

**SIMPLIFIED AQUATIC TOXICITY TEST BASED ON  
FLUORESCIENT DIACETATE METHOD USING ESTERASE  
ACTIVITIES OF THE BACTERIA *BACILLUS CEREUS***



**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  
2009**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

A SIMPLIFIED AQUATIC TOXICITY TEST BASED ON FLUORESCIEIN DIACETATE METHOD USING ESTERASE ACTIVITIES OF THE BACTERIA *BACILLUS CEREUS*

APINAN SUANGOON 4736403 ENAT/M

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

THESIS ADVISORY COMMITTEE : PATANA THAVIPOKE (ENVIRONMENTAL PROTECTION TECHNOLOGY), CHULAPORN KAMNERDPETCH Dr. rer. nat. (TECHNISCHE CHEMIE), DUANGRAT INTHORN Ph.D. (PHARMACEUTICAL SCIENCE)

ABSTRACT

In the present study, the possibility of using Fluorescein Diacetate (FDA) method for assessing toxicity of chemicals in an aquatic environment was evaluated. Inhibition of enzyme esterase of bacteria *Bacillus cereus* was used as experimental end points. The optimum conditions for a toxicity test using a Fluorescein Diacetate (FDA) for assessing toxicity of chemicals, as well as the toxicity of four chemical groups were examined, including : 1) heavy metals cadmium and copper, 2) organic dye, 2,4 dinitrophenol, 3) the aromatic hydrocarbon benzene, and 4) solvents ethanol and DMSO. Comparisons of esterase inhibition observed from different cell cultures of *Bacillus cereus*, i.e. fresh cell and lyophilized cell in response to toxics of the four chemical groups, were also performed.

The results showed that the suitable incubation time and viable cell count for toxicity testing with the FDA method were 2 hours 30 minutes and  $3.5-4.5 \times 10^7$  CFUs/ ml, respectively. Results from toxicity testing of both fresh cell and lyophilized cell cultures with the 4 chemical groups indicated that the heavy metal group was the most toxic. The highest inhibition effect was found with copper. The toxic effect observed from fresh cell culture was  $IC_{50} = 1.12 \pm 0.33$  mg  $Cu^{2+}/l$ , while from lyophilized cell culture was  $IC_{50} = 1.46 \pm 0.40$  mg  $Cu^{2+}/l$ . The toxicity ranking of chemical groups on both fresh cell and lyophilized cell cultures, were heavy metal > organic dye > aromatic hydrocarbon > solvent, accordingly. Sensitivity comparison of fresh and lyophilized bacteria on the four reference chemical groups showed that fresh cell cultures of *Bacillus cereus* seemed to be more sensitive to toxicity than lyophilized cell cultures. The high sensitivity to heavy metal of the FDA toxicity test using *Bacillus cereus* indicated a good possibility exists for applying to screening for heavy metal contamination in the environment. This could greatly reduce the cost of using commercially available bacteria test kits for such a purpose.

KEY WORDS : *BACILLUS CEREUS*/ ESTERASE INHIBITION/ LYOPHILIZED CELLS

79 page

วิธีการอย่างง่าย สำหรับทดสอบความเป็นพิษของแหล่งน้ำ ตามวิธี FLUORESCIEN DIACETATE โดยการใช้  
ปฏิกิริยา ของเอสเทอเรส ในแบคทีเรีย *Bacillus cereus*

SIMPLIFIED AQUATIC TOXICITY TEST BASED ON FLUORESCIEN DIACETATE METHOD USING  
ESTERASE ACTIVITIES OF THE BACTERIA *BACILLUS CEREUS*

อภิสิทธิ์ สวนกุล 4736403 ENAT/M

วท.ม.(เทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : พัฒน ทวีโชค, Ph.D. (ENVIRONMENTAL PROTECTION TECHNOLOGY),  
จุฬารัตน์ กำเนิดเพชร, Dr. rer. nat. (TECHNISCHE CHEMIE), ดวงรัตน์ อินทร, Ph.D. (PHARMACEUTICAL  
SCIENCE)

#### บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ Fluorescein Diacetate (FDA) method ในการ  
ทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีในแหล่งน้ำ โดยใช้ระดับการยับยั้งเอนไซม์ esterase ของ แบคทีเรีย *Bacillus cereus*  
เป็นตัวชี้วัดความเป็นพิษ ทำการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีด้วยวิธี FDA  
รวมถึงทำการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีใน 4 กลุ่มใหญ่ คือ 1) กลุ่มโลหะหนัก ได้แก่ ทองแดง แคดเมียม 2)  
กลุ่มสี้อมที่เป็นสารอินทรีย์ ได้แก่ 2-4 dinitrophenol 3) กลุ่มสารอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ เบนซีน และ 4)  
กลุ่มตัวทำละลาย ได้แก่ เอทานอล และ DMSO นอกจากนี้ยังทำการศึกษาเปรียบเทียบความไวต่อการตอบสนองต่อ  
ความเป็นพิษของตัวแทนสารเคมีทั้ง 4 กลุ่ม ของเซลล์แบคทีเรียสด และเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการทำแห้ง  
แบบเยือกแข็ง

จากผลการศึกษา พบว่า ช่วงเวลาในการบ่มเชื้อ และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ที่เหมาะสมสำหรับวิธี FDA  
คือ 2 ชั่วโมง 30 นาที และ  $3.5-4.5 \times 10^7$  CFUs/ มล ตามลำดับ สำหรับผลการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีทั้ง 4  
กลุ่ม ต่อเซลล์สดและเซลล์ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยพบว่า ทองแดง มีความเป็นพิษมากที่สุด โดย  
มีค่า  $IC_{50}$  สำหรับเซลล์สด เท่ากับ  $1.12 \pm 0.33$  มก/ ลิตร ขณะที่ค่าความเป็นพิษ ( $IC_{50}$ ) ของทองแดงต่อเซลล์ที่ผ่าน  
กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $1.46 \pm 0.40$  มก  $Cu^{2+}$ / ลิตร. โดยสามารถเรียงลำดับค่าความเป็น  
พิษของกลุ่มสารเคมีทั้งต่อเซลล์สดและเซลล์ที่ผ่านกระบวนการทำแห้ง ได้ดังนี้ คือ กลุ่มโลหะหนัก > กลุ่มสี้อม  
อินทรีย์ > กลุ่มสารอโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน > กลุ่มตัวทำละลาย สำหรับการเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์  
แบคทีเรียสดกับเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าแบคทีเรียสดมีแนวโน้มไวในการ  
ตอบสนองต่อความเป็นพิษของสารเคมีที่ใช้ทดสอบมากกว่าแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ความไวในการตอบสนองความเป็นพิษ ต่อสารในกลุ่มโลหะหนัก ของวิธี FDA ที่ใช้เชื้อ *Bacillus*  
*cereus* แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้นในการหาการ  
ปนเปื้อนของโลหะหนักในแหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งจะลดค่าใช้จ่ายในกรณีที่ต้องซื้อชุดทดสอบสำเร็จรูปในตลาด