CORRELATION BETWEEN EXOPOLYMER PRODUCTION AND RESISTANCE TO CADMIUM TOXICITY IN CADMIUM RESISTANT BACTERIUM, *RALSTONIA* SP. TAK1

ANCHULEE WATCHARAMUSIK

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL MANAGEMENT)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการต้านทานแคดเมียมและ exopolymer ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่สามารถต้านทานแคดเมียม (*Ralstonia* sp. TAK1) (CORRELATION BETWEEN EXOPOLYMER PRODUCTION AND RESISTANCE TO CADMIUM TOXICITY IN CADMIUM RESISTANT วท.BACTERIUM, *RALSTONIA* SP. TAK1)

อัญชุลี วัชรมุสิก 4837303 ENTM/M

วท. ม. (เทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เบญจภรณ์ ประภักดี D.Tech.Sc. (ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY TECHNOLOGY AND MANAGEMENT), พัฒน ทวีโภค, Ph.D. (ENVIRONMENTAL PROTECTION TECHNOLOGY), นรินทร์ บุญตานนท์, Ph.D. (BIOLOGICAL SCIENCES)

บทคัดย่อ

การผลิต exopolymer จากแบคทีเรียเป็นกลไกลหนึ่งที่แบคทีเรียใช้ในการต้านทานโลหะหนัก ซึ่ง exopolymer มีคุณสมบัติในการเก็บกักความเป็นพิษของโลหะหนัก แบคทีเรีย *Ralstonia* sp. TAK1เป็นแบคทีเรียที่มีความสามรถในการต้านทานความเป็นพิษของแคดเมียมสูง ซึ่งได้ทำการคัดแยกมาจากดินที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียม ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษา exopolymer ที่ แบคทีเรีย *Ralstonia* sp. TAK1 ผลิตขึ้นและ ความสามารถในการต้านทานความเป็นพิษของแคดเมียมที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาการเจริญเติบโต นอกจากนี้จะศึกษาความสามารถในการต้านทานโลหะหนักเมื่อทำการกระตุ้นด้วย แคดเมียมและสังกะสี

จากการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย *Ralstonia* sp. TAK1 สามารถต้านทานแคดเมียมคลอไรด์สูงถึง 3 โมลลาร์ และ ปริมาณ exopolymer ที่มีค่าสูงสุดอยู่ในช่วงกลางของระยะการเจริญเติบโต ช่วง stationary phase (24 ชม.) ซึ่งมีค่า 0.69 มิลลิกรัมของ น้ำตาลกลูโคลส ต่อ มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้งเซลล์ และจะเริ่มลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะสุดท้ายของ stationary phase นอกจากยังพบว่าแบคทีเรียสามารถผลิต exopolymer สูงสุดในระยะกลางช่วง stationary phase และในระยะนี้แบคทีเรียสามารถต้านทานความเป็นพิษของแคดเมียมได้สูงกว่าระยะ exponential phase อีกด้วย ซึ่งจากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่า exopolymerที่แบคทีเรีย *Ralstonia* sp. TAK1 ผลิตขึ้น มีส่วนช่วยในการต้านทานความเป็นพิษของแคดเมียม ในช่วงเวลา stationary phase ซึ่งจะแตกต่างจากระยะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียช่วง exponential phase ซึ่งมีระดับการต้านทานแคดเมียมกับการผลิต exopolymer ที่ไม่สอดคล้องกัน เพราะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในช่วงนี้ น่าจะมีกลไกลอื่นที่แบคทีเรียใช้ในการต้านทานโลหะหนัก ส่วนแคดเมียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.4 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นการสร้าง exopolymer ให้เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยแคดเมียมในระยะกลางช่วง exponential phases เซลล์แบคทีเรียที่ถูกกระตุ้นด้วยแคดเมียมจะผลิต exopolymer ได้คงที่จากระยะกลางถึงระยะสุดท้ายในช่วง stationary phase อย่างไรก็ตาม ปริมาณ exopolymer ที่สูงที่สุดที่แบคทีเรีย *Ralstonia* sp. TAK1 ผลิตได้จะอยู่ในช่วงการเจริญเติบโต stationary phase

การใช้สารแคดเมียมและสังกะสีที่ความเข้มข้นต่ำในการกระตุ้นเซลล์เพื่อทดสอบความต้านทานความเป็นพิษของแคดเมียมและสังกะสีที่มีความเข้มข้นสูงในกระบวนการต้านทานความเป็นพิษแบบ adaptive and cross-protective พบว่าเมื่อแบคทีเรีย *Ralstonia* sp. TAK1 ได้รับการ กระตุ้นเซลล์ด้วยแคดเมียมและสังกะสีที่ความเข้มข้นต่ำจะทำให้แบคทีเรียมีความสามารถในการต้านทานความเป็นพิษของแคดเมียมและสังกะสีได้สูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารใดเลย เพราะว่าแบคทีเรียมีกลไกลการสร้างโปรตีนชนิดหนึ่งเพื่อป้องกันตัวเองจากความเป็นพิษของแคดเมียมและสังกะสี การศึกษาครั้งนี้สามารถที่นำแบคทีเรีย *Ralstonia* sp. TAK1 หรือ exopolymer ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นไปประยุกต์ใช้หรือเป็นข้อมูลพื้นฐานในการบำบัด น้ำ ดิน และ ดินจะกอน ที่มีการเปื้อนของแคดเมียมได้

94 หน้า

Copyright by Mahidol University

CORRELATION BETWEEN EXOPOLYMER PRODUCTION AND RESISTANCE TO CADMIUM TOXICITY IN CADMIUM RESISTANT BACTERIUM, *RALSTONIA* SP. TAK1

ANCHULEE WATCHARAMUSIK 4837303 ENTM/M

M.Sc. (TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL MANAGEMENT)
THESIS ADVISORS: BENJAPHORN PRAPAGDEE, D.Tech.Sc. (ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY TECHNOLOGY AND MANAGEMENT),
PATANA THAVIPOKE, Ph.D. (ENVIRONMENTAL PROTECTION TECHNOLOGY),
NARIN BOONTANON, Ph.D. (BIOLOGICAL SCIENCES)

ABSTRACT

Production of bacterial exopolymers is one mechanism of heavy metal resistance. It works by the binding of toxic metals to the exopolymers. *Ralstonia* sp. TAK1 is highly resistant to cadmium (Cd) isolated from Cd-contaminated soil. Due to its slimy colony on agar plate, exopolymer production in *Ralstonia* sp. TAK1 was determined. The ability of *Ralstonia* sp. TAK1 to resist to Cd toxicity at different growth phases was also tested. In addition, the induced adaptive and cross-protective resistances to Cd and zinc (Zn) were investigated.

The results showed that *Ralstonia* sp. TAK1 exhibited high Cd resistance at a level up to 3.0 M $CdCl_2$. The amount of exopolymers peaked at the mid-stationary phase (24 hr) (0.69 mg glucose equivalent/ mg dry weight) and sharply decreased at the late-stationary phase. In addition to high production of exopolymers at the mid-stationary phase, *Ralstonia* sp. TAK1 was more resistant to Cd than that of exponential phase cells. These results suggested that the resistance to Cd toxicity in *Ralstonia* sp. TAK1 at the stationary phase is mediated by exopolymer production. Contradictorily, there was no correlation between Cd resistance level and exopolymer production of cells at exponential phase indicating that other mechanism(s) is responsible for Cd resistance of exponential phase cells. The concentrations of $CdCl_2$ at 0.2 and 0.4 mM were able to induce an increase of exopolymers at the mid-exponential phases when compared to uninduced cells. Exopolymer production of Cd-induced cells was constant from the mid-stationary to late-stationary phase. However, the highest exopolymer count was found in uninduced cells at stationary phase of growth.

Exposure to a low concentration of Cd or Zn induced adaptive and cross-protective resistance to higher concentrations of Cd. Additionally, pretreatment of *Ralstonia* sp.TAK1 with an inducing concentration of either Cd or Zn conferred adaptive and cross-protective resistance against subsequent exposure to lethal dose of Zn. The induced protections required newly synthesized protein(s). Cd and Zn-induced adaptive and cross-protective resistance to Cd and Zn toxicity are important mechanisms used by *Ralstonia* sp.TAK1 to survive in heavy metal contaminated environments. These findings could provide a potential application of *Ralstonia* sp.TAK1 or its exopolymers for microbial based bioremediation in Cd-contaminated soils, sediments and waters.

KEYWORDS : EXOPOLYMERS, CADMIUM-RESISTANT MECHANISM;

RALSTONIA SP

94 pp.

Copyright by Mahidol University