

Thesis Title	Efficiency of Cadmium Removal by Immobilized Cadmium Resistant Bacteria Isolated from Cadmium Contaminated Soil, Mae Sot District, Tak Province	
Author	Ms. Panida Rahong	
Degree	Master Degree (Environmental Science)	
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Chitchol Phalaraksh	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Chartchai Khanongnuch	Co-advisor

ABSTRACT

The objectives of this research were to determine the cadmium resistant bacterial in a high contamination area at Mae Sot District, Tak Province, Thailand. Soil sample were collected in 7 sampling site around the contamination area. Soil samples were divided into 3 groups including fish pond (4 samples), natural canal (2 samples) and rice field irrigation canal (1 sample). Cd contamination in soil samples were ranging between 0.14 to 19 mg kg⁻¹. The highest total number of bacterial count (CFU g⁻¹ soil) in nutrient agar with 0.5 mM CdCl₂ • 2.5 H₂O was 3.0 x 10⁵ CFU g⁻¹ soil from fish pond sample.

Morphology of colony and morphology of cell were observed. 7 strains of bacteria were isolated in different colony morphology. The cell was break down and Extraction the DNA followed Siripornmongcolchai method in 2002. Primer27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') and 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') were used for amplification 16S rRNA. Species identification were used by sequencing the 16S rRNA genes. Sequencing of the purified PCR products was carried out by First Base Inc. –Singapore. Homology of 16S rDNA sequence from the selected bacteria was analyzed by BLAST program from *GenBank Database*. All of 7 strain were identify as *Pseudomonas lundensis* (95%), *Pseudomonas monteilii* (97%), *Alcaligenes faecalis* (96%), *Brevundimonas vesicularis* (97%), *Exiguobacterium acetylicum* (99%) *Aeromonas allosaccharophila* (95%) and *Aeromonas hydrophila* (97%)

High Cd resistant bacteria were selected by using Kirby-Bauer disc diffusion method (Bauer *et. al*, 1959). The clear zone was observed in 6 concentration of filter paper disc (0, 0.5, 3, 5, 10 mM and 1M) subsequence placed into the lawn of cell. After incubated in 25 °C in 48 hrs. The smallest clear zone was found in *P. lundensis* (2.00 cm.), *P. monteilii* (3.95 cm.), *A. faecalis* (4.60 cm.), *A. allosaccharophila* (5.31cm.) *B. vesicularis* (5.76 cm.) *A. hydrophila* (5.66 cm.) *E. acetylicum* (12.74 cm.). Two smallest clear zone were selected for immobilize experiment.

Both of 2 species were growth into stationary phase in 45 hrs. *P. lundensis* and *P. monteilii* were cultivated in NB with 1 mM of $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{ H}_2\text{O}$. Immobilized cell were used by submerged immobilized materials and free cell in 48 hr. *P. lundensis* got average value of immobilized ability 73.37% and *P. monteilii* got 49.79%. In Cd removal efficiency *P. monteilii* were got higher result in free cell and immobilized cell cultivation (39.47% and 38.62% respectively) than the *P. lundensis* in free cell and immobilized cell cultivation (29.40% and 39.55% respectively). After determined efficiency of 2 species, *P. lundensis* was the suitable strain for the remediation. Therefore the immobilized cell condition should study in optimum pH, volume of inoculation and temperature.

Biological toxicity was used by Mosquito larva instar 3 (*Anopheles minimus*) were got from the Malaria Research Unit 2, Chiang Mai province. 10 Mosquito larvae/L were cultured in different Cd contaminated water and Cd treated water for calculation of LD_{50} in 48 hrs. LC_{50} of Mosquito larvae was 0.499 ppm. In addition, Mosquito larva was the interesting option for biological toxicity test.

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ประสิทธิภาพการกำจัดแคดเมียมโดยเซลล์ตรึงของแบคทีเรียด้านทาน
แคดเมียมจากดินปนเปื้อนแคดเมียม อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

ผู้เขียน นางสาว ภาณิดา ระหงษ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

คณะกรรมการที่ปรึกษา ผศ. ดร. ชิตชล ผลารักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
 ผศ. ดร. ชาติชาย โจนงนุช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อตรวจหาแบคทีเรียทนแคดเมียมในพื้นที่ปนเปื้อนในระดับสูงที่
อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ประเทศไทย โดยตัวอย่างดินถูกเก็บใน 7 บริเวณโดยรอบพื้นที่ที่มีการ
ปนเปื้อน โดยตัวอย่างดินเหล่านี้จะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ บ่อเลี้ยงปลา (4 ตัวอย่าง) คลองธรรมชาติ
(2 ตัวอย่าง) และคลองไส้ไก่ที่ผ่านพื้นที่การเกษตร (1 ตัวอย่าง) เมื่อตรวจการปนเปื้อนแคดเมียมใน
ตัวอย่างดินพบว่ามีค่าการปนเปื้อนระหว่าง 0.14-19.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อนำตัวอย่างมาแยก
เชื้อแบคทีเรียที่มีความทนแคดเมียมในอาหารแข็งที่มีแคดเมียมจำนวน 0.5 มิลลิโมล ของ $\text{CdCl}_2 \cdot$
 $2.5 \text{ H}_2\text{O}$ พบแบคทีเรียจำนวนสูงสุด 3.0×10^5 CFU ต่อดิน 1 กรัม ที่ได้จากบ่อเลี้ยงปลา

7 สายพันธุ์ของแบคทีเรียแยกโดยความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี จากนั้นลักษณะ
สัณฐานวิทยาของโคโลนี และเซลล์ และโคโลนีของแบคทีเรียจะถูกจดบันทึก จากนั้นเซลล์จะถูกทำให้
แตกเพื่อสกัดดีเอ็นเอตามวิธี Siripornmongkolchai ในปี 2002 Primer 27F (5' AGAGTTTG
ATCMTGGCTCAG 3') และ 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') ถูก
นำมาใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนของ 16S rRNA โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนของ ยีน 16S
rRNA จะถูกนำไปใช้เพื่อการหาลำดับเบสของ 16S rRNA เพื่อวิเคราะห์หาร้อยละของความ
คล้ายคลึงกันของลำดับ 16S rDNA จากแบคทีเรียที่คัดเลือกมา โดยโปรแกรม GenBank ซึ่ง
แบคทีเรียทนแคดเมียมทั้ง 7 สายพันธุ์ที่ถูกระบุว่าเป็นชนิด *Pseudomonas lundensis* (95%),
Pseudomonas monteilii (97%), *Alcaligenes faecalis* (96%), *Brevundimonas vesicularis*

(97%), *Exiguobacterium acetylicum* (99%) *Aeromonas allosaccharophila* (95%) และเชื้อ *Aeromonas hydrophila* (97%)

แบคทีเรียต้านทาน Cd สูงจะได้รับการคัดเลือกโดยใช้ Kirby-Bauer disc diffusion method (Bauer *et al.*, 1959) เพื่อคำนวณหาส่วนที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียใน 6 ความเข้มข้นของแผ่นกระดาษกรองขนาดเล็ก (0, 0.5, 3, 5, 10 มิลลิโมล และ 1 โมล) หลังจากบ่ม 25 องศาเซลเซียส ใน 48 ชั่วโมง ส่วนที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียพบใน *P. lundensis* (2.00 ซม.) *P. monteilii* (3.95 ซม.) *Al. faecalis* (4.60 ซม.), *Ae. allosaccharophila* (5.31 ซม.) *B. vesicularis* (5.76 ซม.) *Ae. hydrophila* (5.66 ซม.) *E. acetylicum* (12.74 ซม.) โดยสองชนิดแบคทีเรียที่มีส่วนไม่มีการเจริญน้อยที่สุดจะถูกเลือกสำหรับการทดสอบการตรึงเซลล์

ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ความทนมากที่สุดคือ *P. lundensis* และ *P. monteilii* จะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวในภาวะเซลล์อิสระ และภาวะตรึงเซลล์ในความเข้มข้น 1 มิลลิโมล ของ $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{ H}_2\text{O}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่าความสามารถในการตรึงของ *P. lundensis* มีค่าเฉลี่ย 73.37% และ *P. monteilii* มีค่าเฉลี่ย 49.79% สำหรับการพิจารณาความสามารถในการกำจัดแคดเมียมใน *P. monteilii* มีประสิทธิภาพในภาวะเซลล์อิสระ 39.47% และการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึง 38.62% โดยมีค่ามากกว่า *P. lundensis* ที่มีค่าการกำจัดแคดเมียมในชนิดเซลล์อิสระ 29.40% และการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึง 39.55% หลังจากพิจารณาคุณสมบัติของทั้งสองเซลล์ทั้งในด้านการยึดเกาะ และการกำจัดแคดเมียมแล้วพบว่า *P. lundensis* เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการบำบัดแคดเมียมที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ถึงแม้ว่าจะมีค่ากำจัดแคดเมียมในภาวะเซลล์อิสระน้อยกว่า *P. monteilii* ก็ตามแต่ภาวะตรึงเซลล์พบว่าค่าการกำจัดแคดเมียมของทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ความสามารถในการกำจัดแคดเมียมยังมีค่าต่ำอยู่ ดังนั้นในสภาพของเซลล์ตรึงจึงควรศึกษาในค่า pH ที่เหมาะสม, ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น และอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งจะส่งเสริมการกำจัดแคดเมียมของแบคทีเรียต่อไป

ในด้านความเป็นพิษทางชีวภาพโดยใช้ลูกน้ำยุงก้นปล่องในระยะที่ 3 (*Anopheles minimus*) โดยใช้ลูกน้ำ 10 ตัวในความปริมาตรน้ำ 1 ลิตร มาเพาะเลี้ยงในสารละลายแคดเมียมที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เพื่อการคำนวณ LD_{50} ใน 48 ชั่วโมง พบว่าค่า LC_{50} มีค่า 0.499 ppm ลูกน้ำยุงจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมในการศึกษาความเป็นพิษของโลหะต่อไปในอนาคต