

การกำจัดแคดเมียมที่ละลายในน้ำโดยแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

นางสาวอณิชา เลื่องชัยเชวง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-521-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# REMOVAL OF SOLUBLE CADMIUM BY BACTERIAL ISOLATES



Miss Anicha Luengchaichawang

สถาบันวิทยบริการ

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

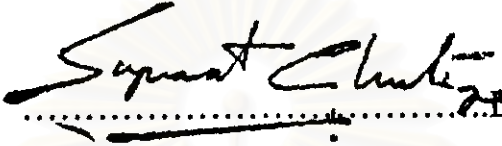
Academic Year 1998

ISBN 974-332-521-2

Thesis Title      Removal of Soluble Cadmium by Bacterial Isolates  
By                      Miss Anicha Luengchaichawang  
Programme        Biotechnology  
Thesis Advisor   Assistant Professor Pin-Chawee Vejjanukroh, Ph.D.

---


Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in  
Partial Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree.


  
.....Dean of Graduate School  
( Professor Supawat Chutivongse, M.D. )

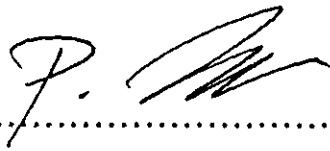
Thesis Committee

  
.....Chairman  
( Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D. )

  
.....Thesis Advisor  
( Assistant Professor Pin-Chawee Vejjanukroh, Ph.D. )

  
.....Member  
( Associate Professor Chaufah Thongthai, Ph.D. )

  
.....Member  
( Assistant Professor Chanwit Kosittanon, Ph.D. )

  
.....Member  
( Pienpak Tasakorn, Ph.D. )

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

อนิชา เลื่องชัยเชวง : การกำจัดโลหะแคดเมียมที่ละลายในน้ำโดยแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ (REMOVAL OF SOLUBLE CADMIUM BY BACTERIAL ISOLATES). อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ปิ่น-จวี เวชชานุเคราะห์; 121 หน้า. ISBN 974-332-521-2.

แบคทีเรียที่สามารถทนแคดเมียมจำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งคัดมาจากแบคทีเรียที่สามารถทนแคดเมียมได้ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มก./มล) จำนวน 346 สายพันธุ์ โดยให้ชื่อสายพันธุ์คัด ดังนี้ CdR-87, CdR-98, CdR-205, CdR-207 และ CdR-273 ที่มีความทนทานต่อแคดเมียมได้ดังนี้ 500, 400, 750, 400 และ 750 มก./มล. ตามลำดับ และสามารถสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharide, EPS) จากผลการตรวจสอบพบว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม *Enterobacter* sp. การเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์คัดเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH ระหว่าง 5-9 ณ อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส จะทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดี และสามารถสร้าง EPS ได้สูงขึ้นด้วย (จาก 1 เป็น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมเซลล์) แบคทีเรียจะสร้าง EPS ได้ปริมาณสูงกว่าเดิมถ้าเพิ่มเวลาการเพาะเชื้อให้มากขึ้น แต่การเติมแคดเมียมลงในอาหารเพาะเชื้อ กลับมีผลทำให้สายพันธุ์คัดส่วนใหญ่สร้าง EPS ได้น้อยลง การดูดซับแคดเมียมจะเพิ่มสูงขึ้น ถ้าเพิ่มปริมาณแคดเมียมในสารละลายจาก 10 เป็น 50 และ 100 มก./มล. แต่กลับทำให้อัตราร้อยละของการดูดซับลดลง เมื่อทำการตรึงเซลล์สายพันธุ์คัดด้วยแคลเซียมแอลจีเนต พบว่าอัตราร้อยละการดูดซับเพิ่มมากกว่า 90 ทั้งนี้มีผลมาจากการดูดซับของสารตรึงหรือ แคลเซียมแอลจีเนตด้วยอัตราการดูดซับจะมากในช่วง 10 นาทีแรก และจะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนถึง 30 นาที เมื่อนำเซลล์สายพันธุ์คัดที่ถูกดึงกลับมาใช้ดูดซับหรือกำจัดแคดเมียมซ้ำอีกเป็นครั้งที่ 2 และ 3 พบว่า ประสิทธิภาพในการดูดซับลดลง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา .....  
สาขาวิชา .....เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....  
ปีการศึกษา ..... 2541 .....

ลายมือชื่อนิสิต ..... อนิชา เลื่องชัยเชวง .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... ปิ่น-จวี เวชชานุเคราะห์ .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## C827194 : MAJOR BIOTECHNOLOGY  
KEY WORD: CADMIUM/ BACTERIA/ EXOPOLYSACCHARIDE  
ANICHA LUENGCHAICHAWANG : REMOVAL OF SOLUBLE CADMIUM BY BACTERIAL ISOLATES. THESIS  
ADVISOR : ASSIST. PROF. PIN-CHAWEE VEJIANUKROH, Ph.D. 121 pp. ISBN 974-332-521-2.

Five of 346 strains of cadmium-resistant isolates (100 µg/ml) were selected and named CdR-87, CdR-98, CdR-205, CdR-207 and CdR-273. They produced exopolysaccharides and resisted cadmium at the concentration of 500, 400, 750, 400 and 750 ( µg/ml ), respectively. By some identification tests, they might be classified as *Enterobacter sp.* Optimum pH and optimum temperature for growth and EPS production of those test bacterial isolates were 5-9 and 30-40 °C, respectively. In addition, the long incubation period ( from 24h to 72h ) of these culture resulted in the higher production of EPS ( from 1 to 30 mg per mg cells ). In contrast, addition of cadmium into the medium reduced the amount of EPS production of most of the bacterial isolates. When the Cd concentrations were increased from 10 to 50 and 100 µg/ml, Cd uptakes were found to be increased but the percentages of uptake were decreased. Immobilization of cells of those isolates with calcium alginate was performing the percentage of Cd biosorption by EPS was more than 90. However, the effect of calcium alginate alone on Cd absorption could not be excluded. The rate of Cs absorption was very rapid during the first 10 minutes of the interaction, Regeneration of immobilized cell was performed two to three times. It was found that the efficient of EPS in Cd absorption was decreased. Those bacterial isolates might be suitable for further investigations in the removal of soluble Cd.

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา \_\_\_\_\_

ลายมือชื่อนิสิต: Anicha. Luengchaichawang

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ \_\_\_\_\_

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา: P.-C. Vejjanukroh

ปีการศึกษา 2541

ลายมือชื่อคณาจารย์ที่ปรึกษาร่วม \_\_\_\_\_

## ACKNOWLEDGEMENT



I wish to express my utmost appreciation and sincere gratitude to my thesis advisor, Assistant Professor Dr. Pin-Chawee Vejjanukroh, for her valuable suggestion, assistance, guidance, time spent discussing on various aspects, and strong encouragement during the thesis work.

It is a pleasure to acknowledge the Department of General Science, Faculty of Science and the Scientific and Technological Instrument Center, Chulalongkorn University, for offering laboratory facilities in this research.

I would like to express my appreciation to Assistant Professor Dr. Vichien Rimphanitchayakit, Associate Professor Dr. Chaufah Thongthai, Assistant Professor Dr. Chanwit Kosittanon and Dr. Pienpak Tasakorn the member of thesis committee, for their valuable advice.

I must thank the following people and friends for their help and encouragement Assistant Professor Dr. Jariya Suchareekul, Mr. Supawin Watcharamul, Mr. Torpaw Channarong, Ms. Nuttanun Pusri, Ms. Benjamas Akkaramhapanich, Ms. Suda Ittisupornrat, Ms. Kongnita Keayniyom, Ms. Siriporn Taveepong-atikul, MS. Thanya panritdum, Mr. Amorn Ovadvorakit and all staff at the Department of General Science.

I am grateful for the financial support from National Science and Technology Development Agency for the studying research work.

As the last opportunity, I would like to express the wholeheartedly thanks and appreciation to Mr. Chatchai and Mrs. Korawan Luengchaichawang and my family for their support and encouragement.



# CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	v
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLE.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATION.....	xiv
CHAPTER	
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Objective.....	4
1.2 Scope of the Study.....	5
1.3 Anticipated Benefits.....	5
2. LITERATURE REVIEW.....	6
2.1 Physical and Chemical Properties of Cadmium.....	6
2.2 Application of Cadmium.....	7
2.2.1 Electroplating or Anticorrosive Coating.....	7
2.2.2 Pigments .....	8
2.2.3 Plastics Stabilizers.....	8
2.2.4 Alloy.....	8
2.2.5 Nickle-Cadmium Batteries.....	9
2.2.6 Miscellaneous.....	9
2.3 Problems and Toxicity of Cadmium.....	10
2.3.1 Effect on Kidney.....	11
2.3.2 Effect on Gastrointestinal Tract.....	11

## CONTENTS (CONT.)

	<b>Page</b>
2.3.3 Effect on Respiratory System.....	11
2.3.4 Effect of Circular System.....	12
2.4 Physico-Chemical and Biological Treatment.....	12
2.4.1 Physico-Chemical Treatment.....	12
2.4.1.1 Precipitation.....	12
2.4.1.2 Oxidation-Reduction.....	14
2.4.1.3 Ion Exchange.....	15
2.4.1.4 Sedimentation.....	16
2.4.1.5 Flotation.....	16
2.4.1.6 Filtration.....	16
2.4.1.7 Adsorption.....	17
2.4.2 Biological Treatments.....	18
2.5 Mechanism of Metal Resistant in Microorganism.....	18
2.5.1 Metals Transformation.....	18
2.5.2 Efflux System.....	19
2.5.3 Accumulation.....	23
2.5.3.1 By Cell walls .....	23
2.5.3.2 Sulfide .....	25
2.5.3.3 Siderophore.....	26
2.5.3.4 Binding Protein.....	27
2.5.3.5 Exopolysaccharides.....	28
2.6 Exopolysaccharides.....	29
2.6.1 Introduction.....	29
2.6.2 Composition and Structure.....	29
2.6.3 Genetics of Exopolysaccharide Synthesis.....	33
2.6.4 Metal Adsorption.....	35



## CONTENTS(CONT.)

	Page
3. MATERIALS AND METHODS.....	37
3.1 Source of Microorganisms.....	37
3.1.1 Samples.....	37
3.1.2 Bacteria References Strains.....	37
3.2 Chemicals, Reagents and Instrument.....	37
3.2.1 Chemicals and Reagents.....	37
3.2.2 Instrument.....	38
3.3 Media.....	39
3.3.1 Culture Media.....	39
3.3.2 Selective Media.....	39
3.3.3 Medium for Metal Resistance Test.....	39
3.4 Analyses of Some Heavy Metals.....	40
3.4.1 Cadmium.....	40
3.4.2 Copper.....	40
3.4.3 Manganese.....	40
3.5 Stain and Biochemical Test.....	40
3.6 Sampling and Cultivation procedures.....	41
3.6.1 Sampling Procedure.....	41
3.6.2 Isolation of Cd-resistance bacteria.....	41
3.6.3 Cadmium resistance test.....	41
3.6.4 Identification of selected bacteria.....	42
3.6.4.1 Biochemical test and selective medium..	42
3.6.4.2 EPS-producing bacteria.....	44
3.7 Effect of Growth Factor on Cadmium-Resistance bacterial Isolates.....	44

## CONTENTS(CONT.)

	<b>Page</b>
3.6.1 Effect of pH.....	44
3.6.2 Effect of Temperature .....	44
3.8 Extraction of Exopolysaccharide.....	44
3.9 Optimum Condition for EPS Production.....	46
3.9.1 Effect of initial pH.....	46
3.9.2 Effect of temperature.....	47
3.9.3 Effect of incubation period.....	47
3.9.4 Effect of initial cadmium concentration.....	47
3.10 Accumulation of Cadmium and Other Metals.....	47
3.10.1 Effect of initial Cd concentration of Cd adsorption by viable cells.....	47
3.10.2 Cadmium.....	48
3.10.3 Copper.....	48
3.10.4 Manganese.....	48
3.11 Immobilization of The Selected Bacterial Strains.....	48
4. RESULTS.....	50
4.1 Screening and Isolation of Cadmium Resistance Bacteria.....	50
4.2 Optimum Condition of Growth Rate.....	60
4.3 Extraction of EPS.....	63
4.4 Optimum Condition for EPS Production.....	64
4.5 Accumulation of Cadmium and Other Metals.....	68
4.5.1 Effect of initial Cd concentration to Cd adsorption by viable cells.....	68

## CONTENTS(CONT.)

	<b>Page</b>
4.5.2 Cadmium adsorption by viable cells, dead cells and EPS.....	70
4.5.3 Copper adsorption by viable cells, dead cells and EPS.....	71
4.5.4 Manganese adsorption by viable cells, dead cells and EPS.....	72
4.6 Immobilization of Bacterial Cells.....	73
4.6.1 Rate of Cd adsorption.....	73
4.6.2 Effect of Ca-alginate bead to Cd adsorption.....	74
4.6.3 Regeneration of cell beads for Cd adsorption.....	74
5. DISCUSSION AND CONCLUSION.....	76
REFERENCES.....	85
APPENDIX A The detail of all samples.....	100
APPENDIX B Media.....	102
APPENDIX C Phenol-Sulfuric acid method.....	107
APPENDIX D Lowry's method.....	109
APPENDIX E Influence of pH, temperature, time and cadmium concentration to EPS production.....	111
APPENDIX F Comparison of uptake and adsorption cadmium by viable cells at different concentration.....	116
APPENDIX G Cadmium and other metals by viable cells, dead cells and EPS.....	117
APPENDIX H Effect of cadmium concentration to pH of media.....	120
BIOGRAPHY.....	121

## LIST OF TABLES

<b>Table</b>		<b>Page</b>
2.1	Aerobic and anaerobic transformation of heavy metals.....	20
2.2	Some well-characterized siderophores from bacterial and fungal species.....	28
2.3	Conclusion of exopolysaccharide production from many Organisms.....	31
4.1	The characteristic of Cd resistance bacterial strains isolated from different sources.....	51
4.2	Some selective media and biochemical test of identification characteristic of selected bacterial isolates.....	57
4.3	Concentration of metals, i.e., Cd, Pb and Cu were detected in sample.....	59
4.4	Resistance of other metals by cadmium-resistant bacterial isolates.....	59
4.5	Effect of centrifugation speed on extraction of EPS and other EPS component of the selected Cd-resistant bacterial isolate, CdR-205.....	63
4.6	Percentage of Cd adsorption by Ca-alginate beads and Immobilized cells (calcium alginate) bead exposed to Different concentration.....	74
5.1	Comparison of Cd uptake by microorganisms.....	83
A-1	The detail of all sample.....	100
E-1	Influence of pH factor on EPS production of each strain.....	111
E-2	Influence of temperature factor on EPS production of each strain.....	113
E-3	Influence of time factor on EPS production of each strain.....	114
E-4	Influence of Cd concentration factor on EPS production of each strain.....	115

## LIST OF TABLES (CONT.)

Table	Page
F-1	Influence of Cd concentration factor on EPS production of each strain.....116
G-1	Comparison the adsorptin of cadmium by viable cells, dead cells and EPS.....117
G-2	Comparison the adsorptin of copper by viable cells, dead cells and EPS.....118
G-3	Comparison the adsorptin of manganese by viable cells, dead cells and EPS.....119
H-1	Effect of Cd concentration to pH media.....120



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURE

Figure	Page
2.1 Pathway for Cd, Mn and Zn uptake and efflux in the <i>A. eutrophus</i> Czc system and <i>S. aureus</i> <i>cadA</i> system.....	22
2.2 Cd uptake by the manganese transport system and efflux by <i>cadA</i> Cd efflux ATPase.....	22
2.3 Czc model for Cd, Zn and Co efflux system functioning as proton/cation antiporter consisting of inner membrane (CzcA), outer membrane (CzcC) and “membrane fusion” (CzcB) protein functioning as a dimer.....	23
2.4 Segment of the cell wall of <i>Bacillus subtilis</i> 168.....	24
2.5 The cell envelop of a Gram-negative bacterium.....	25
2.6 The characteristic of EPS detecting by negative strain And TEM techniques.....	30
2.7 The structure of the polymer from <i>Enterobacter aerogenes</i> strain XM6.....	31
2.8 Bacterial and algal alginate structures.....	33
2.9 Cation binding site of the dimer of L-guluronic acid in polyguluronic acid portions of alginate.....	36
3.1 Multi-inoculator 21 spots.....	42
3.2 Sequence of bacteria identification by some biochemical test.....	43
3.3 The characteristic of EPS.....	46
3.4 The characteristic of calcium alginate beads with cells And without cells.....	49
4.1 Colonial characteristic and gram straining (x1093) of Cd-resistance bacterial strain CdR-87 on TSA (left) and on MacConkey agar (right).....	52



## LIST OF FIGURE(CONT.)

Figure	Page
4.2 Colonial characteristic and gram straining (x1093) of Cd-resistance bacterial strain CdR-87 on TSA (left) and on MacConkey agar (right).....	53
4.3 Colonial characteristic and gram straining (x1093) of Cd-resistance bacterial strain CdR-205 on TSA (left) and on MacConkey agar (right).....	53
4.4 Colonial characteristic and gram straining (x1093) of Cd-resistance bacterial strain CdR-207 on TSA (left) and on MacConkey agar (right).....	53
4.5 Colonial characteristic and gram straining (x1093) of Cd-resistance bacterial strain CdR-273 on TSA (left) and on MacConkey agar (right).....	53
4.6 Some characteristic of biochemical test of bacterial isolates.....	58
4.7 Multi-inoculation test plate, characteristic of bacteria growth on media, control plates(a), media+500 mg/l Cd (b) and media+750 mg/l Cd(c).....	58
4.8 Effect of pH(a), and temperature(b) on cadmium resistant bacteria strain CdR-87.....	60
4.9 Effect of pH(a), and temperature(b) on cadmium resistant bacteria strain CdR-98.....	61
4.10 Effect of pH(a), and temperature(b) on cadmium resistant bacteria strain CdR-205.....	61
4.11 Effect of pH(a), and temperature(b) on cadmium resistant bacteria strain CdR-207.....	62

## LIST OF FIGURE(CONT.)

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
4.12 Effect of pH(a), and temperature(b) on cadmium resistant bacteria strain CdR- 273.....	62
4.13 Effect of pH on EPS production of the selected Cd-resistant bacterial strains.....	64
4.14 Effect of temperature on EPS production of the selected Cd-resistant bacterial strains.....	65
4.15 Effect of incubation period on EPS production of the Selected Cd-resistant bacterial strains.....	66
4.16 Effect of cadmium concentration on EPS production the selected Cd-resistant bacterial strains.....	67
4.17 Effect of initial Cd concentration on Cd adsorptin by viable cell of the selected Cd-resistant bacterial strains.....	68
4.18 Comparison amount of Cd uptake and percentage of Cd adsorption by viable cells of selected Cd-resistant bacterial strains.....	69
4.19 The Cd adsorption by viable cells, dead cells and EPS at initial 10.39 mg/l CdCl <sub>2</sub> .....	70
4.20 The Cu adsorption by viable cells, dead cells and EPS of the selected Cu-resistant bacterial strain.....	71
4.21 The Mn adsorption by viable cells, dead cells and EPS of the selected Mn-resistant bacterial strain .....	72
4.22 Rate of Cd uptake from solution by CdR-205 immobilized cells .....	73
4.23 Cd adsorption by regenerate CdR-205 immobilized bead (a) and CdR-273(b) immobilized bead 3 times of generation.....	75

## LIST OF FIGURE(CONT.)

Figure	Page
C-1 A linear standard curve of glucose detected by Phenol-sulfuric method.....	108
D-1 A linear standard curve of Bovine Serum Albumin detected by Lowry's method.....	110



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ABBREVIATION

Al	=	Aluminium
Ag	=	Silver
As	=	Arsenic
Bi	=	Bismuth
Cd	=	Cadmium
Co	=	Cobalt
Cr	=	Chromium
Cu	=	Copper
Fe	=	Iron
Hg	=	Mercury
Mn	=	Manganese
Mo	=	Molybdenum
Ni	=	Nickle
Pb	=	Lead
Sb	=	Antimony
Se	=	Selenium
Sn	=	Tin
Zn	=	Zinc
°C	=	Degree Celcius
EPS	=	Exopolysaccharide
min	=	Minutes
nm	=	Nanometer
nmole	=	Nanomole
ppm	=	Part Per Million
ppb	=	Part Per Billion
rpm	=	Round Per Minute