

การลดพิษโคโรเนียมและการย่อยสลายพินอลโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ตัด

นางสาว ศิริพร ทวีพงศ์ชุกุล



สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-346-001-2

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19247023

**CHROMIUM DETOXIFICATION AND  
PHENOL DEGRADATION BY BACTERIAL ISOLATES**

**MISS SIRIPHON THAWEEPHONGATHIKUN**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Environmental Science  
Inter-department of Environmental Science**

**Graduate School**

**Chulalongkorn University**

**Academic Year 1999**

**ISBN 974-346-001-2**

Thesis Title           Chromium Detoxification and Phenol Degradation by  
                                  Bacterial Isolates  
By                        Miss Siriphon Thaweephongathikun  
Inter-department    Environmental Science  
Thesis Advisor       Assistant Professor Dr. Pin-Chawee Vejjanukroh, Ph.D.

---

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

.....Dean of Graduate School  
(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

#### THESIS COMMITTEE

*K. Thirakhupt*  
.....Chairman  
(Assistant Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)

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

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

*V. Rimphanitchayakit*  
.....Member  
(Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

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

ศิริพร ทวีพงษ์อติกุล : การลดพิษโครเมียมและการย่อยสลายฟีนอลโดยแบคทีเรียสายพันธุ์คัด (CHROMIUM DETOXIFICATION AND PHENOL DEGRADATION BY BACTERIAL ISOLATES) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ปิ่น-ฉวี เวชชานูเดระห์, 140 หน้า. ISBN 974-346-001-2.

แบคทีเรียที่สามารถทนต่อโครเมียมสูงสุด (2400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 3 สายพันธุ์ ซึ่งคัดเลือกมาจาก 150 สายพันธุ์ได้นำมาใช้ในการทดลอง โดยให้ชื่อสายพันธุ์ว่า CrR-2, CrR-14 และ CrR-15 จากการทดลองพบว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม *Escherichia sp.*, *Pseudomonas sp.* และ *Enterobacter sp.* ตามลำดับ แบคทีเรียที่สามารถทนต่อฟีนอลสูงสุดจำนวน 3 สายพันธุ์ (2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งคัดเลือกมาจาก 225 สายพันธุ์ได้นำมาใช้ในการทดลอง โดยให้ชื่อสายพันธุ์ว่า PhR-26, PhR-33 และ PhR-64 จากการทดลองพบว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.* และ *Escherichia sp.* ตามลำดับ และแบคทีเรียที่สามารถทนต่อโครเมียมและฟีนอลสูงสุด (1200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 3 สายพันธุ์ ซึ่งคัดเลือกมาจาก 120 สายพันธุ์ได้นำมาใช้ในการทดลอง โดยให้ชื่อสายพันธุ์ว่า CPR-4, CPR-16 และ CPR-17 จากการทดลองพบว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.* และ *Escherichia sp.* ตามลำดับ ช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7 และอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการลดพิษโครเมียมและการย่อยสลายฟีนอล การลดพิษโครเมียมและการย่อยสลายฟีนอลโดยแบคทีเรียสายพันธุ์จู่และแบคทีเรียสายพันธุ์คัดจะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดที่ระยะเวลาการบ่ม 6 ชั่วโมง และระยะเวลาการสัมผัสของแบคทีเรียกับสาร 15 นาที การเติมฟีนอลในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าไม่ผลทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น เนื่องจากฟีนอลเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานให้แบคทีเรีย และเมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโครเมียมด้วย ทำให้แบคทีเรียสามารถลดพิษโครเมียมพร้อมทั้งย่อยสลายฟีนอลในเวลาเดียวกันได้ ในแบคทีเรียสายพันธุ์จู่และแบคทีเรียสายพันธุ์คัดที่ทนต่อทั้งโครเมียมและฟีนอล พบว่าการลดพิษ Cr(VI) และการย่อยสลายฟีนอลมีประสิทธิภาพสูง (มากกว่า 80%) และไม่แตกต่างกันมากนัก สำหรับการผลิต Cr(III) นั้นพบว่าเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (น้อยกว่า 20%) เนื่องจากเมื่อ Cr(VI) ผ่านเซลล์เมมเบรนและถูกรีดิวซ์เป็น Cr(III) ภายในเซลล์แล้วจะเชื่อมกับโปรตีนอย่างคงที่ นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์คัดดังกล่าวยังสามารถย่อยสลายอนุพันธ์ของฟีนอล เช่น พารา-ครีซอล ภายใน 2 สัปดาห์ และต้องใช้เวลามากกว่า 3 สัปดาห์ในการย่อยสลาย พารา-คลอโรฟีนอลและพารา-ไนโตรฟีนอล ดังนั้นการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์คัดที่ทนต่อทั้งโครเมียมและฟีนอลจะมีประสิทธิภาพดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์จู่ เนื่องจากไม่สิ้นเปลืองเวลาและค่าใช้จ่ายในการทำงานถึง 2 ครั้งเพื่อให้มีประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน

ภาควิชา สหสาขาวิชา (วิทยาศาสตร์สุขภาพและแวดล้อม)  
 สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สุขภาพและแวดล้อม  
 ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อผลิต  
 อ.ที่ปรึกษา  
 อ.ที่ปรึกษาร่วม

ศิริพร ทวีพงษ์อติกุล  
ปิ่น-ฉวี เวชชานูเดระห์

Siriphon Thaweephongathikun : Chromium Detoxification and Phenol Degradation by Bacterial Isolates. Thesis Advisor : Assist. Prof. Pin-Chawee Vejjanukroh, Ph.D., 140 pp. ISBN 974-346-001-2.

Three strains of 150 strains of chromium-resistant bacterial isolates (2400 µg/ml) were selected and named CrR-2, CrR-14 and CrR-15. By some identification test, they might be classified as *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp. and *Enterobacter* sp., respectively. Three strains of 225 strains of phenol-resistant bacterial isolates (2000 µg/ml) were selected and named PhR-26, PhR-33 and PhR-64. By some identification test, they might be classified as *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. and *Escherichia* sp., respectively. Three strains of 120 strains of chromium/phenol-resistant bacterial isolates (1200 µg/ml) were selected and named CPR-4, CPR-16 and CPR-17. By some identification test, they might be classified as *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp. and *Escherichia* sp., respectively. Optimum pH and temperature for growth and chromium detoxification and phenol degradation were 7 and 37°C. The efficiency of chromium detoxification and phenol degradation appeared maximally during the exponential phase (incubation period; 6 hr.) and contact time (15 min.). Addition of phenol in culture was increased growth of bacterial isolates because phenol as carbon and energy sources, and were also in culture, added chromium, so simultaneous chromium detoxification and phenol degradation. In coculture and chromium/phenol-resistant bacterial isolates found that Cr(VI) detoxification and phenol degradation are high efficiency (more than 80%), but not much different. Cr(III) production found that generated just a little (less than 20%) because Cr(VI) passes through cell membranes and then is reduced to Cr(III) inside the cell stable binds to protein. Those bacterial isolates can degrade derivatives of phenol, i.e., p-cresol within 2 weeks and more than 3 weeks to degrade p-chlorophenol and p-nitrophenol. So efficiency of CPR-resistant bacterial isolates is better than the coculture because of usage a little time and low cost in work at twice in order to be so far efficiency.

ภาควิชา Inter-department (Environmental Science)  
 สาขาวิชา Environmental Science  
 ปีการศึกษา 1999

ลายมือชื่อผู้ผลิต อ.พร. พิเศษ  
 อ.ที่ปรึกษา วิเศษ / 1000  
 อ.ที่ปรึกษาช่วย ---

## ACKNOWLEDGEMENT



First of all, I wish to express my gratitude to my thesis advisor, Assistant Professor Dr. Pin-Chawee Vejjanukroh, for her valuable suggestions, assistance, guidance and strong encouragement during the thesis work. Several good ideas have energized from her vision.

I am thankful to the Inter-department of Environmental Science, Graduate school for everything, the Department of General Science, Faculty of Science, for offering laboratory facilities in the research and the Scientific and Technological Research Equipment Centre, Chulalongkorn University, for electron microscopy and high performance liquid chromatography.

I would like to express my appreciation to Assistant Professor Dr. Kumthorn Thirakhupt, Associate Professor Dr. Chaufah Thongthai, Assistant Professor Dr. Vichien Rimphanitchayakit, Dr. Pienpak Tasakorn, the members of thesis committee, for their valuable advice.

I must thank my teachers for their help and strong encouragement, for instances, Associate Professor Dr. Jariya Sucharekul, Assistant Professor Dr. Pipat Patthanapholpaiboon, Miss Saranya Kengsarikit and Staff of the Department of General Science.

I am thankful to the Graduate School of Chulalongkorn University for financial support. Grateful thanks to Viriya Insurance, Co., Thailand, Thanee, Co., Thailand and Becthai, Co., Thailand for donation of equipment to Department of General Science. I also wish to thank to everybody concerning in my thesis work.

Finally, this thesis could not be accomplished without the support of my father and mother. I thank them for excellent understanding, advice, assistance, consult and help to see my perfect illustrations.

# CONTENTS

	<b>Page</b>
<b>THAI ABSTRACT</b> .....	iv
<b>ENGLISH ABSTRACT</b> .....	v
<b>ACKNOWLEDGEMENT</b> .....	vi
<b>CONTENTS</b> .....	vii
<b>LIST OF TABLES</b> .....	xv
<b>LIST OF FIGURES</b> .....	xvii
<b>ABBREVIATION AND SYMBOL</b> .....	xxi

## **CHAPTER**

<b>1 INTRODUCTION</b> .....	1
<b>1.1 OBJECTIVES</b> .....	3
<b>1.2 SCOPES OF STUDY</b> .....	4
<b>1.3 PLACES</b> .....	4
<b>1.4 ANTICIPATED BENEFITS</b> .....	4
<b>1.5 COMPONENT OF THE THESIS</b> .....	5
<b>2 LITERATURE SURVEY</b> .....	6
<b>2.1 CHROMIUM</b> .....	6
<b>2.1.1 SOURCES</b> .....	6
<b>2.1.2 PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES</b> .....	7
<b>2.1.3 USES</b> .....	8
<b>2.1.4 TOXIC EFFECTS OF CHROMIUM ON             LIVING THINGS</b> .....	9
<b>2.1.4.1 TOXIC EFFECTS ON MAN</b> .....	9
<b>2.1.4.2 TOXIC EFFECTS ON ANIMALS</b> .....	10
<b>2.1.4.3 TOXIC EFFECTS ON PLANTS</b> .....	12

**CONTENTS (CONT.)**

	<b>Page</b>
2.1.4.4 TOXIC EFFECTS ON MICROROGANISMS.....	13
<b>2.2 PHENOL.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1 SOURCES.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2 PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES... 14</b>	<b>14</b>
<b>2.2.3 USES.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.4 TOXIC EFFECTS OF PHENOL ON LIVINGS     THINGS.....</b>	<b>16</b>
2.2.4.1 TOXIC EFFECTS ON MAN.....	16
2.2.4.2 TOXIC EFFECTS ON ANIMALS.....	16
2.2.4.3 TOXIC EFFECTS ON MICROORGANISMS.....	17
<b>2.3 METHODS OF METAL REMOVAL.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.1 PHYSICO-CHEMICAL METHODS.....</b>	<b>18</b>
2.3.1.1 Adsorption.....	18
2.3.1.2 Evaporation .....	19
2.3.1.3 Ion Exchange .....	20
2.3.1.4 Precipitation .....	20
2.3.1.5 Reverse Osmosis .....	21
<b>2.3.2 BIOLOGICAL METHODS.....</b>	<b>21</b>
2.3.2.1 Detoxification.....	21
2.3.2.2 Cr(VI) Reduction.....	23
(a) <i>Cr(VI)-Reducing Microorganisms</i> .....	23
(b) <i>Enzymatic Mechanisms for Cr(VI) Reduction</i> .....	25
(c) <i>Genetic for Cr(VI) Reduction</i> .....	27



## CONTENTS (CONT.)

	<b>Page</b>
2.3.2.3 Biodegradation.....	28
(a) <i>Phenol Degradation</i> .....	29
(b) <i>Genetic for Phenol Degradation</i> .....	31
<b>2.4 METAL-METAL TOXIC INTERACTIONS.....</b>	<b>36</b>
<b>2.4.1 Cr-Zn INTERACTIONS.....</b>	<b>36</b>
<b>2.4.2 Cr-Fe INTERACTIONS.....</b>	<b>36</b>
<b>2.5 PHENOL AS CARBON AND ENERGY</b>	
<b>SOURCE FOR GROWTH.....</b>	<b>37</b>
<b>2.5.1 ENERGETIC AND BACTERIAL GROWTH.....</b>	<b>39</b>
<b>2.5.2 EFFECT OF PHENOL ON OTHER</b>	
<b>COMPOUNDS IN BACTERIAL ISOLATES.....</b>	<b>40</b>
<b>2.5.3 DIAUXIE.....</b>	<b>43</b>
<b>2.5.4 THE GROWTH OF <i>Pseudomonas</i> sp. ON A</b>	
<b>MIXTURE OF GLUCOSE AND PHENOL.....</b>	<b>44</b>
<b>2.5.5 BACTERIAL COCULTURES IN</b>	
<b>MULTIPLE SUBSTRATES.....</b>	<b>46</b>
<b>2.5.6 SYNERGISM.....</b>	<b>47</b>
<b>3 MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1 SOURCES OF MICROORGANISMS.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1.1 SAMPLES.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1.2 BACTERIAL REFERENCE STRAINS.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2 CHEMICALS, REAGENTS, STAINING DYES AND</b>	
<b>INSTRUMENTS.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.1 CHEMICALS.....</b>	<b>50</b>

## CONTENTS (CONT.)

	<b>Page</b>
<b>3.2.2 REAGENTS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.3 STAINING DYES.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.4 INSTRUMENTS.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3 CULTURE MEDIA.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3.1 GENERAL MEDIA.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3.2 SELECTIVE MEDIA.....</b>	<b>53</b>
<b>3.3.3 MEDIUM FOR RESISTANT TEST.....</b>	<b>53</b>
<b>3.3.4 MEDIUM FOR EFFICIENCY TEST.....</b>	<b>53</b>
<b>3.4 STAININGS FOR IDENTIFICATION.....</b>	<b>54</b>
<b>3.5 BIOCHEMICAL TESTS FOR IDENTIFICATION.....</b>	<b>54</b>
<b>3.6 BACTERIOLOGICAL PROCEDURES.....</b>	<b>54</b>
<b>3.6.1 SAMPLING AND CULTIVATION</b>	
<b>PROCEDURES.....</b>	<b>54</b>
<b>3.6.1.1 Sampling Procedures.....</b>	<b>54</b>
<b>3.6.1.2 Isolation of Resistant Bacterial Strains.....</b>	<b>55</b>
<b>3.6.1.3 Resistance Test in Resistant Bacterial</b>	
<b>Isolates.....</b>	<b>55</b>
<b>3.6.1.4 Identification of the Selected Bacterial</b>	
<b>strains.....</b>	<b>55</b>
<b>3.6.1.5 Stability of the Resistance to Chromium</b>	
<b>or Phenol or Chromium/Phenol of the</b>	
<b>Selected Bacterial Strains after Repeated</b>	
<b>Culturing.....</b>	<b>56</b>
<b>3.6.1.6 Resistance of the Selected Bacterial Strains</b>	
<b>to Other Heavy Metals.....</b>	<b>56</b>

## CONTENTS (CONT.)

	Page
<b>3.6.2 EFFECTS OF SOME GROWTH FACTORS ON THE SELECTED BACTERIAL STRAINS...56</b>	
3.6.2.1 Effect of pH.....56	56
3.6.2.2 Effect of Temperature.....57	57
<b>3.6.3 EFFECTS OF PHENOL ON GROWTH RATE OF THE SELECTED BACTERIAL STRAINS...57</b>	
<b>3.7 CHEMICAL PROCEDURES.....58</b>	
<b>3.7.1 EFFICIENCY OF CHROMIUM DETOXIFICATION AND PHENOL DEGRADATION BY THE SELECTED BACTERIAL STRAINS.....58</b>	
3.7.1.1 Incubation Periods and Contact Time.....58	58
3.7.1.2 Effect of Low Concentrations of Chromium Detoxification and Phenol Degradation and Phenol Degradation on Nine Cocultures and Three Single Cultures.....60	60
3.7.1.3 Effect of High Concentrations of Chromium Detoxification and Phenol Degradation and Phenol Degradation on Three Cocultures and Three Single Cultures .....61	61
<b>3.7.2 EFFECTS OF SOME ENVIRONMENTAL FACTORS ON CHROMIUM DETOXIFICATION AND PHENOL DEGRADATION.....61</b>	

## CONTENTS (CONT.)

	<b>Page</b>
3.7.2.1 Effect of pH.....	61
3.7.2.2 Effect of Temperature.....	62
<b>3.7.3 EFFICIENCY OF THE SELECTED BACTERIAL ISOLATES ON DEGRADATION OF THE DERIVATIVE OF PHENOL.....</b>	<b>62</b>
<b>4 RESULTS.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1 ISOLATION, SCREENING AND SELECTION OF CHROMIUM-RESISTANT BACTERIA, PHENOL- RESISTANT BACTERIA AND CHROMIUM/PHENOL- RESISTANT BACTERIA.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1.1 CHROMIUM, PHENOL AND CHROMIUM/PHENOL-RESISTANT BACTERIAL ISOLATES.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1.2 STABILITY OF BACTERIAL RESISTANCE....</b>	<b>64</b>
<b>4.1.3 RESISTANCE OF THE SELECTED BACTERIAL STRAINS TO OTHER HEAVY METALS.....</b>	<b>78</b>
<b>4.1.4 EFFECTS OF pH AND TEMPERATION ON VIABLE COUNTS OF THE SELECTED BACTERIAL STRAINS.....</b>	<b>78</b>
<b>4.2 EFFECTS OF PHENOL ON GROWTH RATE OF THE SELECTED BACTERIAL STRAINS.....</b>	<b>83</b>

## CONTENTS (CONT.)

	Page
<b>4.3 EFFICIENCY OF CHROMIUM DETOXIFICATION AND PHENOL DEGRADATION BY THE SELECTED BACTERIAL STRAINS .....</b>	<b>83</b>
<b>4.3.1 INCUBATION PERIODS AND CONTACT         TIME.....</b>	<b>83</b>
<b>4.3.2 EFFECT OF LOW CONCENTRATIONS OF         CHROMIUM AND PHENOL DEGRADATION         AND PHENOL DEGRADATION ON NINE         COCULTURES AND THREE SINGLE         CULTURES.....</b>	<b>89</b>
<b>4.3.3 EFFECT OF LOW CONCENTRATIONS OF         CHROMIUM AND PHENOL DEGRADATION         AND PHENOL DEGRADATION ON NINE         COCULTURES AND THREE SINGLE         CULTURES .....</b>	<b>89</b>
<b>4.4 EFFICIENCY OF SOME ENVIRONMENTAL FACTORS ON CHROMIUM DETOXIFICATION AND PHENOL DEGRADATION.....</b>	<b>94</b>
<b>4.6 EFFICIENCY OF PHENOL DERIVATIVE DEGRADATION BY THE SELECTED BACTERIAL STRAINS.....</b>	<b>94</b>
<b>5 DISCUSSION AND CONCLUSION.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>112</b>

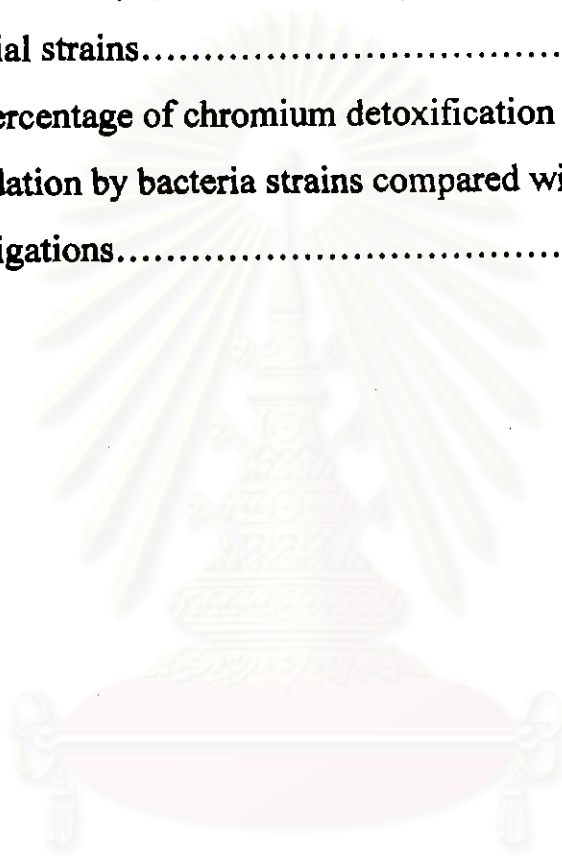


## LIST OF TABLES

<b>Table</b>		<b>Page</b>
4.1	Three sets of experiment about resistance in 495 strains bacterial isolates.....	65
4.2	Some characteristics and identification of nine strains of the chromium-resistant, phenol-resistant and chromium/phenol-resistant bacterial isolates.....	66
4.3	Stability of the resistance to chromium or phenol or chromium/phenol of nine selected bacterial strains after repeated culturing.....	77
4.4	Resistance to other heavy metals of the selected bacterial strains.....	79
4.5	Effect of pH and temperature on growth of the selected bacterial strains.....	80
4.6	Effect of phenol on growth rate of the selected bacterial strains.....	84
4.7	Effect of incubation periods of CPR-16 on contact times.....	86
4.8	Effect of low concentrations; 100, 200, 300 and 400 µg/ml at contact time 15 min., incubation period 6 hr. by nine cocultures and three single cultures.....	90
4.9	Effect of high concentrations; 500, 1000, 1500 and 2000 µg/ml at contact time 15 min., incubation period 6 hr. by three cocultures and three single cultures.....	92
4.10	Effect of pH and temperature on growth of the three cocultures and three single cultures.....	95

## LIST OF TABLES (CONT.)

<b>Table</b>	<b>Page</b>
4.11 Efficiency of phenol derivative degradation on various weeks; 1, 2 and 3 week by the selected bacterial strains.....	98
5.1 The percentage of chromium detoxification and phenol degradation by bacteria strains compared with the former investigations.....	107



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.1 Schematic representation of electron transport to Cr(VI) in <i>E. coli</i> for two pathways of electron transport to Cr(VI).....	26
2.2 The ortho cleavage pathway ( $\beta$ -keto adipate pathway) for oxidation of benzoate.....	32
2.3 The meta cleavage pathway for oxidation of phenol .....	33
2.4 Metabolites, enzymes and inducers of the ortho and meta pathways in <i>P. putida</i> .....	34
2.5 Schematic diagram of biological oxidation of an electron donor for energy and transfer of the energy for cell synthesis. Either an organic electron donor or carbon dioxide may provide the cellular need for carbon.....	41
2.6 Batch growth of <i>Pseudomonas</i> sp. on a mixture of glucose and phenol: cell biomass (curve 1), residual glucose (curve 2), and residual phenol (curve 3). The medium containing 250 mg/L glucose and 250 mg/L phenol was inoculated by cells initially grown on glucose (note that glucose was the preferential substrate). At the time indicated by the arrow the glucose-phenol mixture was added for the second time (note that in this case phenol was preferential substrate).....	45
4.1 Colonial characteristics of chromium-resistant bacterial strains CrR-2 ( <i>Escherichia</i> sp.) grown on NA (a) and NA containing 2400 $\mu$ g/ml chromium (b), incubated at 37°C for 24 hr., and gram staining (c).....	68

## LIST OF FIGURES (CONT.)

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
4.2 Colonial characteristics of chromium-resistant bacterial strains CrR-14 ( <i>Pseudomonas</i> sp.) grown on NA (a) and NA containing 2400 µg/ml chromium (b), incubated at 37°C for 24 hr., gram staining (c), and Electron Microscope (d) .....	69
4.3 Colonial characteristics of chromium-resistant bacterial strains CrR-15 ( <i>Enterobacter</i> sp.) grown on NA (a) and NA containing 2400 µg/ml chromium (b), incubated at 37°C for 24 hr., and gram staining (c).....	70
4.4 Colonial characteristics of phenol-resistant bacterial strains PhR-26 ( <i>Klebsiella</i> sp.) grown on NA (a) and NA containing 2000 µg/ml phenol (b), incubated at 37°C for 24 hr., gram staining (c), and Electron Microscope (d).....	71
4.5 Colonial characteristics of phenol-resistant bacterial strains PhR-33 ( <i>Pseudomonas</i> sp.) grown on NA (a) and NA containing 2000 µg/ml phenol (b), incubated at 37°C for 24 hr., and gram staining (c).....	72
4.6 Colonial characteristics of phenol-resistant bacterial strains PhR-64 ( <i>Escherichia</i> sp.) grown on NA (a) and NA containing 2000 µg/ml phenol (b), incubated at 37°C for 24 hr., and gram staining (c).....	73

## LIST OF FIGURES (CONT.)

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
4.7 Colonial characteristics of chromium/phenol-resistant bacterial strains CPR-4 ( <i>Pseudomonas</i> sp.) grown on NA (a) and NA containing 1200 µg/ml chromium-phenol (b), incubated at 37°C for 24 hr., and gram staining (c).....	74
4.8 Colonial characteristics of chromium/phenol-resistant bacterial strains CPR-16 ( <i>Proteus</i> sp.) grown on NA (a) and NA containing 1200 µg/ml chromium-phenol (b), incubated at 37°C for 24 hr., ram staining (c) and Electron Microscope (d).....	75
4.9 Colonial characteristics of chromium/phenol-resistant bacterial strains CPR-17 ( <i>Escherichia</i> sp.) grown on NA (a) and NA containing 1200 µg/ml chromium-phenol (b), incubated at 37°C for 24 hr., and gram staining(c).....	76
4.10 Effect of pH on growth of the bacterial strains.....	81
4.11 Effect of temperature on growth of the bacterial strains.....	82
4.12 Effect of phenol on growth rate of the selected bacterial strains.....	85
4.13 Efficiency of Cr(VI) detoxification and phenol degradation at contact time 15 min. varied from incubation period; 6, 12, 24 and 48 hr. by CPR-16.....	87
4.14 Efficiency of Cr(VI) detoxification and phenol degradation at incubation period 6 hr. varied from contact time; 15, 30, 45 and 60 min. by CPR-16.....	88

## LIST OF FIGURES (CONT.)

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
4.15 Efficiency of Cr(VI) detoxification and phenol degradation at incubation period 6 hr., contact time 15 min. varied from concentration; 100, 200, 300 and 400 $\mu\text{g/ml}$ .....	91
4.16 Efficiency of Cr(VI) detoxification and phenol degradation at incubation period 6 hr., contact time 15 min. varied from concentration; 500, 1000, 1500 and 2000 $\mu\text{g/ml}$ .....	93
4.17 Effect of pH on growth of the three cocultures and three single cultures.....	96
4.18 Effect of temperature on growth of the three cocultures and three single cultures.....	97
4.25 Efficiency of degradation of 50 $\mu\text{g/ml}$ p-Cresol, p-Chlorophenol and p-Nitrophenol, on the third week.....	99
D.1 Standard curve of chromium by colorimetric method.....	133
D.1 Standard curve of phenol by direct photometric method.....	134

## ABBREVIATION AND SYMBOL

Ag	=	Silver
AgNO <sub>3</sub>	=	Silver nitrate
A.N.	=	Atomic number
B.P.	=	Boiling point
Cd	=	Cadmium
CdCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	=	Cadmium chloride
cm	=	Centimeter
CPR-	=	Chromium/phenol-resistant bacterial isolates
Cr	=	Chromium
Cr(III)	=	Chromic ion
Cr(VI)	=	Chromate
CrR-	=	Chromium-resistant bacterial isolates
Cu	=	Copper
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	=	Copper sulfate
°C	=	Degree celsius
g	=	Gram
g/kg	=	Gram/kilogram
g/L	=	Gram/liter
Hg	=	Mercury
HNO <sub>3</sub>	=	Nitric acid
H <sub>2</sub> S	=	Hydrogen sulfide
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	=	Sulfuric acid

$K_2CrO_4$	=	Potassium chromate
$K_2Cr_2O_7$	=	Potassium dichromate
Kg	=	Kilogram
Kb	=	Kilobase
L	=	Liter
m	=	Meter
mg	=	Milligram
mg/kg	=	Milligram/kilogram
mg/L	=	Milligram/liter
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
mmol	=	Millimole
Mn	=	Manganese
$MnSO_4 \cdot H_2O$	=	Manganese sulfate
mol	=	Mole
M.P.	=	Melting point
M.W.	=	Molecular weight
$\mu g$	=	Microgram
$\mu g/g$	=	Microgram/gram
$\mu g/L$	=	Microgram/liter
$\mu g/ml$	=	Microgram/milliliter
$\mu mol$	=	Micromole
$\mu mol/L$	=	Micromole/liter
$\mu mol/mg$	=	Micromole/milligram
NA	=	Nutrient Agar
NB	=	Nutrient Broth
$NH_4Cl$	=	Ammonium chloride

Ni	=	Nickel
$\text{NiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	=	Nickel sulfate
nm	=	Nanometer
NS	=	0.85% Normal saline
PB	=	Phosphate buffer
Ph	=	Phenol
PhR-	=	Phenol-resistant bacterial isolates
ppb	=	Parts per Billion
ppm	=	Parts per Million
Temp	=	Temperature
U	=	Uranium
V	=	Volume
W	=	Weight
Zn	=	Zinc
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	=	Zinc Sulfate

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย