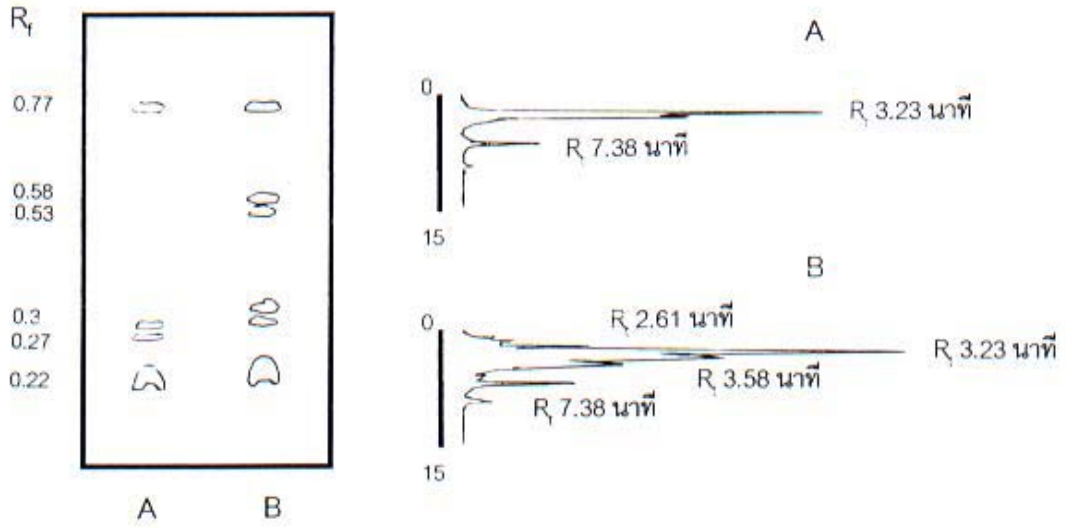
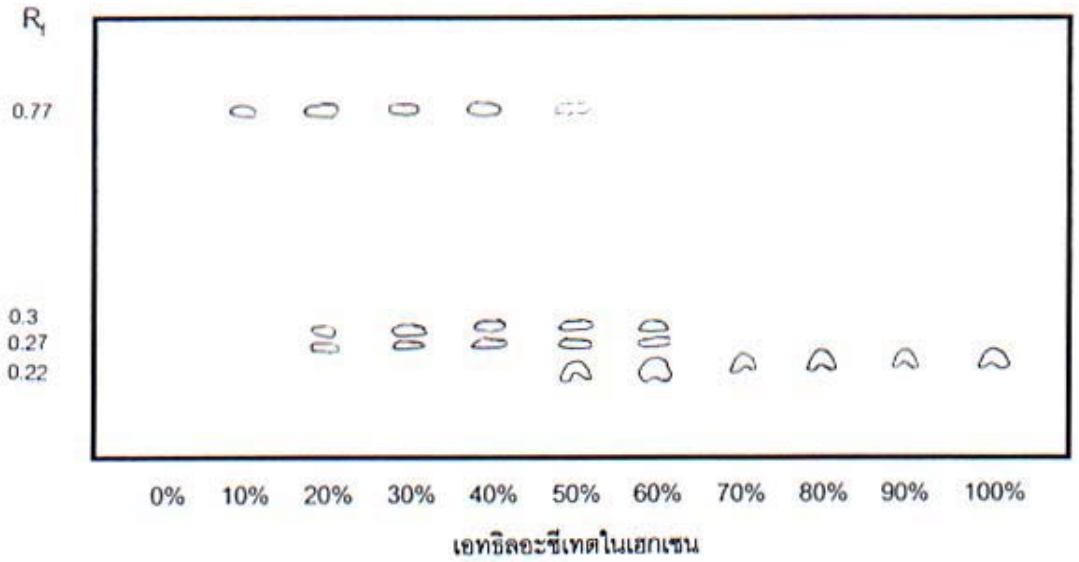
HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 3.17 และ 3.18 ตามลำดับ พบว่าเมื่อวิเคราะห์ลำดับส่วนที่ชะด้วย 80 – 100% เอธิลอะซีเตทด้วย TLC จะแสดงเพียงจุดเดียวที่ R_f 0.22 และจากผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าลำดับส่วนที่ชะด้วย 80% เอธิลอะซีเตทมีความบริสุทธิ์สูงสุดและมีปริมาณมากที่สุดโดยมียอดเดียวที่ R_t 3.23 นาที ดังนั้นจึงเลือกลำดับส่วนที่ชะด้วย 80% เอธิลอะซีเตทเพื่อมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต่อไป และให้ชื่อส่วนนี้ว่า สารมัธยันต์ A53

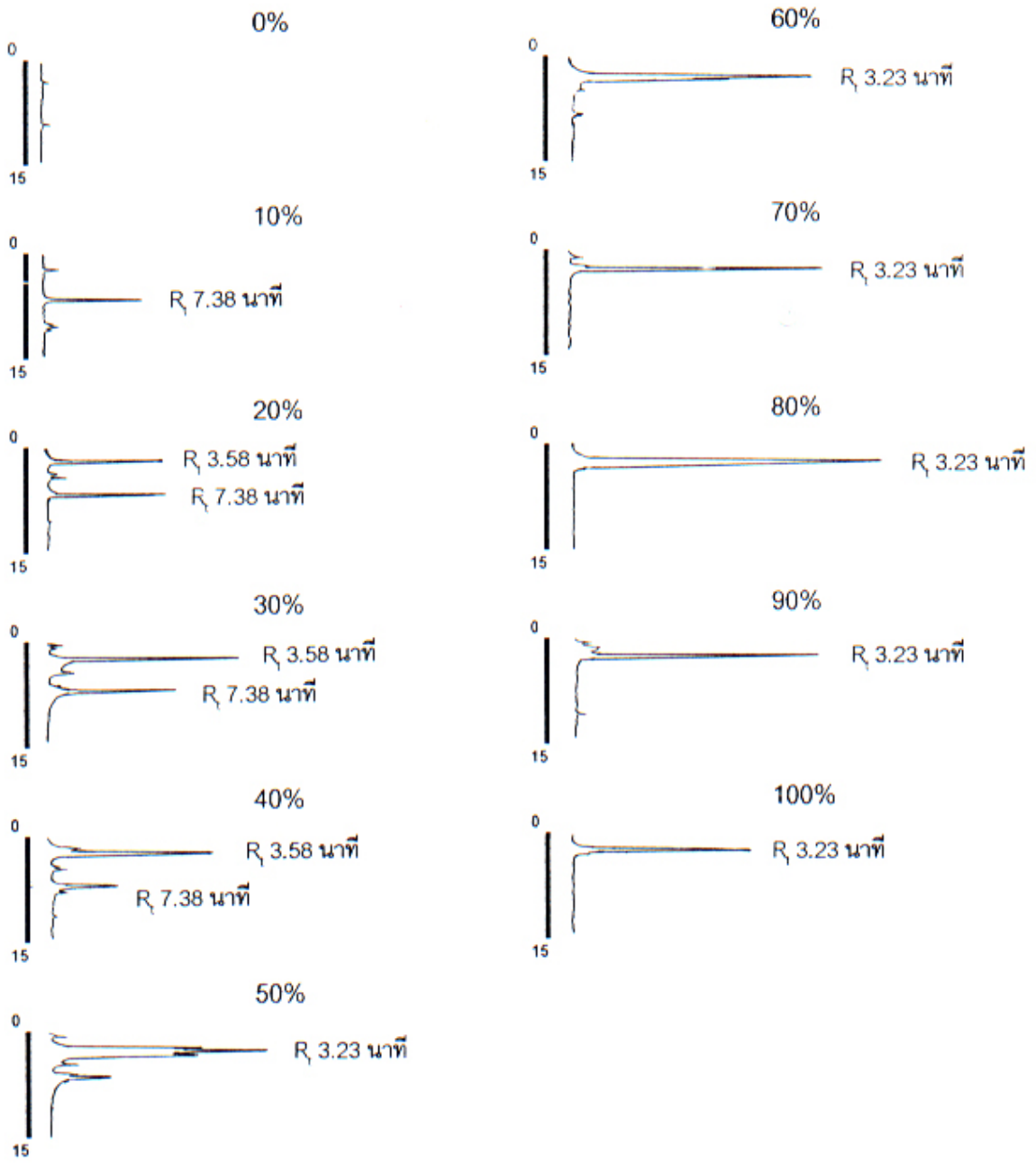


ก. ข.

รูปที่ 3.16 **ก.) TLC โครมาโตแกรม ข.) HPLC โครมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์** A53 **ที่แยกได้โดยวิธี** preparative TLC **จากสายพันธุ์** A53 (A) **เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ** (B) (R_t 7.38 **นาทีคืออะซีแนพธิลีน)**



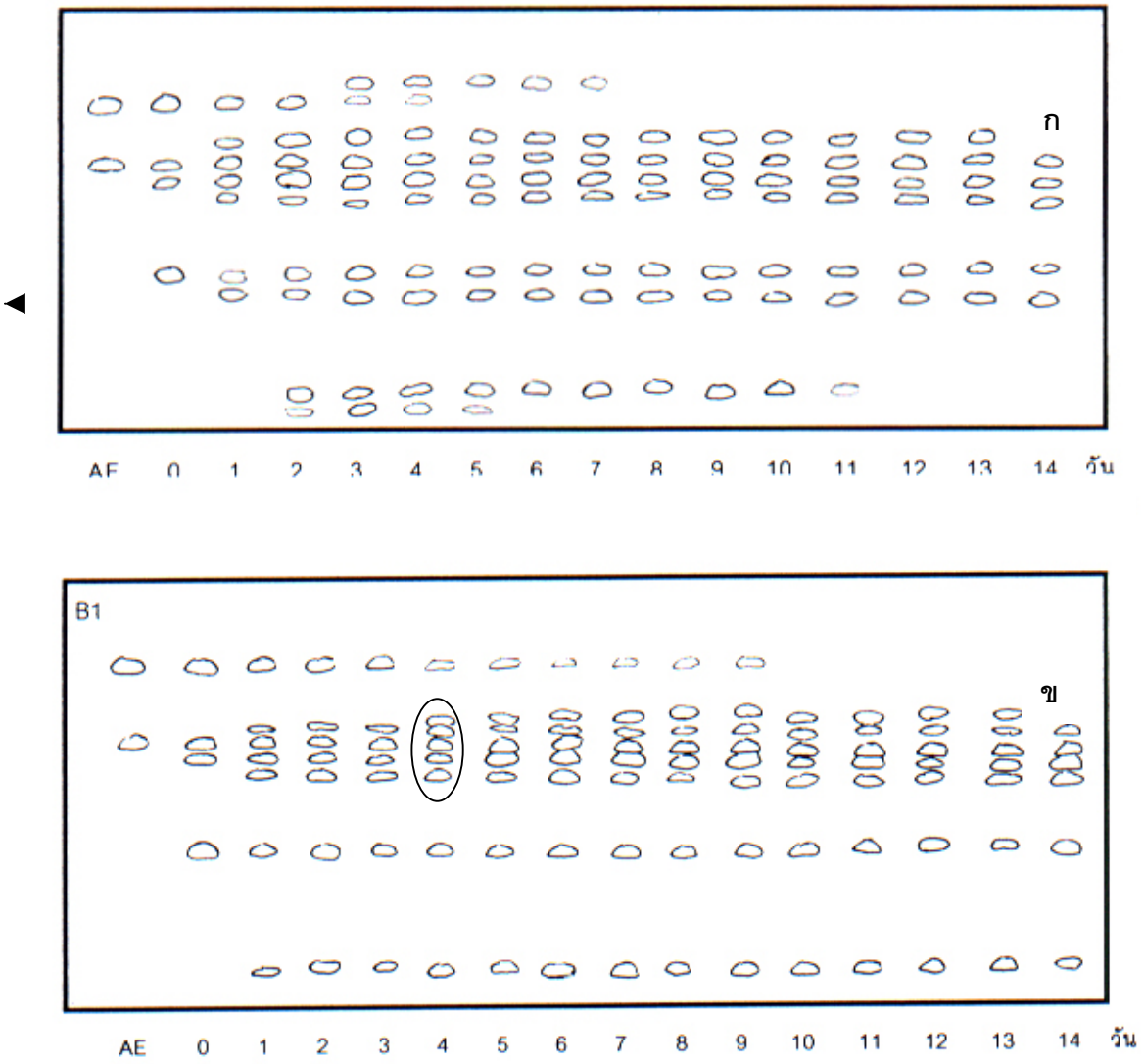
รูปที่ 3.17 **TLC โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์** A53 **มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย** 0 – 100% **เอธิลอะซีเทตในเฮกเซน**



รูปที่ 3.18 HPLC โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ A53 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย 0 – 100% เอธิลอะซีเทตในเฮกเซน (R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพธิลีน)

3.12.2 การแยกสารมัธยันต์ B1

จากการสกัดและวิเคราะห์สารมัธยันต์เมื่อเพาะเลี้ยงสายพันธุ์กลาย B1 ในอะซีแนพธิลีนเป็นเวลา 14 วัน พบว่าสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นแตกต่างไปจากเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยอะซีแนพธิลีนดังแสดงในรูปที่ 3.19

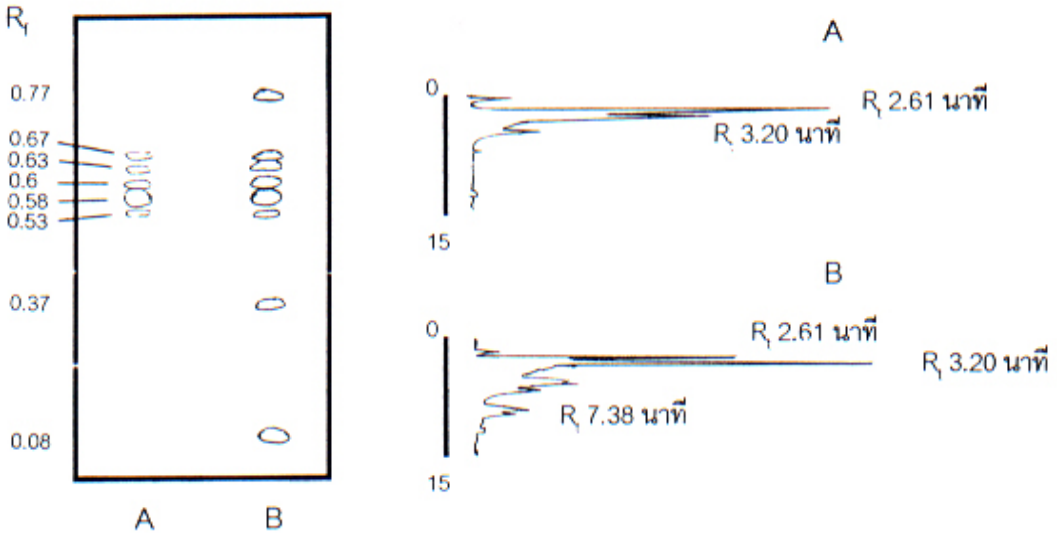


รูปที่ 3.19 TLC **โครโตแกรมของสารมัธยันต์ที่จากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์** CU-A1 (ก) และ B1 (ข) **ในอาหารเลี้ยงเชื้อ** CFMM **ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น** 600 **มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลา** 0 **ถึง** 14 **วัน** (AE **คืออะซีแนพธิลีน) วงรีแสดงกลุ่มของสารมัธยันต์สะสมที่แตกต่างจากสายพันธุ์** CU-A1

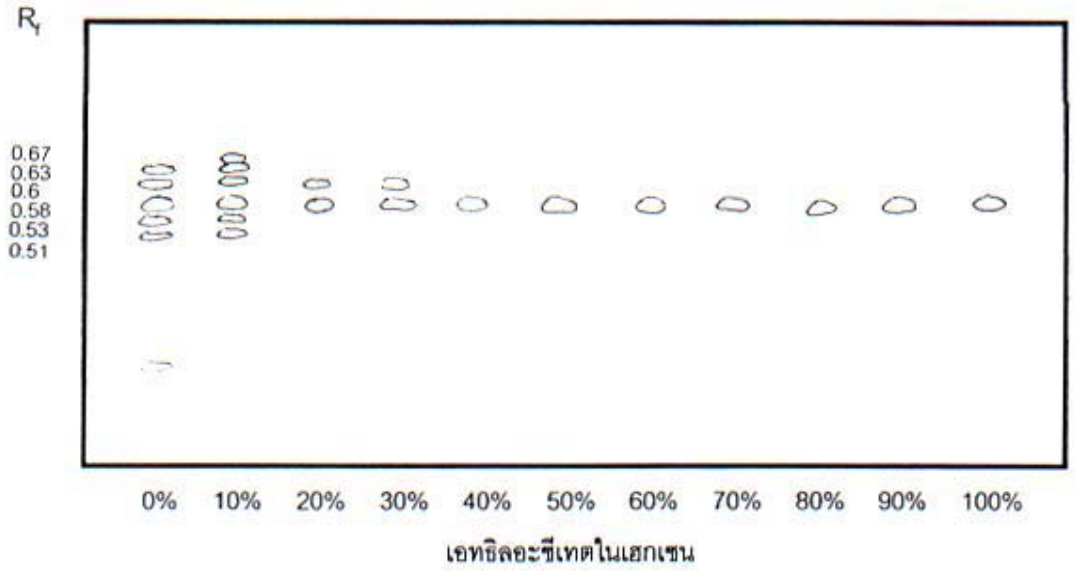
จากการวิเคราะห์สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยวิธี TLC พบว่าตั้งแต่วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ได้พบสารมัธยันต์ชนิดหนึ่งมีการสะสมที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ CU-A1 ดังแสดงในวงรี โดยสารมัธยันต์นี้เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตรและมีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่าสารมัธยันต์ชนิดอื่นๆ แสดงว่าสายพันธุ์ B1 สะสมสารมัธยันต์นี้ในปริมาณสูง จึงได้เลี้ยง

สายพันธุ์กลาย A53 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตรเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำการแยกสารมัธยันต์ชนิดนี้ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC

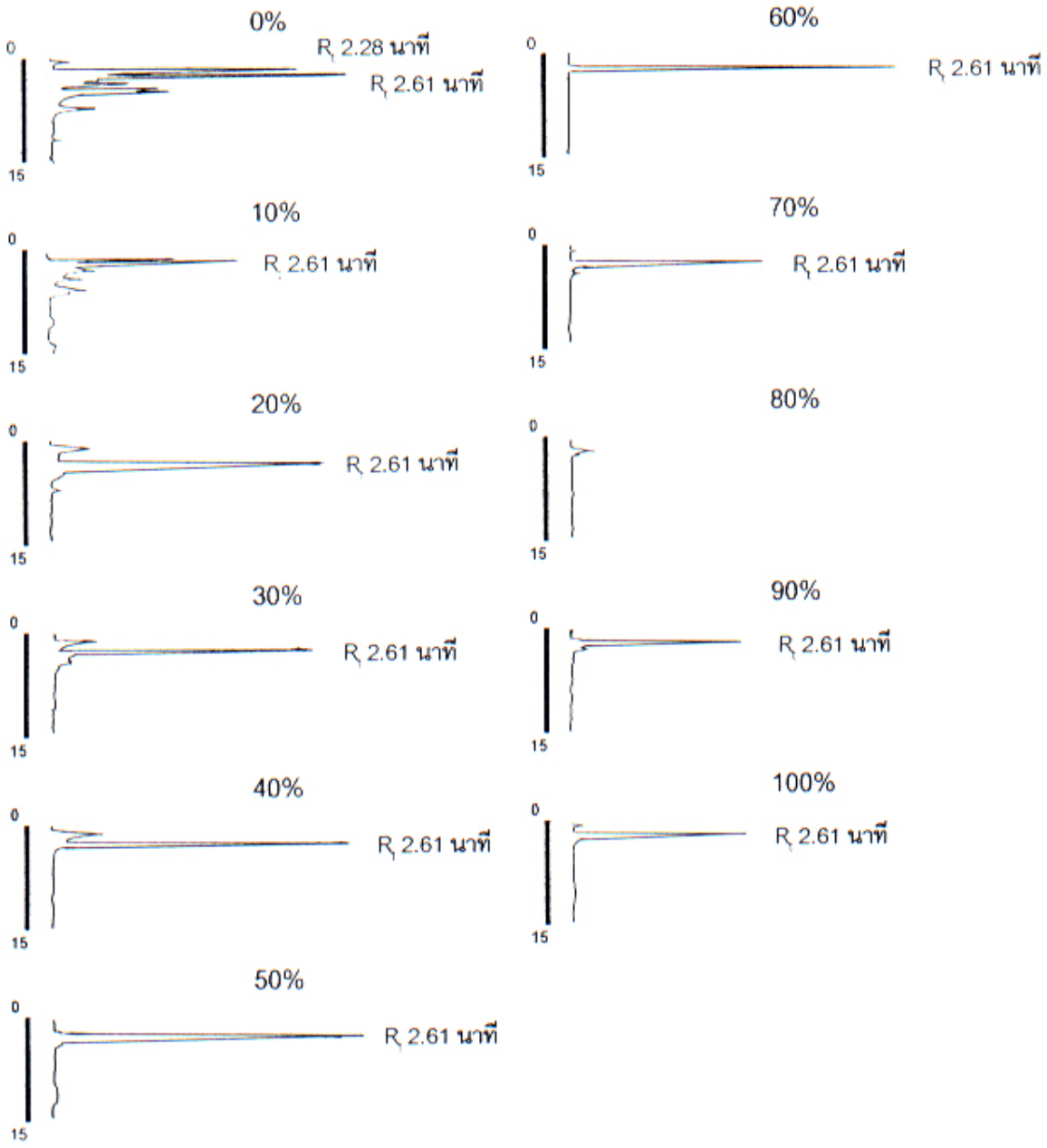
เมื่อนำสารมัธยันต์นี้ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และวิธี HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 3.20 ก). และ ข). ตามลำดับ พบว่าสารมัธยันต์ที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์จึงได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยชะคอลัมน์เป็นลำดับส่วนด้วย 0 ถึง 100% เอธิลอะซีเตทในเฮกเซน เพิ่มความเข้มข้นของเอธิลอะซีเตทลำดับส่วนละ 10% จากนั้นวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี TLC และ HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 3.21 และ 3.22 ตามลำดับ พบว่าเมื่อวิเคราะห์ลำดับส่วนที่ชะด้วย 40 – 100% เอธิลอะซีเตทด้วย TLC จะแสดงเพียงจุดเดียวที่ R_f 0.58 และจากผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าลำดับส่วนที่ชะด้วย 60% เอธิลอะซีเตทมีความบริสุทธิ์สูงสุดและมีปริมาณมากที่สุดโดยมียอดเดียวที่ R_t 2.61 นาที ดังนั้นจึงเลือกลำดับส่วนที่ชะด้วย 60% เอธิลอะซีเตทเพื่อมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต่อไป และให้ชื่อส่วนนี้ว่า สารมัธยันต์ B1



รูปที่ 3.20 **ก.) TLC โครมาโตแกรม ข.) HPLC โครมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์** B1 **จากสายพันธุ์** B1 **ที่แยกได้โดยวิธี** preparative TLC (A) **เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ** (B) (R_t 7.38 **นาทีคืออะซีแนพธิลีน**)



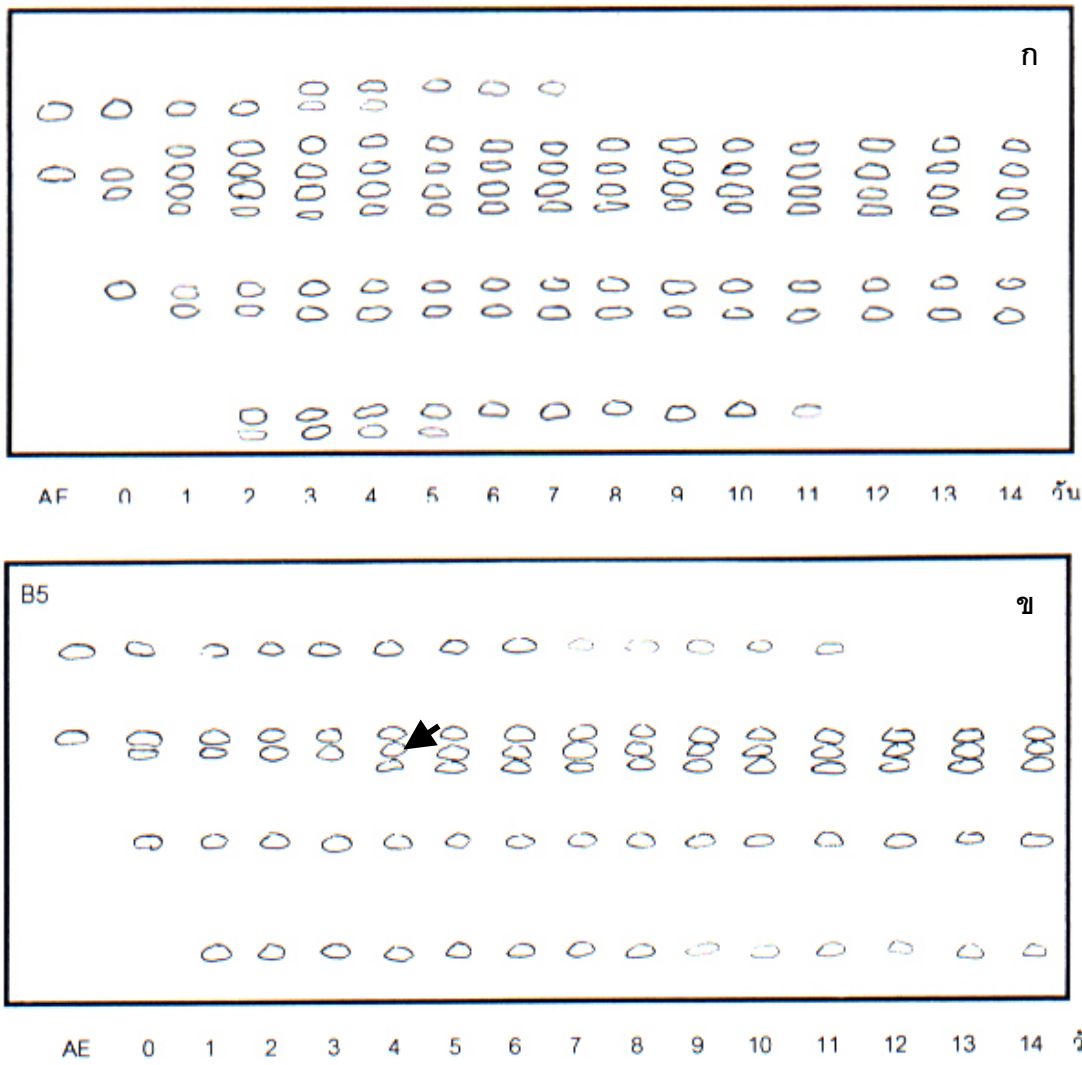
รูปที่ 3.21 TLC **โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์** B1 **มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย** 0 – 100% **เอธิลอะซีเทตในเฮกเซน**



รูปที่ 3.22 HPLC **โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์** B1 **มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย** 0 – 100% **เอธิลอะซีเทตในเฮกเซน** (R_t 7.38 **นาทีคืออะซีแนพธิลีน**)

3.12.3 การแยกสารมัธยันต์ B5

จากการสกัดและวิเคราะห์สารมัธยันต์เมื่อเพาะเลี้ยงสายพันธุ์กลาย B5 ในอะซีแนพธิลีนเป็นเวลา 14 วัน พบว่าสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นแตกต่างไปจากเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยอะซีแนพธิลีนดังแสดงในรูปที่ 3.23

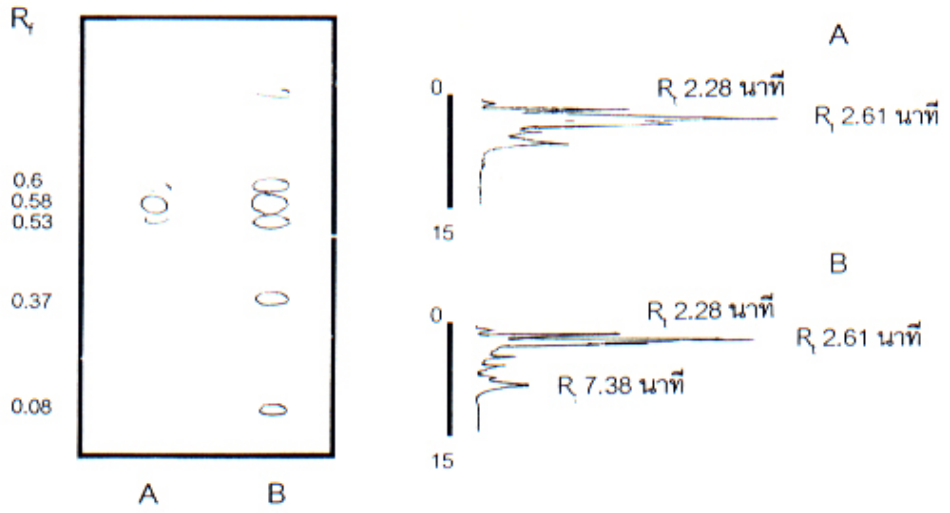


รูปที่ 3.23 **TLC โครโตแกรมของสารมัธยันต์ที่จากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์** CU-A1 **(ก) และ** B5 **(ข) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ** CFMM **ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น** 600 **มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลา** 0 **ถึง** 14 **วัน (**AE **คืออะซีแนพธิลีน) ลูกศรแสดงสารมัธยันต์สะสมที่แตกต่างจากสายพันธุ์** CU-A1

จากการวิเคราะห์สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยวิธี TLC พบว่าตั้งแต่วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ได้พบสารมัธยันต์ชนิดหนึ่งซึ่งมีค่า R_f ประมาณ 0.58 ดังแสดงโดยลูกศรในรูปที่ 3.23 ข โดยสารมัธยันต์นี้เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตรและมีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่าสารมัธยันต์ชนิดอื่นๆ แสดงว่าสายพันธุ์ B5 สะสมสารมัธยันต์นี้ในปริมาณสูง จึงได้เลี้ยงสายพันธุ์กลาย A53 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตรเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำการแยกสารมัธยันต์ชนิดนี้ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC

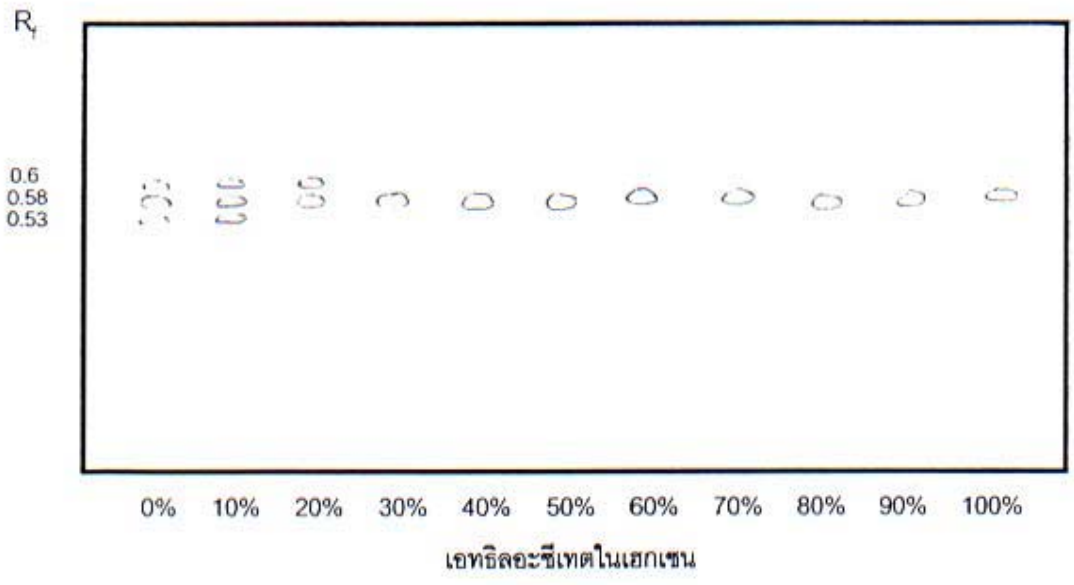
เมื่อนำสารมัธยันต์นี้ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และวิธี HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 3.24 ก). และ ข). ตามลำดับ พบว่าสารมัธยันต์ที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์จึงได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยชะคอลัมน์เป็นลำดับส่วนด้วย 0 ถึง 100% เอธิลอะซีเตทในเฮกเซน เพิ่ม

ความเข้มข้นของเอธิลอะซีเตทลำดับส่วนละ 10% จากนั้นวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี TLC และ HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 3.25 และ 3.26 ตามลำดับ พบว่าเมื่อวิเคราะห์ลำดับส่วนที่ชะด้วย 30 – 100% เอธิลอะซีเตทด้วย TLC จะแสดงเพียงจุดเดียวที่ R_f 0.58 และจากผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าลำดับส่วนที่ชะด้วย 80% เอธิลอะซีเตทมีความบริสุทธิ์สูงสุดและมีปริมาณมากที่สุดโดยมียอดเดียวที่ R_t 2.61 นาที ดังนั้นจึงเลือกลำดับส่วนที่ชะด้วย 80% เอธิลอะซีเตทเพื่อมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต่อไป และให้ชื่อส่วนนี้ว่า สารมัธยันต์ B5

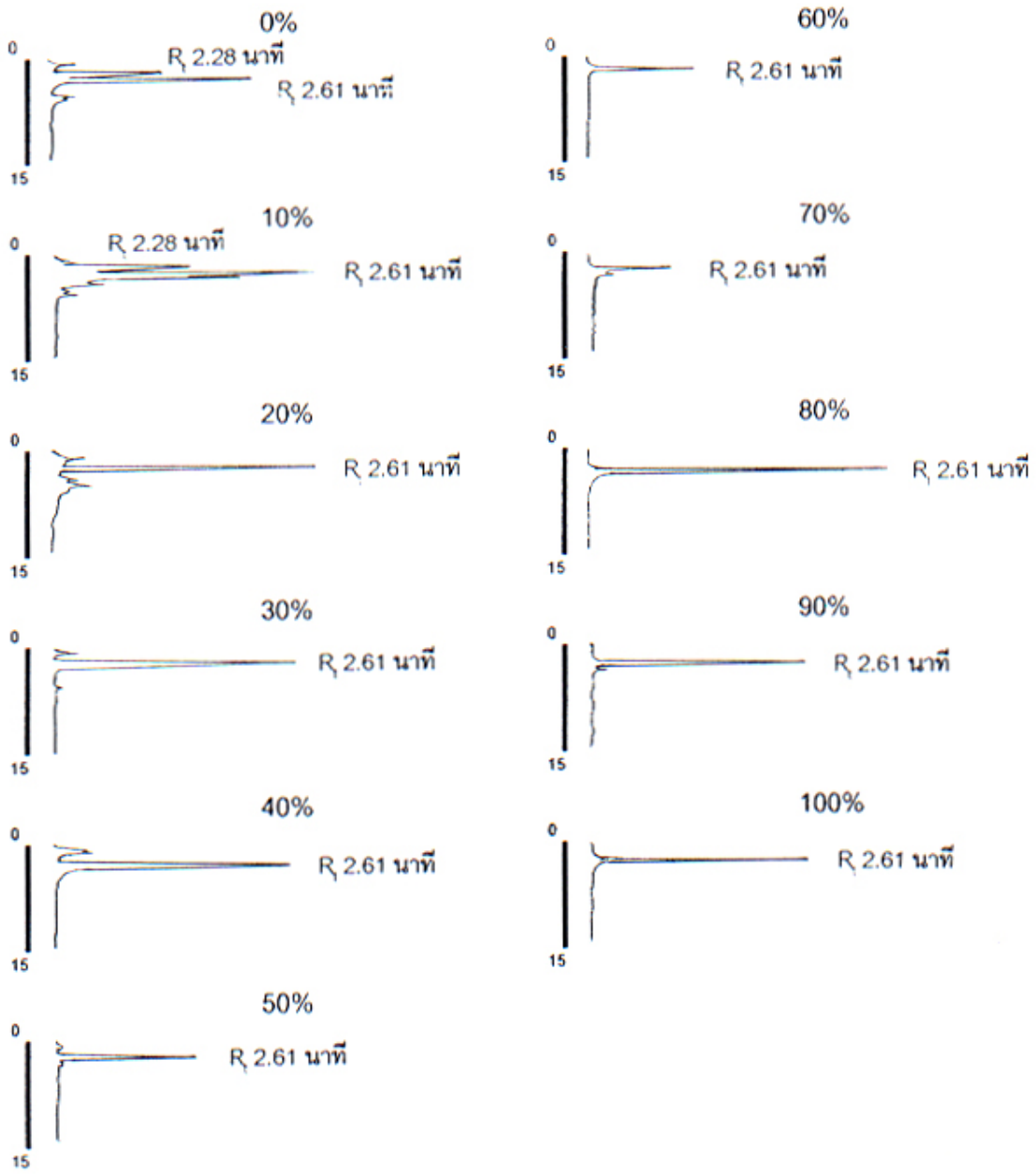


ก. ข.

รูปที่ 3.24 ก.) TLC โครมาโตแกรม ข.) HPLC โครมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ B5 ที่แยกได้โดยวิธี preparative TLC จากสายพันธุ์ B5 (A) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (B)
(R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพธิลีน)



รูปที่ 3.25 TLC โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ B5 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย 0 – 100% เอธิลอะซีเทตในเฮกเซน

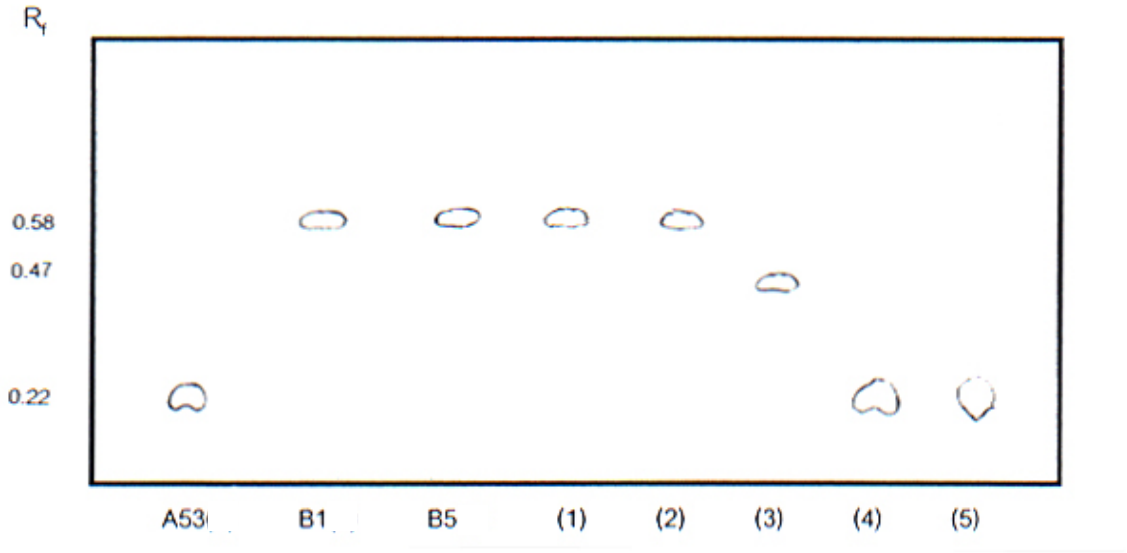


รูปที่ 3.26 **HPLC โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์** B5 **มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย** 0 – 100% **เอธิลอะซีเทตในเฮกเซน** (R_t 7.38 **นาทีคืออะซีแนพธิลีน**)

3.12.4 การตรวจสอบชนิดของสารเบื้องต้นโดยวิธี TLC

TLC เป็นวิธีตรวจสอบชนิดของสารเบื้องต้นวิธีหนึ่งโดยดูจากค่า R_f ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของสารแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับค่า R_f ของสารมาตรฐาน งานวิจัยนี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบค่า R_fบน TLC ของสารมัธยันต์ A53 B1 และ B5 กับสารอะโรมาติกที่มีรายงานว่าเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกชนิดอื่นๆ ได้แก่ อะซีแนพธีนควิโนน กรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก

กรดซาลิไซลิก กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก และ กรดโปรโตคาทีคูอิก ผลการทดลองได้แสดงในรูปที่ 3.27 และตารางที่ 3.2 พบว่าสารมัธยันต์ A53 ซึ่งเรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต มีค่า R_f เท่ากับ 0.22 เช่นเดียวกับกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ในขณะที่สารมัธยันต์ B1 และสารมัธยันต์ B5 เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัตราไวโอเลต และมีค่า R_f เท่ากับ 0.58 ซึ่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐานอะซีแนพธีนควิโนน และกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกที่เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัตราไวโอเลต และมีค่า R_f เท่ากับ 0.58 เช่นกัน



รูปที่ 3.27 TLC **โครมาโตแกรมของสารมัธยันต์** A53 B1 **และ** B5 **เปรียบเทียบกับ** (1) **อะซีแนพธีนควิโนน** (2) **กรดแนพธาลีน** 1,8-**ไดคาร์บอกซิลิก** (3) **กรดซาลิไซลิก** (4) **กรด** 2,5-**ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก** (5) **กรดโปรโตคาทีคูอิก**

ตารางที่ 3.2 ค่า R_f จากการวิเคราะห์ TLC และลักษณะการเรืองแสงของสารมัธยันต์ A53 B1 และ B5 ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215 –250 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานชนิดต่างๆ

สาร	การเรืองแสง	ค่า R_f
สารมัธยันต์ A53	ฟ้า	0.22
สารมัธยันต์ B1	ม่วง	0.58
สารมัธยันต์ B5	ม่วง	0.58
อะซีแนพธีนควิโนน	ม่วง	0.58
กรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก	ม่วง	0.58
กรดซาลิไซลิก	ม่วง	0.47
กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก	ฟ้า	0.22
กรดโปรโตคาทีคูอิก	ม่วงน้ำตาล	0.20

3.13 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี (MS) และ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

3.13.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ A53

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ A53 ด้วยวิธี MS และวิธี NMR จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี MS ได้แมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ A53 ดังแสดงในภาคผนวก ก รูปที่ ก1(ก) โดยมีค่า M^+ เท่ากับ 154 แสดงว่าสารนี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 154 และเมื่อเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ A53 กับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิสิก) ดังแสดงในรูปที่ ก1(ข.) พบว่ามีรูปแบบของแมสสเปกตรัมเหมือนกัน

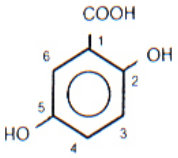
จากการพิสูจน์เอกลักษณ์สารมัธยันต์ A53 โดย NMR พบสัญญาณของ ^{1}H-NMR ที่

δ 7.15 (1 H, d, J = 4 Hz, H-6)

δ 6.95 (1 H, dd, J = 4, 9 Hz, H-4)

δ 6.76 (1 H, d, J = 9 Hz, H-3)

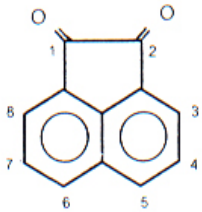
และ ^{13}C-NMR, δ 112.5, 114.5, 117.8, 123.7, 149.3, 154.1, 171.7 ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิสิก) ที่มีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 3.28



รูปที่ 3.28 โครงสร้างโมเลกุลของกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิสิก)

3.13.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ B1

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ B1(1) ด้วยวิธี MS พบว่าจากแมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ B1 ดังแสดงในภาคผนวก ก รูปที่ ก4 (ก) ได้ค่า M^+ เท่ากับ 182 แสดงว่าสารนี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 182 และเมื่อเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ B1 กับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานอะซีแนพธีนควิโนน ดังแสดงในรูปที่ ก4 (ข.) พบว่ามีรูปแบบของแมสสเปกตรัมเหมือนกัน แสดงว่าสารมัธยันต์ B1(1) คือ อะซีแนพธีนควิโนน ที่มีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 3.29



รูปที่ 3.29 โครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนพธีนควิโนน

3.13.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ B5

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ B5 ด้วยวิธี MS และวิธี NMR จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี MS ได้แมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ B5 ดังแสดงในภาคผนวก ก รูปที่ ก5(ก) โดยมีค่า M^+ เท่ากับ 198 แสดงว่าสารนี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 198 และเมื่อเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ B5 กับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานของ 1,8-แนพธาลิกแอนไฮไดรด์ ดังแสดงในรูปที่ ก5(ข.) พบว่ามีรูปแบบของแมสสเปกตรัมเหมือนกัน

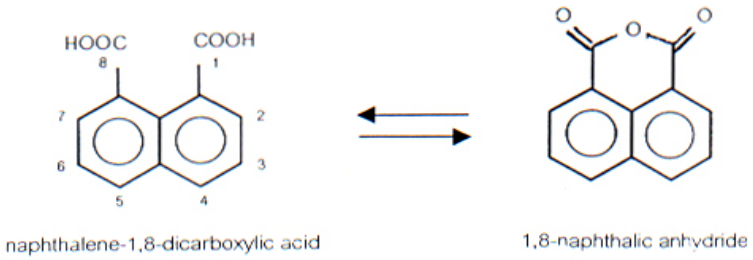
^{1}H-NMR ของสารมัธยันต์ B5 ให้สัญญาณดังนี้

δ 7.62 (2 H, dd, J = 7.3, 8.8 Hz, H-3, H-6)

δ 8.31 (2 H, d, J = 8.8 Hz, H-4, H-5)

δ 8.62 (2 H, d, J = 7.3 Hz, H-2, H-7)

ข้อมูลจากการวิเคราะห์สอดคล้องกับโครงสร้างของ 1,8-แนพธาลิกแอนไฮไดรด์ ซึ่งเป็นรูปที่สกัดได้ในสภาวะที่เป็นกรดของสารมัธยันต์ กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ที่มีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 3.30



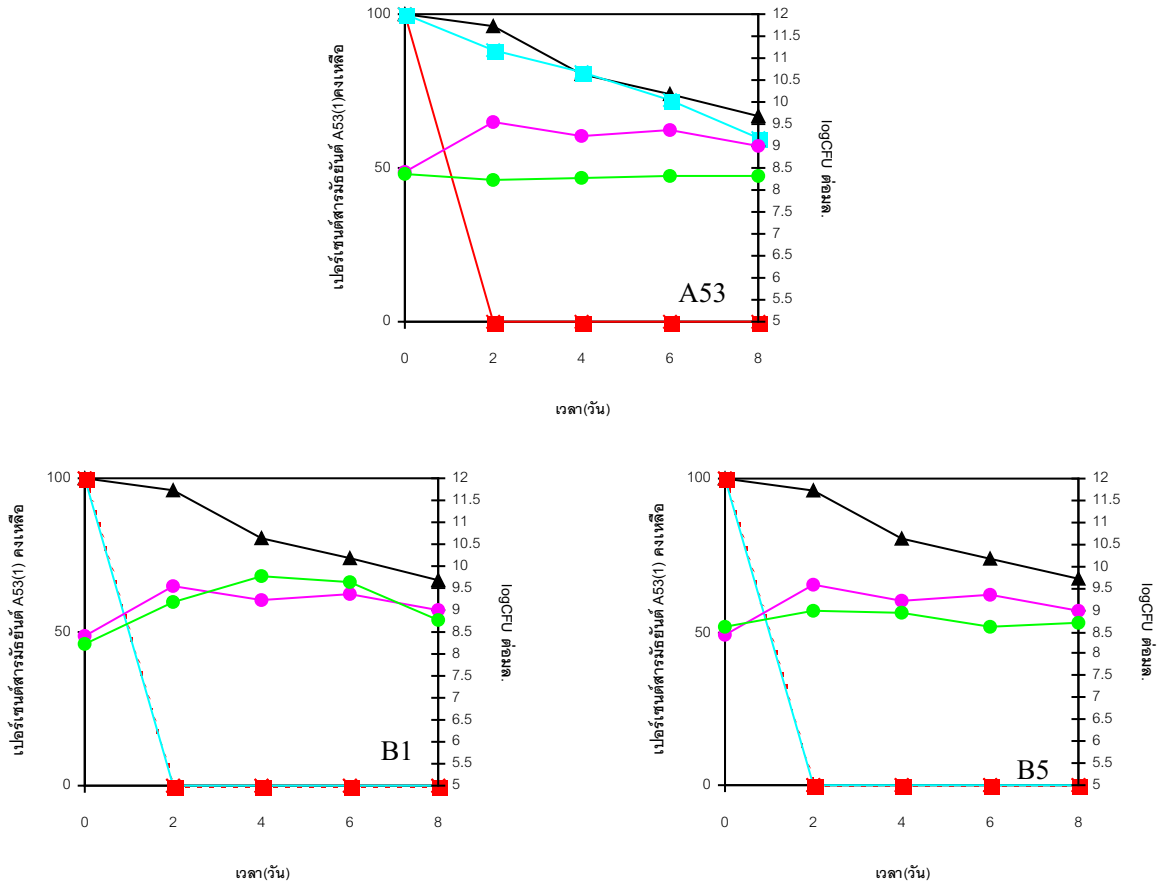
รูปที่ 3.30 **โครงสร้างโมเลกุลของ** 1,8-**แนพธาลิกแอนไฮไดรด์ และ กรดแนพธาลีน-**1,8-**ไดคาร์บอกซิลิก**

3.14 ผลของสารมัธยันต์ A53 B1 และ B5 ต่อการเจริญของสายพันธุ์กลายสายพันธุ์ต่าง ๆ ของ *Rhizobium* sp. CU-A1

งานวิจัยในขั้นตอนนี้จะทดสอบยืนยันว่า สายพันธุ์กลาย A53, B1 และ B5 ไม่สามารถใช้สารมัธยันต์ที่แต่ละเชื้อสะสมคือ A53 B1 และ B5 ตามลำดับเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ โดยทำการวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเชื้อและการลดลงของปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ให้ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1

3.14.1 สารมัธยันต์ A53 หรือกรด 2,5-ไดคาร์บอกซิลิก (กรดเจนทิสิก) เป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยง *Rhizobium* sp. CU-A1 และสายพันธุ์กลาย A53, B1 และ B5 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีสารมัธยันต์ A53 คือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร จากการเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายสารมัธยันต์ A53 พบว่า *Rhizobium* sp. CU-A1 และสายพันธุ์กลาย B1 และ B5 สามารถย่อยสลายกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกจนไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกที่เหลืออยู่ได้ภายในระยะเวลา 2 วัน ได้พร้อมกับมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในขณะที่สายพันธุ์กลาย A53 ไม่สามารถย่อยสลายกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกและไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 3.31 จึงยืนยันได้ว่ากรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก เป็นสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายของอะซีแนพธิลีนของสายพันธุ์กลายนี้จริง

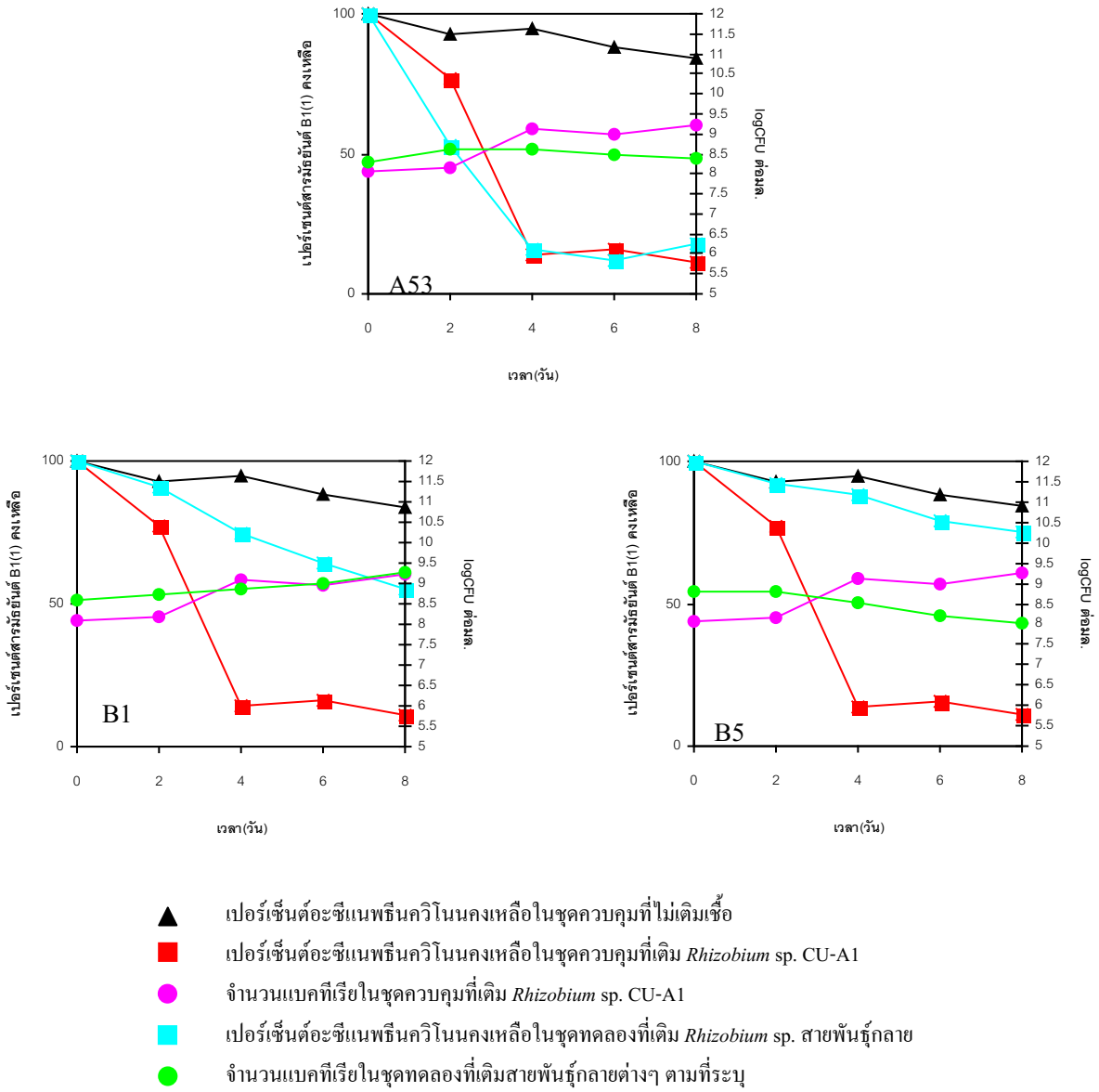


รูปที่ 3.31 **การเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย A53 B1 และ B5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีสารมัธยันต์ A53 หรือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ** *Rhizobium* sp. CU-A1

3.14.2 สารมัธยันต์ B1 หรืออะซีแนพธีนควิโนนเป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยง *Rhizobium* sp. CU-A1 และสายพันธุ์กลาย A53, B1 และ B5 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีสารมัธยันต์ B1 คืออะซีแนพธีนควิโนนความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร พบว่าแต่ละสายพันธุ์กลายมีรูปแบบการเจริญและความสามารถในการออกซิไดซ์อะซีแนพธีนควิโนนไปเป็นสารมัธยันต์อื่นๆ แตกต่างกันไปเมื่อเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 ดังผลการทดลองในรูปที่ 3.32 โดย *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยสามารถสลายอะซีแนพธีนควิโนนจนเหลือปริมาณต่ำกว่า 30% ของปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารที่ลดลง ในขณะที่สายพันธุ์กลาย A53 ก็สามารถออกซิไดซ์อะซีแนพธีนควิโนนจนเหลือปริมาณต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 4 เช่นเดียวกัน แต่มีการเจริญเพียงเล็กน้อย สายพันธุ์กลาย B5 พบปริมาณอะซีแนพธีนควิโนนคงเหลือมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นหลังการบ่มจนถึงวันที่ 8 อาจอธิบายได้ว่าปริมาณอะซีแนพธีนควิโนนคงเหลือที่วิเคราะห์ได้ อาจไม่ใช่อะซีแนพธีนควิโนน แต่เป็นแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกที่เกิดขึ้นทั้งนี้เพราะ ค่า R_t ของแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC คือ 2.61 ซึ่งเท่ากับอะซีแนพธีนควิโนน

สายพันธุ์กลาย B1 เป็นสายพันธุ์กลายที่สะสมอะซีแนพธีนควิโนนจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน เมื่อวิเคราะห์รูปแบบการเจริญพบว่าสามารถออกซิไดซ์อะซีแนพธีนควิโนนได้ปริมาณเล็กน้อย โดยคงเหลืออะซีแนพธีนควิโนนปริมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 8 และมีการเจริญเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์กลายอื่นๆ ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าอะซีแนพธีนควิโนนสามารถเกิดการแตกตัวไปเป็นกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกได้เองโดยปัจจัยทางกายภาพไม่ต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ (Selifonov และคณะ 1996) ดังนั้นในสายพันธุ์กลาย B1 อาจเกิดกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกที่ถูกเปลี่ยนจากอะซีแนพธีนควิโนนบางส่วนด้วยวิธีทางกายภาพ ทำให้ปริมาณอะซีแนพธีนควิโนนลดลงและกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกที่เกิดขึ้นนี้ เชื้อยังสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ จึงสามารถเห็นการเจริญของสายพันธุ์ B1 นอกจากนี้ การเจริญของสายพันธุ์ B1 ยังน้อยกว่าสายพันธุ์ CU-A1 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนอะซีแนพธีนควิโนนไปเป็นกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดยวิธีทางกายภาพเกิดได้น้อยกว่าเมื่อมีการเร่งของเอนไซม์ (Selifonov และคณะ 1996)



รูปที่ 3.32 **การเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย** A53 B1 **และ** B5 **ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** CFMM **ที่มีสารมัธยันต์** B1 **หรืออะซีแนพธีนควิโนนความเข้มข้น** 300 **มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ** *Rhizobium* sp. CU-A1

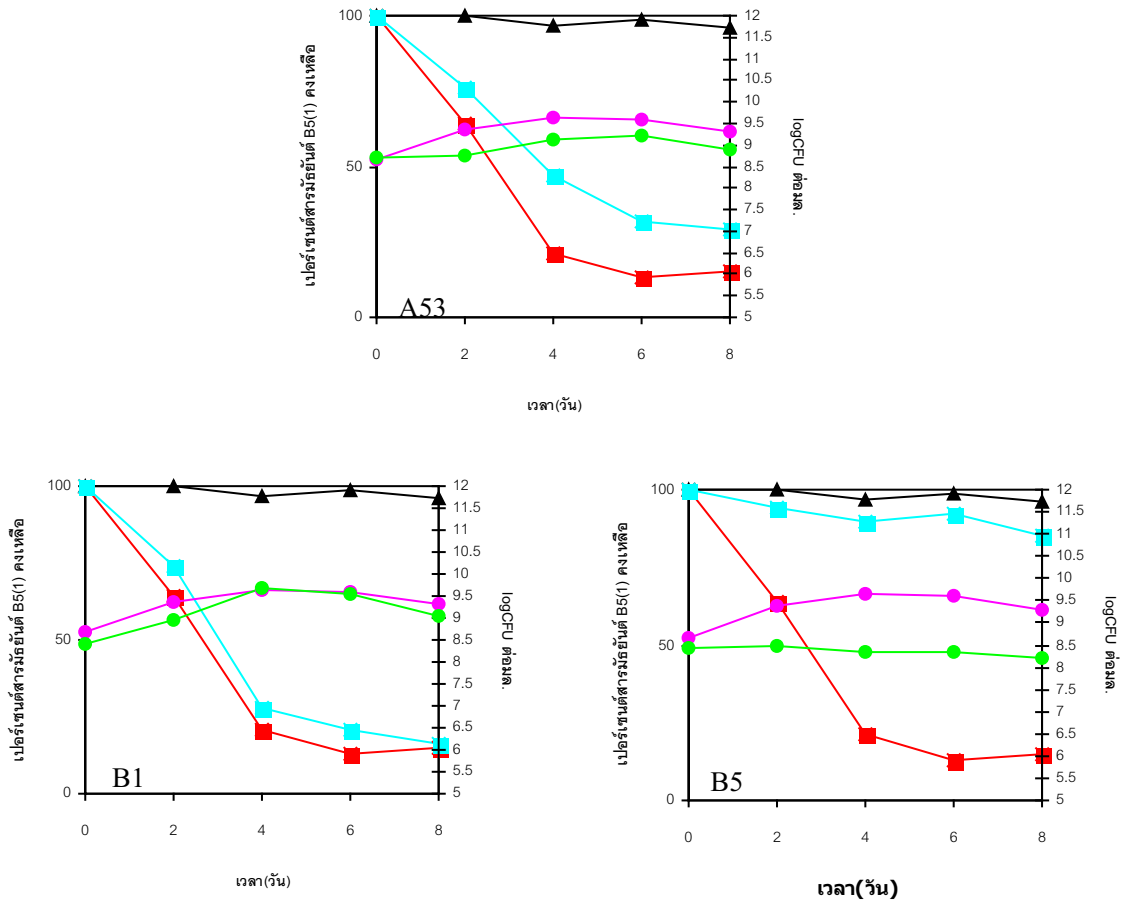
3.14.2 สารมัธยันต์ B5 หรือกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกเป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยง *Rhizobium* sp. CU-A1 และสายพันธุ์กลาย A53, B1 และ B5 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีสารมัธยันต์ B5 คือกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร พบว่าแต่ละสายพันธุ์กลายมีรูปแบบการเจริญและความสามารถในการออกซิไดซ์อะซีแนพธีนควิโนนไปเป็นสารมัธยันต์อื่นๆ แตกต่างกันไปเมื่อเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 ดังแสดงในรูปที่ 3.33

พบว่าสายพันธุ์กลาย B1 มีรูปแบบในการลดปริมาณของสารมัธยันต์นี้คล้ายคลึงกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยสามารถใช้กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกจนเหลือปริมาณต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของ

ปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารที่ลดลง สายพันธุ์กลาย A53 สามารถออกซิไดซ์กรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกจนเหลือปริมาณต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 8 แต่มีการเจริญเพิ่มจำนวนเพียงเล็กน้อย

สำหรับสายพันธุ์กลาย B5 ไม่สามารถย่อยสลายกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกได้เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 และไม่สามารถกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ แสดงว่าสายพันธุ์กลาย B5 มีความบกพร่องในการย่อยสลายกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งยืนยันว่าเป็นสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายของอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์กลายนี้จริง



▲ เปอร์เซ็นต์กรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกคงเหลือในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ

■ เปอร์เซ็นต์กรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกคงเหลือในชุดควบคุมที่เติม *Rhizobium* sp. CU-A1

● จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่เติม *Rhizobium* sp. CU-A1

■ เปอร์เซ็นต์กรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกคงเหลือในชุดทดลองที่เติม *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลาย

● จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมสายพันธุ์กลายต่างๆ ตามที่ระบุ

รูปที่ 3.33 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย A53 B1 และ B5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีสารมัธยันต์ B5 หรือกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การกลายพันธุ์โดยใช้ทรานสโปซอน Tn5

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะศึกษาสารมัธยันต์จากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน และยีนที่เกี่ยวข้องใน Rhizobium sp. CU-A1 โดยเริ่มจากกลายพันธุ์สายพันธุ์ CU-A1 โดยใช้ Transposon Tn5 ด้วยวิธีคอนจูเกชัน ซึ่งทำให้ได้ทรานสคอนจูแกนท์จำนวน 15730 โคลน จากการตรวจสอบการแทรกสอดของ Tn5 พบว่า Tn5 สามารถแทรกสอดเข้าสู่ดีเอ็นเอของ Rhizobium sp. CU-A1 แบบสุ่ม นำทรานสคอนจูแกนท์ทั้งหมดไปตรวจสอบหาสายพันธุ์กลายที่บกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ได้สายพันธุ์กลายรวมทั้งสิ้น 18 สายพันธุ์

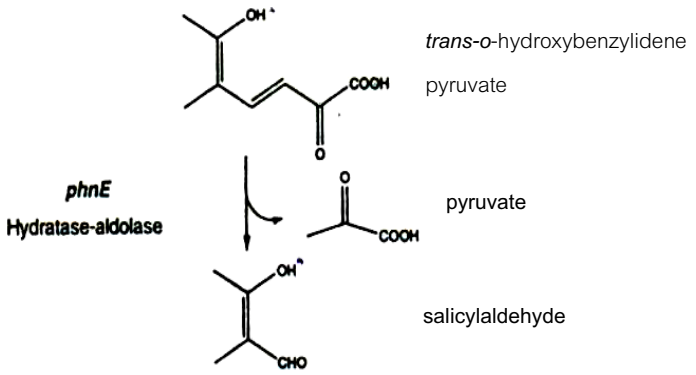
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

เมื่อนำสายพันธุ์กลายมาไฮบริไดซ์ด้วย Tn5-probe พบว่าสายพันธุ์กลายที่ทดสอบมีชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณมีขนาดแตกต่างกัน จึงได้สุ่มเลือกสายพันธุ์กลาย E11 ที่ให้สัญญาณประมาณ 9.4 kb เพื่อโคลนเข้าในเวกเตอร์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอด โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่มีลำดับจำเพาะกับ Tn5 และทิศทาง 5'→3' ออกจาก Tn5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ติดกับ Tn5 คล้ายคลึงกับดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไฮดราเทส-อัลโดเลสใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (ความเหมือนเท่ากับ 38%) ซึ่งเอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการตัดกิ่งคาร์บอนของ *trans-o*-hydroxybenzylidene-pyruvic acid (tHBPA) ได้เป็น salicylaldehyde ในวิถีการย่อยสลายแนพธาลีน (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ดังนั้น จึงทำ AE-Probe จากชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ เพื่อใช้หาดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในสายพันธุ์ CU-A1 ต่อไป ได้โคลนชิ้น 4.5 kb *Bam*HI-*Hin*dIII เข้าในเวกเตอร์ได้เป็นพลาสมิด pWT หาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของชิ้นแทรกสอดนี้ พบว่าชิ้นแทรกสอดมีขนาด 4574 bp นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดดังกล่าวไปเทียบความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.1 จากข้อมูลความเหมือนในระดับกรดอะมิโนที่ได้จากโปรแกรม BlastX และการหาตำแหน่งจุดเริ่มต้นและสิ้นสุดการถอดรหัสเป็นโปรตีน รวมถึงตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (ribosome binding site, RBS) อาจสามารถระบุกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ได้จำนวน 5 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน (รูปที่ 4.1) ดังนี้

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์กล่าวคือยังไม่สามารถพบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ putative ferredoxin reductase ที่ประมวลรหัสโดยยีน *mocF* ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Bahar *et al*., 1998) เท่ากับ 33% พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับฟลาวิน (flavin) ภายในโมเลกุลของ FAD ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 33-43 ของ ORF1 โดยบริเวณดังกล่าวประกอบด้วยกรดอะมิโน TVAGANAAGGD คล้ายกับรายงานที่เสนอโดย Eggink *et al*. (1990) ซึ่งลำดับกรดอะมิ

โนเป็น TX_6AXGD (X หมายถึง กรดอะมิโนตัวใดๆ) putative ferredoxin reductase ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* เป็นองค์ประกอบหนึ่งของระบบเอนไซม์ออกซิจีเนส (oxygenase system) เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารไรโซพีน (rhizopines) ซึ่งไรโซพีนเป็นสารประกอบประเภท inositol ที่สร้างโดย bacteroid ในรากพืช (Bahar *et al*., 1998) โดยเอนไซม์ออกซิจีเนสนี้ใน *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร PAHs

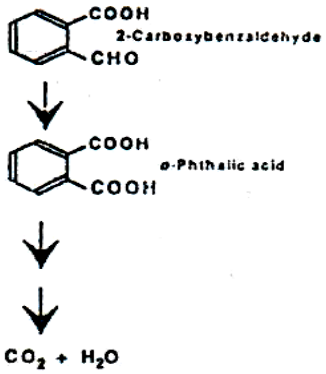
กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) หรือยีน *acnE* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับไฮดราเทส-อัลโดเลส ที่ประมวลรหัสโดยยีน *phnE* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เท่ากับ 38% เอนไซม์ไฮดราเทส-อัลโดเลสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ทำหน้าที่ในการตัดกิ่งคาร์บอนของ *trans-o*-hydroxybenzylidene-pyruvic acid (tHBPA) ได้เป็น salicylaldehyde ในวิถีการย่อยสลายแนพธาลีน และทำงานในลักษณะเดียวกันในวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีน (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 5.1



รูปที่ 4.2 **การเร่งปฏิกิริยาของไฮดราเทส-อัลโดเลสใน** *Burkholderia* sp. **สายพันธุ์** RP007 (Laurie **และ** Lloyd-Jones, 1999)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) หรือยีน *acnK* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ประมวลรหัสโดยยีน *phdK* ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) เท่ากับ 46% พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับ NAD^+ ของ aldehyde dehydrogenase superfamily (F/Y)(I/T)G(S/E)(T/P)XX(G/F) (Horn *et al*., 1991) ในลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 226-233 ของ ORF3 ซึ่งประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนดังนี้ FIGSAATG และยังพบว่าตำแหน่งของบริเวณอนุรักษ์นี้มีความใกล้เคียงกับบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 227-234 (FIGSTDTG) ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) นอกจากนี้ยังพบบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 250-257 ของ ORF3 โดยประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนดังนี้ LELGGKNP ซึ่งคล้ายกับบริเวณเร่ง (active site) ของอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ AN10 (Bosch *et al*., 1999) ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าวเป็น LELGGKSP 2-คาร์

บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ให้เป็น กรด *o*-phthalic ในวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีน (Iwabuchi และ Harayama, 1997) ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 **การเร่งปฏิกิริยาของ** 2-**คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนของ** *Nocardioides* sp. **สายพันธุ์** KP7 (Iwabuchi **และ** Harayama, 1997)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 (ORF4) อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดที่ต่างจาก ORF1-3 และ 5 ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับโปรตีนที่คล้ายกับ adducin ที่ประมวลรหัสโดยยีนในจีโนมของ *Mesorhizobium loti* (Kaneko *et al*., 2000) เท่ากับ 38% ปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่การทำงานของโปรตีนที่คล้ายกับ adducin ที่แน่นอน

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 (ORF5) เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือยังไม่สามารถพบรหัสหยุดการแปลรหัส (stop codon) ที่ตำแหน่งสุดท้ายของ ORF ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ short-chain dehydrogenase ที่ประมวลรหัสโดยยีน *yigI* ของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01 (Stover *et al*., 2000) เท่ากับ 43% short-chain dehydrogenase ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ร่วมในกระบวนการ β-oxidation ในสายพันธุ์ PA01 ซึ่งกระบวนการ β-oxidation นี้ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs

เมื่อพิจารณาความเกี่ยวข้องของ ORF กับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนพบว่า ORF1 ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (putative ferredoxin reductase) เนื่องจากพบบริเวณอนุรักษ์ในการจับกับฟลาวินภายในโมเลกุลของ FAD ของเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส โดยลำดับกรดอะมิโนของ ORF1 มีความเหมือนกับ putative ferredoxin reductase ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. v*iciae* ที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของระบบเอนไซม์ออกซิจีเนส เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารไรโซพีน (rhizopines) ซึ่งไม่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน แต่ ORF1 นั้นเป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์การเปรียบเทียบความเหมือนกับกรดอะมิโนของโปรตีนใน GenBank อาจเป็นการเปรียบเทียบเพียงบางส่วนกับฐานข้อมูล สำหรับการย่อยสลาย PAHs ทั่วไปนั้นต้องการไดออกซิจีเนสเป็นเอนไซม์เริ่มต้นในปฏิกิริยาการย่อยสลาย (Ensley *et al*., 1982; Ensley & Gibson, 1983) ไดออกซิจีเนส

ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ได้แก่ เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส เฟอร์รีดอกซิน ISP large subunit (α_2) และ small subunit (β_2) (Ensley *et al*., 1982) ซึ่งเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสเป็นหน่วยหนึ่งที่สำคัญต่อการทำงานของไดออกซิจีเนส แต่พบรายงานได้กล่าวว่าเชื้อบางสายพันธุ์ที่ย่อยสลาย PAHs ขาดส่วนที่เป็นเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสไปแต่การทำงานของไดออกซิจีเนสยังคงปกติเนื่องจากการทดแทนการทำงานของเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสที่ไม่จำเพาะต่อปฏิกิริยาในเซลล์เจ้าบ้าน (Simon *et al*., 1993) ดังนั้นในกรณี ORF1 อาจเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน แต่การสรุปชัดเจนขึ้นเมื่อมีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ครบถ้วน หรือศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญในอะซีแนพธิลีนและการแสดงออกหรือการทำหน้าที่ของยีน

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนต่อไปคือ ORF2 และ ORF3 หรือยีน *acnE* และ *acnK* ซึ่งถอดรหัสเป็น hydratase-aldolase และ aldehyde dehydrogenase ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดยังพบว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs อื่นๆ ดังที่ได้แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ hydratase-aldolase และ aldehyde dehydrogenase

จุลชีพ	hydratase-aldolase	aldehyde dehydrogenase	ย่อยสลาย	เอกสารอ้างอิง
Rhizobium sp. CU-A1	*acnE*	*acnK*	อะซีแนพธิลีน	งานวิจัยนี้
Pseudomonas putida G7	*nahE*	*nahF*	แนพธาลีน	Simon *et al*., 1993
Burkholderia sp. RP007	*phnE*	*phnF*	ฟีแนนทรีน	Laurie และ Lloyd-Jones, 1999
Nocardioides sp. KP7	*phdJ*	*phdK*	ฟีแนนทรีน	Iwabuchi และ Harayama, 1997

เมื่อพิจารณาการจัดเรียงตัวของ *acnEK* พบว่ายีนทั้งสองมีการจัดเรียงตัวแตกต่างจากยีนในกลุ่ม *nah* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีน (Simon *et al*., 1993) ซึ่งเป็นยีนกลุ่มที่ค่อนข้างมีการอนุรักษ์อย่างสูง ยีนกลุ่มคล้าย *nah* จัดเรียงตัวเป็นโอเปอรอน *nahAaAbAcAdBFCQED* โดย *nahF* ถอดรหัสเป็น aldehyde dehydrogenase และ *nahE* ถอดรหัสเป็น hydratase-aldolase ซึ่งระหว่าง 2 ยีนดังกล่าวมียีนอื่นคั่นและลำดับของยีนสลับที่กัน

เมื่อเทียบการจัดเรียงตัวกับยีนใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ซึ่งมีความคล้ายกรดอะมิโนของ ORF2 หรือยีน *acnE* มากที่สุด พบว่าการจัดเรียงตัวของยีน *acnEK* มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ RP007 ซึ่งยีน *phnF* ที่ถอดรหัสเป็นอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสของสายพันธุ์ RP007 อยู่ติดกับยีน *phnE* ที่ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ไฮดราเทส-อัลโดเลส (*phnFE*) ภายในโอเปอรอนเดียวกัน

การจัดเรียงตัวของยีนของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) ซึ่งประมวลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่คล้ายกับกรดอะมิโนจาก ORF3 หรือยีน *acnK* มากที่สุด พบว่าการจัดเรียงตัวของยีน *acnEK* ยังคงมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ KP7 โดยยีน phdK ที่ถอดรหัสเป็น 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส อยู่ใกล้ยีน *phdJ* ที่ถอดรหัสเป็น ทรานส-คาร์บอกซีเบนซอลไพรูเวตอัลโดเลส มากที่สุดแต่มี ORF อื่นคั่น (phdJ, ORF1, phdK)

ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าการจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 นี้อาจจะไม่อยู่รวมเป็น cluster เหมือนยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ส่วนใหญ่ (Simon *et al*., 1993; Denome *et al*., 1993; Takizawa *et al*., 1994) โดยมี ORF4 ซึ่งลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับโปรตีนที่คล้ายกับ adducin ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs แทรกอยู่ระหว่าง ORF2 และ ORF3 และ ORF5 ที่ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ short-chain dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์หนึ่งที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ดังที่ได้เคยมีรายงานมา โดยรายงานไม่ได้กล่าวถึงหน้าที่การทำงานในปฏิกิริยาการย่อยสลาย PAHs ที่แน่ชัด (Denome *et al*., 1993) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs อาจไม่อยู่รวมเป็น cluster ได้ เช่นยีนประมวลรหัส 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส จาก *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีน มีดีเอ็นเอแทรกอยู่ ซึ่งมีขนาด 1,455 bp ประกอบด้วย 7 Open Reading Frames (ORFs) มีส่วนที่เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนทั้งหมด 3 ยีน และ อีก 4 ORFs ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีน (Iwabuchi และ Harayama, 1997)

นอกจากนี้ Romine *et al.* (1999) พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอะโรมาติกหลายชนิดจาก *Sphingomonas aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 ได้แก่ ไบฟีนิล แนพธาลีน เมตา-ไซลีน พารา-ครีซอล และพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนที่พบในเชื้อสายพันธุ์นี้ ได้แก่ ยีน *nahE nahD* และ *nahF* มีการกระจายตัวอยู่ห่างๆกันและถูกคั่นด้วยยีนจากวิถีการย่อยสลายสารอื่น

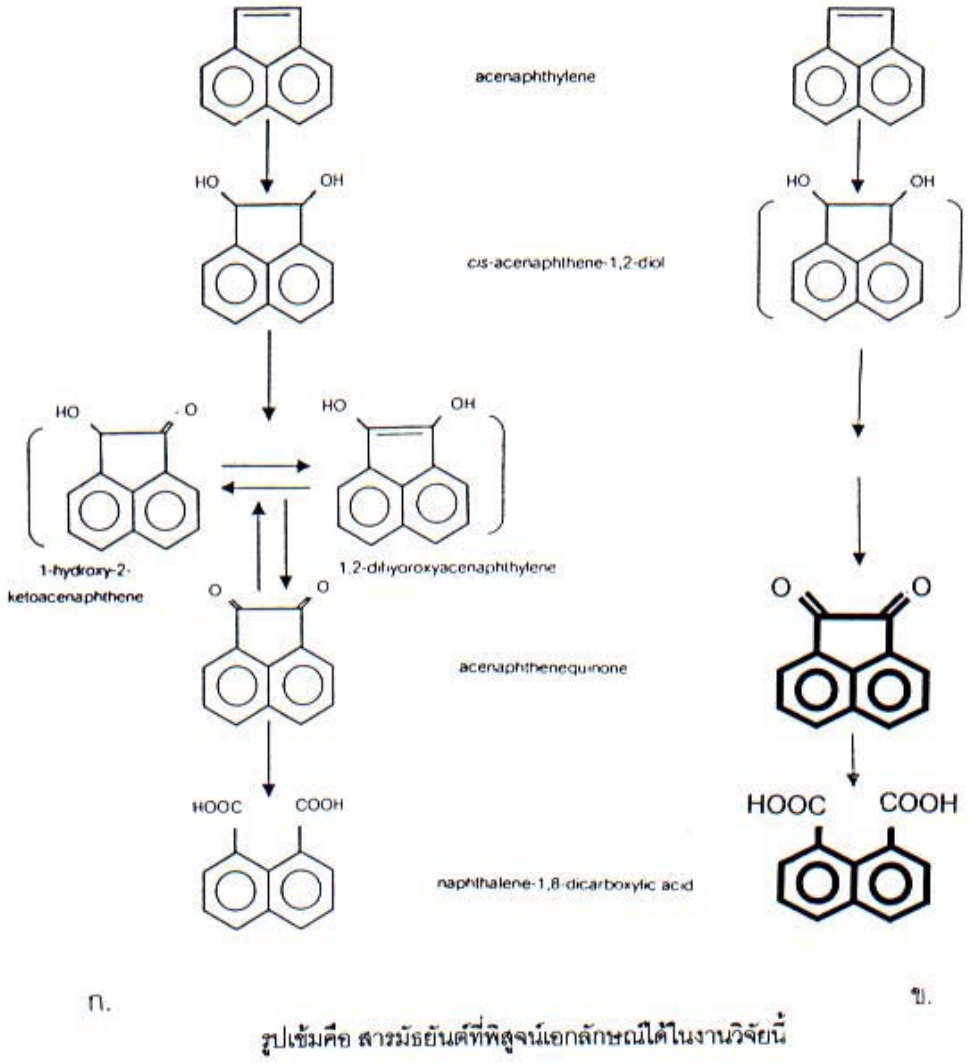
งานวิจัยนี้จึงเป็นงานแรกที่ได้กล่าวถึงยีน *acnE* และ *acnK* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* โดยแสดงให้เห็นว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 มียีน ดังกล่าวแตกต่างจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs อื่นตามที่ได้เคยมีรายงานมาแล้ว ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน และการจัดเรียงตัวของยีน โดยยีนอาจจะกระจัดกระจายไม่อยู่รวมกับเป็น cluster แต่การสรุปจะชัดเจนยิ่งขึ้นถ้าทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนต่อจากชิ้นดีเอ็นเอในพลาสมิด pWT ทั้งในส่วนต้นและปลายเพิ่มเติมเพื่อตรวจหายีนอื่นที่เหลือเพื่อการระบุตำแหน่ง การจัดเรียงตัวของยีนที่ชัดเจนขึ้น นอกจากนี้ศึกษาการทำหน้าที่ของยีนที่แยกได้นี้ จะเป็นการยืนยันที่ชัดเจนยิ่งขึ้นว่ายีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจริง

สารมัธยันต์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

ผลการทำสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี พบว่าสายพันธุ์กลาย A53 สะสมกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิสิก), สายพันธุ์กลาย B1 สะสมอะซีแนพธีนควิโนน และสายพันธุ์กลาย B5 สะสมกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก จากผลการวิเคราะห์สารมัธยันต์สามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อ A53, B1 และ B5 กับการสะสมสารมัธยันต์ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละเชื้อ โดย A53 เจริญได้ในอาหารที่มีอะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 3.11 ก.) เนื่องจากสลายวงเบนซีนของอะซีแนพธิลีนจนถึงกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ในขณะที่ B1 และ B5 เจริญไม่ได้ (รูปที่ 3.11 ข.) เนื่อง

จากเปลี่ยนอะซีแนพธิลีนไปถึงเพียงอะซีแนพธีนควิโนน และ กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก เท่านั้น ไม่มีการแตกของวงเบนซีนจึงไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้

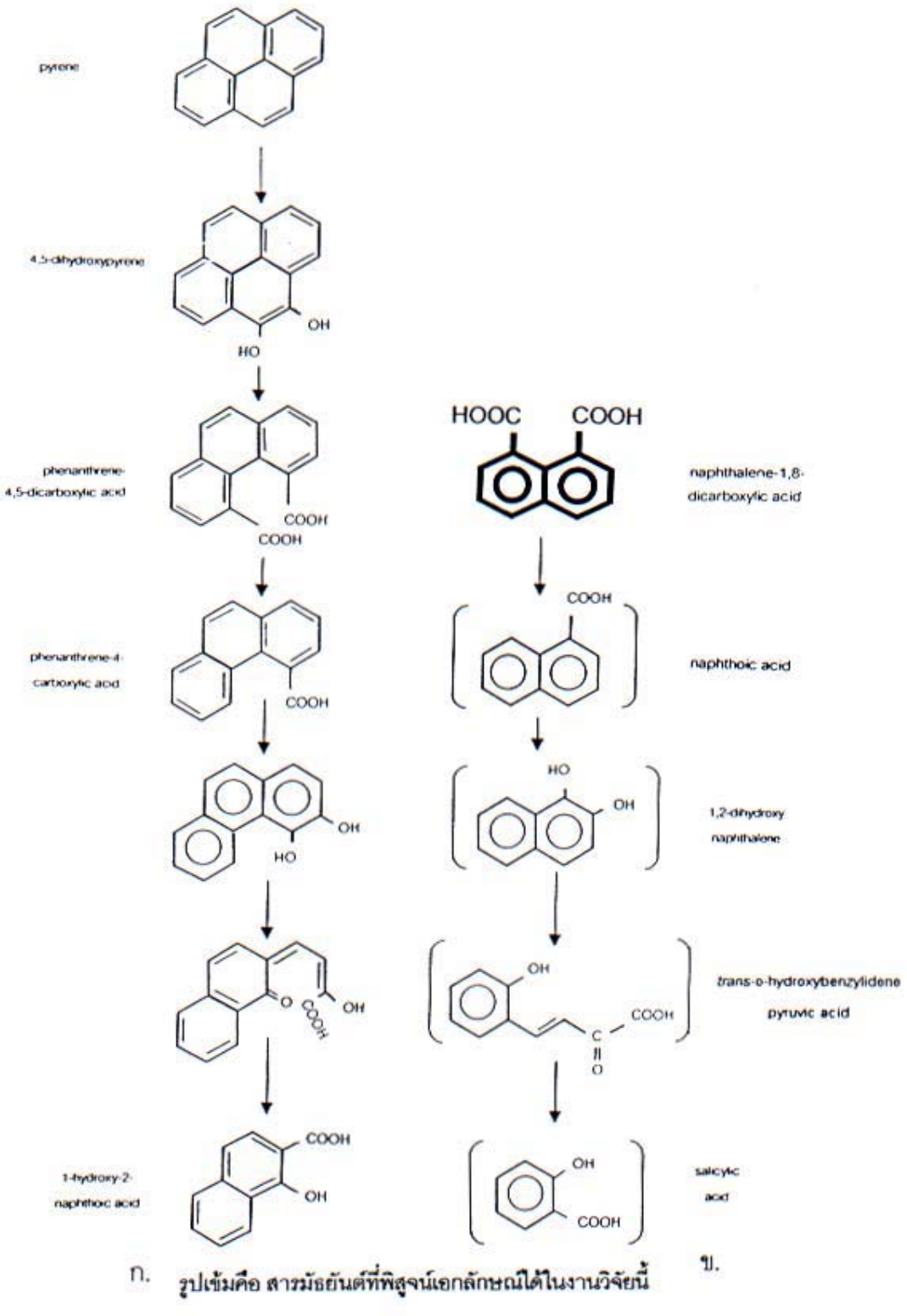
จากรายงานการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Selifenov *et al*., 1996) พบว่าอะซีแนพธิลีนจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็น *ซิส*-1,2-อะซีแนพธีนไดออล, อะซีแนพธีนควิโนน และกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ ในงานวิจัยนี้พบอะซีแนพธีนควิโนน และกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกเป็นสารมัธยันต์ที่พบสะสมจากสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 แสดงว่า *Rhizobium* sp. CU-A1 น่าจะมีวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนมาเป็นกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก เช่นเดียวกันกับใน *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ดังแสดงในรูปที่ 4.4



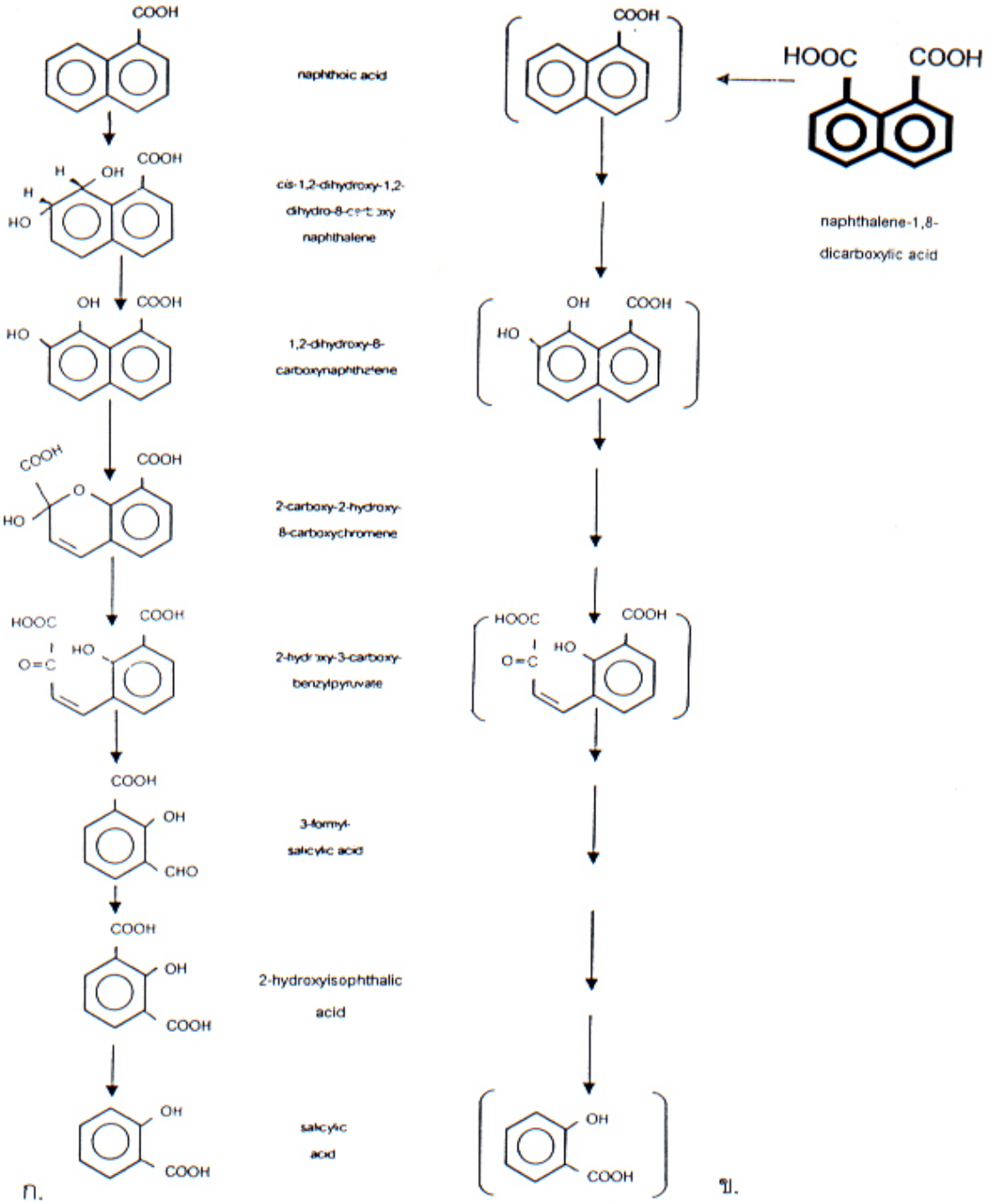
รูปที่ 4.4 **วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนเป็นกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดย** *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Selifenov *et al*., 1996) (ก.) **และวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย** *Rhizobium* sp. CU-A1 **ที่เสนอในงานวิจัยนี้**

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ในงานวิจัยนี้ตรวจพบสายพันธุ์กลายที่สะสม กรด-2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก หรือกรดเจนทิสิก ซึ่งพบว่าเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสาร PAHs หลายชนิด (Starovoitov, 1975 และ Grifoll *et al.*, 1995) ซึ่งแสดงว่า *Rhizobium* sp. CU-A1 สามารถย่อยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกมาเป็นกรดเจนทิสิกได้ ซึ่งน่าจะเกิดขึ้นโดยวิถีที่เสนอดังนี้

กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกอาจถูกย่อยสลายคล้ายกันกรดฟีแนนทรีน-4,5-ไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium* sp. AP1 (Vila *et al.*, 2001) และ *Mycobacterium* sp. PYR-1 (Young *et al.*, 1995) ซึ่งมีสารประกอบดังกล่าวมีโครงสร้างที่มีหมู่คาร์บอกซิลบนวงอะโรมาติกเบนซีน 2 หมู่ คล้ายคลึงกับกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด จะออกซิไดซ์กรดฟีแนนทรีน-4,5-ไดคาร์บอกซิลิกไปเป็นกรดฟีแนนทรีน-4-คาร์บอกซิลิกโดยดึงหมู่คาร์บอกซิลบนวงเบนซีนออก 1 หมู่ และหลังจากนั้นจะเกิดการเติมออกซิเจนบนวงเบนซีนที่มีหมู่คาร์บอกซิลอยู่เพื่อแตกวงต่อไป ในทำนองเดียวกันกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกอาจจะถูกตัดหมู่คาร์บอกซิลบนวงเบนซีนออก 1 หมู่ ทำให้เกิดเป็นกรดแนพโธอิก และเกิดการเติมออกซิเจน 2 อะตอมบนวงเบนซีนที่มีหมู่คาร์บอกซิลของกรดแนพโธอิกเพื่อแตกวงต่อไป เช่นเดียวกับวิถีการย่อยสลายไพรีน ดังแสดงในรูปที่ 4.5 หรือกรดแนพโธอิกจะถูกเติมออกซิเจน 2 อะตอมบนวงเบนซีนที่ไม่มีหมู่คาร์บอกซิลเกิดเป็น 1,2-ไดไฮ ดรอกซี-8-คาร์บอกซีแนพธาลีน เหมือนเช่นวิถีการย่อยสลายกรดแนพโธอิกของ *Pseudomonas maltophilia* CSV89 (Phale *et al.*, 1995) ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ซึ่งทั้ง 2 วิถีจะเปลี่ยนกรดแนพโธอิกไปเป็นกรดซาลิไซลิกเช่นเดียวกัน



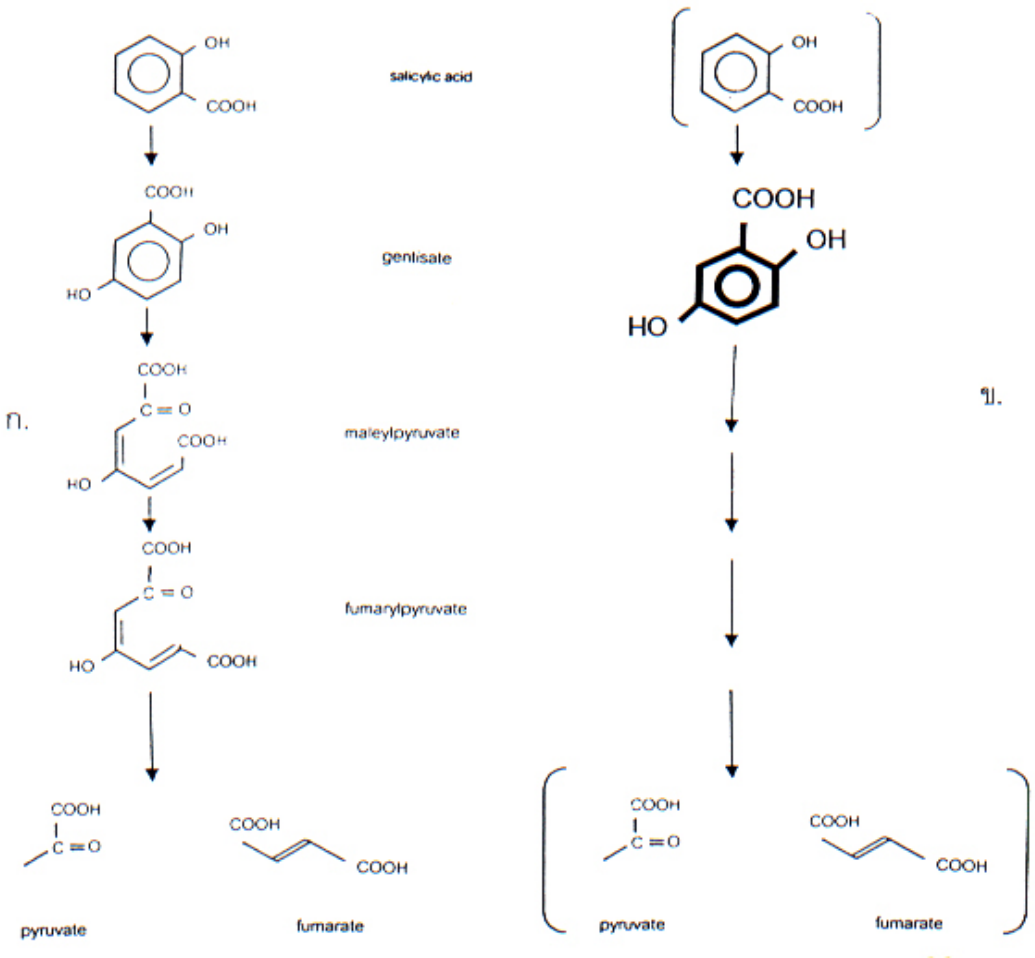
รูปที่ 4.5 **วิถีการย่อยสลายไพรีนโดย** *Mycobacterium* sp. AP1 (Vila *et al.*, 2001) **(ก.) และไดอะแกรมเสนอวิถีการย่อยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดย** *Rhizobium* sp. CU-A1 **(ข.)**



รูปเข้มคือ สารมัธยันต์ที่พิสูจน์เอกลักษณ์ได้ในงานวิจัยนี้

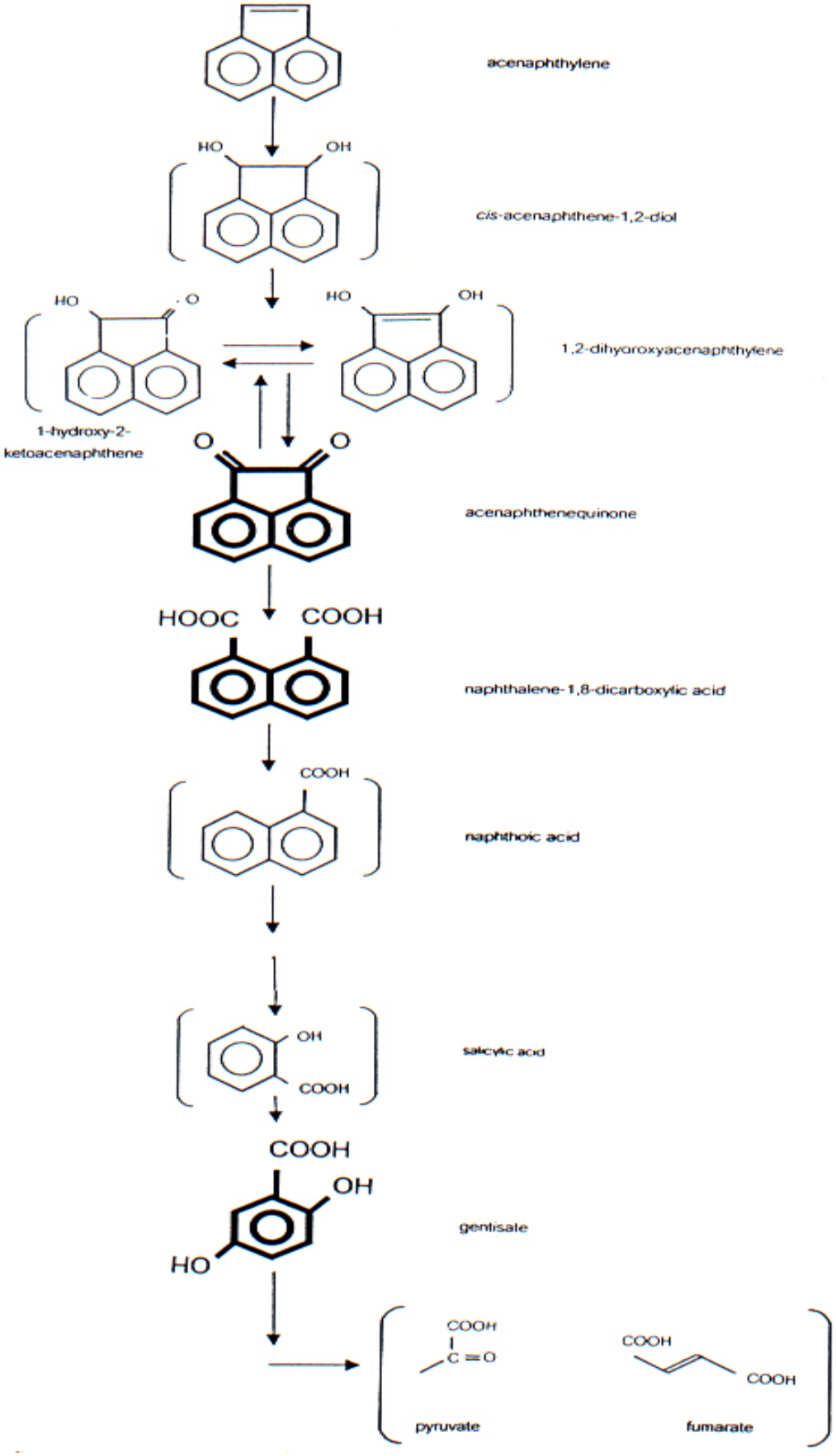
รูปที่ 4.6 **วิถีการย่อยสลายกรดแนพโธอิกโดย** *Pseudomonas maltophilia* CSV89 (Phale *et al.*, 1995) **(ก.) และไดอะแกรมเสนอวิถีการย่อยสลายกรดแนพธาลีน-**1,8-**ไดคาร์บอกซิลิกโดย** *Rhizobium* sp. **สายพันธุ์** CU-A1 **(ข.)**

หลังจากนั้นกรดซาลิไซลิกจะเปลี่ยนเป็นกรดเจนทิสิก (Fuenmayor *et al.*, 1998) และเปลี่ยนเป็นมาริลไพรูเวท, ฟูมาริลไพรูเวท และไพรูเวทกับฟูมาเรท ตามลำดับ (Ning *et al.*, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 5.4 เพื่อเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป



รูปที่ 4.7 **วิถีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิก** (Fuenmayor *et al.*, 1998) **และกรดเจนทิสิก** (Ning *et al.*, 2001) **(ก.) และไดอะแกรมเสนอวิถีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกโดย** *Rhizobium* sp. CU-A1 **(ข.)**

โดยสรุปแล้ว ผลจากการพบสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน 3 ชนิดคือ อะซีแนพธีนควิโนน, กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก สามารถทำนายวิถีเมตาบอลิสมเบื้องต้นของอะซีแนะธิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 ได้ ดังนี้คือ อะซีแนพธิลีนจะถูกเมตาบอไลท์ไปเป็น อะซีแนพธีนควิโนน, กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ซึ่งสารมัธยันต์ในวงเล็บเป็นสารมัธยันต์ที่ยังไม่สามารถสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอนได้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งจะต้องหาสายพันธุ์กลายที่สะสมสารมัธยันต์ต่างๆ เพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.8 **ไดอะแกรมเสนอวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย** *Rhizobium* sp. CU-A1

เอกสารอ้างอิง

บุญยงค์ โล่ห์วงศ์วัฒน. 2540. อย่าทิ้งขยะอันตราย. วารสารโรงงาน. ปีที่ 15. ฉบับที่ 1. ตุลาคม 2539-มกราคม 2540.

พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535.

สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน. 2542. การกำจัดสารพิษอันตรายจากโรงงานอุตสาหกรรม. เอกสารประกอบการศึกษา เผยแพร่โดยสำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน กรมโรงงานอุตสาหกรรม.

Alexander, R., Kagi, R. I., Rowland, S. J. Sheppard, P. N., and Chirila, T. V. 1985. The effects of thermal maturity on distribution of dimethylnaphthalenes and trimethylnaphthalenes in some ancient sediments and petroleums. Geochem. Cosmochim. 49: 385-395.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1999. Current Protocols in Molecular Biology. 4th ed. New York: John Wiley & Sons.

Bahar, M., de Majnik, J., Wexler, M., Fry, J., Poole, P. S., and Murphy, P. J. 1998. A model for the catabolism of rhizopine in *Rhizobium leguminosarum* involves a ferredoxin oxygenase complex and the inositol degradation pathway. Mol. Plant Microbe Interact. 11(11): 1057-1068.

Bosch, R., Garcia-Valdes, E., and Moore, E. R. B. 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. Gene. 236: 149-157.

Calder, J.A. and Lader, J.H. 1996. Effect of dissolved aromatic hydrocarbons on the growth of marine bacteria in batch culture. Appl. Environ. Microbiol. 32(1):95-101.

Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.

Cockson, J. T. 1995. Application of biological processes. In Bioremediation enginerring design and application. p. 9., Cockson, J. T. (ed.). McGraw-Hill, Inc. USA.

Denome, S. A., Stanley, D. C., Olson, E. S., and Young, K. D. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. J. Bacteriol. 175: 6890-6901.

Eggink, G., Engel, H., Vriend, G., Terpstra, P., and Witholt, B. 1990. Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*: structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. J. Mol. Biol. 212: 135-142.

Ensley, B. D., and Gibson, D. T. 1983. Naphthalene dioxygenase: Purification and properties of a terminal oxygenase component. J. Bacteriol. 155: 505-511.

Ensley, B. D., Gibson, D. T. and Laborde, A. L. 1982. Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from *Peudomonas* sp. strain NCIB 9816. J. Bacteriol. 149: 948-954.

Ensley, B. D., Ratzkin, B. J., Osslund, T. D., Simon, M. J., Wackett, L. P., and Gibson, D. T. 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. Science. 222: 167-169.

Fernandez, P. M., Grifoll, A. M., Solanas, J. M., Bayona, and J., AlBaiges. 1992. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. Environ. Sci. Technol. 26: 817-829.

Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyes, A. L., and Williams, P. A. 1998. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. J. Bacteriol. 180: 2522-2530.

Grifoll, M., Selifenov, S. A., Galtin, C. V., and Chapman, P. J. 1995. Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.

Horn, J. M., Harayama, S., and Timmis, K. N. 1991. DNA sequence determination of the TOL plasmid (pWWO) *xylGFJ* genes of *Pseudomonas putida*: implications for the evolution of aromatic catabolism. Mol. Microbiol. 5: 2459-2474.

Iwabuchi, T., and Harayama, S. 1997. Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. strain KP7. J. Bacteriol. 179(20): 6488-6494.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., and Tabata, S. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res. 7(6): 331-8.

Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H., Kodama, T., and Omori, T. 1997. Cloning and characterization of the genes involved in the degradation of dibenzofuran by *Terrabacter* sp. strain DBF63. J. Ferment. Bioeng. 84(5): 387-399.

Komatsu, T, Omori, T., and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. Biosci. Biotech. Biochem. 57(5): 864-865.

Laurie, A. D., and Lloyd-Jones, G. 1999. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. J. Bacteriol. 181(2): 531-540.

LaVoie, E. J. and Rice, J. E. 1988. Structure-activity relationships among tricyclic polynuclear aromatic hydrocarbons. In: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis: Structure-Activity Relationships. pp. 151-156. vol. 1. Yang, S. K., and Silverman, B. D. (eds.). (n.p.): CRC Press.

Lederer, W. H. 1985. Acenaphthylene. In: Regulatory Chemicals of Health and Environmental Concern. p.1. Lederer, W. H. (ed.). (n.p.): Van Nostrand Reinhold Company.

Lee, S., and Cutright, T. J. 1996. Nutrient medium for the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils. Environ. Sci. Technol. 14: 1524-1528.

Manahan, S. E. 1993. Reduction, Treatment, and Disposal of Hazardous waste. In Fundamentals of Environmental Chemistry. pp. 687-720., Manahan, S. E. (ed.). Lewis Publishers.

Mattox, C. F., and Humanick, M. J. 1980. Organic groundwater contaminants from UCG. In situ. 4: 129-151.

Mueller, J. G., Chapman, P. J., and Pritchard, P. H. 1989. Action of fluorene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3085-3090.

Neurath, G. B. 1972. Recent advances in knowledge of the chemical composition of tobacco smoke. In The Chemistry of Tobacco and Tobacco smoke. pp. 77-97., Schmeltz, I. (ed.). Plenum Publishing Corp., New York.

Ning, Y. Z., Fuenmayor, S. L., and Williams, P. A. 2001. *nag* Genes of *Ralstonia* (Formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. J. Bacteriol. 183:700-708.

Phaengthai, S., Pattaragulwanit, K., Pinphanichakarn, P., Juntongjin, K., Omori, T. and Thaniyavarn, S. (2000) Novel acenapthylene degrading bacterium, *Rhizobium* sp. CU-A1. Proceedings of The 1st Conference on Science & Technology University-Industry Linkages under TJTTP, p242-247.

Phale, P. S., Mahajan, M. C. and Vaidyyanathan, C. S. 1995. A pathway for biodegradation of 1-naphthoic acid by *Pseudomonas maltophilia* CSV89. Arch. Microbiol. 163: 42-47

Radke, M. 1987. Organic geochemistry of aromatic hydrocarbons. In Advanced in petroleum geochemistry, vol 2. pp. 141-202., J. Brooks and D. Welte. (ed.). Academic Press, London.

Rao, G.S. 1996 Glutathionyl hydroquinone : a potent pro-oxidant and a possible toxic of benzene. Toxicology. 106:49-54.

Romine, M. F., Still Well, L. C., Wong, K.-K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. K., and Saffer, J. D. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid form *Sphingomonas aromaticivorans* F199. J. Bacteriol. 181(5): 1585-1602.

Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schocken, M. J., and Gibson, D. T. 1984. Bacterial oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. Appl. Environ. Microbiol. 48(1): 10-16.

Selifenov, S. A., Grifoll, M., Eaton, R. W., and Chapman, P. J. 1996. Oxidation of naphthenoaromatic and methyl-substituted aromatic compounds by naphthalene 1,2-dioxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 62: 507-514.

Sevaraj, G. and Iyer, V.N. 1983. Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in Rhizobium meliloti and related bacteria. J. Bacteriol. 156:1292-1300.

Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., Suen, W., Cruden, D. L., Gibson, D. T., and Zylstra, G. J. 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. Gene. 127: 31-37.

Simon, R., Priefer, U., and Puehler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Bio/Technol. 1: 784-791.

Starovoitov, K. 1975. Properties of salicylate-5-hydroxylase from *Moraxella osloensis*. J. Bacteriol. 121: 86-91

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., and Garber, R. L. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature. 406: 959-964.

Takizawa, N., Kaida, N., Torigoe, S., Moritani, T., Sawada, T., Satoh, S., and Kiyohara, H. 1994. Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. 176: 2444-2449.

Tongpim, S. and Pickard M.A. 1999 Cometabolic oxidation of phenanthrene to phenanthrene *trans*-9,10-dihydrodiol by *Mycobacterium* strain S1 growing on anthracene in the precence of phenanthrene. Can. J. Microbiol. 45:369-376.

Vila, J., Lopez, Z., Sabate. L., Minguillon. C., Solanas, A. M., and Grifoll, M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1 : Action of the isolate on two-and three-rings polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5497-5505.

Volkering, F. A., Breure, A. M., Sterkenberg, A., and Van Andel, J. G. 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons; effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. Appl. Microbiol Biotechnol. 36: 548-552.

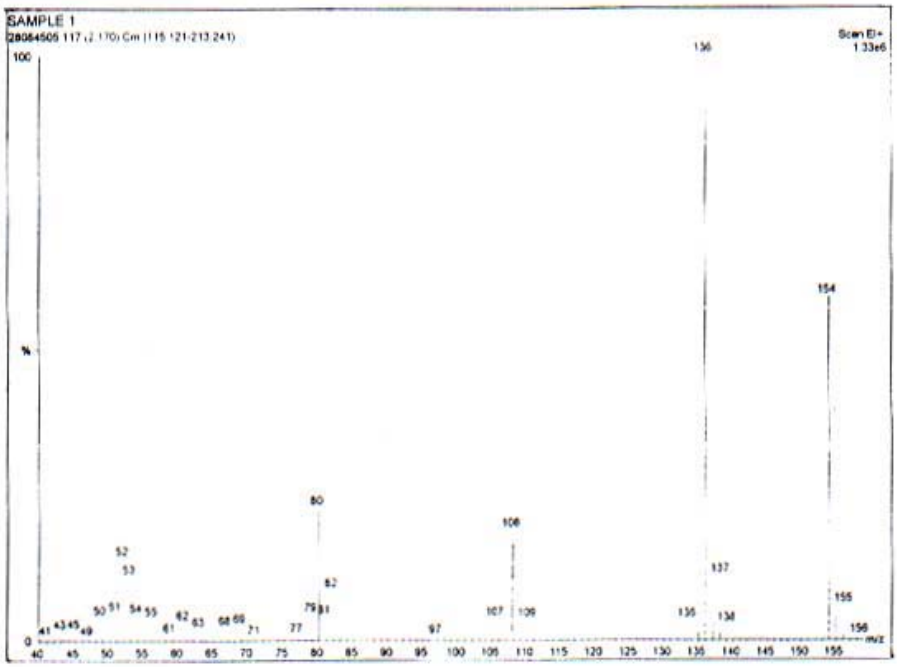
Wilson, S. C., and Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Environ. Pollut. 81: 229-249.

Weissenfels, W.D., Beyer, M. and Klein, J. 1990 Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthrene by pure bacterial cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:479-484.

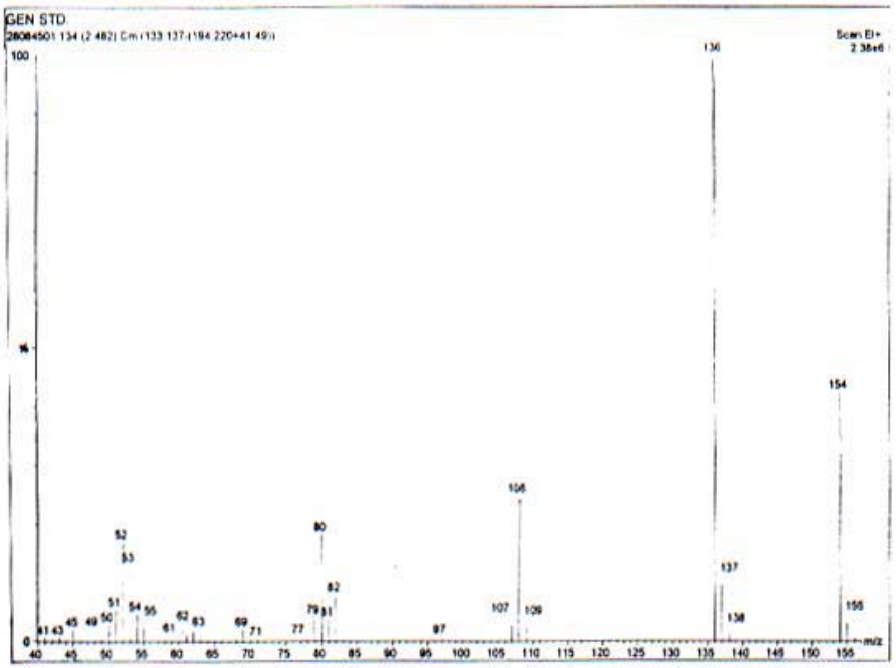
Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 33: 103-119.

Young, L. Y. and Cerniglia, C. R. 1995. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. pp. 286-296. Wiley-Liss, Inc. New York.

ภาคผนวก ก

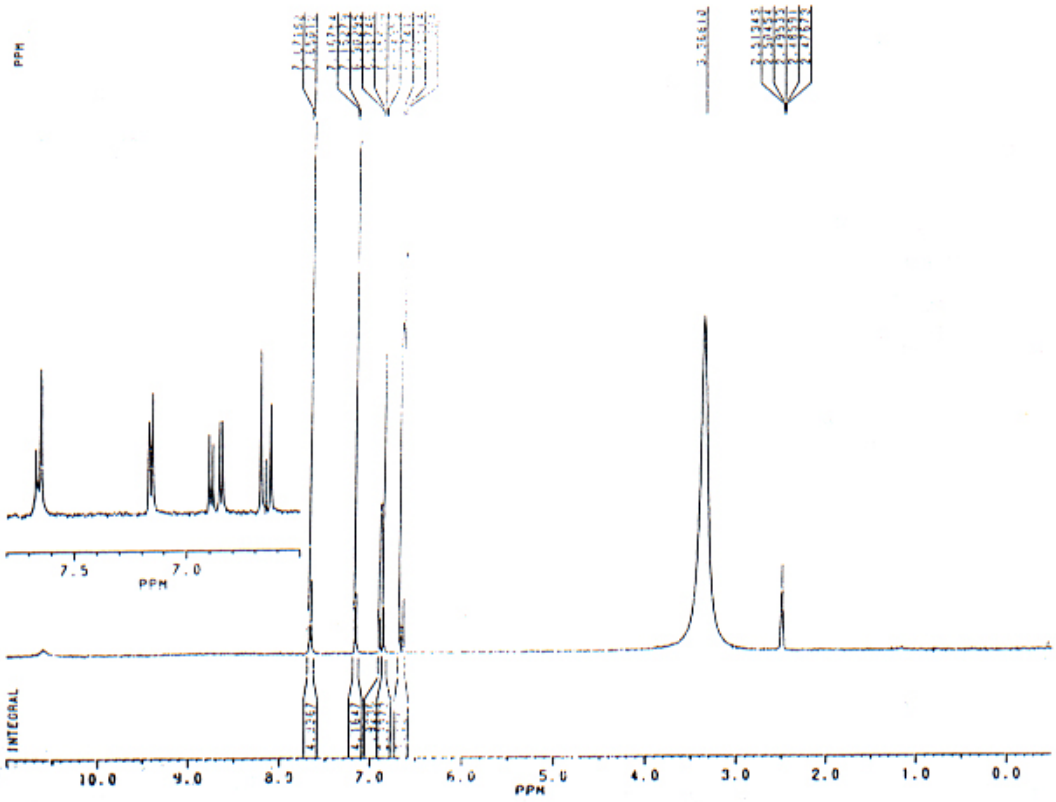


ก.

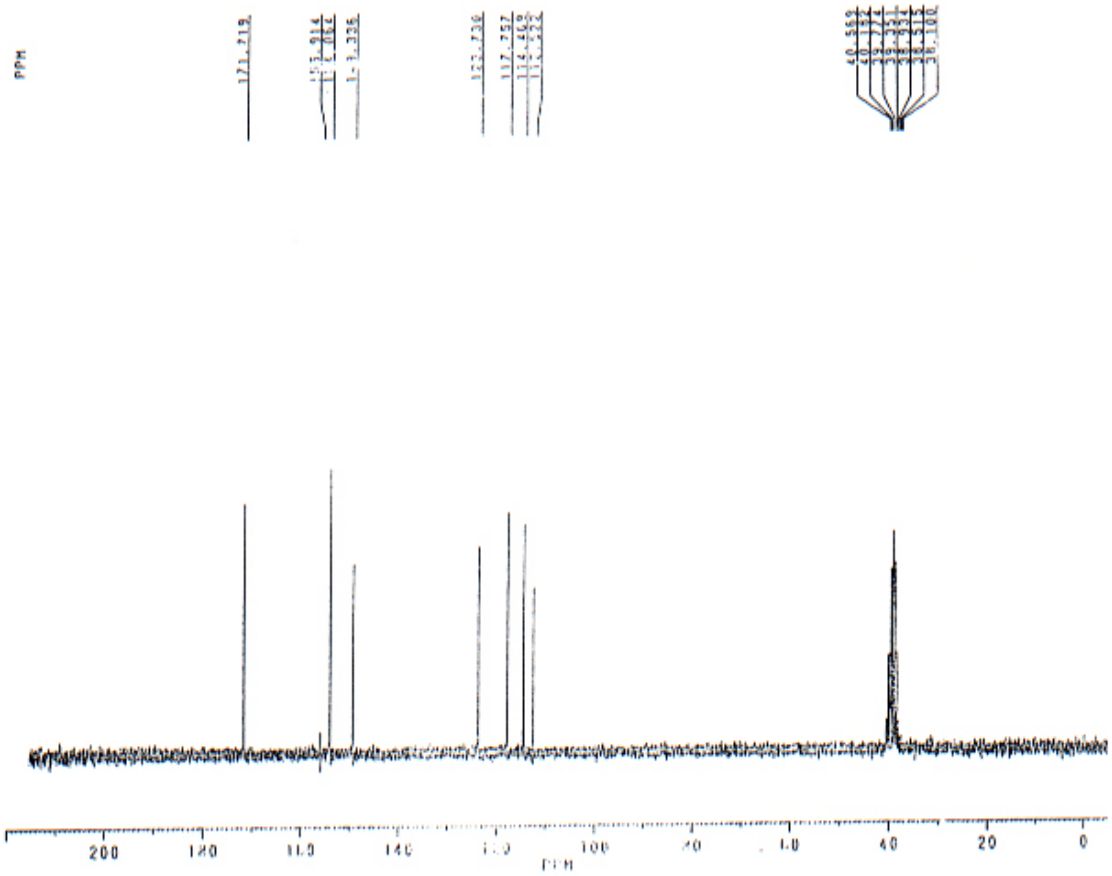


ข.

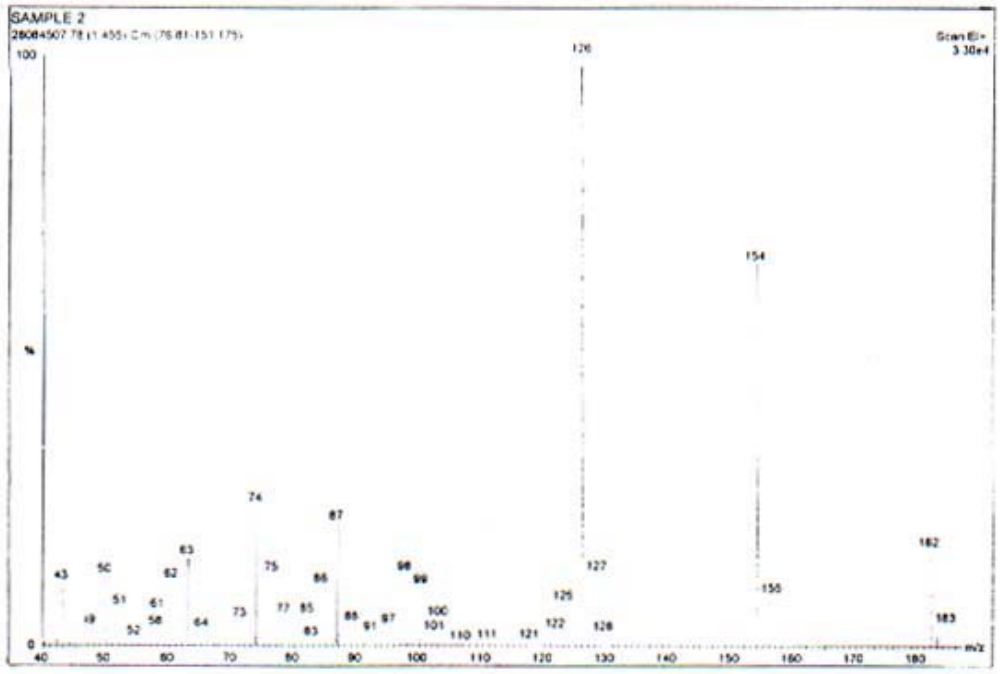
รูปที่ ก1 แมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ A53 ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์กลาย A53 (ก.) เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (ข.)



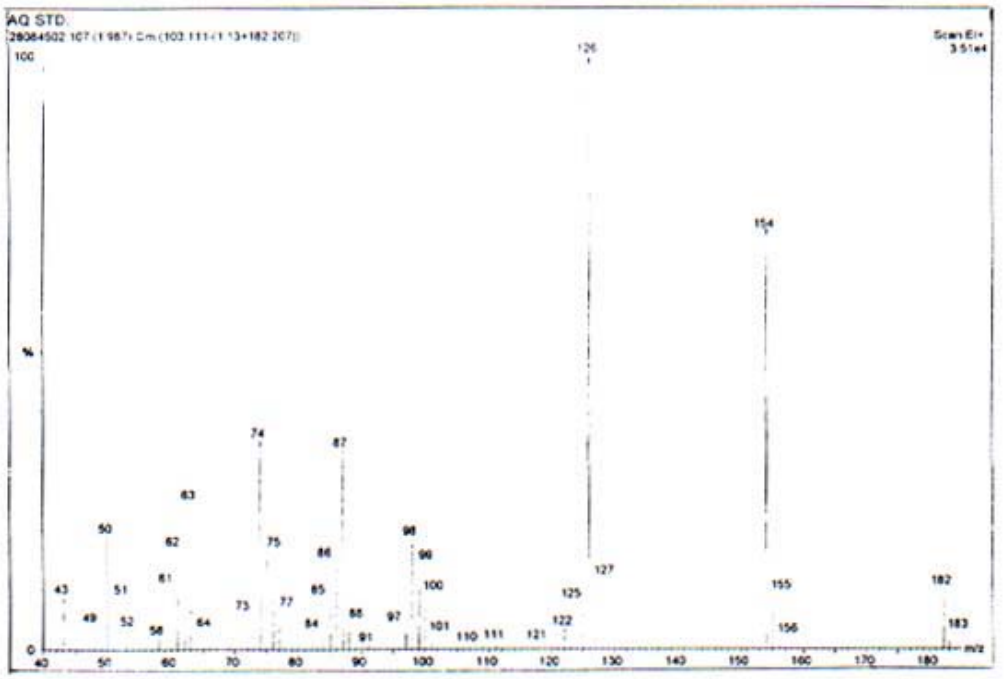
รูปที่ ก2 ^{1}H NMR สเปกตรัม ของสารมัธยันต์ A53 ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์กลาย A53



รูปที่ ก3 C^{13} NMR สเปกตรัม ของสารมัธยันต์ A53 ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์กลาย A53

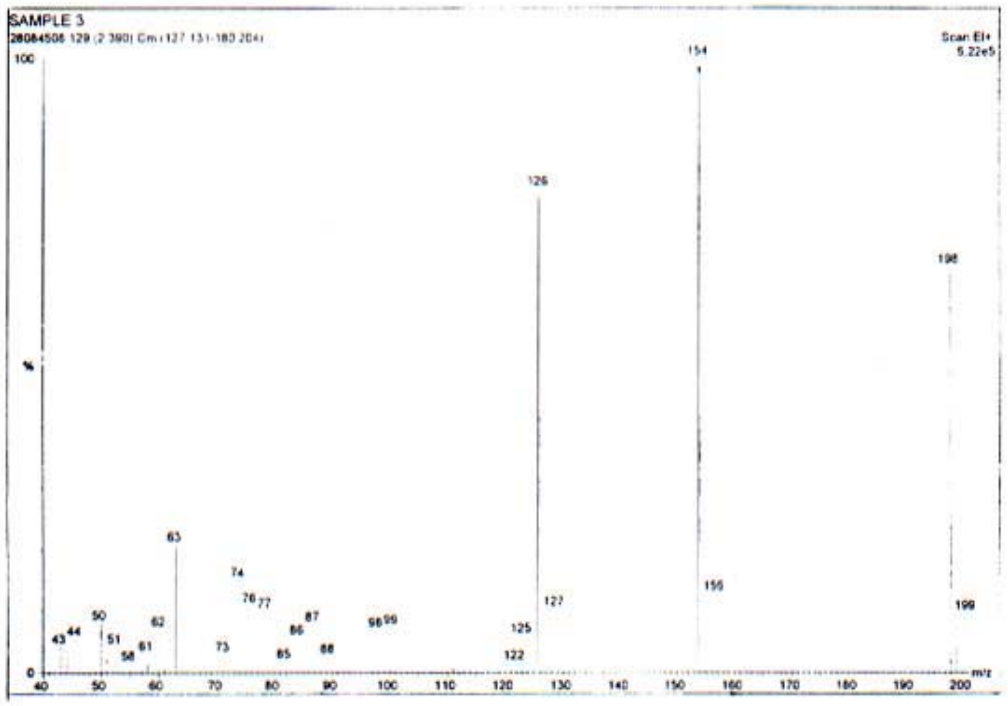


ก.

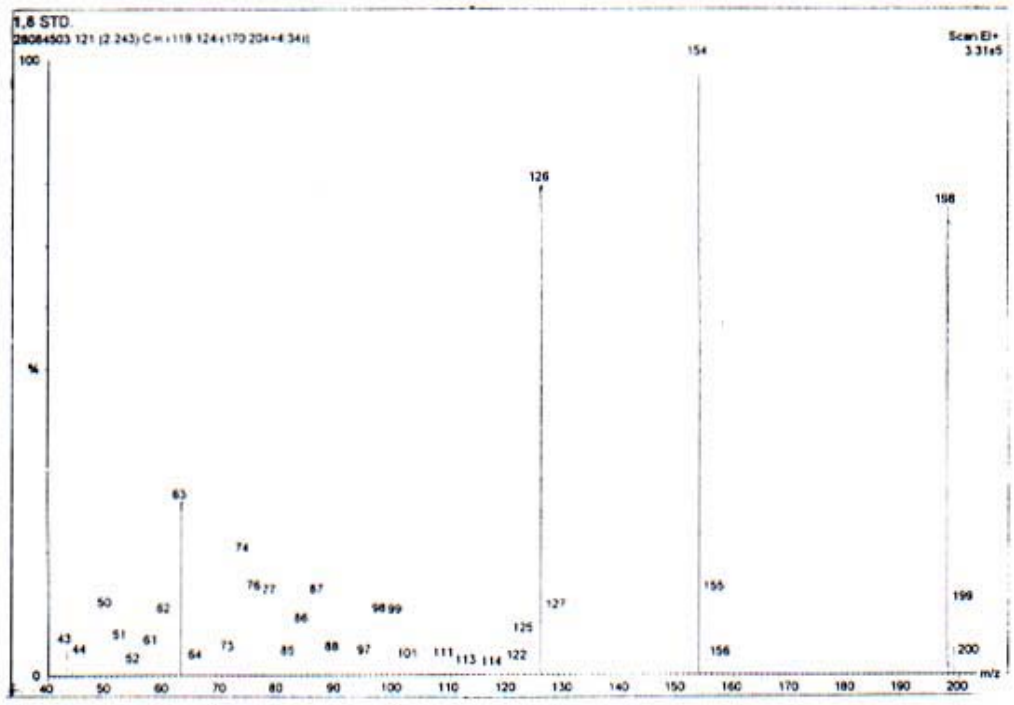


ข.

รูปที่ ก4 แมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ B1 ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์กลาย B1 (ก.) เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานอะซีแนพธีนควิโนน (ข.)

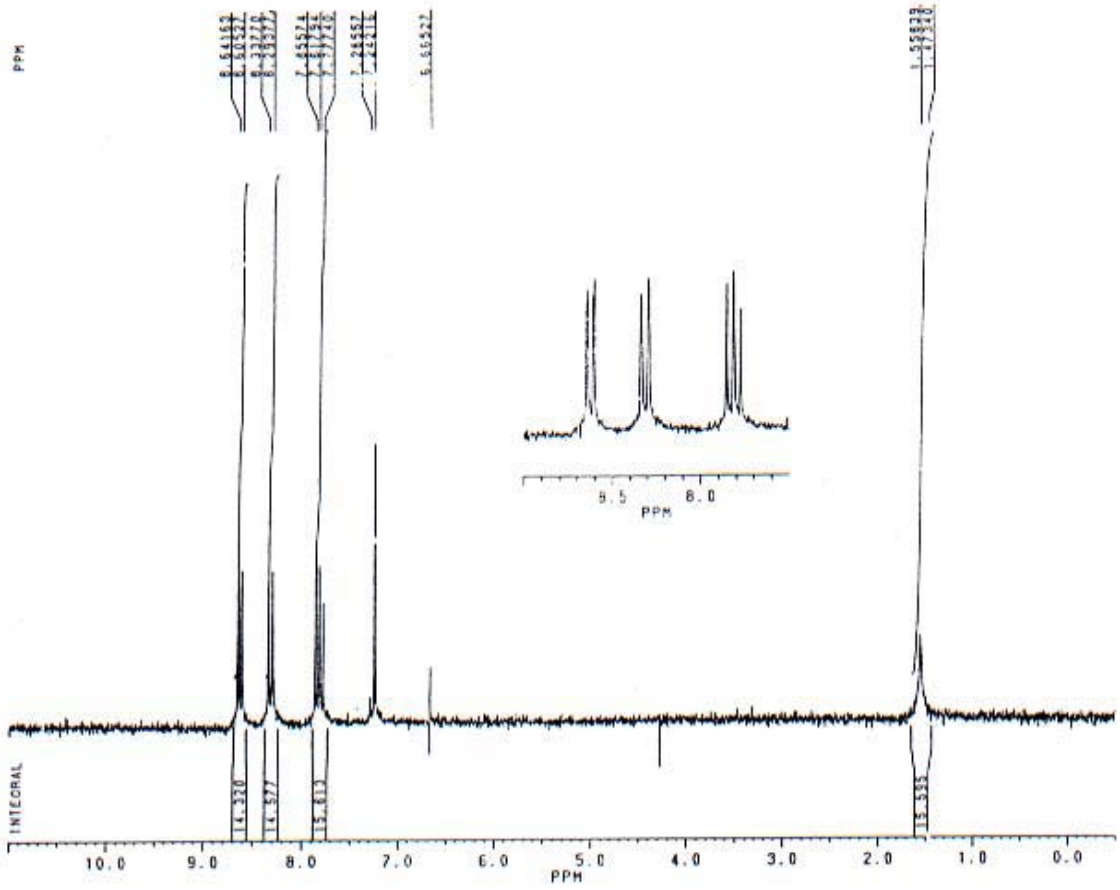


ก.



ข.

รูปที่ ก5 แมสสเปกตรัมของสารมัธยันต์ B5 ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์กลาย B5 (ก.) เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐาน 1,8-แนพธาลิกแอนไฮไดรด์ (ข.)



รูปที่ ก6 32 ^{1}H NMR สเปกตรัม ของสารมัธยันต์ B5 ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์กลาย B5

ภาคผนวก ข

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. manuscript

Pattaragulwanit, K., Poonthrigpun, S., Kriangkripipat, T., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S., Petsom, A., and Pinpanichakarn, P. (2004) Novel intermediates of acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. CU-A1, an evidence for naphthalene-1,8-dicarboxylic acid metabolism.

2. การเผยแพร่ผลงาน

โปสเตอร์งานจุฬาวิชาการ ประจำปี 2545 ร่วมกับหน่วยวิจัย Bioremediation

Nintanawongsa, T., Lorratanachaiyong, T., Pinphanichakarn, P., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S. and Pattaragulwanit, K. (2003) Isolation and characterization of genes involved in acenaphthylene degradation in *Rhizobium* sp. CU-A1. Abstract, BioThailand 2003, Technology for life. P241 (poster).

Poonthrigpan, S., Petsom, A., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S. Juntongjin, K. and Pinphanichakarn, P. (2003) Identification of accumulated intermediates from the degradation of acenaphthylene by *Rhizobium* sp. CU-A1 transposon mutants Abstract, BioThailand 2003, Technology for life. P303 (poster).

Pattaragulwanit, K., Poonthrigpun, S., Lorrattanachaiyong, T., Kriangkripipat, T., Petsom, A., and Pinpanichakarn, P. (2004) Gene involving and intermediate from acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. CU-A1 Abstract “การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว.” P155 (poster)

Novel intermediates of acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. CU-A1, an evidence for naphthalene-1,8-dicarboxylic acid metabolism.

Kobchai Pattaragulwanit[a*], Siriwat Poonthrigpun[a], Thanyanuch Kriangkripipat[a], Kanchana Juntongjin[a], Suthep Thaniyavarn[a], Amorn Petsom[b], Pairoh Pinpanichakarn[a]

[a]Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

[b]Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

***Corresponding author. Mailing address : Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand**
Phone : 66-2218-5070 Fax : 66-2252-7576
E-mail : Kobchai@sc.chula.ac.th

Introduction

Acenaphthylene is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) found as constituents of coal tar and tobacco smoke (Neurath, 1972) and organic contaminants of groundwater (Mattox and Humenick, 1980). Acenaphthylene is one of the 16 PAHs listed in priority toxic pollutants compiled by the US Environmental Protection Agency. This compound is well known for causing adverse effects to humans as well as aquatic organisms (Lederer, 1985).

The metabolism of acenaphthylene by mammals and the isolated metabolites have been reported in detail (Hopkins *et al.,* 1962) whereas the metabolic pathways of acenapthylene by microorganism have been rarely investigated and remain unclear. Schocken and Gibson (1984) reported the ability of *Beijerinckia* sp. to cometabolize acenaphthylene by dioxygenation acenaphthylene to form *cis*-1,2-acenaphthenedihydrodiol, 1,2-dihydroxyacenaphthylene and finally to acenaphthenequinone which cannot further be oxidized. Komatsu *et al.,* (1993) found that the pure culture strain *Pseudomonas* sp. A4 can transform acenaphthylene to 1,8-naphthalenedicarboxylic acid. Although this strain can utilized acenaphthylene and 1,8-naphthalenedicarboxylic acid as a sole carbon and energy source, no metabolite from the oxidation of 1,8-naphthalenedicarboxylic acid was reported in present. Transformation of acenaphthylene to *cis*-acenaphthene-1,2-diol can also be performed by *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (pRE695) carrying naphthalene dioxygenase gene cloned from plasmid NAH7. Then, the nonspecific dehydrogenase activities presented in the host strain further oxidized *cis*-acenaphthene-1,2-diol to 1,2-acenaphthenequinone prior to spontaneously ring fission to form naphthalene-1,8-dicarboxylic acid (Selifonov *et al.*, 1996). No further oxidation of naphthalene-1,8-dicarboxylic acid was found. It is also interesting how the microorganism gains the c-atom from naphthalene-1,8-dicarboxylic acid.

In order to accumulate intermediates of acenaphthylene degradation, we mutagenized the strain CU-A1 using transposon Tn5. The accumulated intermediates was purified by TLC and HPLC before subjected to be identified by MS and NMR. In this paper, we describe an novel metabolic intermediate of acenaphthylene degradation lower than naphthalene-1,8-dicarboxylic acid. These results confirmed that the strain CU-A1 can use acenaphthylene as substrate for growth. Moreover, the acenaphthylene degradation pathways were also proposed.

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids

Rhizobium sp. CU-A1 was isolated from petroleum contaminated soil in Thailand on the basis of the ability to grow on acenaphthylene as the sole carbon and energy source. (Phaengthai *et al.*, 2000) *Escherichia coli* S17-1 containing the suicide vector pSUP2021 (Simon *et al.* 1983) was used as conjugable transposon Tn5 donor.

Media and growth conditions

Carbon-free mineral medium (CFMM) employed for routinely cultivation of the strain CU-A1 and the mutants thereof was prepared after Kasuga *et al.* (1997). Acenaphthylene and other polyaromatic compounds were solubilized in dimethyl sulfoxide whereas protocatechuic acid in absolute ethanol. All PAHs solution were filter sterilized through a PTFE membrane cartridge (0.2 μm in pore size; Advantec Toyo, Tokyo) and added to CFMM following autoclaving and adjusting pH to 7.5 at a final concentration of acenaphthylene 0.6 g/l, protocatechuic acid 1 g/l and other PAHs 0.1 g/l. *Rhizobium* sp. CU-A1 and mutants thereof were routinely grown at 30 °C: with agitation at 200 rpm . *Rhizobium* sp. CU-A1 and *E. coli* S17-1 were also cultured at 37 °C in LB or 2YT medium (Sambrook and Russel, 1999) Agar plate were prepared by addition of Nobel or Bacto agar 1.5% (w/v). Kanamycin was added at 50 μg/ml. *Rhizobium* sp. CU-A1 and mutants were kept at –70 °C in CFMM supplemented with acenaphthylene or protocatechuic acid, respectively, in 50% glycerin culture.

Transposon mutagenesis

Transposon Tn5 on the suicide vector pSUP2021 was conjugally transferred from *E. coli* S17-1 to *Rhizobium* sp. CU-A1 by filter mating technique. Exponential phase cells of *E. coli* S17-1 as donor and *Rhizobium* sp. CU-A1 as recipient in LB medium were mixed at the donor-to-recipient ratios of 1:1 in a microfuge tube and centrifuged. The pellet was resuspended in 50 μl of the supernatant and transferred to a nitrocellulose membrane (pore size 0.45 μm; Sartorius, Germany) placed on LB agar. After mating 30°C for 18-24 hours, the cell mixture was resuspended in 1 ml 0.85% NaCl and 100-μl portion of an appropriately diluted solution was spreaded onto CFMM agar supplemented with protocatechuic acid and kanamycin. Following incubation at 30°C for 4 days, transconjugants were spotted onto master plates of the same composition.

Selection of acenaphthylene degrading defective mutants

To select acenaphthylene degrading defective mutants, transconjugants were transferred from master plate onto CFMM agar supplemented with kanamycin and acenaphthylene was applied as crystal on the lid. The selection plates were sealed with parafilm and incubated at 30°C up to one week. Mutants can be screened by growth or production of coloured metabolites on selection plated and confirmed by their inability to grow in liquid CFMM with acenaphthalene as sole carbon and energy source within 3 days.

Extraction and purification of acenaphthylene degradation intermediates

For isolation of intermediates, acenaphthylene degrading defective mutants were enriched in CFMM supplemented with protocatechuic acid and kanamycin at 30°C for 24 hours following by centrifugation and washing three times with 0.85% NaCl. The pellet was resuspended in CFMM before transferred to CFMM containing 0.6 g/l acenaphthylene. The culture was cultivated at 30°C with agitation 200 rpm for 5 days before subjected to extract intermediates

After incubation, the culture was acidified to pH 2-3 with 1N HCl and then extracted twice with equal volume of ethyl acetate. The ethyl acetate extracts were pooled together and dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness in vacuo at 25 °C. The residue was redissolved in methanol for further purification. Accumulated intermediates were purified by preparative thin-layer chromatography (TLC) (TLC plate silica gel 60 F_{254}, Merck, Germany) with hexane:ethyl acetate:acetic acid (10:10:1) as the developing solvent. The major spot was scraped off, eluted with ethyl acetate and submitted to silica gel column chromatography. The column was stepwise-eluted with 0-100% ethyl acetate in hexane with 10% increment for each step. Each fraction was dried over anhydrous Na_2SO_4, evaporated to dryness in vacuo at 25 °C and redissolved in methanol. The resulting intermediates were analysed for their purity by TLC and reversed phase HPLC with ODS column (Shimadzu Scientific, Japan) as described in Nuttapun *et al.* (2000).

Identification of intermediates

The purified intermediates were identified by mass spectrometry using a Trio 2000 mass spectrometry (Fisons Instruments, England). The mass spectrometer was operated at 70 eV of electron ionization energy. Intermediates were identified by comparison of their electron impact (EI) MS spectra with those obtained from authentic samples.

For ^{1}H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) analyses, the metabolite was dissolved in 10% (v/v) deuterated methanol (CD_3OD) in deuterated chloroform ($CDCl_3$) and analyzed at 500 MHz (JNM-A500 spectrometer, Jeol, Ltd., Tokyo, Japan)

Chemicals

All chemicals used in this study were obtained from Kanto Chemical, Tokyo, Japan or Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany. Bacteriological media were purchased from Difco Laboratories, Detroit, Michican. Solvents were obtained from Merck, Darmstadt, Germany. All chemicals and solvents were of the highest purity commercially available.

Results and discussion

Tn5 transposon mutagenesis and isolation of acenaphthylene degrading defective mutants

In order to study the intermediate of ACN degradation by the strain CU-A1, the transposon mutagenesis experiments were performed so as to block the gene involving ACN degradation pathway. After conjugation using recipient strain CU-A1, the transfer frequency of Tn5 from the donor *E. coli* S17-1 was observed at approximately 4.7×10^{-5} per recipient. No spontaneous kanamycin-resistant mutants derived from *Rhizobium* sp. CU-A1 was found under the same condition. Southern hybridization analysis revealed that Tn5 was ramdomly inserted at only one site in the chromosomal DNA of each transconjugants (data not shown). From about 15,000 transconjugants obtained, three mutants defective in utilizing acenaphthylene as their sole carbon source were isolated and designated as A53, B1 and B5, respectively.

Isolation and purification of accumulated intermediates

Preliminary determination by analytical TLC of the crude extracts from 14 days-acenaphthylene degradation by the mutant strain A53, B1 and B5 showed the occurrence of spot patterns different from those of wild type strain CU-A1 (Fig 1). Major spots at R_f 0.22, R_f 0.58, R_f 0.58 from strain A53, B1 and B5, named as intermediate I, II and III, respectively were isolated from preparative thin layer chromatography and purified by silica gel column chromatography and eluted with eluted with 0-100% ethyl acetate in hexane. HPLC analysis confirmed the purity of intermediates as shown by single peak at retention times (R_t) of 3.23, 2.61 and 2.61 min for intermediate I, II and III respectively.

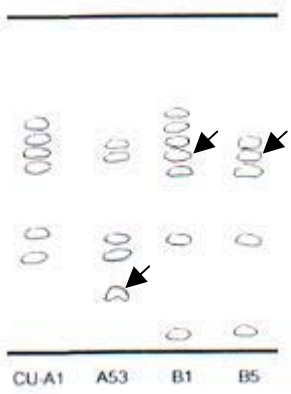


Fig. 1 Analytical TLC showed accumulated intermediates after 14 days incubation CFMM supplemented with acenaphthylene. Arrows indicated spots of intermediates at R_f 0.22, R_f 0.58, R_f 0.58 from strain A53, B1 and B5, respectively.

Identification of purified intermediates

MS analysis of intermediate I revealed a molecular ion (M^+) at *m/z* of 154 which was the base peak and fragment ions at *m/z* 136, 108, 80 and 52 as shown in figure 3. This mass spectral fragmentation pattern and a mass spectral library search suggested that intermediate I was 2,5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid). Its identity was further confirmed by comparing the mass spectra with those of an authentic standard (data not shown). The ^1H and ^{13}C NMR spectrum of the metabolite I was also identical to that of 2,5-dihydroxybenzoic acid.

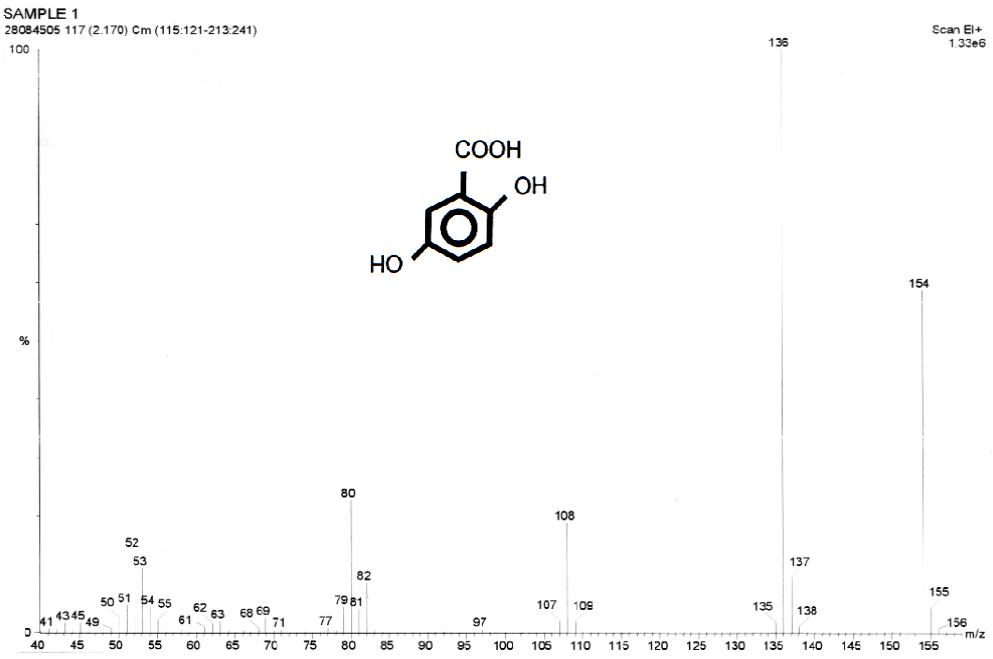


Fig. 2 Mass spectrum of intermediate I isolated from acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. A53. Mass spectral characteristic of this intermediate is shown in Table 1.

Following a similar approach, intermediate II with R_t of 2.61 min was analysed by MS. The results revealed that the mass spectrum of intermediate II consisted of a molecular ion at *m/z* of 182 and characteristic fragment ions at *m/z* values of 154, 126, 98, 87, 74, 63 and 50 and a base peak at an *m/z* of 182 (Fig. 4). It was identified by comparing the mass spectra with those of an authentic sample as acenaphthenequinone.

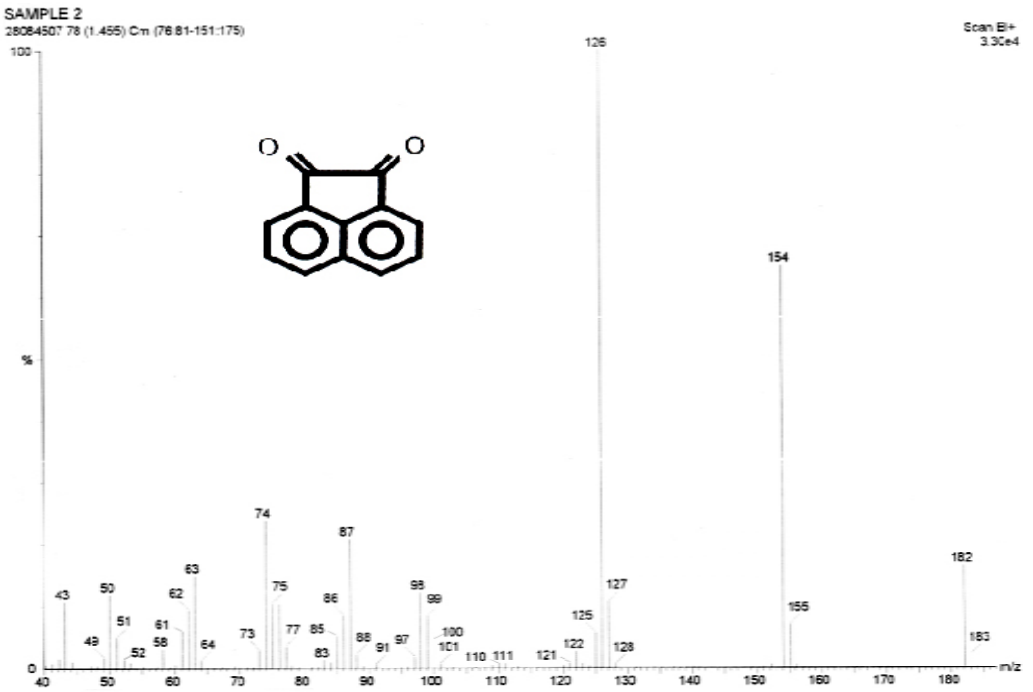


Fig. 3 Mass spectrum of intermediate II isolated from acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. B1. Mass spectral characteristic of this intermediate is shown in Table 1.

The mass spectrum of intermediate III (R_t 2.61 min) showed an apparent molecular ion at an *m/z* of 198, fragment ions at *m/z* of 154, 126, 98, 87, 74, 63 and 50 (Fig. 5). The base peak was at an *m/z* of 198. Its mass spectra were also similar when compared with those of an authentic standard. Moreover, the ^{1}H NMR of the metabolite III showed the same spectrum as of 1,8-naphthalic anhydride. Consequently, on the basis of he molecular weight and fragmentation patterns, the intermediate III could be identified as 1,8-naphthalic anhydride which is an acid form of napthalene-1,8-dicarboxylic acid.

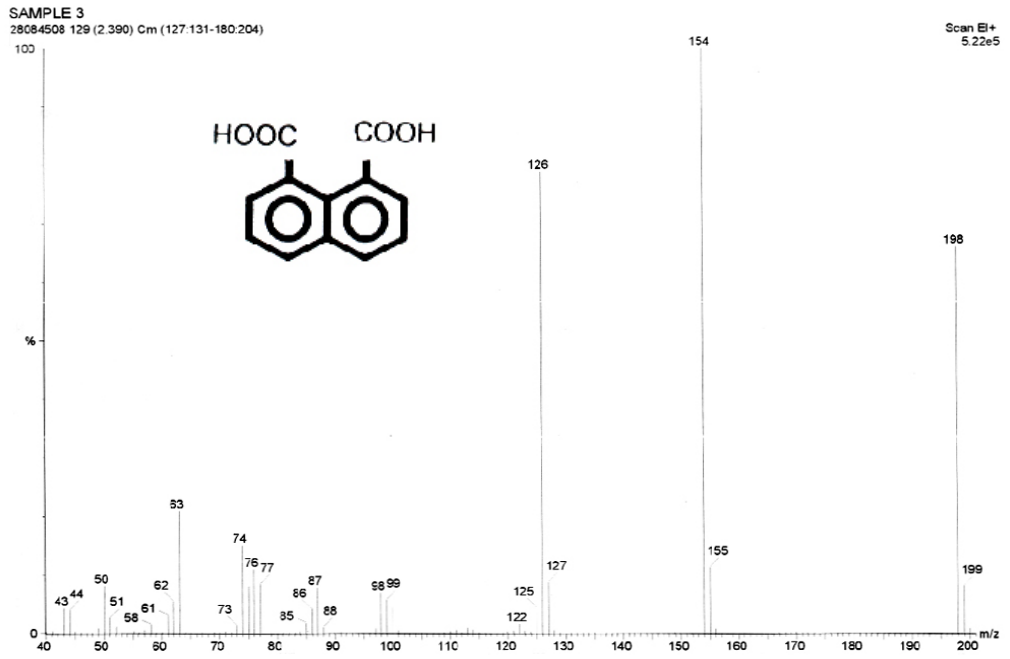


Fig. 4 Mass spectrum of intermediate III isolated from acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. B5. Mass spectral characteristic of this intermediate is shown in Table 1.

Growth of *Rhizobium* mutant strains on intermediate I, II and III

In order to ensure that these three identified intermediates I, II and III are the accumulated metabolites of acenaphthylene degrading pathway which cannot be used as carbon sources for growth of the mutant comparing with the wild type strain CU-A1, all mutants and wild type strains were culture in CFMM supplemented with each intermediate at the concentration of 300 mg/l for 8 days.

Table 2 Growth of *Rhizobium* sp. CU-A1 and their Tn5 mutants on various substrates.

Growth on	Strains			
	CU-A1	A53	B1	B5
Acenaphthylene	+[a]	-[b]	-	-
Intermediate I (2,5-dihydroxybenzoic acid)	+	-	+	+
Intermediate II (Acenaphthenequinone)	+	+	+	-
Intermediate III (Naphthalene-1,8-dicarboxylic acid)	+	+	+	-

[a] and [b] indicated that the strains can grow or not grow with selected substrates with in 8 days, respectively

Discussion and conclusion

The objective of this study is to identify metabolites from acenaphthylene degradation in *Rhizobium* sp. CU-A1. We therefore induced mutagenesis of this strain using transposon Tn5 as described in previous works (Laurie and Lloyd-Jones, 1999; Simon *et al.*, 1983). Transposon Tn5 can transpose randomly into chromosomal DNA of *Rhizobium* sp. CU-A1 with the efficiency of approximately 4.7 x 10^{-5} per recipient cells which was comparable to the efficiency obtained from Tn5 mutagenesis of *Rhizobium meliloti* (Simon *et al.,* 1983). Three mutant strains incapable of growing with acenaphthylene as carbon source were selected from about 15,000 transconjugants. After incubation of these mutant strains in CFMM supplemented with acenaphthylene for 14 days, the acidic extract was preliminary analysed by TLC. The result showed that the mutants A53, B1 and B5 had a different TLC pattern from each other and from wild type strain CU-A1 as shown in figure 2. The accumulated intermediates with R_f 0.22, R_f 0.58, R_f 0.58 from strain A53, B1 and B5, named as intermediate I, II and III, respectively, as shown by a major spot with high intensity, were subjected to purify by preparative TLC and HPLC and silica gel column chromatography.

Identification using MS and NMR compared with authentic standard revealed that intermediates I, II and III were 2,5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid), acenaphthene-quinone and naphthalene-1,8-dicarboxylic acid, respectively. Acenaphthenequinone and naphthylene-1,8-dicarboxylic acid have been identified as intermediates of acenaphthylene degradation by *Pseudomonas aeruginosa* recombinant strain PA01 (Selifonov *et al.,* 1996) and *Beijerinckia* sp. (Schocken and Gibson, 1984). This compound was reported as a dead-end product of acenaphthene and acenaphthylene oxidation by *Pseudomonas cepacia* F297 (Grifoll *et al.*, 1995) and *Ps. aeruginosa* PA01 and PA01 (pRE695) (Selifonov *et al.*, 1996) On the contrary, *Alcaligenase eutrophus* and *A. paradoxus* could oxidized naphthylene-1,8-dicarboxylic acid which was an intermediate of acenaphthene degradation, to 3-hydroxygenzene-1,2-dicarboxylic acid. However, there was no published data available on the further bacterial metabolism of naphthylene-1,8-dicarboxylic acid.

2,5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid) was newly identified as accumulated intermediate of acenaphthylene metabolism. Gentisic acid was found to be the product of various kinds of PAHs metabolism such as naphthalene via salicylic acid (Fuenmayor *et al.,* 1998.), fluorene (Grifoll *et al.*, 1995). Gentisic acid could be further oxidized by the strain CU-A1 to maleylpyruvate and fumarylpyruvate which are the same as *Raltonia* ap. strain U2 (Ning *et al.,* 2001)

In order to confirm that these compound were actually intermediates of acenaphthylene degradation pathways, the purified intermediates were used as substrate for

growth of wildtype strain CU-A1 and mutant strain A53, B5 and B1. The strain CU-A1 could utilize all substrate and exhibit growth whereas all the mutants could not use acenaphthylene as substrate for growth. The mutant strain A53 could not use 2,5-dihydroxybenzoic acid because this strain lacked of the enzyme involving 2,5-dihydroxybenzoic acid oxidation due to the insertion of transposon in that gene. Therefore A53 could not grow on this substrate. The mutant strain B1 was incapable to utilize acenaphthenequinone which was its accumulated intermediate but it showed the growth on acenaphthenequinone as sole carbon sources. This can be explained by spontaneous chemical transformation of acenaphthenequinone to naphthalene-1,8-dicarboxylic acid (Selifonov *et al.*, 1996) which can be further used as substrate for growth. The mutant strain B5 accumulated naphthalene-1,8-dicarboxylic acid and could not use that substrate for growth as well as acenaphthenequinone whereas 2,5-dihydroxybenzoic acid could be used as growth substrate.

According to the identification of acenaphthenequinone and naphthylene-1,8-dicarboxylic acid, it might be proposed as shown in figure 5 that the early step of acenaphthylene degradation in *Rhizobium* sp. CU-A1 could occur in the same manner as proposed in *P. aeruginosa* PA01 (pRE695) (Selifonov *et al.*, 1996). Acenaphthylene could be dioxygenated to be *cis*-acenaphthene-1,2-diol. After dehydrogenation of *cis*-acenaphthene-1,2-diol, acenaphthenequinone was formed and would be spontaneously oxidized to naphthylene-1,8-dicarboxylic acid.

Naphthylene-1,8-dicarboxylic acid may be decarboxylated one of the carboxyl group on pentene ring of acenaphthylene and hereby was converted to 1-naphthoic acid. This reaction may occur in the same manner as the oxidation of phenantherene-4,5-dicarboxylic acid, an intermediate of pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. AP-1 (Vila *et al.,* 2001) and *Mycobacterium* sp. PYR-1 (Young *et al.,* 1995), in which one carboxyl group was decarboxylated from the substrate and resulted in the formation of phenanthrene-4-carboxylic acid. 1-naphthoic acid might be dioxygenated at position 1,2 resulting in 1,2-dihydroxynaphthalene which would be further oxidized to trans-o-hydroxybenzilidene pyruvic acid and salicylic acid, respectively.

The other possible pathway of 1-naphthoic acid oxidation would be dioxygenation at the position 7,8 of benzene ring of 1-naphthoic acid which contains no carboxyl group. The resulting 1,2-dihydroxy-8-carboxynaphthalene might be oxidized to salicylic acid using the same pathway as described for naphthoic acid degradation by *Pseudomonas maltophila* CSV89. (Phale *et al.,* 1995) Then, salicylic acid would be metabolised to gentisic acid, maleyl pyruvate and fumaryl pyruvate (Fuenmayor *et al.*, 1998; Ning *et al.*, 2001).

In conclusion, we suggested that *Rhizobium* sp. CU-A1 has ability to cleave the fused five-membered ring of acenaphthylene to form naphthalene-1,8-dicarboxylic acid via acenaphthenequinone. One of the benzene ring of naphthalene-1,8-dicarboxylic acid could further be cleaved to form 2,5-dihydroxybenzoic acid. This ability is consistent with our earlier observation that *Rhizobium* sp. CU-A1 was able to use acenaphthylene as its sole source of carbon and energy. (Phaengthai *et al.,* 2000)

References

Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyes, A. L., and Williams, P. A. 1998. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. J. Bacteriol. 180: 2522-2530.

Grifoll, M., Selifenov, S. A., Galtin, C. V., and Chapman, P. J. 1995. Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723.

Hopkins, R. P., Brooks, C. J. W., and Young, L. 1962. Biochemical studies of toxic agents. 13. The metabolism of acenaphthylene. Biochem. J. 82: 457-466.

Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H., Kodama, T., and Omori, T. 1997. Cloning and characterization of the genes involved in the degradation of dibenzofuran by *Terrabacter* sp. strain DBF63. J. Ferment. Bioeng. 84(5): 387-399.

Komatsu, T, Omori, T., and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. Biosci. Biotech. Biochem. 57(5): 864-865.

Laurie, A. D., and Lloyd-Jones, G. 1999. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. J. Bacteriol. 181(2): 531-540.

Lederer, W. H. 1985. Acenaphthylene. In: Regulatory Chemicals of Health and Environmental Concern. p.1. Lederer, W. H. (ed.). (n.p.): Van Nostrand Reinhold Company.

Mattox, C. F., and Humanick, M. J. 1980. Organic groundwater contaminants from UCG. In situ. 4: 129-151.

Neurath, G. B. 1972. Recent advances in knowledge of the chemical composition of tobacco smoke. In The Chemistry of Tobacco and Tobacco smoke. pp. 77-97., Schmeltz, I. (ed.). Plenum Publishing Corp., New York.

Ning, Y. Z., Fuenmayor, S. L., and Williams, P. A. 2001. *nag* Genes of *Ralstonia* (Formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. J. Bacteriol. 183:700-708.

Phaengthai, S., Pattaragulwanit, K., Pinphanichakarn, P., Juntongjin, K., Omori, T. and Thaniyavarn, S. (2000) Novel acenapthylene degrading bacterium, *Rhizobium* sp. CU-A1. Proceedings of The 1st Conference on Science & Technology University-Industry Linkages under TJTTP, p242-247.

Phale, P. S., Mahajan, M. C. and Vaidyyanathan, C. S. 1995. A pathway for biodegradation of 1-naphthoic acid by *Pseudomonas maltophilia* CSV89. Arch. Microbiol. 163: 42-47

Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schocken, M. J., and Gibson, D. T. 1984. Bacterial oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. Appl. Environ. Microbiol. 48(1): 10-16.

Selifenov, S. A., Grifoll, M., Eaton, R. W., and Chapman, P. J. 1996. Oxidation of naphthenoaromatic and methyl-substituted aromatic compounds by naphthalene 1,2-dioxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 62: 507-514.

Simon, R., Priefer, U., and Puehler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Bio/Technol. 1: 784-791.

Supaka, N., Pinpanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., Omori, T. and Junthongjin, K. 2001 Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade fluoranthrene and pyrene via cometabolism. Science Asia 27:21-28.

Vila, J., Lopez, Z., Sabate. L., Minguillon. C., Solanas, A. M., and Grifoll, M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1 : Action of the isolate on two-and three-rings polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5497-5505.

Young, L. Y. and Cerniglia, C. R. 1995. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. pp. 286-296. Wiley—Liss, Inc. New York.

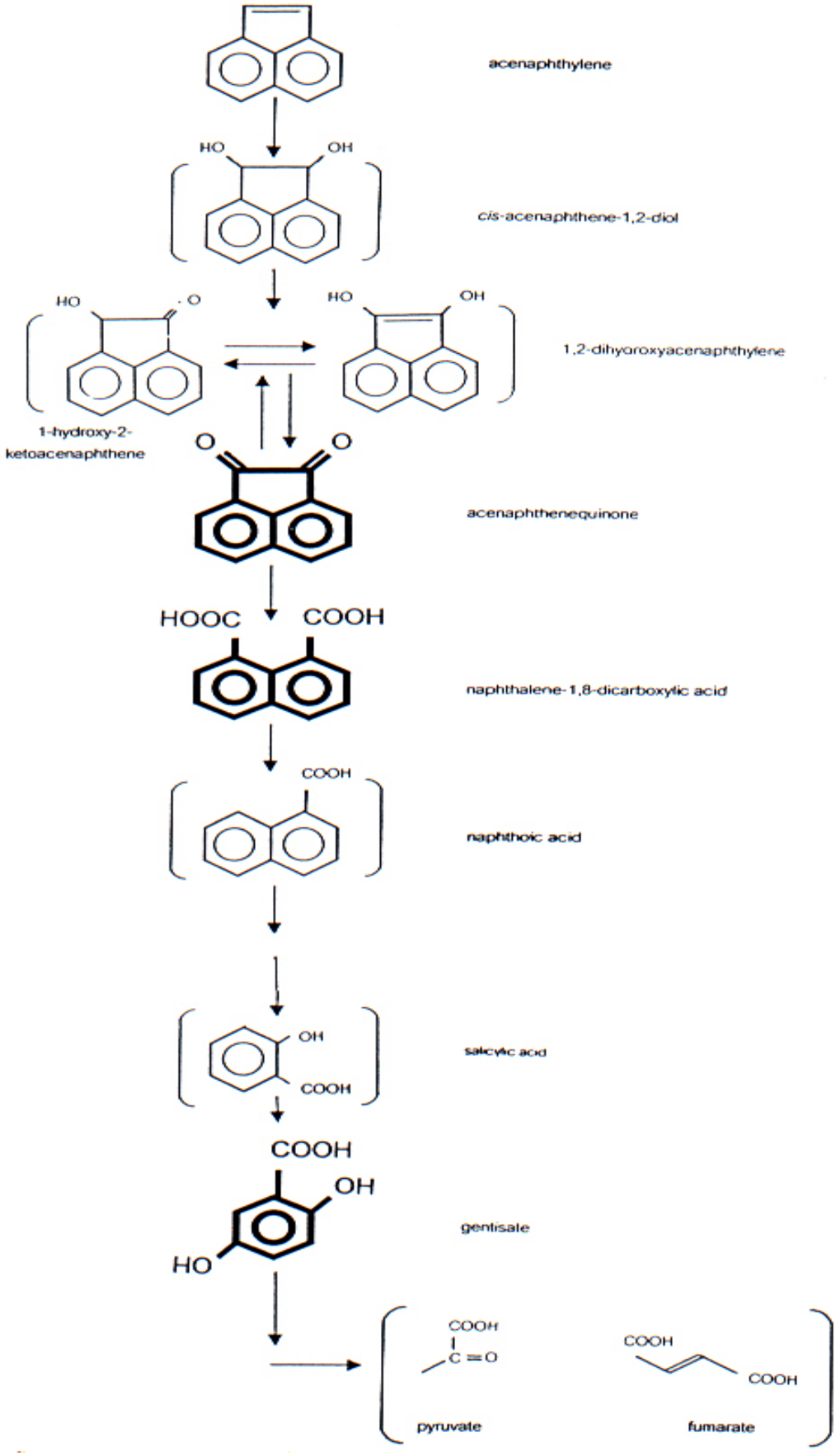


Figure 5 Propose pathway of acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. strain CU-A1. Pictures printed in bold represent the identified metabolites from this study