**Abstract (บทคัดย่อ)**

**Project Code :** TRG4580088
**(รหัสโครงการ)**

**Project Title :** การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลาย
**(ชื่อโครงการ)** อะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1


**Investigator :** Kobchai Pattaragulwanit, Dr. rer. nat.
Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University
**(ชื่อนักวิจัย) :** ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**E-mail Address** : kobchai@sc.chula.ac.th


**Project Period :** 2 years
**(ระยะเวลาโครงการ)**

**บทคัดย่อ :** *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนซึ่งแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมในประเทศไทย เพื่อศึกษายีนที่เกี่ยวข้องและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ได้กลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn*5* เพื่อที่จะได้สายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนได้ เพื่อพิสูจน์ลักษณะสารมัธยันต์ที่สะสมได้ เพาะเลี้ยงสายพันธุ์กลาย A53 B1 และ B5 ในอาหารสูตรต่ำที่มีอะซีแนพธิลีน สกัดสารมัธยันต์จากน้ำเลี้ยงโดยใช้เอธิลอะซีเตทและทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) และซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี พิสูจน์ลักษณะสารมัธยันต์ที่บริสุทธิ์ด้วยแมสสเปคโทรเมทรี (MS) และ/หรือนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) พบว่าสารมัธยันต์ที่สะสมจากสายพันธุ์กลาย A53 B1 และ B5 คือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก อะซีแนพธีนควิโนนและกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก นอกจากนี้ ได้แยกและศึกษาลักษณะยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยเซาเธอร์นไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของสายพันธุ์ E11 และสายพันธุ์ดั้งเดิม CU-A1 กับตัวติดตาม Tn*5* และ AE ตามลำดับ จากนั้นโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 4.5 kb *Bam*HI-*Hin*dIII พบกรอบอ่านรหัสเปิด 5 แห่งซึ่งคล้ายคลึงกับเป็นยีนที่ประมวลรหัสของโปรตีนตามลำดับจาก 5'→3' ดังต่อไปนี้ เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (33%) ไฮดราเทส-อัลโดเลส (38%) 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (46%) โปรตีนที่คล้ายแอดดูซิน (38%) และดีไฮโดรจีเนส (46%) งานวิจัยนี้ยังเป็นงานวิจัยแรกที่ได้เสนอวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในแบคทีเรียตระกูล *Rhizobium* โดยอาศัยข้อมูลจากสารมัธยันต์ที่ได้แยกและพิสูจน์ลักษณะ รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้อง พบว่าอะซีแนพธิลีนจะถูกย่อยสลายผ่านอะซีแนพธีนควิโนน และกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งสารประกอบชนิดหลังจะถูกย่อยสลายต่อไปได้เป็นกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก

**Keywords:** Rhizobium, acenaphthylene degradation, intermediates, gene, 2,5-dihydroxybenzoic acid

**Abstract :** *Rhizobium* sp. strain CU-A1 is a potential acenaphthylene (ACN) degrading bacterium isolated from petroleum contaminated soil in Thailand. In order to study genes involving and intermediates from ACN degradation, transposon Tn*5* mutagenesis was performed to obtain ACN degrading defective mutants. To identify accumulated intermediates, the mutant strains A53, B1 and B5 were cultured in minimal medium containing ACN. The intermediates were extracted from culture broth using ethyl acetate and purified by thin layer chromatography and silica gel column chromatography. The purified intermediates were identified by mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance to be 2,5-dihydroxybenzoic acid, acenaphthenequinone and naphthalene-1,8-dicarboxylic acid. In addition, genes involving ACN degradation were isolated and characterized by Southern hybridization DNA of the strain E11 and CU-A1 with Tn*5*- and AE-probe, respectively. The 4.5 kb *Bam*HI-*Hin*dIII-fragment was then cloned and sequenced. Five open reading frames (ORFs) were identified which showed homology to gene encoding for protein as following: ferredoxin reductase (33%), hydratase-aldolase (38%), 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase (46%), adducin like protein (38%), and dehydrogenase (46%). The ACN degradation pathway was also proposed.

**Methodology:** *Rhizobium* sp. CU-A1 was mutagenized by Transposon Tn*5*. Three mutants incapable of growing with ACN were used for isolation of intermediates and genes involving ACN degradation. Mutants were cultivated in carbon free medium containing ACN followed by extraction with ethyl acetate. Isolate intermediates was purified preparative TLC and silica gel column chromatography before subjected to identify by MS and NMR. Genes involving ACN degradation were isolated and characterized by Southern hybridization DNA of strain E11 and CU-A1 with Tn*5*- and AE-probe, respectively. The 4.5 kb *Bam*HI-*Hin*dIII-fragment was cloned and nucleotide sequences were determined.

**Results and Discussion:** Three intermediates were isolated and characterised as 2,5-dihydroxybenzoic acid, acenaphthenequinone and naphthalene-1,8-dicarboxylic acid. Five open reading frames (ORFs) were identified which showed homology to gene encoding for ferredoxin reductase, hydratase-aldolase, 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, adducin like protein, and dehydrogenase. Base on this results, ACN may be degraded by strain CU-A1 via acenaphthenequinone, naphthalene-1,8-dicarboxylic acid and 2,5-dihydroxybenzoic acid, respectively.

**Future direction:** The functional analysis of the isolated genes should be performed and some intermediates should be characterized in order to ensure the proposed ACN degradation pathways.