

**ENZYME INHIBITION OF *BACILLUS CEREUS*
AS A TOOL FOR WATER TOXICITY TESTING**

KANNIKAR SUBRUNGRUENG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(APPROPRIATE TECHNOLOGY FOR RESOURCES
AND ENVIRONMENTAL DEVELOPMENT)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005**

**ISBN 974-04-5962-5
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การใช้การยับยั้งเอนไซม์ของ *Bacillus cereus* ในการทดสอบความเป็นพิษของน้ำ

ENZYME INHIBITION OF *BACILLUS CEREUS* AS A TOOL FOR WATER TOXICITY TESTING

กรรณิการ์ ทรัพย์รุ่งเรือง 4436170 ENAT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พัฒน ทวีโภค, Ph.D. (ECOTOXICOLOGY), จำลอง อรุณเลิศอารีย์ Ph.D. (FISHERIES), วิเทศ ศรีเนตร, D.Sc. (ENVIRONMENTAL CHEMISTRY)

บทคัดย่อ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ วิธี Dehydrogenase (DHA) และ Fluorescein Diacetate (FDA) methods ในการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีและน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยใช้ระดับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ dehydrogenase และ esterase ของ แบคทีเรีย *Bacillus cereus* เป็นตัวชี้วัดความเป็นพิษของวิธี DHA และ FDA ตามลำดับ ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทดลอง ซึ่งรวมถึง วิธีการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และระดับความเป็นกรดและด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมี เลือกสารเคมีที่ใช้ มาจาก 4 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มโลหะหนัก ได้แก่ ทองแดง แคลเซียม และสังกะสี กลุ่มตัวทำละลาย ได้แก่ เอทานอล และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ สารออกซิไดซ์ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กลุ่มสารอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ เบนซีน และ เฮกซะคลอร์ ส่วนน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ทำการเก็บตัวอย่างจากบ่อน้ำบาดาลน้ำเสีย ในเขตอุตสาหกรรม วงแหวนชัชวาลซอย 9 โครงการ 2 เขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร

จากผลการศึกษา พบว่า อายุและจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับวิธี DHA และ FDA มีความแตกต่างกัน โดยกรณีวิธี DHA คือ 8 ชั่วโมงและ 10^8 เซลล์ ส่วนวิธี FDA นั้นควรใช้แบคทีเรียอายุ 4 ชั่วโมง ที่ปริมาณความหนาแน่น 10^7 เซลล์ และพบว่าในระดับ pH 7-8 เป็นช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับวิธีแรก ส่วนวิธีที่สองนั้น พบว่า pH 7 เป็นช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

การทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีทั้ง 4 กลุ่ม พบว่าสารเคมีกลุ่มโลหะหนักมีความเป็นพิษต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมากที่สุด โดยวิธี DHA พบว่า แคลเซียม มีความเป็นพิษมากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.72 มก/ลิตร ส่วนวิธี FDA พบว่า ทองแดง มีความเป็นพิษมากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.08 มก/ลิตร ความเป็นพิษของกลุ่มสารเคมีเรียงลำดับได้ดังนี้ คือ กลุ่มโลหะหนัก > กลุ่มสารอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน > สารออกซิไดซ์ > กลุ่มตัวทำละลาย ยกเว้นเฮกซะคลอร์ซึ่งอยู่ในกลุ่มสารไฮโดรคาร์บอน ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้ คือ 1.2 มก/ลิตร ไม่สามารถตรวจวัดความเป็นพิษ สำหรับการทดสอบความไวของแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ต่อ โลหะหนัก แคลเซียม และ สังกะสี พบว่าแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการทำแห้งมีความไวในการตอบสนองความเป็นพิษของโลหะทั้งสองมากกว่าแบคทีเรียสด ส่วนการทดสอบความเป็นพิษของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมนั้นพบว่าวิธี FDA มีความไวต่อความเป็นพิษมากกว่าวิธี DHA โดยค่า IC_{50} สำหรับวิธีทั้งสอง คือ ความเข้มข้นน้ำตัวอย่างร้อยละ 8.83 และ 20.29 หรือ คิดเป็นค่า toxic unit เท่ากับ 11.32 และ 4.83 ตามลำดับ.

ความไวในการตอบสนองความเป็นพิษ ต่อโลหะหนัก ของวิธี DHA และ FDA แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้วิธีทั้งสองนี้เพื่อใช้ในการตรวจเบื้องต้นเพื่อหาการปนเปื้อนของสารในกลุ่มนี้ในแหล่งน้ำธรรมชาติ และน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งจะเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการทดสอบที่ปกติจำเป็นต้องใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปแบคทีเรีย ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดเป็นอย่างมาก แต่ในกรณีนี้ตัวอย่างมีระดับความเป็นกรด-ด่าง สูงหรือต่ำผิดปกติ การใช้วิธีทั้งสองจากการศึกษาค้นคว้านี้ เพื่อตรวจพิจารณาการปนเปื้อนของแหล่งน้ำนั้นอาจไม่เหมาะสม

ENZYME INHIBITION OF *BACILLUS CEREUS* AS A TOOL FOR WATER TOXICITY TESTING

KANNIKAR SUBRUNGRUENG 4436170 ENAT/M

M.Sc. (APPROPRIATE TECHNOLOGY FOR RESOURCES AND ENVIRONMENTAL DEVELOPMENT)

THESIS ADVISORS: PATANA THAVIPOKE, Ph.D. (ECOTOXICOLOGY), CHUMLONG ARUNLERTAREE, (FISHERIES), VITHET SRINETR, D.Sc. (ENVIRONMENTAL CHEMISTRY)

ABSTRACT

In the present study, the possibility of using Dehydrogenase (DHA) and Fluorescein Diacetate (FDA) method for assessing toxicity of chemicals and industrial effluent was evaluated. For both method, inhibition of enzyme activities, i.e. dehydrogenase and esterase, respectively, of bacteria *Bacillus cereus* were used as experimental end points. Conditions for the experiments, including cell preparation, initial cell numbers in inoculum, as well as pH levels of culture media were optimized. For toxicity testing of chemicals, four chemicals groups, including heavy metal i.e. copper, cadmium and zinc; solvents, i.e. dimethylsulfoxide (DMSO) and ethanol; an oxidizing agent i.e. hydrogenperoxide; and aromatic hydrocarbon, i.e. benzene and heptachlor were used. The industrial effluent sample was collected from the wastewater treatment plant in industrial Zone at Wongwaen Chatchawan Soi 9, Project 2, Bangkoktain, Bangkok.

The results showed that suitable incubation times and cell density for DHA and FDA methods were different. For DHA method, suitable incubating time and cell density were 8 hr and 10^8 cell/ ml, respectively, while 4 hours and 10^7 cell/ml were suitable for the FDA method. For both methods, pH levels of the culture media seemed to be critical for the result. The most suitable pH levels for the first method were between pH 7 to 8. The second method was more sensitive to pH change and only pH 7 showed no inhibitory effects to the results.

Results from toxicity testing of both test methods with the 4 chemicals groups indicated that heavy metal group was the most toxic group. For DHA method, cadmium had the highest inhibition effect with the $IC_{50} = 1.72$ mg/ l. However, for FDA method, copper was the most toxic with, $IC_{50} = 5.08$ mg/ l. The toxicity ranking of chemical groups was heavy metal group > aromatic hydrocarbon group > oxidizing agent > solvent group accordingly. One exception was heptachlor, which belongs to aromatic hydrocarbon group. At the maximum concentration that could be prepared, 1.2 mg/ l, no inhibitory effects was observed. Comparing the sensitivity of fresh and lyophilized bacteria on copper and zinc toxicity, the results showed that lyophilized cells were more sensitive to both metals than fresh bacteria cells. Toxicity assessment of the industrial effluent sample with both methods showed that the FDA method was more sensitive than the DHA method. The IC_{50} s were 8.83 % effluent for FDA and 20.29 % for DHA methods, which equivalent to 11.32 and 4.93 toxic units, respectively.

The high sensibility of the DHA and FDA toxicity test method to heavy metals indicated possibility of applying them for screening of heavy metal contamination in the environment and industrial effluent. This could greatly reduce cost of using commercially available bacterial test kits for the purpose. However, for toxicity assessment of environmental samples with unusually low or high pH level, the two methods presented here might not be suitable.

KEY WORDS: BACTERIAL ASSAY/ *BACILLUS CEREUS*/ ESTERASE/ DEHYDROGENASE/ ENZYME INHIBITION

120 pp. ISBN 974-04-5962-5