

บทนำ (Introduction)

ปัญหามลพิษจากการปนเปื้อนโลหะหนักชนิดต่างๆ เช่น แคดเมียม โครเมียม ทองแดง ตะกั่ว ปรอท สารหนูและสังกะสีในสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาที่สำคัญและนับวันจะทวีความรุนแรงเพิ่มขึ้นเนื่องจากการมีการขยายตัวทางเศรษฐกิจของประเทศทั้งภาคอุตสาหกรรม การคมนาคมขนส่ง เกษตรกรรม และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปัญหาทางสุขภาพและสิ่งแวดล้อมที่สำคัญ ก่อให้เกิดผลกระทบต่อประชากรที่อาศัยอยู่ในชุมชนเหล่านั้น ในประเทศไทยมีหลายพื้นที่ที่พบมีการปนเปื้อนของโลหะหนักโดยเฉพาะบริเวณที่เป็นแหล่งนิคมอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น น้ำเสียที่ปล่อยจากนิคมอุตสาหกรรม จังหวัดระยองและนิคมอุตสาหกรรมจังหวัดปทุมธานีพบมีการปนเปื้อนของโลหะหนัก เช่น นิกเกิลและสังกะสี ในปริมาณสูง มีการปนเปื้อนของแคดเมียมใกล้พื้นที่บริเวณ โรงงานอุตสาหกรรมที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก (Juwa *et al.*, 2008) มีการปนเปื้อนของสารตะกั่วในลำห้วยคลิตี้ล่าง ที่อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี (ชวิพรรณ และ ภนิดดา, 2551) ส่งผลทำให้เกิดมีการปนเปื้อนของสารพิษโลหะหนักในตะกอนดิน และแหล่งน้ำตามธรรมชาติเกินค่ามาตรฐานสิ่งแวดล้อมและค่าที่อนุญาตให้มีการบริโภค มีผลเสียต่อระบบนิเวศวิทยาและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชนที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้น

Bioremediation เป็นการนำวิธีทางชีวภาพโดยเฉพาะจุลินทรีย์มาใช้ในการบำบัดสารเคมี น้ำมันและโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม (Bonaventura & Johnson, 1997) ในการกำจัดโลหะหนักมีหลายวิธีที่ใช้ศึกษาและทดลองอยู่ในห้องปฏิบัติการเช่น การศึกษาคัดแยกจุลินทรีย์ที่ทนต่อโลหะหนักจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนเพื่อนำมาช่วยในการกำจัดโลหะหนัก (Pepi *et al.*, 2007; Haferburg & Kothe 2007; De *et al.*, 2008; Rehman, *et al.*, 2008) วิธี Phytoremediation ซึ่งเป็นการทดลองใช้พืชที่ทนต่อโลหะหนักและสามารถสะสมโลหะหนักมา

ช่วยบำบัดโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม (Gleba *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2007; Arshad *et al.*, 2008; Lone *et al.*, 2008) การใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียโดยเฉพาะพวก Rhizobacteria มาช่วยในการส่งเสริมการกำจัดโลหะหนัก (Glick, 2005; Khan, 2006; Rani *et al.*, 2008)

ปัจจุบันมีความพยายามในการนำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular biology) และพันธุวิศวกรรม (DNA engineering) มาพัฒนาเพื่อช่วยลดความเป็นพิษ และช่วยในการกำจัดโลหะหนักชนิดต่างๆ จากสิ่งแวดล้อม เช่น การทดลองใช้แบคทีเรียที่ผ่านขั้นตอนทางพันธุวิศวกรรมมาใช้หรือใช้ร่วมกับพืชในการกำจัดโลหะหนัก หรือการศึกษาให้แบคทีเรียที่มีการ express microbial cell surface ของโปรตีนที่จำเพาะมาใช้ในการดูดซับสารและโลหะหนัก (Wu, *et al.*, 2006; Zhuang, *et al.*, 2007; Saleem *et al.*, 2008) Heavy metal binding protein คือโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักชนิดต่างๆ ได้อย่างจำเพาะ เช่น Heavy metal binding domain ที่มี CxxC motif ของโปรตีน CopA และ metallochaperone จาก *S. aureus* สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับคอปเปอร์ โคบอลต์ และแคดเมียม (Sittisak *et al.*, 2007) และ metal binding peptide ที่มี sequence เป็น Gly-His-His-Pro-His-Gly (HP) และ Gly-Cys-Gly-Cys-Pro-Cys-Gly-Cys-Gly (CP) สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโลหะหนักแคดเมียม (Kotrba *et al.*, 1999) โปรตีนที่มี Histidine-rich metal binding domain สามารถจับกับคอปเปอร์ได้อย่างจำเพาะ (Battistoni *et al.*, 2001) การศึกษาจนถึงปัจจุบันนี้พบ Heavy metal binding protein ได้หลายชนิด เช่น cysteine rich-metallothioneins (MTs) (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Gupta *et al.*, 2002) Glutathione (GSH) (Penninckx, 2002) และ GSH-related phytochelatin (PCs) (Cobbett & Goldsbrough, 2002) โดย Metallothioneins เป็นโปรตีนขนาดเล็กจากพืชสัตว์และจุลินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำขนาดประมาณ 6.5 kDa,

61-62 amino acid residues โดยมี amino acid พวก cysteine ประกอบอยู่(Cobett & Goldsbrough, 2002; Vasak, 2005) ส่วนพวก Glutathione (GSH: L-gamma-glutamyl-L-cysteinylglycine) เป็นเปปไทด์ที่จับกับโลหะหนักได้โดย Reduced glutathione (GSH)สามารถ form stable complexes ได้ทั้งกับ hard และ soft metal ions (Krezel & Bal, 1999) GSH-related phytochelatin (PCs) เป็น enzymatically synthesized peptides ที่โครงสร้างประกอบด้วย Glu-Cys จึงมีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักได้ดีกว่าพวก Metallothioneins (Mehra & Mulchandani, 1995; Cobett & Goldsbrough, 2002) นอกจากนี้ synthetic phytochelatin (Ecn) ยังถูกนำมาศึกษาและพบว่าสามารถช่วยเพิ่มการสะสมของโลหะหนักได้ (Bae *et al.*, 2001)

ปัจจุบันมีความพยายามหลายวิธีเพื่อช่วยกำจัดโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม เช่นการใช้พืชหรือจุลินทรีย์หรือใช้พืชร่วมกับจุลินทรีย์มาช่วยในการกำจัดโดยให้มีการสะสมโลหะหนัก (Bioaccumulation) ในเซลล์ของพืชหรือจุลินทรีย์เหล่านั้น โดยในธรรมชาติพบพืชและจุลินทรีย์สามารถสร้างโปรตีนที่มีคุณสมบัติจับกับโลหะหนัก (Heavy metal binding protein) ได้หลายชนิด เช่น โปรตีนที่มี Histidine-rich metal binding domain, cysteine rich-metallothioneins (MTs), Glutathione (GSH) และ GSH-related phytochelatin (PCs) จากความก้าวหน้าของเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในปัจจุบันจึงมีการพัฒนานำเอาเทคนิคทางเหล่านี้มาศึกษาเพื่อช่วยในการกำจัดโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม มีการตัดต่อยีนที่จับกับโลหะหนักได้ใส่ในแบคทีเรียหรือพืช และนำไปศึกษาการกำจัดโลหะหนักได้ในระดับห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาในระดับโมเลกุลเกี่ยวกับความเป็นไปได้ในการใช้ purified โปรตีนที่ได้จาก Heavy

metal binding domain มาต่อรวมกันและศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนในการจับกับโลหะหนัก รวมทั้งปัจจัยอื่นๆที่อาจมีผลต่อการจับของโลหะหนักชนิดต่างๆ กับโปรตีน

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียที่มีความทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆรวมทั้งโลหะหนักได้ดีโดย ในแบคทีเรีย *S. aureus* จะพบ Heavy metal binding domain ที่ N-terminal ของโปรตีน copper-transporting ATPase ซึ่งมีทั้งที่เป็นแบบ Histidine-rich metal binding domain และ cysteine rich- metal binding domain ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีจุดประสงค์ที่ต้องการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของ Heavy metal binding domain และศึกษาคุณสมบัติและปัจจัยในการจับกับโลหะหนักของโปรตีนนี้และความรู้จากงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำ heavy metal binding fusion protein มาใช้เป็นประโยชน์ในการผลิตสารดูดซับโลหะหนักหรือสารกรองโลหะหนักที่ปนเปื้อนในธรรมชาติในอนาคต