การกำจัดปรอทที่ละลายน้ำโดยแบคทีเรียสายพันธุ์คัด

นางสาว คงนิตา เคยนิยม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของ การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-346-000-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19107295

REMOVAL OF SOLUBLE MERCURY BY BACTERIAL ISOLATES

Miss Kongnita Koieniyom

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Program of Biotechnology
Faculty of Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 1999
ISBN 974-346-000-4

Thesis Title	Removal of Soluble Mercury by Bacterial Isolates
By	Miss Kongnita Koieniyom
Programme	Biotechnology
Thesis Advisor	Assistant Professor Pin-Chawee Vejjanukroh, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.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 Charnwit Kosittanon, Ph.D.)

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

คงนิตา เคยนิยม: การกำจัดปรอทที่ละลายน้ำโดยแบคทีเรียสายพันธุ์คัด (Removal of soluble mercury by bacterial isolates.) อ.ที่ปรึกษา ผศ.ดร. ปิ่น-ฉวี เวชชานุเคราะห์, 111 หน้า. ISBN 974-346-000-4.

แบคทีเรียจำนวน 272 สายพันธุ์ที่ต้านปรอท ซึ่งแยกจากตัวอย่างจำนวน 61 ตัวอย่าง พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 259 สายพันธุ์ที่ต้านปรอทโดยวิธีการเปลี่ยนปรอทละลายน้ำให้กลายเป็นไอปรอท จากนั้นแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์จากแบคทีเรียดังกล่าวจำนวน 259 สายพันธุ์นั้นถูกคัดเลือกเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์คัด มีชื่อว่า สายพันธุ์ HgR-11 และ HgR-14 ซึ่งถูกจัดอยู่ในจีนัส *Acinetobacter* sp. และต้านปรอทได้สูงถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มคก/มล) ทั้งสองสายพันธุ์ การศึกษาต่อมาพบว่า สายพันธุ์คัดทั้งสองเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีปรอทอยู่จำนวนเล็กน้อย (5 มคก/มล) และอยู่ในสภาพเป็นกลาง (พีเอช = 8) โดยบ่มเชื้อไว้ ณ อุณหภูมิ 35° ซ สำหรับในอาหารที่มีปรอทปนอยู่ปริมาณค่อนข้างน้อย (0, 4 และ 8 มคก/มล) พบว่า ปรอทไม่มีผลต่อการเติบโตของสายพันธุ์คัดทั้งสอง แต่ทำให้ช่วงการปรับตัว (Lag phase) ของแบคทีเรียนั้นยาวมากกว่าปกติ แต่ในอาหารที่มีปรอทปนอยู่ในปริมาณสูง (100 และ 150 มคก/มล) พบว่า จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงปรอทนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็วมาก ผลกระทบของค่าพีเอชและอุณหภูมิที่มีต่อการกลายเป็นไอของปรอทที่เกิดขึ้นในเวลา 24 ชั่วโมงของการบ่มเชื้อ พบว่า ความเข้มข้นของปรอทจะลดลงได้มากถึงร้อยละ 98 ในสภาพที่เป็นด่างไม่สูงนัก (พีเอช 7-9) ณ อุณหภูมิ 25°-40° ซ ของการบ่มเชื้อ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ความเข้มข้นของปรอทในช่วงเวลาที่ต่างกันนั้นก็ลดลงด้วย โดยเฉพาะในช่วงเวลา 0-2 ชั่วโมงแรกจะลดลงอย่างรวดเร็วมาก เพราะฉะนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์คัดทั้งสองน่าจะเหมาะสำหรับการศึกษาขั้นสูงต่อไป เพื่อสามารถนำไปใช้ในการกำจัดปรอทออกจากน้ำได้ในอนาคต

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....คงนิตา เคยนิยม.....

สาขาวิชา..เทคโนโลยีทางชีวภาพ.... อ.ที่ปรึกษา.....ปิ่น-ฉวี เวชชานุเคราะห์.....

ปีการศึกษา.....2542..... อ.ที่ปรึกษาร่วม.....

Kongnita Koieniyom: Removal of soluble Mercury by Bacterial Isolates. Thesis Advisor: Assist. Prof. Pin-Chawee Vejjanukroh, Ph.D. 111pp. ISBN. 974-346-000-4.

Isolation and screening of 272 mercury-resistant bacterial strains from 61 samples were performed and 259 of those strains were found to be able to transform soluble mercury or $HgCl_2$ (aq) to volatile mercury or Hg(0). And 2 of 259 mercury—resistant (with volatilization ability) bacterial strain were selected, named HgR-11 and HgR-14, identified biochemically and bacteriologically to possibly be ***Acinetobacter*** sp., and resistant to 250 micrograms per milliliter (μg/mL) Optimum conditions for growth of two selected strains in the presence of 5 μg/mL mercury (for induction), i.e., pH and temperature, were 8 and 35 degree Celsius (°C), respectively. In low mercury concentration (0, 4 or 8 μg/mL), there was no effect on growth, but longer lag phase was detected, and in high mercury concentration (100 and 150 ppm), the initial amounts of cells were reduced rapidly. Effect of pH and temperature on volatilization of mercury were conducted after 24-hour incubation. The results indicated that mercury was removed from the medium exceeding to 98% at pH 7-9 and incubated from the medium at 25°-40°C. In addition, the reduction of mercury concentration at difference time intervals was found and indicated that mercury concentrations were reduced rapidly in early incubation (0-2 hours). Therefore, the selected mercury resis6ttant bacterial strains may be suitable considerably to be used for further investigations in removal of soluble mercury.

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา....Biotechnology..... อ.ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....1999..... อ.ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENT

This thesis was succeeded by a favour of many people and organization. First of all, I was deeply grateful to thesis advisor, Assistant Professor Dr. Pin-Chawee Vejjanukroh, who give me a favorable advice and make me receive a thorough instruction in laboratory study included a good point of view.

The second, I was thankful for the favour of Gradute School and Programe of Biotechnology, Faculty of Science about scholarship. Grateful thanks to everyone in Department of Radiology, Faculty of Medicine and Sakchai Polyclinic who kindly developed and support the X-ray film.

Grateful thanks to Dr. Kunihiko Nakamura, National Institute for Minamata Disease, Japan who support referent strain of bacterium.

Many thank for kindly help of a personnel and my friends. Thanks my sister, who help me in everything.

Finally, my farther, who are support a lot of money and provide everything for me. My mother, who is devote her time to catch me at night, take care and worry about my health. I was appreciate the attention of my parents and to be thankful for the favour of everybody.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABBSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....xii

LIST OF FIGURES.....xiii

ABBREVIATION.....xiv

CHAPTER 1 INTRODUCTION

1.1 OBJECTIVE.....5

1.2 SCOPE OF THE STUDY.....6

1.3 PLACES.....6

1.4 ANTICIPATED BENEFITS.....6

1.5 COMPONENT OF THESIS.....7

CHAPTER 2 LITERATURE SURVEY

2.1 MERCURY.....8

2.1.1 SOURCES.....8

2.1.1.1 NATURAL SOURCE.....8

2.1.1.2 ANTROPOGENIC SOURCE.....9

2.1.2 PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES.....10

2.1.3 USE OF MERCURY.....10

2.1.4 TOXICLY.....12

2.1.4.1 HUMAN.....12

2.1.4.2 ANIMALS.....14

CONTENT (CONT.)

Page

2.1.4.3 PLANTS.....14
2.1.4.4 MICROORGANISMS.....14
2.2 METHODS OF MERCURY REMOVAL.....15
2.2.1 PHYSICO-CHEMICAL METHODS.....15
2.2.1.1 CHEMICAL PRECIPITATION.....16
2.2.1.2 CHEMICAL REDUCTION.....16
2.2.1.3 FILTRATION OR ADSORPTION.....16
2.2.1.4 ION EXCHANGE.....17
2.2.1.5 SOLVENT EXTRACTION.....17
2.2.2 METHODS OF WASTE DISPOSAL.....18
2.2.3 BIOLOGICAL METHODS.....19
2.2.3.1 ALGAL.....19
2.2.3.2 YEAST AND FUNGAL.....19
2.2.3.3 PLANT.....19
2.2.3.4 BACTERIA.....20
2.3 MICROBIAL TRANSFORMATIONS OF MERCURY.....22
2.3.1 METHYLATION.....22
2.3.1.1 IN SEDIMENTS AND AQUATIC SYSTEMS.....22
2.3.1.2 RATES AND STIMULATORY EFFECTS.....23
2.3.1.3 MECHANISMS OF METHYLATION OF MERCURY.....24
2.3.2 DEGRADATION AND VOLATILIZATION.....25
2.3.2.1 IN NATURAL ENVIRON.....26
2.3.2.2 RATES IN PURE CULTURE.....26

CONTENT (CONT.)

Page

2.3.2.3 MECHANISMS OF MERCURY DEGRADATION AND VOLATILIZATION 28

2.3.3 OXIDATION.....28

2.4 BACTERIAL MERCURY RESISTANCE.....29

2.4.1 INTRODUCTION.....29

2.4.2 POPULATIONS.....30

2.4.3 MECHANISMS.....33

2.4.4 REGULATION OF MERCURY RESISTANCE.....35

CHAPTER 3 MATERIALS AND METHOD

3.1. SOURCE OF MICROORGANISMS.....39

3.1.1 SAMPLE 39

3.1.2 BACTERIAL REFERENCE STRAINS.....39

3.2 CHEMICAL, REAGENT, STAINING DYE AND INSTRUMENT.....40

3.2.1 CHEMICALS.....40

3.2.2 REAGENTS.....41

3.2.3 STAINING DYE.....41

3.2.4 INSTRUMENTS.....42

3.3 CULTURE MEDIA.....42

3.3.1 GENERAL MEDIA.....42

3.3.2 SELECTIVE MEDIA.....42

3.3.3 RESISTANT TEST.....43

3.3 STAINING.....43

CONTENT (CONT.)

Page

3.5 BIOCHEMICAL TEST.....43
3.6 SAMPLING OF CULTIVATION PROCEDURE.....44
3.6.1 SAMPLING.....44
3.6.2 ISOLATION.....44
3.6.3 MERCURY RESISTANCE TEST.....45
3.6.4 SCREENING OF ISOLATES FOR VOLATILIZATION OF MERCURIC CHLORIDE.....45
3.6.5 IDENTIFICATION OF SELECTED BACTERIAL STRAINS.....46
3.7 EFFECT OF SOME GROWTH FATORS AT PRESIENTED OF MERCURY ON MERCURY RESISTANT BACTERIA.....47
3.7.1 EFFECT OF pH.....47
3.7.2 EFFECT OF TEMPERATURE.....48
3.7.3 EFFECT OF MERCURY CONCENTRATION.....48
3.8 EFFECT OF pH AND TEMPERATURE ON MERCURY VOLATILIZATION IN THE SELECTED BACTERIAL ISOLATES.....49
3.8.1 EFFECT OF pH.....49
3.8.2 EFFECT OF TEMPERATURE.....49
3.9 REDUCTION OF MERCURY.....50
3.10 RECOVERY OF METALS.....50

CONTENT (CONT.)

Page

CHAPTER 4 RESULTS

4.1 SCREENING, ISOLATION AND COLLECTION OF MERCURY RESISTANCE BACTERIA.....52

4.2 RESISTANCE TO OTHER METALS BY SELECTED BACTERIAL STRAINS.....53

4.3 EFFECT OF SOME ENVIRONMENTAL FACTORS ON GROWTH OF THE SELECTED BACTERIAL STRAINS.....53

4.4 EFFECT OF SOME FACTORS ON VOLATILIZATION CAPACITY OF THE SELECTED BACTERIAL STRAINS.....53

4.5 REDUCTION OF MERCURY AT DIFFERENT TIME.....53

4.6 RECOVERY OF METALS.....53

CHAPTER 5 DISCUSSION AND CONCLUSION.....71

REFERENCES.....75

APPENDICES

APPENDIX A Bacterial Source.....88

APPENDIX B Media.....90

APPENDIX C The determination of mercury with dithizone.....95

APPENDIX D Some characteristics of selected bacterial Isolates and the percentage of removal Compare to the former investigations.....98

BIOGRAPHY 100

LIST OF TABLES

Page

Table 2.1 11
Table 2.2 12
Table 2.3 13
Table 4.1 60
Table 4.2 61
Table 4.3 61
Table 4.4 62
Table 4.5 63
Table 4.6 64
Table 4.7 65
Table 4.8 65
Table 4.9 66
Table 4.10 68
Table 4.11 70

LIST OF FIGURES

Page

Figure 2.1.....37
Figure 2.2.....37
Figure 2.3.....38
Figure 3.1.....51
Figure 3.2.....51
Figure 4.1.....54
Figure 4.2.....55
Figure 4.3.....56
Figure 4.4.....57
Figure 4.5.....58
Figure 4.6.....59
Figure 4.7.....60
Figure 4.8.....64
Figure 4.9.....64
Figure 4.10.....66
Figure 4.11.....67
Figure 4.12.....68
Figure 4.13.....70

ABBREVIATE

Ag	= silver as ($AgNo_3$) Silver nitrate
Cd	= Cadmium as ($CdCl_2$. H_2o) Cadmium chloride
Cr	= Chromium as (K_2Cro_4) Potassium cromate
Cu	= Copper as ($CuSo_4$. $5H_2o$) Copper sulfate
d	= day
Hg	= elemental mercury
Hg(I), Hg^+	= mercurous ion
Hg.R	= mercury-resistant bacterial strain
Hg(II), Hg^{2+}	= mercuric ion
Hg(0), Hg^o	= metallic mercury, vapor
MM	= Methylmercury
ml	= milli liter
mg.	= milligram
mm	= millimeter
Mn	= Manganease as ($MnCl_2$. $4H_2o$) Manganease chloride
MR-VP	= Methyl Red-Vogeaproskauer tests
µg.	= microgram
Ni	= Nickel as ($NiSo_4$. $6H_2o$) Nickel sulfate
nm.	= nanometre
ppb	= part per billion
ppm	= part per million
TSI	= Triple sugar ion (TSI) agar
Zn	= Zinc as ($ZnSo_4$. $7H_2o$) Zinc sulfate

NAME OF ORGANISMS

E. coli	= ***Escherichia coli***
S. macescens	= ***Serratia macescens***
P. aeruginosa	=***Pseudomonas aeruginosa***
P. putida	=***Pseudomonas putida***
E. aerogenes	=***Enterobacter aerogenes***
P. fluorescens	=***Pseudomonas fluorescens***
B. meqaterium	=***Bacillus meqaterium***