

หัวข้อคุณูปการ

การจำแนกลักษณะและการประเมินกลไกในการลดความเป็นพิษของแบคทีเรียต้านทานอาร์ซีนิกและผลของเชื้อต่อการสะสมอาร์ซีนิกในแครอท

ผู้เขียน

นางสาว ยุพา จอมแก้ว

ปริญญา

วิทยาศาสตร์สุขภาพบัณฑิต

(ปฐพีศาสตร์และการจัดการทรัพยากรธรรมชาติ)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ผศ. ดร.อรรณณ นัทรสิริรุ่ง

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

อ. ดร.ฐาติ สันทรทรัพย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รศ. ดร.พิทยา สรวณศิริ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

อาร์ซีนิกเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูงมาก พบแพร่กระจายในดินที่ปลูกพืชทั่วโลก ดังนั้นจึงมีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหาร อาร์ซีนิกทำให้เกิดผลด้านลบหลายประการต่อสุขภาพของมนุษย์ด้วยเหตุนี้จึงก่อให้เกิดกระแสความห่วงใยอย่างมากต่อทั้งสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์ ในประเทศไทย ความเข้มข้นของอาร์ซีนิกที่มีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐานของสำนักงานสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ (3.9 mg/kg) พบในดินที่ใช้ในการเกษตรกรรมหลายแห่งรวมถึงบนพื้นที่สูงทางภาคเหนือ การทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการแยก และ คัดกรองแบคทีเรียต้านทานอาร์ซีนิกซึ่งสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปของอาร์ซีนิกได้ การประเมินกลไกในการลดความเป็นพิษและความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียไอโซเลตต้านทานอาร์ซีนิกสูงแล้วจึงนำไอโซเลตคัดเลือกรมาทำการวิเคราะห์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) และนำไปทดสอบผลต่อการเปลี่ยนรูปของอาร์ซีนิกในดิน และการสะสมของอาร์ซีนิกในแครอท ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ดินเกษตรกรรมบนพื้นที่สูงของภาคเหนือในประเทศไทย (พื้นที่: 1) พระบาทห้วยต้ม 2) ปางตะ 3) หุ่นเริง 4) แม่แสบ 5) อ่างช้าง 6) วาวี และ 7) สบโขง) มีค่าความเข้มข้นของอาร์ซีนิก (5.45 ถึง 39.48 mg/kg) สูงกว่าค่ามาตรฐาน (3.9 mg/kg) ผลการแยกเชื้อได้แบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 40 ไอโซเลต หลังจากการคัดกรองเบื้องต้นพบว่ามีเพียง 9 ไอโซเลต เท่านั้นที่ถือว่าเป็นเชื้อต้านทานอาร์ซีนิก (sodium arsenite: Na-As(III)) ที่หลายระดับความเข้มข้นภายใต้ค่าพีเอชต่ำ (pH 4.5 และ 4.7) โดยมีค่า MIC เท่ากับ 40 mM หลังจากการคัดกรองครั้งที่สองพบว่ามีเพียง 4 ไอโซเลตเท่านั้นคือ BAs8, BAs11, BAs19 และ BAs29 ที่มีความสามารถโดดเด่นในการต้านทาน

อาร์จีนิกภายใต้ค่าพีเอชที่หลากหลาย ดังนั้นจึงได้คัดเลือกเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ไอโซเลท BAs7 ซึ่งอ่อนไหวต่ออาร์จีนิกในสภาพ พีเอชต่ำ ดังนั้นจึงได้คัดเลือกเพื่อทดสอบความคู่กับ ไอโซเลทด้านทานอาร์จีนิก ไอโซเลทด้านทานอาร์จีนิกทุกตัวมีกระบวนการออกซิเดชันและเปลี่ยนรูป As(III) ไปเป็น As(V) ผลการวัดการเปลี่ยนรูปอาร์จีนิกแสดงให้เห็นว่า BAs29 แสดงความสามารถสูงสุดในการต้านทานและมีเปอร์เซ็นต์เปลี่ยนรูปสูงสุดคือ 64.5% ไอโซเลทด้านทานอาร์จีนิกสูงทำให้ค่าพีเอชในอาหารเหลวเพิ่มจาก 4.7 เป็นประมาณ $7 > 8.0$ ไอโซเลท BAs7 ซึ่งอ่อนไหวต่ออาร์จีนิกไม่สามารถเพิ่มค่าพีเอชของอาหารได้ ดังนั้นการที่ค่าพีเอชในอาหารถูกเพิ่มขึ้นสูงใกล้ค่าที่เป็นกลาง/ด่าง อาจมีความจำเป็นเพื่อให้การออกซิไดซ์รูปที่เป็นพิษสูงของอาร์จีนิก (อาร์จีนิกใน: As(III)) เป็นรูปที่มีความเป็นพิษน้อยลง (อาร์จีนิกใน: As(V)) มีประสิทธิภาพสูง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นเด่นชัดถึงกลไกเพื่อความอยู่รอดของเชื้อ 2 กลไก (การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการออกซิเดชันของอาร์จีนิกใน) ของไอโซเลทด้านทานอาร์จีนิก และความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดระหว่างสภาพของค่าพีเอชของอาหาร และกระบวนการออกซิเดชันของ As(III)

ผลการประเมินความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียไอโซเลทที่ด้านทานอาร์จีนิกสูงพบว่า ทุกไอโซเลทสามารถละลายฟอสเฟต ไอโซเลทที่คัดเลือกมีศักยภาพสูงในการละลาย แคลเซียมฟอสเฟต (5.95 ถึง 100.04 mg P/L) และมีศักยภาพปานกลางในการผลิต IAA (9.36 ถึง 20.32 mg IAA/L) ความสามารถในการละลายแคลเซียมฟอสเฟตของแต่ละไอโซเลท เพิ่มขึ้น 2 ถึง 6 เท่าเมื่อสัมผัสกับสภาพที่มี As(III) ไอโซเลท BAs7 ซึ่งอ่อนไหวต่ออาร์จีนิกแสดงความสามารถสูงสุดในการละลายฟอสเฟตทั้งในอาหารที่มีและไม่มี As(III) (55.56 และ 100.04 mg/L, ตามลำดับ) ผลการทดลองนี้บ่งบอกถึงว่า การเพิ่มขึ้นของการละลายฟอสเฟตเป็นกลไกที่สำคัญอันหนึ่งที่จะกีดกันการดูดซึมอาร์จีนิกทำให้ลดความเป็นพิษลง การผลิต IAA ให้ผลการทดลองที่คล้ายคลึงกันจึงอาจเป็นอีกกลไกหนึ่งที่จัดการกับความเป็นพิษของอาร์จีนิก ผลการทดลองนี้ดูเหมือนว่าจะเป็นการรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับปรากฏการณ์ที่ชัดเจนนี้ นอกจากนี้ไอโซเลทด้านทานอาร์จีนิกยังเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอกและความยาวรากของเมล็ดคენาได้อีกด้วย ดังนั้นไอโซเลทดังกล่าวนี้สามารถนำไปใช้ในการบำบัดมลพิษของอาร์จีนิกทางชีวภาพ รวมทั้งการส่งเสริมการงอกของเมล็ด

การวิเคราะห์เชิงวงสวนวิวัฒนาการโดยวิธีการหาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA (16S rDNA) แสดงให้เห็นว่า 5 ไอโซเลทที่คัดเลือก จัดอยู่ใน 2 สกุลคือ *Bacillus* และ *Mycobacterium* โดยที่ไอโซเลท BAs7 และ BAs19 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (% similarity) 99% กับ *Bacillus stratosphericus*, BAs8 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้าย 98% กับ *Bacillus*

pumilus, BAs 29 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้าย 98% กับ *Bacillus altitudinis* และ BAs11 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้าย 99% กับ *Mycobacterium neoaurum* ผลการทดสอบเชิงคุณภาพโดยใช้ silver nitrate (AgNO_3) พบว่า BAs11 และ BAs29 มีความสามารถทั้งในการออกซิไดซ์อาร์ซีนิก และการรีดิวซ์อาร์ซีนิก ซึ่งแสดงให้เห็นความสามารถในการผลิตเอนไซม์ทั้ง arsenite oxidase และ arsenate reductase สำหรับ BAs8 และ BAs19 แสดงความสามารถเฉพาะการออกซิไดซ์อาร์ซีนิก ส่วนไอโซเลท BAs7 ซึ่งอ่อนไหวต่ออาร์ซีนิก ไม่มีความสามารถในการออกซิไดซ์อาร์ซีนิก แต่สามารถรีดิวซ์อาร์ซีนิกได้

ทำการประเมินผลของไอโซเลทที่คัดเลือกคือ BAs7, BAs11 และ BAs29 ต่อการเปลี่ยนรูปอาร์ซีนิกในดินปางคะ (ปริมาณอาร์ซีนิกเริ่มต้น = 17.14 mg/kg) และการสะสมอาร์ซีนิกในหัวและใบของแครอท ภายใต้สภาพที่ไม่ใส่ปุ๋ยและใส่ปุ๋ย นำดินปางคะของแต่ละกรรมวิธีมาบ่ม 15 วัน แล้วนำไปปลูกแครอทระยะเวลา 75 วัน หลังการเก็บเกี่ยว ผลการทดลองพบว่า ดินปางคะที่ใส่ BAs29, BAs11+Lime และ BAs29+Lime ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของอาร์ซีนิกมากที่สุด (24.88, 24.61 และ 24.29% ตามลำดับ) กรรมวิธี BAs29 และ BAs29+Lime ยังให้ค่าผลรวมของ As(V) สูงที่สุดในช่วงทั้งหมดของระยะการบ่ม (15+75 วัน) แสดงให้เห็นว่าไอโซเลทนี้สามารถออกซิไดซ์ As(III) ให้ไปเป็น As(V) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉลี่ยแล้วการใช้แบคทีเรียไอโซเลทด้านทานอาร์ซีนิกให้ค่าฟอสฟอรัสในดินต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม ในทางตรงข้ามกรรมวิธีที่มีการใส่ปุ๋ยให้ค่าฟอสฟอรัสสูงกว่ากรรมวิธีที่ไม่ใส่ปุ๋ย เนื่องจากอาร์ซีนิกสามารถเข้าไปสู่เซลล์พืชด้วยระบบเดียวกันกับฟอสเฟต ดังนั้นปรากฏการณ์นี้แสดงนัยยะของการดูดฟอสเฟตแทนอาร์ซีนิกเพื่อจัดการกับความเป็นพิษของอาร์ซีนิก ดินปางคะที่ใส่เชื้อ BAs29 ส่งผลให้ค่าการสะสมอาร์ซีนิกในใบต่ำที่สุด (0.025 mg/kg) ในขณะที่ BAs29 + Lime ให้ค่าการสะสมอาร์ซีนิกในหัวแครอทต่ำที่สุด (0.025 mg/kg) แบคทีเรียไอโซเลทด้านทานอาร์ซีนิกนอกจากจะทำให้ลดอาร์ซีนิกในดินและในแครอทแล้วยังช่วยเพิ่มชีวมวลและการดูดใช้ธาตุอาหารอีกด้วย การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ระดับของพีเอชและฟอสเฟต ในสภาพแวดล้อมหนึ่ง ๆ เป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับกลไกการลดความเป็นพิษของแบคทีเรียด้านทานอาร์ซีนิก ไอโซเลท BAs29 สามารถลดความเป็นพิษของอาร์ซีนิกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการบำบัดมลพิษทางชีวภาพซึ่งจะนำไปสู่การลดการสะสมอาร์ซีนิกในพืชสำหรับบริโภคได้

Dissertation Title Characterization and Evaluations of Detoxification Mechanisms of Arsenic Resistant Bacteria and Their Effects on Arsenic Accumulation in Carrot

Author Miss Yupa Chromkaew

Degree Doctor of Philosophy
(Soil Science and Natural Resources Management)

Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Arawan Shutsrirung	Advisor
Lect. Dr. Choochad Santasup	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Pittaya Sruamsiri	Co-advisor

ABSTRACT

Arsenic (As), a highly toxic heavy metal, is widely distributed in cultivated soils worldwide thus a high risk of food-chain contamination. Arsenic generates various adverse effects to human health and other living organisms leading to a much concern of both environment and human health. In Thailand, concentration of arsenic in soils that exceed the national environment standard (3.9 mg/kg) have been found in many cultivated soils including on highland areas of northern Thailand. Therefore, the present study was aimed to isolate and screen As resistant bacteria capable of performing arsenic transformation. Detoxification mechanisms and plant growth promoting ability of bacterial isolates were evaluated. Phylogenetic analysis of the high arsenic-resistant isolates was also performed. High As resistant isolates were selected and examined their effects on arsenic transformation in contaminated soil and As accumulation in carrot.

The results indicated that cultivated soils of highland areas of northern Thailand (Site: 1) Prabathhuaytom; 2) Pangda; 3) Tungroeng; 4) Maehae; 5) Angkhang 6) Vavee and 7) Sobkhong) showed higher concentration of arsenic (5.45 to 39.48 mg/kg) than the arsenic maximum concentration limits (MCL) (3.90 mg/kg). A total of 40 arsenic resistant isolates was obtained. After preliminary screening, only nine isolates were

resistant to various levels of arsenic (sodium arsenite: Na-As(III)) under low pH (4.5 and 4.7) with the MIC of 40 mM. After the second screening, only four isolates, i.e. BAs8, BAs11, BAs19 and BAs29 exhibited promising resistant ability under various pH values, thus were selected for further investigations. Moreover, BAs7 appeared to be sensitive to arsenic particularly under low pH values therefore it was selected to test along with the resistant isolates. Determination of arsenic transformation revealed that the oxidation of As(III) to As(V) was observed in all the high tolerant isolate. BAs29 exhibited the highest resistant ability with the maximum percentage of arsenite transformation 64.5%. High arsenic resistant isolates increased the pH of the broth medium from 4.7 to around 7 to > 8.0 while arsenic sensitive isolate (BAs7) was not able to increase the pH of the medium. Therefore, the raising of pH up to the value near to neutral/alkaline might be required for the effective oxidizing of the highly toxic form of arsenic (As(III)) into the less toxic form (As(V)). The results of this experiment highlighted the two survival mechanisms (pH changes and arsenite oxidation) of the arsenic resistant isolates and the close relationship between pH conditions of surrounding medium and As(III) oxidation process.

Plant growth promoting potential of the high resistant isolates was determined. The results showed that all the isolates were able to solubilize phosphate (P). The selected isolates showed a high potential to solubilize insoluble Ca-phosphate (5.95 to 100.04 mg P/L), and a moderate potential to produce IAA (9.36 to 20.32 mg IAA/L). The ability of each isolate to solubilize Ca-phosphate was increased 2 to 6 times when exposed to an arsenite environment. Arsenic-sensitive isolate, BAs7 showed the highest ability to solubilize Ca-phosphate in medium without and with arsenite (55.56 and 100.04 mg/L, respectively). The results implied that the increment of phosphate solubilization is an important mechanism to exclude arsenic uptake thus less toxicity. The similar results were found with IAA production and might also be another mechanism of bacteria to cope with arsenic toxicity. Our results seemed to be the first report on this clear phenomenon.

Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences indicated that the five selected isolates, representing two major bacterial genera; *Bacillus* and *Mycobacterium*. Isolates BAs7 and BAs19 showed 99% similarity to *Bacillus stratosphericus*, BAs8 showed 98% similarity to *Bacillus pumilus*, BAs 29 showed 98% similarity to *Bacillus*

altitudinis and BAs11 showed 99% similarity to *Mycobacterium neoaurum*. A qualitative silver nitrate (AgNO_3) indicated that isolates BAs11 and BAs29 exhibited both arsenite oxidizing as well as arsenate reducing abilities suggesting their ability in producing both arsenite oxidase and arsenate reductase enzymes. BAs8 and BAs19 showed only the ability to oxidize arsenite. A sensitive isolate, BAs7 was not able to oxidize arsenite and could only reduce arsenate.

The isolates BAs7, BAs11 and BAs29 were selected to evaluate their effects on arsenic transformation in Pangda soils (initial amount of As = 17.14 mg/kg) and arsenic accumulation in the roots and leaves of carrot under un-lime and liming conditions. Pangda soils under each respective treatment were incubated for 15 days then the soils were used to grow carrot for 75 days. The results indicated, after harvesting, that the soils treated with BAs29, BAs11+Lime and BAs29+Lime gave the highest As reducing percentage (24.88, 24.61 and 24.29%, respectively). Treatment BAs29 and BAs29+Lime also gave the highest sum values of As(V) for the entire period of incubation (15+75 days) suggesting that this isolate could effectively oxidize As(III) to As(V). On the average, the use of As-resistant bacterial isolates gave lower phosphorus (P) values than the controls. In contrast, the soil P values of treatments with liming were higher than treatments without liming. Since, arsenate can enter the plant cell through the same system as phosphate therefore, this phenomenon implied the uptake of phosphate instead of As to cope with toxicity. Pangda soils treated with BAs29 gave the lowest value of As accumulations in leaves (0.025 mg/kg) while BAs29 + Lime gave the lowest value of As accumulations in the storage roots (0.025 mg/kg). In addition, the use of As-resistant isolates not only reduced As in soils and in carrot but also increase biomass and nutrients uptake. The present study revealed that the pH and phosphate levels in a specific environment are of important factors for effective detoxification mechanisms by As-resistant bacterial. The isolate BAs29 exhibited effective As detoxification thus can be used as a promising microorganisms for bioremediation which can led to less As accumulation in edible crops.