acenaphthenequinineม II คือ Naphthalene-1,8-dicarboxylic acid, III คือ Gentisic acid, IV คือ 1-Naphthoic acid และ V คือ Salicylic acid**

ดวงกมล ธูปมงคล (2546) ได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยติดตามทรานสโปซอน Tn*5* ที่แทรกอยู่ในจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. ที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน (ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ , 2544) ด้วยเทคนิคเซาท์เธิร์นไฮบริไดเซชัน โดยมีทรานสโปซอน Tn*5* เป็นตัวติดตาม หาลำดับนิวคลีโอไทด์ข้างเคียงทรานสโปซอน Tn*5* เพื่อสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 จากนั้นจึงโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *Eco*RI ขนาดประมาณ 5.9 กิโลเบส ซึ่งให้สัญญาณจากการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามเข้าใน พลาสมิด pBluescript K/S ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดว่า pDE จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการสับโคลนและใช้ universal primer หรือใช้ primer walking เมื่อนำผลนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลใน GenBank พบว่านิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน

ของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.9 กิโลเบส มีความเหมือนกับโปรตีนในฐานข้อมูล GenBank ดังแสดงในตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 2.1 ข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 หน้าที่และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับยีนอ้างอิง (ดวงกมล ฐูปมงคล, 2546)**

| ORF | ยีนอ้างอิงที่มีความใกล้เคียงสูงสุด และ GenBank Accession NO. | ความเหมือนกับกรดอะมิโนของยีนอ้างอิง (%) | ประมวลรหัสเอนไซม์ |
|---|---|---|---|
| ORF1 (*acnAc*) | *dbdCa* ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* 127W :AB121977.1 | 76% | $\alpha$ -subunit ของไดออกซิจีเนส |
| ORF2 (*acnAd*) | *dbdCb* ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* 127W :AB121977.1 | 60% | $\beta$- subunit ของไดออกซิจีเนส |
| ORF3 (*acnAb*) | *dbdCc*ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* 127W :AB121977.1 | 71% | ferredoxin |
| ORF4 (*acnB*) | *dbdD*ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* 127W :AB121977.1 | 67% | Dihydrodiol dehydrogenase |
| ORF5* (*acnF*) | *phnF* ของ *Burkholderia* sp. RP007: AAD09868.1 | 65% | Aldehyde dehydrogenase |

* ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยังไม่สมบูรณ์

จากงานวิจัยของดวงกมล ฐูปมงคล (2546) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 พบว่า ORF5 ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือ ยังไม่พบรหัสหยุด (stop codon) ของยีน *acnF* ดังกล่าว 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, 1994) *nag* จาก Ralstonia sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) และ *phn* จาก *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เป็นต้น ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์ในการศึกษายีนที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* ซึ่งคาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs