

Abstract (บทคัดย่อ)

Mechanisms of cadmium ions toxicity in microorganisms and their responses have successfully been investigated. Proteomic profiles of *Escherichia coli* (*E. coli*) upon exposure to 0.2 mM cadmium ions were studied. In parallel, engineered cells expressing polyhistidine on the outer membrane or cytoplasmic polyhistidine were applied to prove the roles of reduction of metal uptake or intracellular metal complexation. Changes of aconitase, elongation factor-Ts, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and protein-disulfide isomerase were found in both control and engineered *E. coli*. Meanwhile, expression of polyhistidine on the membrane mediated down-regulation of H⁺-transporting ATPase, succinate dehydrogenase and glycerol kinase and up-regulation of Mn-SOD. Expression of cytoplasmic polyhistidine led to decreasing of Mn-SOD, succinyl-Co-A synthetase and outer membrane protein together with increased expression of glycerol kinase. Such adaptations were concluded and further compared with environmental bacteria. Bacteria from 41 sites were isolated and identified by MALDI-Biotypers. Four kinds of bacteria demonstrated high resistance against cadmium ions as follows: *Morganella morganii* (1.6 mM) ~ *Pseudomonas aeruginosa* (1.6 mM) > *Enterobacter cloacae* (0.8 mM) ~ *Aeromonas hydrophila* (0.8 mM). *Enterobacter cloacae* was selected to study the mechanism of cells in response to cadmium. Growth curves and cadmium accumulation capability of the isolated bacteria were subsequently investigated and compared with the control laboratory strains. Intracellular cadmium contents after 1-hour incubation with subtoxic doses of cadmium ions at 0.02 and 0.2 mM were determined by atomic absorption spectrophotometry. Cadmium accumulations in environmental strains were higher than those of the lab stain. 2-DE showed that many pathways e.g protein folding, protein synthesis, energy metabolism pathway and transportation were accounted for bacterial adaptation in response to cadmium. Up-regulation of the cadmium-binding proteins were observed in the highest cadmium-accumulated strain of *Enterobacter cloacae* EN01. Moreover, metal-responsive proteins were also identified and proposed as candidate biomarkers for metal monitoring and bioremediation in the future.

Keywords: cadmium stress, polyhistidine, proteomics, metal complexation, outer membrane protein, environmental bacteria

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีในการวิเคราะห์บทบาทความเป็นพิษของไอออนโลหะแคดเมียมที่มีต่อจุลชีพ รวมถึงการศึกษากการตอบสนองของจุลชีพที่มีต่อไอออนเหล่านั้นโดยอาศัยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ โดยโมเดลที่ใช้ในการศึกษาในระยะแรก คือ การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) ในสถานะที่มีไอออนของโลหะแคดเมียมความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ นอกจากนั้น เพื่อเป็นการศึกษาเปรียบเทียบกลไกการตอบสนองในเชิงลึก ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้มีการใช้เซลล์ *E. coli* ที่มีการดัดแปลงให้แสดงออกเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการจับกับไอออนโลหะที่มีส่วนประกอบของกรดอะมิโนชนิดฮิสทีดีน ทั้งในลักษณะที่แสดงออกบนผิวเซลล์ (Outer membrane protein) หรือแสดงออกในไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic protein) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการดักจับไอออนไว้บริเวณผิวเซลล์เพื่อลดการผ่านเข้าสู่เซลล์ หรือใช้ในการจับกับไอออนของโลหะในลักษณะสารประกอบเชิงซ้อนภายในไซโตพลาสซึมตามลำดับ จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิด อาทิ aconitase, elongation factor-Ts, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase และ protein-disulfide isomerase ในเซลล์ควบคุมและเซลล์ที่ดัดแปลง ซึ่งพบว่า เซลล์ที่มีเปปไทด์ฮิสทีดีนบนผิวเซลล์ลดการแสดงออกของโปรตีนที่ชื่อว่า H⁺-transporting ATPase, succinate dehydrogenase และ glycerol kinase และมีการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ Mn-SOD ในขณะที่ พบมีการลดการแสดงออกของเอนไซม์ชนิดนี้ ร่วมกับ succinyl-Co-A synthetase และ outer membrane protein และมีการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ glycerol kinase ในเซลล์ที่แสดงออกเปปไทด์ในไซโตพลาสซึม โดยกระบวนการปรับตัวและการตอบสนองของเซลล์เหล่านี้ถูกวิเคราะห์และสรุปผลเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบกับ การตอบสนองของแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม โดยในงานวิจัยชิ้นนี้มีการแยกแบคทีเรียจาก 41 แหล่งและชนิดของแบคทีเรียเหล่านี้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย MALDI-Biotypers ซึ่งพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 4 ชนิดที่มีความสามารถในการทนต่อพิษของไอออนแคดเมียมในปริมาณที่สูง ดังนี้ *Morganella morganii* และ *Pseudomonas aeruginosa* ทนได้ถึง 1.6 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ *Enterobacter cloacae* และ *Aeromonas hydrophila* ทนได้ที่ 0.8 มิลลิโมลาร์ และเมื่อทำการนำเชื้อ *Enterobacter cloacae* มาศึกษาการตอบสนองต่อโลหะแคดเมียมในรายละเอียดทั้งการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโต และศักยภาพในการดูดซับไอออนโลหะแคดเมียม (Cadmium accumulation) โดยเป็นการวิเคราะห์ปริมาณไอออนของแคดเมียมที่ถูกดูดซับและเก็บไว้ในเซลล์โดยใช้เทคนิค Atomic Absorption Spectrophotometry ภายหลังเวลา 1 ชั่วโมงในสถานะที่มีความเข้มข้นของไอออนแคดเมียมที่ 0.02 และ 0.2 มิลลิโมลาร์ จากผลการวิจัยพบว่า ศักยภาพในการดูดซับโลหะของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมสูงกว่าเชื้อที่เป็นสายพันธุ์ควบคุม และจากผลการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์แสดงให้เห็นว่า มีกลไกหลายชนิดที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์ ได้แก่ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการม้วนตัว (protein folding), protein synthesis, energy metabolism pathway และ transportation นอกจากนั้น ยังพบมีการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการจับกับไอออนโลหะแคดเมียม (Cadmium-binding proteins) ในเชื้อ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN01 ที่มีความสามารถในการดูดซับโลหะได้สูงที่สุด ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ถูกนำมาวิเคราะห์จำแนกชนิดเพื่อประเมินศักยภาพและความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ ในลักษณะเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) การปนเปื้อนไอออนของโลหะ รวมไปถึงการใช้เซลล์เหล่านี้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมในอนาคตต่อไป