



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียและพืชในการส่งเสริมการ
บำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนด้วยพืชและการพัฒนาเซลล์ตรึง
แบคทีเรียสำหรับการเติมหัวเชื้อในดิน

โดย รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี

มิถุนายน 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียและพืชในการส่งเสริมการ
บำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนด้วยพืชและการพัฒนาเซลล์ตรึง
แบคทีเรียสำหรับการเติมหัวเชื้อในดิน

รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี
คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และมหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล และการทำวิจัยในครั้งนี้ได้รับความช่วยเหลือในการทำการทดลองบางส่วนจาก คุณจิรวิฐ์ แสงทอง นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล รวมทั้งนางสาวกุลชญา เสร็จกิจ นางสาวจิราภรณ์ วันกุ่มภา นายพงศ์ศรัณย์ โรจนธีรนาถ นางสาวชลธิชา เชื้อผาสุข นางสาวนิราภร ศิริปัญญาชัย นายวีระกิตติ์ วนิชวิทย์ และนายอดิเทพ นิสัยตรงศรีสุข นักศึกษาระดับปริญญาโทและปริญญาตรีของคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และขอขอบคุณคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนประเภท “ทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นกลาง ประจำปี พ.ศ. 2557 เลขที่ RSA5780026” จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยมหิดล

รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจภรณ์ ประภักดิ์
นักวิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA5780026

ชื่อโครงการ: การทำงานร่วมกันของแบคทีเรียและพืชในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนด้วยพืชและการพัฒนาเซลล์ตรึงแบคทีเรียสำหรับการเติมหัวเชื้อในดิน

ชื่อนักวิจัย: รศ.ดร.เบญจภรณ์ ประภักดิ์ คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล: benjaphorn.pra@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 16 มิถุนายน 2557 – 15 มิถุนายน 2560

บทคัดย่อ:

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมคือ *Micrococcus* sp. MU1 *Pseudomonas* sp. PM2 และ *Arthrobacter* sp. TM6 ในการเพิ่มการละลายของแคดเมียมในดินในสภาวะที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพด้วยการเติมสารอาหารและส่งเสริมการเติบโตและการบำบัดแคดเมียมในดินโดยใช้พืช ตลอดจนศึกษาผลของการใช้เซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมบนโคโตซานและถ่านชีวภาพต่อการส่งเสริมบำบัดแคดเมียมในดินโดยใช้พืช ผลการศึกษาพบว่าดินปนเปื้อนที่เติม *Arthrobacter* sp. และเติมสารอาหารให้มีอัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนในดิน เท่ากับ 20:1 มีปริมาณแคดเมียมในรูป Bioavailable form เพิ่มขึ้น และจากผลการศึกษาพบว่าพืชในโรงเรือนทดลอง พบว่า *Micrococcus* sp. ช่วยส่งเสริมการเติบโตของข้าวโพดที่ปลูกในดินไม่ปนเปื้อนและดินปนเปื้อนแคดเมียม และยังช่วยเพิ่มการสะสมของแคดเมียมในส่วนรากและส่วนยอดของข้าวโพดได้อีกด้วย และพบว่าการกระตุ้นทางชีวภาพโดยเติมสารอาหารให้มีอัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนในดินเท่ากับ 20:1 และการเติม *Micrococcus* sp. ช่วยส่งเสริมให้वानเศรษฐีและถั่วเหลืองมีการเติบโตได้มากที่สุด ส่วนการกระตุ้นทางชีวภาพและการเติม *Arthrobacter* sp. ช่วยส่งเสริมให้वानเศรษฐีและถั่วเหลืองมีการสะสมแคดเมียมได้สูงสุด สำหรับผลการศึกษาของเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. บนโคโตซานและถ่านชีวภาพ พบว่าเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. บนโคโตซานและถ่านชีวภาพสามารถรอดชีวิตในดินปนเปื้อนแคดเมียมได้ และพบว่าการใช้เซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. บนโคโตซานและถ่านชีวภาพมีประสิทธิภาพในการเพิ่มการสะสมแคดเมียมในवानเศรษฐีได้น้อยกว่าการใช้เซลล์อิสระ ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 9 ของการเก็บเกี่ยวพืช ประสิทธิภาพของการใช้เซลล์ตรึงแบคทีเรียบนโคโตซานส่งผลในการส่งเสริมการสะสมแคดเมียมในवानเศรษฐีได้ไม่แตกต่างกับการใช้เซลล์อิสระ สรุปได้ว่าการเติมแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมร่วมกับการกระตุ้นทางชีวภาพด้วยสารอาหารสามารถช่วยส่งเสริมกระบวนการบำบัดแคดเมียมโดยใช้พืชได้ นอกจากนี้ การใช้เซลล์ตรึงแบคทีเรียยังสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนโดยใช้พืชได้ ดังนั้น เทคโนโลยีการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนทางชีวภาพโดยใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมจัดเป็นแนวทางที่เหมาะสมในการจัดการพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียมได้ต่อไป

คำหลัก: แบคทีเรียต้านทานแคดเมียม, ดินปนเปื้อนแคดเมียม, การบำบัดโดยพืช, เซลล์ตรึงแบคทีเรีย

Abstract

Project Code: RSA5780026

Project Title: Synergistic use of bacteria and plant to promote cadmium phytoremediation in contaminated soil and development of immobilized cells for soil bioaugmentation

Investigator: Assoc.Prof.Dr.Benjaphorn Prapagdee
Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University

E-mail Address: benjaphorn.pra@mahidol.ac.th

Project Period: 16 June 2014 – June 2017

Abstract:

This research aims to study the potential of cadmium-resistant bacteria, including *Micrococcus* sp. MU1, *Pseudomonas* sp. PM2 and *Arthrobacter* sp. TM6 to increase soil cadmium solubility under the nutrient biostimulation and to promote plant growth and cadmium phytoremediation. The results found that the bioavailable form of cadmium in soil inoculation with *Arthrobacter* sp. and the biostimulation at C/N ratio of 20:1 increased compared to the uninoculated control. The results of the greenhouse study found that *Micrococcus* sp. promoted the growth of *Zea mays* L. planted in uncontaminated and cadmium-spiked soils. *Micrococcus* sp. increased cadmium accumulation in the roots and shoots of *Z. mays* L. *Micrococcus* sp. inoculation and the biostimulation at C/N ratio of 20:1 promoted the growth of *Chlorophytum laxum* and *Glycine max* L. The highest cadmium accumulation in *C. laxum* and *G. max* L. was found in plants with *Arthrobacter* sp. inoculation and the biostimulation at C/N ratio of 20:1. The results of chitosan- and biochar-immobilized *Arthrobacter* sp. showed that chitosan- and biochar-immobilized *Arthrobacter* sp. TM6 can survive in cadmium contaminated soil. In addition, the efficiency of chitosan- and biochar-immobilized *Arthrobacter* sp. TM6 on increasing cadmium accumulation in *C. laxum* was lower than that of *Arthrobacter* sp. TM6 free cells. Except at week 9 of the harvest period, the efficiency of chitosan-immobilized *Arthrobacter* sp. and *Arthrobacter* sp. free cells of on increasing cadmium accumulation in *C. laxum* was not different. Our study concluded that combined use of bioaugmentation with cadmium-resistant bacteria and nutrient biostimulation can promote cadmium phytoremediation. The use of chitosan-immobilized bacterial cells increased the cadmium phytoremediation. Therefore, bioremediation technology of cadmium-contaminated soil using plant and cadmium-resistant bacteria is an appropriate approach for management of cadmium-polluted areas.

Keywords: Cadmium-resistant bacteria, Cadmium-contaminated soil, Phytoremediation, Immobilized bacterial cells

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฅ
หน้าสรุปโครงการ	1
บทที่ 1 บทนำ	3
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	3
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	5
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	6
1.4 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย	6
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 วิธีการศึกษา	7
2.1 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ	7
2.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	7
2.3 การตรวจวัดการสร้างกรด IAA สารไซโตไคน์ และ Exopolymer ที่ ระยะเวลาต่างๆ ของการเจริญของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียม	8
2.4 การทดสอบผลของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมต่อความยาวของรากแก้ว เหลืองและข้าวโพดในสภาวะที่มีและไม่มีแคดเมียมโดยวิธี <i>In vivo root</i> elongation assay	9
2.5 การเก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนแคดเมียมและการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และเคมีของดิน	10
2.6 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในการละลายหรือ การเพิ่มค่า Bioavailability ของแคดเมียมในดินปนเปื้อนทั้งในสภาวะที่มีการ กระตุ้นทางชีวภาพ (Biostimulation) และไม่มีการกระตุ้นทางชีวภาพ	11
2.7 การศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์ในดิน ปนเปื้อนแคดเมียม ทั้งแบบที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและไม่มีการกระตุ้นทาง ชีวภาพ	11
2.8 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมที่สร้างกรด IAA ใน การส่งเสริมการเติบโตและการสะสมแคดเมียมในข้าวโพด	12

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
2.9 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินโดยใช้วุ้นเสริมและถั่วเหลืองในสภาวะที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพ (Biostimulation)	13
2.10 การเตรียมเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมและการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียม	13
2.11 การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมภายหลังการเก็บรักษาและการรอดชีวิตของเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในดินปนเปื้อนแคดเมียม	14
2.12 การประเมินความสามารถของเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในวัสดุตรึงในการช่วยเพิ่มการละลายหรือเพิ่มค่า Bioavailability ของแคดเมียมในดินปนเปื้อน	14
2.13 การทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมบนโคโคซานและถ่านชีวภาพในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินโดยใช้วุ้นเสริม	14
2.14 การศึกษาศึกษากลุ่มประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่ทำการบำบัดโดยใช้วุ้นเสริมร่วมกับเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล	15
2.15 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	15
บทที่ 3 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	16
3.1 การเจริญและปริมาณสารที่สร้างจากแบคทีเรียต้านทานแคดเมียม	16
3.2 ผลของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมต่อความยาวของรากพืชทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีแคดเมียม	18
3.3 ผลของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมต่อการละลายหรือค่า Bioavailability ของแคดเมียมในดินในสภาวะที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหาร	19
3.4 การรอดชีวิตของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในดินปนเปื้อนแคดเมียมทั้งในสภาวะที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหาร	21
3.5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการเติบโตของข้าวโพดในดินปนเปื้อนและไม่ปนเปื้อนแคดเมียมและการสะสมแคดเมียมของข้าวโพด	23
3.6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินของวุ้นเสริมและถั่วเหลืองในสภาวะที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหาร	27
3.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียม	34

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.8 ผลการรอดชีวิตของเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมภายหลังการเก็บรักษาและการรอดชีวิตของเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในดินปนเปื้อนแคดเมียม	36
3.9 ผลของเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมต่อการละลาย หรือค่า Bioavailability ของแคดเมียมในดิน	37
3.10 ประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินโดยใช้วัชพืชรุกราน	38
3.11 กลุ่มประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนแคดเมียม	42
บทที่ 4 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	44
4.1 สรุปผลการศึกษา	44
4.2 ข้อเสนอแนะ	47
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก การเผยแพร่ผลงาน	52

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินปนเปื้อนแคดเมียมที่เก็บจากพื้นที่ปนเปื้อนในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก	20
2	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในการเพิ่มการละลายของแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อนทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีสารอาหาร	21
3	สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินที่นำมาใช้ทดสอบ	23
4	ผลของ <i>Micrococcus</i> sp. MU1 ต่อการเติบโตของต้นข้าวโพดที่ปลูกในดินที่ไม่ปนเปื้อนและปนเปื้อนแคดเมียม	24
5	ค่า PEC, BAF และ TF ของข้าวโพดที่ปลูกในดินปนเปื้อนที่มีการเติมและไม่เติม <i>Micrococcus</i> sp. MU1	26
6	สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินปนเปื้อนแคดเมียมที่เก็บจากพื้นที่ปนเปื้อนในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก	27
7	ผลของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมต่อการเติบโตของวุ้นเศรษฐกิจที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม	28
8	ความเข้มข้นของแคดเมียมที่สะสมในวุ้นเศรษฐกิจหลังปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม	29
9	ค่า PEC, BAF และ TF ของวุ้นเศรษฐกิจที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม	30
10	ผลของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมต่อการเติบโตของถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม	31
11	ความเข้มข้นของแคดเมียมที่สะสมในถั่วเหลืองหลังปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม	32
12	ค่า PEC, BAF และ TF ของถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม	33
13	พื้นที่ผิว ปริมาตรรูพรุน และ ขนาดรูพรุนของโคโคซานและถ่านชีวภาพ	35
14	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ตรึง <i>Arthrobacter</i> sp. TM6 บนโคโคซานและถ่านชีวภาพในดินปนเปื้อนแคดเมียม	36
15	ผลของเซลล์ตรึง <i>Arthrobacter</i> sp. TM6 ในการส่งเสริมการละลายแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อน	37
16	ผลของเซลล์ตรึง <i>Arthrobacter</i> sp. TM6 บนโคโคซานและถ่านชีวภาพต่อการเติบโตของวุ้นเศรษฐกิจที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม	38
17	ความเข้มข้นของแคดเมียมที่สะสมในวุ้นเศรษฐกิจหลังปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติมเซลล์ตรึง <i>Arthrobacter</i> sp. TM6 บนโคโคซานและถ่านชีวภาพ	39
18	ค่า PEC, BAF และ TF ของวุ้นเศรษฐกิจที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติมเซลล์ตรึง <i>Arthrobacter</i> sp. TM6 บนโคโคซานและถ่านชีวภาพ	41

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
19	สายพันธุ์ของแบคทีเรียจากแถบดีเอ็นเอเด่นจากการวิเคราะห์ด้วย PCR-DGGE	43

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แบคทีเรียต้านทานแคดเมียม; (ก) <i>Micrococcus</i> sp. MU1 (ข) <i>Pseudomonas</i> sp. PM2 และ (ค) <i>Arthrobacter</i> sp. TM6 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่เติมแคดเมียม	9
2	พื้นที่เก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนแคดเมียมในอำเภอมะนัง จังหวัดตาก	10
3	การเจริญและการสร้างกรด IAA ของ <i>Micrococcus</i> sp. MU1	16
4	การเจริญและการสร้างสารไฮเดรโอโพรของ <i>Pseudomonas</i> sp. PM2	17
5	การเจริญและการสร้างสาร Exopolymer ของ <i>Arthrobacter</i> sp. TM6	17
6	ผลของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมต่อความยาวของรากแก้วเหลืองที่เพาะในสภาวะที่ไม่มีและมีแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ	18
7	ผลของ <i>Micrococcus</i> sp. MU1 ต่อความยาวของรากข้าวโพดในสภาวะที่ไม่มีและมีแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ	19
8	การรอดชีวิตของ <i>Micrococcus</i> sp. MU1 ในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติมและไม่มีการเติมสารอาหาร	22
9	การรอดชีวิตของ <i>Pseudomonas</i> sp. PM2 ในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติมและไม่มีการเติมสารอาหาร	22
10	การรอดชีวิตของ <i>Arthrobacter</i> sp. TM6 ในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติมและไม่มีการเติมสารอาหาร	22
11	ความเข้มข้นของแคดเมียมที่สะสมในส่วนรากและยอดของข้าวโพดที่เก็บเกี่ยวในช่วงระยะเวลาต่างๆ หลังจากปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม	25
12	การกำจัดแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อนของข้าวโพดที่มีการเติม <i>Micrococcus</i> sp. MU1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียในช่วงระยะเวลาต่างๆ	26
13	ลักษณะทางกายภาพของวัสดุตรึง (ก1) ไคโตซาน และ (ข1) ถ่านชีวภาพ และเซลล์ตรึง <i>Arthrobacter</i> sp. TM6 บน (ก2) ไคโตซานและ (ข2) ถ่านชีวภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 10000 เท่า	35
14	โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนแคดเมียมจากการวิเคราะห์โดยวิธี PCR-DGGE	42

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมทั้งในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงจำนวน 3 สายพันธุ์คือ *Micrococcus* sp. MU1, *Pseudomonas* sp. PM2 และ *Arthrobacter* sp. TM6 ที่สร้างกรดอินโดล-3-อะซิติก (Indole-3-acetic acid; IAA) สารไซเดอโรฟอรัส (Siderophore) และสาร Exopolymer ตามลำดับ ในการเพิ่มการละลายของแคดเมียมในดิน และส่งเสริมการเติบโตและการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนโดยใช้พืช ผลการศึกษาพบว่า *Micrococcus* sp. MU1 สร้างกรด IAA ได้สูงสุด 561.43 ± 11.93 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมงของการเจริญ ส่วน *Pseudomonas* sp. PM2 สร้างสารไซเดอโรฟอรัสได้สูงสุด $71.75 \pm 1.11 \mu\text{M}$ of Deferoxamine mesylate equivalents ที่ 48 ชั่วโมงของการเจริญ และ *Arthrobacter* sp. TM6 สร้าง Exopolymer ได้สูงสุด 19.64 ± 0.19 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมงของการเจริญ และพบว่า *Micrococcus* sp. MU1 สามารถเพิ่มความยาวของรากแก้วเหลืองได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีแคดเมียม และนำดินปนเปื้อนแคดเมียมที่เก็บจากพื้นที่จังหวัดตากมาทดสอบผลของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์ต่อการละลายแคดเมียมในดินในสภาวะการกระตุ้นทางชีวภาพ (Biostimulation) โดยการเติมสารอาหารที่มีการค่าอัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N ratio) เท่ากับ 10:1, 10:2 และ 20:1 พบว่าดินปนเปื้อนแคดเมียมที่เติม *Arthrobacter* sp. TM6 และมีการปรับค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 ช่วยให้ปริมาณแคดเมียมในรูป Bioavailable form เพิ่มขึ้น และพบว่าแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถเพิ่มจำนวนในดินปนเปื้อนแคดเมียมในช่วงแรกจนถึงวันที่ 5 หลังจากนั้นปริมาณเซลล์ค่อนข้างคงที่ และค่อยๆ ลดลง โดยจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์สูงสุดเมื่อมีการปรับค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1

นอกจากนี้ เมื่อนำ *Micrococcus* sp. MU1 มาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเติบโตและการสะสมแคดเมียมของข้าวโพด (*Zea mays* L.) อายุ 4 สัปดาห์ ที่ปลูกในดินไม่ปนเปื้อนและดินปนเปื้อนแคดเมียม (ดินที่มีการเติมสารละลายแคดเมียม) โดยการเติม *Micrococcus* sp. MU1 ในดินที่ปลูกข้าวโพด (Bioaugmentation) พบว่า *Micrococcus* sp. MU1 ช่วยเพิ่มความยาวราก ความยาวยอด (ใบ) และชีวมวลของข้าวโพดทั้งที่ปลูกในดินไม่ปนเปื้อนและดินปนเปื้อนแคดเมียม ข้าวโพดมีการสะสมแคดเมียมในส่วนยอด (ใบ) มากกว่าส่วนรากในช่วงแรกหลังการเพาะปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แต่ในช่วงระยะเวลาการปลูกตั้งแต่ 4 สัปดาห์ถึง 12 สัปดาห์ ข้าวโพดสะสมแคดเมียมในส่วนรากมากกว่าในส่วนยอด นอกจากนี้ ยังพบว่าการเติม *Micrococcus* sp. MU1 ในการปลูกพืชช่วยส่งเสริมให้ข้าวโพดสะสมแคดเมียมได้มากขึ้นทั้งในส่วนรากและส่วนยอด โดยข้าวโพดที่ระยะการปลูกที่ 6 สัปดาห์มีปริมาณแคดเมียมสะสมสูงที่สุด และพบว่าค่า Phytoextraction coefficient (PEC) ค่า Bioaccumulation factor (BAF) และค่า Translocation factor (TF) ของข้าวโพดในชุดทดลองที่มีการเติม *Micrococcus* sp. MU1 มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย ข้าวโพดมีค่า PEC ประมาณ 1.0 และค่า BAF มากกว่า 1.0 ในช่วงการเก็บเกี่ยวในสัปดาห์ที่ 12 และตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ตามลำดับ ซึ่งค่า

PEC และค่า BAF มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเจริญของข้าวโพด ส่วนค่า TF มากกว่า 1.0 เฉพาะในช่วงการเก็บเกี่ยวในสัปดาห์ที่ 2 และลดลงตามอายุพืช เนื่องจากแคดเมียมส่วนใหญ่สะสมที่ราก ซึ่งพืชที่มีค่า PEC และ BAF มากกว่า 1.0 จัดเป็นพืชที่มีศักยภาพสำหรับ Phytoextraction แต่อย่างไรก็ตาม ค่า TF ในช่วงการเก็บเกี่ยวในสัปดาห์ที่ 6 และ 12 มีค่าลดลงต่ำมาก ดังนั้น ข้าวโพดจึงจัดเป็นพืชที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นพืชบำบัดแคดเมียมโดยอาศัยกระบวนการ Phytoextraction ได้ดีในช่วงแรก แต่ช่วงหลังกระบวนการบำบัดแคดเมียมของข้าวโพดอาศัยกระบวนการ Phytostabilization

สำหรับผลการบำบัดดินปนเปื้อนแคดเมียมของว่านเศรษฐี (*Chlorophytum laxum*) อายุ 6 เดือน ในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่เก็บจากพื้นที่ปนเปื้อน อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก และมีการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหารที่ปรับค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 และเติมแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมแต่ละสายพันธุ์ (Bioaugmentation-assisted by biostimulation) พบว่าว่านเศรษฐีเติบโตได้สูงสุดในดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพโดยปรับค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 และเติม *Micrococcus* sp. MU1 ในขณะที่ว่านเศรษฐีที่ปลูกในดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Arthrobacter* sp. TM6 มีการสะสมแคดเมียมได้สูงสุด และพบว่าแคดเมียมส่วนใหญ่สะสมในรากของว่านเศรษฐีสูงกว่าในส่วนยอด (ใบ) ของว่านเศรษฐี เนื่องจากลักษณะรากที่เป็นหัวขนาดเล็ก (Tuberous rhizomes) แต่มีปริมาณการสะสมแคดเมียมในส่วนรากและส่วนยอดไม่แตกต่างกันมาก และว่านเศรษฐีมีค่า PEC ต่ำในทุกชุดการทดลอง และค่า BAF เพิ่มขึ้นตามอายุพืชที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ว่านเศรษฐีที่ปลูกในดินที่มีการเติม *Arthrobacter* sp. TM6 และปรับค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 มีค่า TF มากกว่า 1.0 แสดงว่าแคดเมียมมีการเคลื่อนย้ายจากส่วนรากไปส่วนยอดของว่านเศรษฐีได้ดี ดังนั้น ว่านเศรษฐีเหมาะแก่การนำไปบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนโดยอาศัยกระบวนการ Phytoextraction

ส่วนผลการบำบัดดินปนเปื้อนแคดเมียมโดยใช้ถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) อายุ 2 สัปดาห์ พบว่าถั่วเหลืองที่ปลูกในดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหารที่ปรับค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 และเติม *Micrococcus* sp. MU1 เติบโตสูงสุดในทุกระยะการเก็บตัวอย่าง และถั่วเหลืองที่ปลูกในดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Arthrobacter* sp. TM6 มีการสะสมแคดเมียมได้สูงสุดในทุกระยะการเก็บตัวอย่าง โดยถั่วเหลืองสะสมแคดเมียมในส่วนรากสูงกว่าในส่วนใบและส่วนต้นหลายในปริมาณที่แตกต่างกันมากในทุกชุดการทดลองตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บเกี่ยวพืช และยังพบแคดเมียมปริมาณสูงในส่วนฝักและเมล็ดของถั่วเหลือง นอกจากนี้ ยังพบว่าถั่วเหลืองมีค่า PEC และ BAF สูงมากกว่า 1.0 แสดงว่าถั่วเหลืองมีความสามารถในการดูดดึงแคดเมียมออกจากดินและสะสมแคดเมียมได้ดี โดยเฉพาะถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อนที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Arthrobacter* sp. TM6 แต่แคดเมียมส่วนใหญ่สะสมในส่วนรากไม่เคลื่อนย้ายไปสู่ส่วนยอด ทำให้ค่า TF ของถั่วเหลืองมีค่าต่ำมากตลอดอายุการเก็บเกี่ยวพืช ดังนั้น ถั่วเหลืองจึงจัดเป็นพืชบำบัดแคดเมียมโดยอาศัยกระบวนการ Phytostabilization อย่างไรก็ตาม แคดเมียมที่สะสมในเมล็ดถั่วเหลืองยังสูงเกินค่ามาตรฐานสำหรับการนำมาใช้เป็นอาหาร

จากผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการละลายแคดเมียมออกจากดินและการบำบัดแคดเมียมโดยใช้พืช พบว่า *Arthrobacter* sp. TM6 มีความสามารถดีที่สุดในการช่วยละลายแคดเมียมออกจากดิน และทำให้พืชทั้งว่านเศรษฐีและถั่วเหลืองมีการสะสมแคดเมียมได้มากขึ้น ดังนั้นจึงเลือก *Arthrobacter* sp. TM6 มาใช้ในการตรึงเซลล์ด้วยโคโตซานและถ่าน

ชีวภาพ และนำเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโตซานและถ่านชีวภาพไปส่องดูลักษณะทาง สัณฐานวิทยา และทดสอบการรอดชีวิตของภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโตซานและถ่านชีวภาพลดลงหลังเก็บรักษานาน 1 เดือน ประมาณร้อยละ 25.0 และ 13.2 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นในวัสดุตรึงก่อนการ เก็บรักษา ส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโตซานและถ่านชีวภาพในดิน ปนเปื้อนแคดเมียม โดยเติมเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโตซานหรือถ่านชีวภาพ ในดิน ปนเปื้อนแคดเมียม และผสมให้เข้ากัน ก่อนเก็บตัวอย่างดินและเซลล์ตรึงที่ระยะเวลาต่างๆ มาตรวจวัด จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ผลการศึกษาพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Arthrobacter* sp. TM6 ในดินปนเปื้อน แคดเมียมเพิ่มขึ้นในจนถึงวันที่ 10 และ 15 ก่อนลดลงตามระยะเวลาการเจริญในดินปนเปื้อนแคดเมียม นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโตซานและถ่านชีวภาพ ยังมีประสิทธิภาพใน การช่วยเพิ่มการละลายแคดเมียมในดินปนเปื้อนในรูป Water soluble form ได้ใกล้เคียงกับการใช้เซลล์ อิสระ (Free cells) แต่เพิ่มค่า DTPA-extractable form ได้น้อยกว่าการใช้เซลล์อิสระ

ผลการศึกษาการส่งเสริมการเติบโตของวุ้นแอสเครนเซีย (อายุ 2 เดือน) โดยใช้เซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโตซานและเซลล์ตรึงบนถ่านชีวภาพ เปรียบเทียบกับการเติมเซลล์อิสระ *Arthrobacter* sp. TM6 พบว่าเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโตซานหรือถ่านชีวภาพไม่มีผลต่อ การส่งเสริมการเติบโตของวุ้นแอสเครนเซียทุกช่วงระยะเวลาการเก็บเกี่ยวพืชเช่นเดียวกับการเติมเซลล์อิสระ *Arthrobacter* sp. TM6 ส่วนผลการศึกษาของเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโตซานหรือถ่าน ชีวภาพต่อการส่งเสริมการสะสมแคดเมียมของวุ้นแอสเครนเซียเปรียบเทียบกับ การเติมเซลล์อิสระ *Arthrobacter* sp. TM6 พบว่าการใช้เซลล์ตรึงแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการสะสมแคดเมียม ในวุ้นแอสเครนเซียได้น้อยกว่าการใช้เซลล์อิสระ โดยเฉพาะในช่วงแรกของการเก็บตัวอย่าง แต่ในระยะเวลา การเก็บตัวอย่างพืชในสัปดาห์ที่ 9 พบว่าเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโตซานมีประสิทธิภาพ ส่งเสริมให้วุ้นแอสเครนเซียสะสมแคดเมียมได้ไม่แตกต่างกับการใช้เซลล์อิสระ *Arthrobacter* sp. TM6 โดย แคดเมียมสะสมในส่วนรากใกล้เคียงกับส่วนยอด (ใบ) ของวุ้นแอสเครนเซีย และการใช้เซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโตซานช่วยส่งเสริมให้วุ้นแอสเครนเซียสะสมแคดเมียมได้สูงกว่าการใช้เซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนถ่านชีวภาพ อาจเนื่องมาจากลักษณะรูพรุนของโคโตซานทำให้แบคทีเรียเกาะได้ในปริมาณ มากและมีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย

ผลการศึกษากลุ่มประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติมเซลล์อิสระและเซลล์ ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 โดยวิธี PCR-Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE) พบว่า ดินปนเปื้อนแคดเมียมที่นำมาปลูกวุ้นแอสเครนเซียมีกลุ่มแบคทีเรียเด่นคือ *Salmonella subterranean*, *Arthrobacter phenanthrenivorans* และ *Achromobacter denitrificans* และยังสามารถตรวจพบ *Arthrobacter* sp. TM6 ในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติม *Arthrobacter* sp. TM6 ทั้งในรูปเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงบนโคโตซานและถ่านชีวภาพหลังจากการปลูกวุ้นแอสเครนเซีย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักในดินพบได้ในหลายประเทศและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น โดยสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายและการปนเปื้อนของโลหะหนักไปยังแหล่งต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม เกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการทำเหมืองแร่ อีกทั้งการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจ ทำให้เกิดการขยายตัวของภาคอุตสาหกรรม ซึ่งโลหะหนักเป็นวัตถุดิบที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท รวมทั้งเกิดจากการทิ้งหรือการฝังกลบของเสียอันตรายอย่างผิดวิธี ซึ่งการปนเปื้อนของโลหะหนักในดินจัดเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม เพราะโลหะหนักมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ โดยเฉพาะการปนเปื้อนของโลหะหนักในดินบริเวณที่เป็นพื้นที่เกษตรกรรม ทำให้เกิดการถ่ายทอดโลหะหนักผ่านทางห่วงโซ่อาหาร และเกิดผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ที่มีการบริโภคพืชและผลิตผลจากพืชที่ปลูกในดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก โดยทำให้เกิดพิษต่อระบบต่างๆ ของร่างกายทั้งแบบเรื้อรังหรือเฉียบพลัน โลหะหนักชนิดหนึ่งที่พบการปนเปื้อนในหลายพื้นที่และเป็นปัญหาสำคัญของมลพิษทางดินคือแคดเมียม เพราะแคดเมียมจัดเป็นโลหะหนักที่ไม่จำเป็นต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต (Non-essential element) และสามารถสะสมในสิ่งมีชีวิตและเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต ซึ่งการได้รับแคดเมียมแบบเรื้อรัง (Chronic exposure) ทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของไต โลหิตจาง กระดูกพรุนและแตกหักง่าย (Liu et al., 2009) นอกจากนี้ International Agency for Research on Cancer (IARC) และ National Toxicology Program ยังจัดให้แคดเมียมอยู่ในกลุ่มของสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (Human carcinogen) (Waalkes, 2000; Huff et al., 2007) และจากการทดสอบการก่อมะเร็งของแคดเมียมในสัตว์ทดลองพบว่าแคดเมียมสามารถก่อให้เกิดเนื้องอกในสัตว์ทดลองได้หลายอวัยวะหรือเนื้อเยื่อ (Joseph, 2009)

สำหรับในประเทศไทย พบการปนเปื้อนแคดเมียมในน้ำ ดินตะกอน และดินในพื้นที่บริเวณลำห้วยแม่ตา อำเภอมะขาม จังหวัดตาก โดยเฉพาะดินที่ใช้ทำการเพาะปลูกมีปริมาณแคดเมียมในดินสูงเกินค่ามาตรฐานคุณภาพดินเพื่อการอยู่อาศัยและการเกษตร ที่กำหนดปริมาณแคดเมียมในดินไม่เกิน 37 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งในบริเวณดังกล่าวเป็นพื้นที่ศักยภาพแร่ มีการทำเหมืองแร่สังกะสี โดยแคดเมียมและสังกะสีเป็นสายแร่ที่อยู่คู่กัน ทำให้ปริมาณแคดเมียมที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมีมากตามปริมาณการผลิตสังกะสี นอกจากนี้ การบุกเบิกพื้นที่เพื่อทำการเกษตรของประชาชนในพื้นที่ การเปิดหน้าดินทำให้มีการชะล้างแคดเมียมออกมามากขึ้น รวมทั้งการใช้ปุ๋ยฟอสเฟตในพื้นที่เกษตรกรรม เพื่อปรับปรุงคุณภาพดิน โดยในปุ๋ยฟอสเฟตไม่ได้มีเฉพาะธาตุและสารอาหารสำหรับการเติบโตของพืช แต่ยังมีโลหะปนเปื้อนอีกหลายชนิด (Metal impurity) รวมทั้งแคดเมียม สาเหตุเหล่านี้จึงทำให้มีการสะสมแคดเมียมในดินเพิ่มมากขึ้นและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ที่อาศัยบริเวณที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม (เบญจภรณ์ ประภักดี และจิรวิฐ์ แสงทอง, 2559)

ดังนั้น จึงต้องมีการหาวิธีการที่เหมาะสมในการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียมให้อยู่ในสถานะที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะการใช้วิธีทางชีวภาพ หรือเรียกว่า Bioremediation ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก โดยเฉพาะการใช้พืช (Phytoremediation) ร่วมกับการใช้จุลินทรีย์มาช่วยในการบำบัดแคดเมียมในดิน โดยการอาศัยความสามารถของพืชในการดูดซับและสะสมแคดเมียมในพืช ร่วมกับการใช้แบคทีเรียด้านทานแคดเมียมที่ช่วยส่งเสริมการเติบโตของพืช และการช่วยละลายแคดเมียมในดินให้อยู่ในรูปที่พืชดูดซับได้ หรือเรียกว่า Bioavailable form ซึ่งการใช้พืชร่วมกับการเติมแบคทีเรียด้านทานแคดเมียม (Bioaugmentation) ในการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อน จะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการบำบัดแคดเมียมได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ การใช้วิธีการกระตุ้นทางชีวภาพ (Biostimulation) โดยเติมสารอาหารเข้าไปช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียจะช่วยให้แบคทีเรียทำงานได้ดียิ่งขึ้น รวมทั้งการพัฒนาเซลล์ตรึงแบคทีเรีย (Immobilized cells) เพื่อเพิ่มความอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อนำไปเติมลงในดิน และสามารถนำไปใช้ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนได้สะดวก โดยวัสดุตรึงที่ดีควรเป็นวัสดุจากธรรมชาติที่ไม่มีพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ เช่น ไคโตซาน (Gentili et al., 2006) และถ่านชีวภาพ

ดังนั้น การวิจัยนี้จึงศึกษาผลของการกระตุ้นทางชีวภาพต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียม 3 สายพันธุ์ คือ *Micrococcus* sp. MU1 เป็นแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมที่สร้างกรดอินโดล-3-อะซิติก (IAA) *Pseudomonas* sp. PM2 เป็นแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมที่สร้างไซเดอโรฟอร์ (Siderophore) และ *Arthrobacter* sp. TM6 เป็นแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมที่สร้าง Exopolymer ในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในวุ้นเครชชีและถั่วเหลือง และการพัฒนาเซลล์ตรึงของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมบนไคโตซานและถ่านชีวภาพ ตลอดจนการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมทั้งที่อยู่ในรูปแบบเซลล์อิสระ (Free cells) และเซลล์ตรึงบนไคโตซาน (Chitosan-immobilized cell) และถ่านชีวภาพ (Biochar-immobilized cell) ในการช่วยเพิ่มการละลายของแคดเมียมในดินปนเปื้อน และการส่งเสริมการเติบโต การดูดซับ (Uptake) และการสะสมแคดเมียมในวุ้นเครชชี ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางสำคัญในการใช้ประโยชน์ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมกับพืชเพื่อช่วยส่งเสริมกระบวนการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียมโดยใช้พืชได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1) เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในการเพิ่มการละลายของแคดเมียมหรือการเพิ่มค่า Bioavailability ของแคดเมียมในดินปนเปื้อน
- 2) เพื่อพิสูจน์ผลการส่งเสริมร่วมกันของการใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในการบำบัดแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อน
- 3) เพื่อพัฒนาเซลล์ตรึงแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมโดยใช้วัสดุตรึงจากธรรมชาติและทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ตรึงแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมภายหลังการเก็บรักษา
- 4) เพื่อทดสอบความสามารถของเซลล์ตรึงแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนของพืชไม้ประดับ
- 5) เพื่อศึกษากลุ่มประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนที่ทำการบำบัดแคดเมียมโดยใช้พืชร่วมกับเซลล์ตรึงแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และในโรงเรือนเพาะชำพืช โดยตัวอย่างดินปนเปื้อนแคดเมียมที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นดินปนเปื้อนจากพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียมที่เก็บจากพื้นที่การเกษตรในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก สำหรับตัวแทนพืชไม้ประดับที่ใช้คือ ว่านเศรษฐี ส่วนพืชไร่ คือ ถั่วเหลือง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ปลูกในพื้นที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

1.4 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ระยะเวลาในการศึกษาตลอดโครงการ 3 ปี ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ.2557 ถึงเดือนมิถุนายนพ.ศ. 2560 สำหรับสถานที่ศึกษาคือห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม และโรงเรือนเพาะชำต้นไม้ คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบความสามารถของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมทั้งในรูปแบบของเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในการส่งเสริมการละลายของแคดเมียมในดินปนเปื้อน
- 2) ทราบความสามารถของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมทั้งในรูปแบบของเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในการส่งเสริมการเติบโตและการสะสมแคดเมียมของว่านเศรษฐีและถั่วเหลือง
- 3) ทราบผลของการกระตุ้นทางชีวภาพ (Biostimulation) โดยการปรับสารอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการละลายของแคดเมียมในดินปนเปื้อนและการสะสมแคดเมียมในพืช

บทที่ 2

วิธีการศึกษา

2.1 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- Analytical balance (Mettler Toledo XS204)
- Autoclave (Hirayama model HA-300MII)
- Binocular light microscope (Olympus model CH-2)
- Biological safety cabinet (LFBH-90MSSP)
- Flame atomic absorption spectrophotometer (AA240FS)
- Horizontal submarine gel electrophoresis apparatus
- Hot-air oven (Contherm model CAT 260M)
- Hotplate (Labinco model L35)
- Incubator (Termaks model KB8400)
- Incubator shaker (Thermo electron model 481)
- Membrane filter apparatus
- Micropipette (Rainin, Mettler Toledo)
- Microwave digester (Ethos TC)
- pH meter (Orion model EA940)
- Refrigerated centrifuge (Hermel model 2323K)
- Scanning electron microscope (JSM-5800LV)
- Spectrophotometer (Thermo electron model 481)
- Thermocycler (Perkin-Elmer Cetus Model 480)
- UV light (Chemi Genius Bioimaging system)
- Vortex mixer (Vortex-Genie2 model G-560E)
- Vacuum pump (Gas model DAA-V174-ED)
- Whatman filter paper No.42
- กระจกพลาสติกและวัสดุเพาะชำพืช
- เครื่องแก้วทางวิทยาศาสตร์

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- Chrome azurol S (CAS) agar
- Luria-Bertani (LB) agar
- Luria-Bertani (LB) broth
- Absolute ethanol (C_2H_5OH)

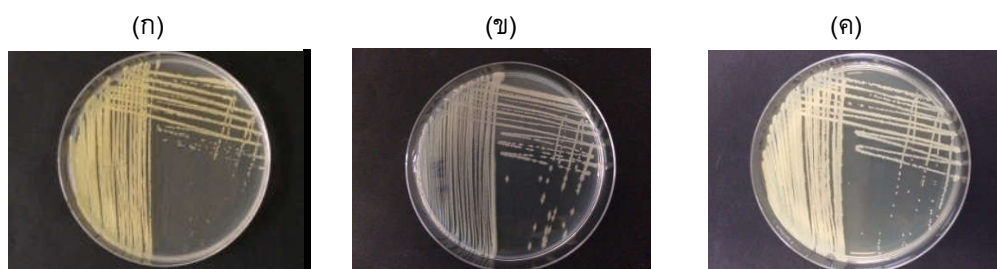
- Cadmium nitrate ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$)
- Ferrous sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Glucose
- Glycerol
- Hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA)
- Hydrochloric acid (HCl)
- Hydrogen peroxide (H_2O_2)
- Indole-3-acetic acid (IAA)
- Iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Lead nitrate ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)
- L-tryptophan
- Magnesium sulphate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Manganese sulphate monohydrate ($\text{MnO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Molybdenum trioxide (MoO_3)
- Nitric acid (HNO_3)
- Piperazine-N,N'-bis [2-ethanesulfonic acid] (PIPES)
- Sodium acetate ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$)
- Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)
- Sodium hydroxide (NaOH)
- Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Tris-base)

2.3. การตรวจวัดการสร้างกรด IAA สารไซเดอโรฟออร์ และ Exopolymer ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการเจริญของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียม

นำแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมมาแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมจำนวน 3 สายพันธุ์ที่สร้างกรดอินโดล-3-อะซีติก (IAA-producing *Micrococcus* sp. MU1) (รูปที่ 1ก) สารไซเดอโรฟออร์ (Siderophore-producing *Pseudomonas* sp. PM2) (รูปที่ 1ข) และ Exopolymer (Exopolymer-producing *Arthrobacter* sp. TM6) (รูปที่ 1ค) ที่คัดแยกโดย Prapagdee และคณะ (2013) Duangboobpha และคณะ (2012) และ Prapagdee และคณะ (2013) ตามลำดับ มาทำการตรวจวัดสารที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สร้างที่ระยะเวลาการเจริญต่าง ๆ สำหรับการตรวจวัดปริมาณกรด IAA โดยการเพาะเลี้ยง *Micrococcus* sp. MU1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่เติม L-tryptophan ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28^oซ ก่อนเก็บเซลล์ที่เวลา 8, 12, 24, 36, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ และปั่นเก็บส่วนน้ำใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4^oซ ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เพื่อนำส่วนน้ำใสที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณกรด IAA ตามวิธีการของ Gordon และ Weber (1951)

ส่วนการตรวจวัดปริมาณสารไซเดอโรฟออร์ โดยเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp. PM2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 minimal medium และนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28^oซ

ก่อนเก็บเซลล์ที่เวลา 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ และปั่นเก็บส่วนน้ำใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 °C ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เพื่อนำส่วนน้ำใสที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณสารไฮดรอกซีโรฟอร์ในรูปของสาร Deferoxamine mesylate (DFAM) ซึ่งเป็นสารไฮดรอกซีโรฟอร์ในกลุ่ม Hydroxamate (Amico et al., 2008) ตามวิธีการของ Schwyn และ Neillands (1986) และการตรวจวัดปริมาณสาร Exopolymer โดยเพาะเลี้ยง *Arthrobacter* sp. TM6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB และนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 °C ก่อนเก็บสารแขวนลอยเซลล์ที่เวลา 8, 12, 24, 36, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อนำมาสกัดสาร Exopolymer ตามวิธีการของ Kunito และคณะ (2001) และนำตะกอน Exopolymer ที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณในรูปของน้ำตาลกลูโคสโดยใช้วิธีการ Phenol-sulfuric (Dubois et al., 1956) และในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อตรวจวัดปริมาณสารที่สร้างขึ้น จะทำการตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีการวัดค่าความขุ่นเซลล์โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร



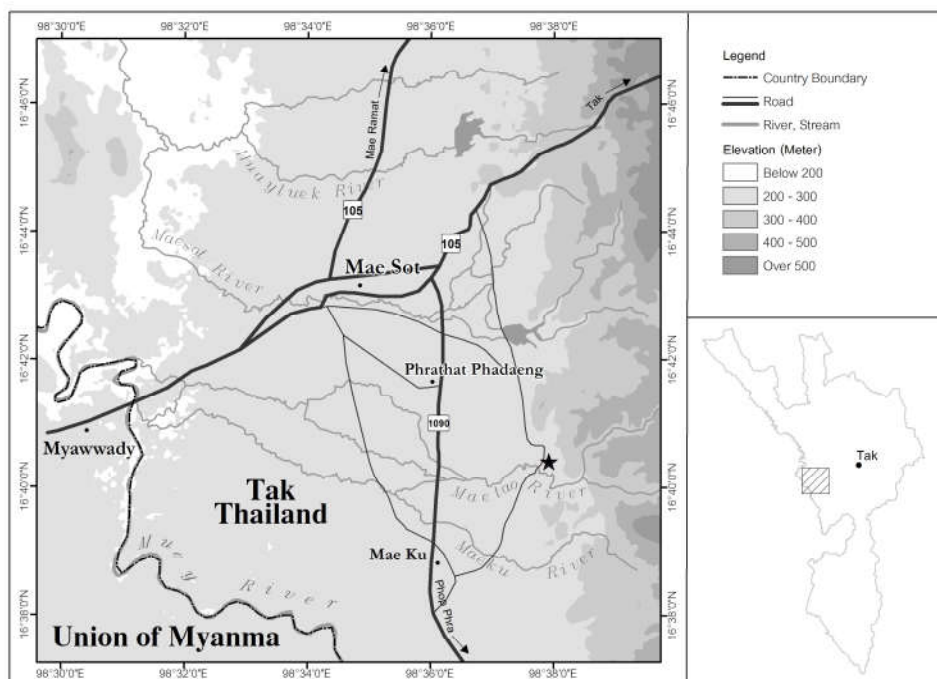
รูปที่ 1 แบคทีเรียด้านทานแคดเมียม; (ก) *Micrococcus* sp. MU1 (ข) *Pseudomonas* sp. PM2 และ (ค) *Arthrobacter* sp. TM6 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่เติมแคดเมียม

2.4 การทดสอบผลของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมต่อความยาวของรากแก้วเหลืองและข้าวโพดในสภาวะที่มีและไม่มีแคดเมียมโดยวิธี *In vivo* root elongation assay

การเตรียมเมล็ดแก้วเหลืองและข้าวโพดมาทำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่บริเวณรอบเมล็ดออก (Surface sterilization) โดยแช่เมล็ดในส่วนผสมของเอทานอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในอัตราส่วน 1:1 และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 2 ครั้ง ก่อนเก็บในจานแก้วปราศจากเชื้อ และเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียด้านทานแคดเมียม โดยนำแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมแต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB และบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น ก่อนนำมาถ่ายใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่เติม L-tryptophan ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้มีค่าความขุ่นเซลล์เท่ากับ $OD_{600} \sim 0.1$ และนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 °C ก่อนเก็บเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้มาปรับค่าความขุ่นเซลล์เท่ากับ $OD_{600} \sim 0.2$ และนำเมล็ดพืชใส่ลงไป ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำเมล็ดพืชไปเพาะบนกระดาดทรายรองในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อตามวิธีของ Belimov และคณะ (2005) และ Sheng และคณะ (2008) โดยบนกระดาดทรายรองมีการเติมแคดเมียมที่มีความเข้มข้นต่างๆ และนำเมล็ดพืชมาบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5-10 วัน สังเกตการงอกและวัดความยาวของราก

2.5 การเก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนแคดเมียมและการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน

การเก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนแคดเมียมจากบริเวณพื้นที่การเกษตรในหมู่บ้านพะเต๊ะ ตำบลพระธาตุผาแดง อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก (พิกัด (N 16° 40.593, E 098° 37.630) (รูปที่ 2) โดยเฉพาะในส่วนหน้าดินความลึก 0-20 เซนติเมตร นำดินมาผึ่งไว้ให้แห้งในที่ร่ม ก่อนนำมาบดและตรวจวัดสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน ได้แก่ ขนาดของอนุภาคดิน (Particle size distribution) เนื้อดิน (Soil texture) pH ของดิน ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity; EC) ความจุในการแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation exchange capacity; CEC) ปริมาณสารอินทรีย์ (Organic matter) ไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Available P) โพแทสเซียมที่สกัดได้ (Extractable K) แมกนีเซียมที่สกัดได้ (Extractable Mg) และโซเดียมที่สกัดได้ (Extractable Na) โดยส่งตัวอย่างดินวิเคราะห์ที่ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และวิเคราะห์ปริมาณของแคดเมียมทั้งหมดในดิน (Total cadmium) โดยนำดินไปสกัดด้วยกรดไนตริกและกรดไฮโดรคลอริกในอัตราส่วน 1:3 (v/v) (Aqua regia solution) (Acid-digested form) โดยใช้เครื่อง Microwave digester ตามวิธีของ McGrath and Cunliffe (1985) และ US.EPA method 3052 (1996) และกรองส่วนที่ย่อยแล้วด้วยกระดาษกรอง Whatman No.42 เพื่อนำส่วนน้ำใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมทั้งหมดในดินโดยใช้เครื่อง FAAS และทำการวิเคราะห์ค่าแคดเมียมในรูป Bioavailable form โดยการสกัดด้วยสาร diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) (DTPA-extractable cadmium) ตามวิธีของ Quevauviller และคณะ (1998) และ Faust และ Christians (2000) และกรองส่วนสกัดด้วย DTPA แล้วโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.42 เพื่อนำส่วนน้ำใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมด้วยเครื่อง Flame Atomic Adsorption Spectrophotometry (FAAS)



รูปที่ 2 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนแคดเมียมในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

2.6 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในการละลายหรือการเพิ่มค่า Bioavailability ของแคดเมียมในดินปนเปื้อนทั้งในสภาวะที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพ (Biostimulation) โดยการเติมสารอาหาร

นำดินปนเปื้อนแคดเมียมที่เตรียมได้ไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave) ก่อนนำไปทดสอบการส่งเสริมการละลายของแคดเมียมในดิน โดยแบ่งตัวอย่างดินเป็นชุดทดลองที่ไม่มีการกระตุ้นทางชีวภาพ (ไม่เติมสารอาหาร) และที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพ โดยการเติมสารอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนในอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) เท่ากับ 10:1, 10:2 และ 20:1 ตามลำดับ (ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน) จากนั้นจึงเติมแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมแต่ละสายพันธุ์ลงในดินตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Rajkumar และ Freitas (2008) โดยนำหัวเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB โดยปรับให้มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $OD_{600} \sim 0.1$ และนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ปราศจากเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง และนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียมาแขวนลอยในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ที่ปราศจากเชื้อ และปรับความเข้มข้นให้ได้ $OD_{600} \sim 1.5$ แล้วจึงนำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเติมลงในตัวอย่างดินปนเปื้อนแคดเมียมที่ฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วน้ำหนัก 10 กรัมในหลอดพลาสติก ส่วนชุดควบคุมเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน และแยกตัวอย่างดินออกเป็น 2 ส่วน โดยดินส่วนที่ 1 นำไปเติมน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ลงในหลอดพลาสติกที่มีตัวอย่างดินและเขย่าอย่างแรง เพื่อชะแคดเมียมออกจากดิน และกรองสารแขวนลอยดินด้วยกระดาษกรอง Whatman No.42 นำส่วนน้ำใสที่กรองได้ไปตรวจวัดค่าแคดเมียมในรูป Water-soluble form โดยใช้เครื่อง FAAS ส่วนตะกอนดินนำไปสกัดแคดเมียมด้วยกรดไนตริก (HNO_3) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ในอัตราส่วน 1:3 (v/v) เพื่อนำไปหาความเข้มข้นของแคดเมียมทั้งหมดในดิน (Acid-digested form) ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3) และนำดินส่วนที่ 2 มาวิเคราะห์ค่าแคดเมียมในรูป Bioavailable form โดยการสกัดด้วยสาร DTPA (DTPA-extractable form) ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3)

2.7 การศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์ในดินปนเปื้อนแคดเมียมในสภาวะที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหาร

เตรียมดินปนเปื้อนแคดเมียมที่ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำ และแบ่งตัวอย่างดินออกเป็นชุดทดลองที่ไม่มีการเติมสารอาหารและมีการเติมสารอาหารคาร์บอนและไนโตรเจน โดยปรับให้มีอัตราส่วน C/N ในดิน เท่ากับ 10:1, 10:2 และ 20:1 นำแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมแต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB โดยปรับให้มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $OD_{600} \sim 0.1$ และนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $OD_{600} \sim 1.0$ ก่อนนำไปเติมในดินปราศจากเชื้อ (5% v/w) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 1, 3, 5, 10, 15 และ 20 วัน เพื่อนำมาตรวจวัดจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตในดิน โดยการ Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB

2.8 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่เรียด้านทานแคดเมียมที่สร้างกรด IAA ในการส่งเสริมการเติบโตและการสะสมแคดเมียมในข้าวโพด

การเตรียมต้นกล้าของข้าวโพด (*Zea mays* L. cv. CPDK 888) โดยการเพาะเมล็ดข้าวโพดในดินปลูกพืชทั่วไปจนมีอายุประมาณ 4 สัปดาห์ ซึ่งต้นกล้าข้าวโพดมีความสูงของลำต้นประมาณ 50 เซนติเมตร และเลือกต้นกล้าข้าวโพดที่สมบูรณ์แข็งแรงไปปลูกในดินไม่ปนเปื้อน และดินปนเปื้อนแคดเมียมในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 เซนติเมตร ที่มีดินปนเปื้อนแคดเมียมกระถางละ 3.0 กิโลกรัม ซึ่งทำการเตรียมดินปนเปื้อนโดยการเติมสารละลายแคดเมียมลงไป 3.0 กรัมในดิน ผสมให้เข้ากันและบ่มดินไว้ในที่ร่มประมาณ 1 เดือน ตามวิธีการของ Thawornchaisit และ Polprasert (2009) และนำดินปนเปื้อนที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมี และปริมาณแคดเมียมในดิน ทำการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียที่เรียด้านทานแคดเมียมที่สร้างกรด IAA; *Micrococcus* sp. MU1 โดยปรับให้มีความขุ่นของสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ $OD_{600} \sim 0.2$ และนำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมได้ไปเติมในดินไม่ปนเปื้อนและดินปนเปื้อนแคดเมียมบริเวณรอบรากต้นกล้าข้าวโพด โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง (ชุดการทดลองละ 3 ขั้ว) ตามรายละเอียดดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) ปลูกพืชในดินไม่ปนเปื้อนแคดเมียม

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) ปลูกพืชในดินไม่ปนเปื้อนแคดเมียม + MU1

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) ปลูกพืชในดินปนเปื้อนแคดเมียม

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) ปลูกพืชในดินปนเปื้อนแคดเมียม + MU1

นำกระถางของแต่ละชุดการทดลองที่ปลูกพืชกระถางละ 1 ต้นมาวางในโรงเรือนทดลองที่ใช้แสงธรรมชาติ และรดน้ำทุกวัน และเก็บตัวอย่างดินและพืชในแต่ละกระถางในสัปดาห์ที่ 2, 4, 6 และ 12 (ระยะให้เมล็ด) สัปดาห์หลังการปลูกพืช ตามลำดับ ทำการวัดการเติบโตของพืชที่ปลูกในดินไม่ปนเปื้อนแคดเมียม โดยการวัดความยาวราก ความสูงต้น และน้ำหนักแห้งของพืช ส่วนพืชที่ปลูกในดินปนเปื้อนจะทำการวัดการเติบโตเช่นเดียวกัน และวัดปริมาณแคดเมียมที่สะสมในส่วนรากและส่วนยอดของพืช โดยนำแต่ละส่วนของพืชไปบดและสกัดด้วยกรดไนตริกและกรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) ในอัตราส่วน 2:1 (v/v) และย่อยด้วยเครื่อง Microwave digester ตามวิธีของ Simmons และคณะ (2003) และ US.EPA method 3052 (1996) และกรองส่วนที่ย่อยได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.42 เพื่อนำส่วนน้ำใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคดเมียมที่สะสมในแต่ละส่วนของพืชด้วยเครื่อง FAAS สำหรับตัวอย่างดินนำไปสกัดด้วยกรดและตรวจวัดปริมาณแคดเมียม เช่นเดียวกับข้อ 3)

นำค่าความเข้มข้นของแคดเมียมในดินและในพืชของชุดการทดลองที่ 3 และ 4 มาคำนวณปริมาณการสะสมแคดเมียมของพืชต่อต้น และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระบวนการ Phytoextraction โดยเปรียบเทียบจากค่า Phytoextraction coefficient (PEC) (Kumar et al., 1995; Ghosh and Singh, 2005) ค่า Bioaccumulation factor (BAF) soil (Khaokaew and Landrot, 2015) และค่าการเคลื่อนที่ของโลหะหนักจากบริเวณส่วนราก (Underground part) ไปสะสมยังบริเวณส่วนเหนือดิน (Aboveground หรือ Aerial part) ของพืช หรือเรียกว่าค่า Translocation factor (TF) (Mattina et al., 2003) ตามสมการต่อไปนี้

$$\text{Phytoextraction coefficient (PEC)} = \frac{\text{ความเข้มข้นแคดเมียมในพืช (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง)}}{\text{ความเข้มข้นแคดเมียมในดิน (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง)}}$$

$$\text{Bioaccumulation factor (BAF)} = \frac{\text{ความเข้มข้นแคดเมียมในพืช (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง)}}{\text{ความเข้มข้นแคดเมียมในรูป Bioavailable form ในดิน (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง)}}$$

$$\text{Translocation factor (TF)} = \frac{\text{ความเข้มข้นแคดเมียมในส่วนยอดของพืช (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง)}}{\text{ความเข้มข้นแคดเมียมในส่วนรากของพืช (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง)}}$$

2.9 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินโดยใช้วุ้นเครพและถั่วเหลืองในสภาวะที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพ (Biostimulation) โดยการเติมสารอาหาร

การเตรียมต้นกล้าของวุ้นเครพ (*Chlorophytum laxum*) อายุประมาณ 6 เดือน และต้นกล้าถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) อายุประมาณ 2 สัปดาห์ มาปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพ (Biostimulation) โดยการเติมสารอาหารให้มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ในดินเท่ากับ 20:1 และมีการเติมแบคทีเรียต้านทานแคดเมียม 3 สายพันธุ์ คือ *Micrococcus* sp. MU1, *Pseudomonas* sp. PM2 และ *Arthrobacter* sp. TM6 โดยวิธีการเตรียมหัวเชื้อใช้วิธีเดียวกับวิธีการศึกษาในข้อ 2.8) โดยพืชแต่ละชนิดแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง (ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ) ตามรายละเอียดดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 (T1) ปลูกพืชในดินปนเปื้อนแคดเมียม
- ชุดการทดลองที่ 2 (T2) ปลูกพืชในดินปนเปื้อนแคดเมียม + เติม C/N ratio 20:1
- ชุดการทดลองที่ 3 (T3) ปลูกพืชในดินปนเปื้อนแคดเมียม + เติม C/N ratio 20:1 + MU1
- ชุดการทดลองที่ 4 (T4) ปลูกพืชในดินปนเปื้อนแคดเมียม + เติม C/N ratio 20:1 + TM6
- ชุดการทดลองที่ 5 (T5) ปลูกพืชในดินปนเปื้อนแคดเมียม + เติม C/N ratio 20:1 + PM2

เก็บตัวอย่างพืชและดิน เพื่อนำมาตรวจวัดการเติบโตของพืชและแคดเมียมในแต่ละส่วนของพืช และปริมาณแคดเมียมในดิน โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.8) โดยเก็บตัวอย่างวุ้นเครพทุก 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ ส่วนถั่วเหลืองเก็บตัวอย่างทุก 1 เดือน เป็นเวลา 3 เดือน โดยแบ่งระยะการเก็บตัวอย่างตามช่วงการเจริญของถั่วเหลืองคือ เดือนที่ 1 ระยะ Vegetative stage ก่อนออกดอก (Before flowering stage) เดือนที่ 2 ระยะ Reproductive stage เริ่มออกฝัก (The beginning pods stage; R3) และเดือนที่ 3 ระยะ Reproductive stage เมล็ดสมบูรณ์ (The full seed stage; R6) และนำค่าความเข้มข้นของแคดเมียมในแต่ละส่วนของพืชและดินมาคำนวณค่า PEC, BAF และ TF

2.10 การเตรียมเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมและการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียม

คัดเลือกแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมที่ให้ผลในการส่งเสริมการละลายแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อน และสะสมแคดเมียมในพืชได้ดีที่สุดมาทำการตรึงเซลล์บนไคโตซานเกล็ด (Flake chitosan) และ

ถ่านชีวภาพ (Biochar) โดยเตรียมวัสดุตั้งให้มีความหนาแน่นประมาณ 2 มิลลิเมตร (ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของเนื้อดิน) และนำแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่เจือจาง 4 เท่าและเติมวัสดุตั้งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนนำไปกรอง เพื่อแยกเซลล์ตั้ง และนำเซลล์ตั้งแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมมาส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และนำไปทดสอบหาค่าพื้นที่ผิว (Surface area) ปริมาตรรูพรุน (Pore volume) และ ขนาดรูพรุน (Pore size) โดยใช้เครื่อง Brunauer–Emmett–Teller (BET)

2.11 การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ตั้งแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมภายหลังการเก็บรักษาและการรอดชีวิตของเซลล์ตั้งแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในดินปนเปื้อนแคดเมียม

นำเซลล์ตั้งแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมมาเก็บใส่หลอดพลาสติกปราศจากเชื้อและเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน และเก็บตัวอย่างเซลล์ตั้งทุก 2 สัปดาห์ เพื่อนำมาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต สำหรับวิธีการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ตั้งแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในดินปนเปื้อนแคดเมียมใช้วิธีการศึกษาเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 5) แต่เติมเซลล์ตั้งแบคทีเรียด้านทานแคดเมียม (5% w/w) ในดินปนเปื้อนปราศจากเชื้อแทนการเติมในรูปเซลล์อิสระ (Free cells)

2.12 การประเมินความสามารถของเซลล์ตั้งแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในวัสดุตั้งในการช่วยเพิ่มการละลายหรือเพิ่มค่า Bioavailability ของแคดเมียมในดินปนเปื้อน

นำเซลล์ตั้งแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมมาเติมลงในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่ปราศจากเชื้อโดยใช้วิธีการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.6) แต่เติมเซลล์ตั้งแบคทีเรียด้านทานแคดเมียม (5% w/w) ในดินปนเปื้อนแทนการเติมในรูปของเซลล์อิสระ

2.13 การทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ตั้งแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมบนไคโตซานและถ่านชีวภาพในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินโดยใช้วัชพืชรูปร่าง

นำเซลล์ตั้งแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมบนไคโตซานและถ่านชีวภาพมาเติมลงในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่ปลูกวัชพืชรูปร่าง อายุประมาณ 2 เดือน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมเฉพาะไคโตซานและถ่านชีวภาพ รวมทั้งชุดทดลองที่เติมเฉพาะเซลล์อิสระของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียม โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง (ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ) ตามรายละเอียดดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 (T1) ปลูกพืชในดินปนเปื้อนแคดเมียม + ไคโตซาน

ชุดการทดลองที่ 2 (T2) ปลูกพืชในดินปนเปื้อนแคดเมียม + ถ่านชีวภาพ

ชุดการทดลองที่ 3 (T3) ปลูกพืชในดินปนเปื้อนแคดเมียม + เซลล์อิสระ

ชุดการทดลองที่ 4 (T4) ปลูกพืชในดินปนเปื้อนแคดเมียม + เซลล์ตั้งบนไคโตซาน

ชุดการทดลองที่ 5 (T5) ปลูกพืชในดินปนเปื้อนแคดเมียม + เซลล์ตั้งบนถ่านชีวภาพ

เก็บตัวอย่างพืชและดิน เพื่อนำมาตรวจวัดการเติบโตและแคดเมียมที่สะสมในแต่ละส่วนของวัชพืชรูปร่าง และปริมาณแคดเมียมในดิน โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.8) โดยเก็บตัวอย่างวัชพืชรูปร่างทุก 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ และนำค่าความเข้มข้นของแคดเมียมในแต่ละส่วนของพืชและดินมาคำนวณค่า PEC, BAF และ TF

2.14 การศึกษาศึกษากลุ่มประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่ทำการบำบัดโดยใช้ วานเครษฐีร่วมกับเซลล์ตรึงแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

นำตัวอย่างดินปนเปื้อนแคดเมียมจากการศึกษาในข้อ 2.13) หลังปลูกวานเครษฐีเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ไปศึกษากลุ่มประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนแคดเมียมและติดตามแบคทีเรียต้านแคดเมียมที่เติมลงไปโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Muyzer et al., 1999) โดยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA โดยวิธี PCR โดยใช้ Universal primers คือ 341F-GC (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-GC Clamp-3') และ 520R (5'-ACCGCGGCTGCTGGC-3') (Muyzer et al., 1993) และนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR product) มาทำ DGGE บนแผ่นพอลิอะคริลอะไมด์เจลความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ที่มี Gradient ความเข้มข้นของสารละลาย Denaturant (ฟอร์มาไมด์และยูเรีย) 30-70 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ DCodeTM system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) จากนั้นย้อมพอลิอะคริลอะไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที และตรวจดูแถบ DNA ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่นแสง 312 นาโนเมตร และเลือกตัดแถบดีเอ็นเอเด่นบนแผ่นเจลมาโคลนเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy และนำไปทรานสฟอร์มเข้าเซลล์ *E. coli* JM109 เพื่อนำเลี้ยงและเพิ่มปริมาณ Recombinant plasmid ก่อนนำไปสกัด และนำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ M13F (-20) (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') ซึ่งจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์ และใช้ระบบ LI-COR® NEN 4200 Global IR2 DNA Sequencing และเครื่อง ABI® PRISM DNA Sequencers และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอมาวิเคราะห์และจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

2.15 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

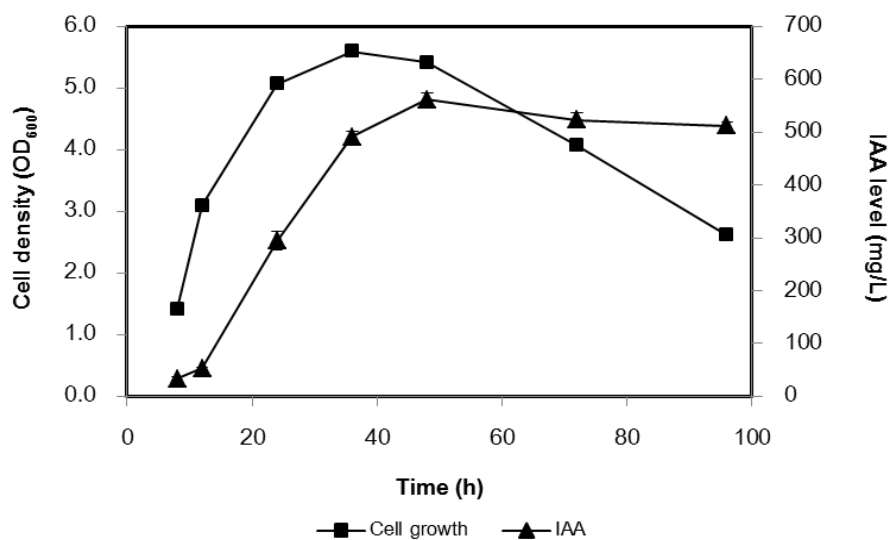
นำข้อมูลการสร้างสาร IAA ไซเดอโรฟอร์ และ Exopolymers จากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ค่าปริมาณแคดเมียมในรูป Water soluble, DTPA-extractable และ Acid-digested forms รวมทั้งปริมาณของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมแต่ละสายพันธุ์ในการรอดชีวิตในดินปนเปื้อนแคดเมียมมาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และนำค่าความยาวรากของเมล็ดพืชทดสอบในสภาวะที่มีแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ และปริมาณแคดเมียมในดินและพืชทดสอบ ตลอดจนความสูงของต้น ความยาวของราก และน้ำหนักแห้งของพืชทดสอบจากผลการศึกษาในระดับเรือนทดลองมาวิเคราะห์ค่าแปรปรวนของข้อมูลแบบทางเดียว (One-way analysis of variance; ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ DUNCAN multiple range test (DMRT) ที่ $p\text{-value} < 0.05$

บทที่ 3

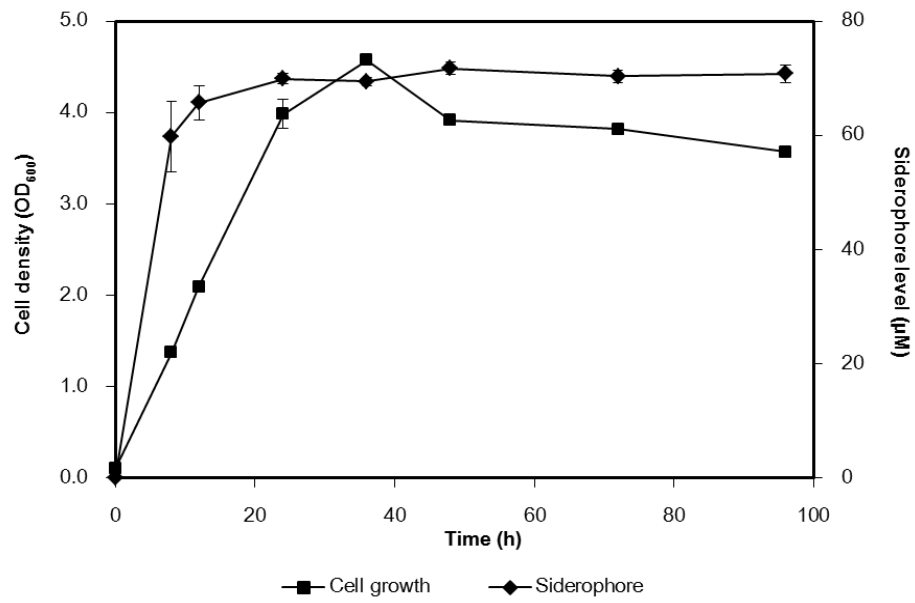
ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 การเจริญและปริมาณสารที่สร้างจากแบคทีเรียด้านทานแคดเมียม

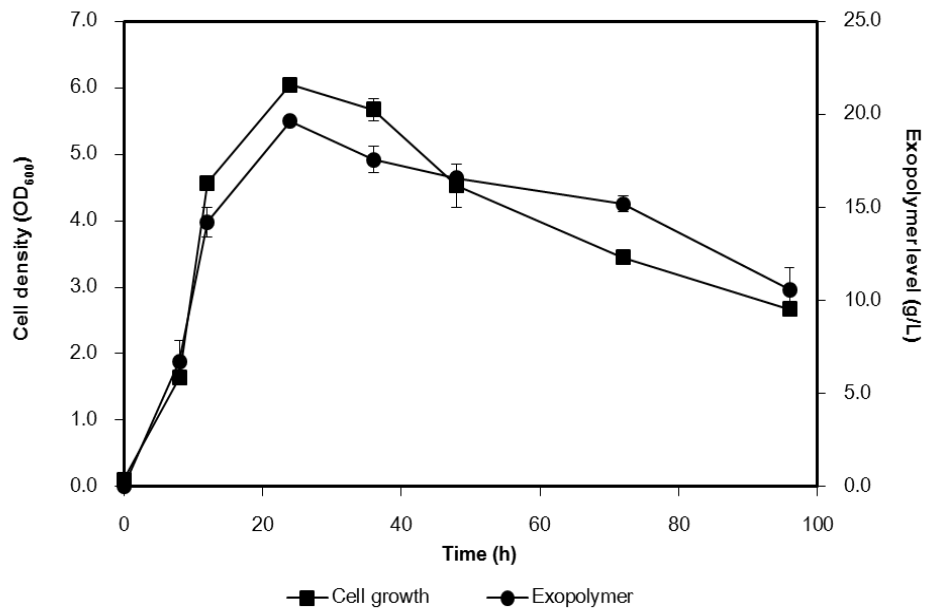
ผลการตรวจวัดการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิก (IAA) สารไซโตโครฟอร และ Exopolymer ที่สร้างจาก *Micrococcus* sp. MU1, *Pseudomonas* sp. PM2 และ *Arthrobacter* sp. TM6 ตามลำดับ ตามระยะเวลาการเจริญต่างๆ แสดงในรูปที่ 3-5 ตามลำดับ โดยพบว่า *Micrococcus* sp. MU1 สามารถสร้างกรด IAA ได้สูงสุด 561.43 ± 11.93 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมงของการเจริญ ส่วน *Pseudomonas* sp. PM2 สามารถสร้างสารไซโตโครฟอรได้สูงสุด 71.75 ± 1.11 μM of deferroxamine mesylate equivalents ที่ 48 ชั่วโมงของการเจริญ และ *Arthrobacter* sp. TM6 สร้าง Exopolymer ได้สูงสุด 19.64 ± 0.19 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมงของการเจริญ ซึ่งมีรายงานว่าแบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างสารเหล่านี้ โดยกรด IAA ทำหน้าที่ในการส่งเสริมการเติบโตของพืช (Ma et al., 2009) นอกจากนี้ ยังพบว่า แบคทีเรียด้านทานแคดเมียมที่สร้างกรด IAA สามารถช่วยส่งเสริมการสะสมแคดเมียมในทานตะวัน (*Helianthus annuus*) ได้ด้วย (Prapagdee et al., 2013) ส่วนสารไซโตโครฟอร เป็นสารที่สามารถจับกับโลหะและเพิ่มการละลายของโลหะออกจากดินได้ โดยพบว่า Siderophore producing bacteria ช่วยเพิ่มการละลายตะกั่วและโครเมียมในดิน (Braud et al., 2009) และ Exopolymer มีประสิทธิภาพในการจับกับไอออนของโลหะ โดยอาศัย Functional groups ที่มีประจุลบเช่น Hydroxyl, Carboxyl, Phosphate และ Sulphate groups (Chang et al., 1995)



รูปที่ 3 การเจริญและการสร้างกรด IAA ของ *Micrococcus* sp. MU1



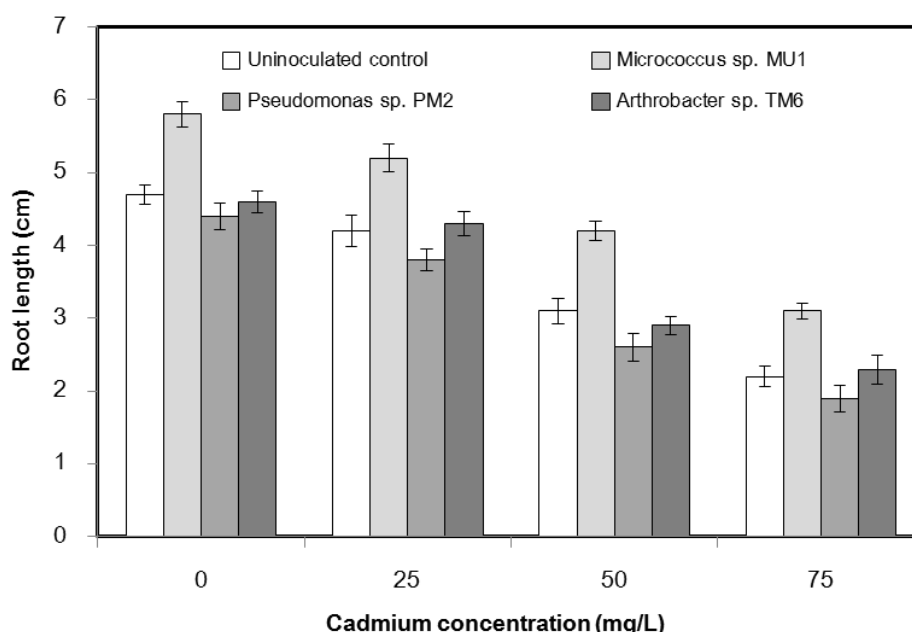
รูปที่ 4 การเจริญและการสร้างสารไซเดอโรฟอรัของ *Pseudomonas* sp. PM2



รูปที่ 5 การเจริญและการสร้างสาร Exopolymer ของ *Arthrobacter* sp. TM6

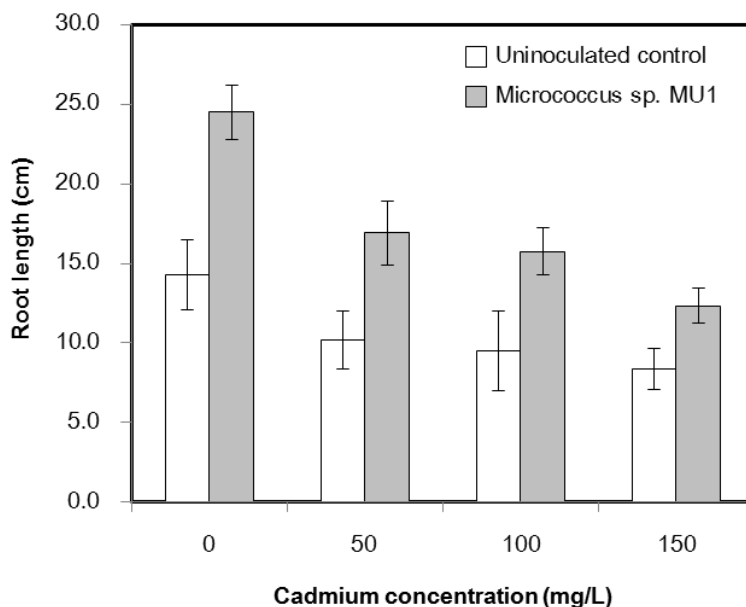
3.2 ผลของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมต่อความยาวของรากพืชทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีแคดเมียม

นำเมล็ดถั่วเหลืองมาแช่ในแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมแต่ละสายพันธุ์และนำไปเพาะเมล็ดบนกระดาษกรองที่เดิมสารละลายแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า *Micrococcus* sp. MU1 ช่วยส่งเสริมความยาวรากของถั่วเหลืองได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีแคดเมียม ในขณะที่ *Pseudomonas* sp. PM2 และ *Arthrobacter* sp. TM6 ไม่มีผลต่อความยาวของรากถั่วเหลือง เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการแช่เมล็ดถั่วเหลืองในแบคทีเรียต้านทานแคดเมียม (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ผลของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมต่อความยาวของรากถั่วเหลืองที่เพาะในสภาวะที่ไม่มีและมีความเข้มข้นต่างๆ

จากผลความสามารถของ *Micrococcus* sp. MU1 ที่ช่วยส่งเสริมความยาวรากของถั่วเหลืองในสภาวะที่มีและไม่มีแคดเมียมได้ดี เนื่องจาก *Micrococcus* sp. MU1 เป็นแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมที่สร้างกรด IAA ได้ จึงนำเฉพาะ *Micrococcus* sp. MU1 มาทดสอบการส่งเสริมความยาวรากของข้าวโพดโดยนำเมล็ดข้าวโพดมาแช่ในแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมแต่ละสายพันธุ์และนำไปเพาะเมล็ดบนกระดาษกรองที่เดิมสารละลายแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 50, 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงผลการศึกษาในรูปที่ 7 โดยพบว่า *Micrococcus* sp. MU1 สามารถช่วยเพิ่มความยาวรากของข้าวโพดได้ทั้งในสภาวะที่ไม่มีแคดเมียมและที่มีแคดเมียมความเข้มข้นสูงถึง 150 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่า ถึงแม้ว่าแคดเมียมมีความเป็นพิษต่อพืช โดยเฉพาะในข้าวโพด (Ahmad et al., 2014) แต่ *Micrococcus* sp. MU1 สามารถช่วยส่งเสริมความยาวรากพืชได้ในสภาวะที่มีแคดเมียม อย่างไรก็ตามการเติบโตของรากพืชลดลงเมื่อความเข้มข้นของแคดเมียมเพิ่มมากขึ้น (Chen et al., 2003)



รูปที่ 7 ผลของ *Micrococcus* sp. MU1 ต่อความยาวของรากข้าวโพดในสภาวะที่ไม่มีและมีแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.3 ผลของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมต่อการละลายหรือค่า Bioavailability ของแคดเมียมในดินในสภาวะที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหาร

นำแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์มาทดสอบการส่งเสริมการละลายหรือการเพิ่มค่า Bioavailability ของแคดเมียมในดิน โดยนำดินปนเปื้อนแคดเมียมที่เก็บจากพื้นที่ปนเปื้อน อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก มาตรวจวัดสมบัติทางกายภาพและเคมี และตรวจวัดความเข้มข้นของแคดเมียมทั้งหมดในดิน (Total cadmium หรือ Acid-digested form) และความเข้มข้นของแคดเมียมในรูป Bioavailable cadmium ที่สกัดด้วยสาร DTPA (DTPA-extractable form) ดังแสดงผลในตารางที่ 1 โดยจากสมบัติทางเคมีของดินปนเปื้อนนี้นพบว่าปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน (Organic matter) ต่ำ โดยในค่า C/N ratio ในดิน 12.6 ซึ่งในการศึกษานี้จะทำการปรับค่า C/N ratio ในดิน โดยการเติมกลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีค่า C/N ratio ในดินเป็น 10:1, 10:2 และ 20:1 หรือ 10, 5 และ 20 ตามลำดับ

โดยทั่วไปแคดเมียมที่ปนเปื้อนในดินธรรมชาติเป็นเวลานาน แคดเมียมส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปที่สิ่งมีชีวิตเข้าถึงไม่ได้ (Non-bioavailable form) ซึ่งเมื่อนำพืชไปบำบัดแคดเมียมโดยไปดูดดึง (Uptake) ออกมาจากดินหรือกระบวนการ Phytoextraction พืชจะไม่สามารถดูดดึงแคดเมียมออกจากดินได้ดี ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกระบวนการบำบัดแคดเมียมออกจากดินของพืช ต้องมีการช่วยให้แคดเมียมในดินละลายออกมาหรืออยู่ในรูปที่สิ่งมีชีวิตเข้าถึงได้ (Bioavailable form) ซึ่งการเติมแบคทีเรียบางชนิดในดินปนเปื้อนแคดเมียมก็สามารถช่วยเพิ่มการละลายของแคดเมียมในดินได้ สำหรับผลของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์ในการละลายแคดเมียมออกจากดิน แสดงผลในรูปที่เป็น Water-soluble form, DTPA-extractable form และ Acid-digested form ในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินปนเปื้อนแคดเมียมที่เก็บจากพื้นที่ปนเปื้อนในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

Property	Value
Particle size distribution	
- Sand (%)	48
- Silt (%)	28
- Clay (%)	24
Soil texture	Sandy clay loam
pH (1:1 w/v H ₂ O)	7.5
Electrical conductivity (1:5) (dS/m)	0.20
Cation exchange capacity (cmol/kg)	14.0
Organic matter (%)	2.55
Total nitrogen (%)	0.13
Available phosphorous (mg/kg)	24
Extractable potassium (mg/kg)	171
Extractable magnesium (mg/kg)	334
Extractable calcium (mg/kg)	6185
Total cadmium (Acid-digested form) (mg/kg)	45.88
Bioavailable cadmium (DTPA-extractable form) (mg/kg)	17.93

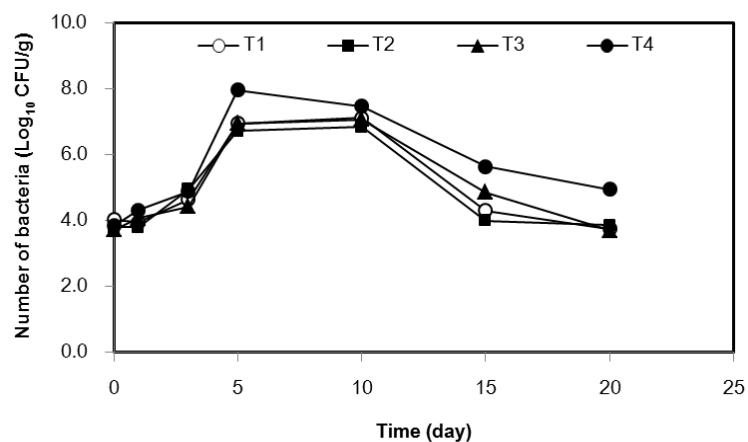
จากผลการศึกษาผลของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมต่อการเพิ่มการละลายของแคดเมียมในดิน (ตารางที่ 2) พบว่าในสถานะที่ไม่มีการเติมสารอาหารเพิ่มลงในดิน (C/N ratio ในดินเท่ากับ 12.6) แบคทีเรียต้านทานแคดเมียมช่วยเพิ่มการละลายของแคดเมียมในดิน โดยปริมาณแคดเมียมในรูป Water-soluble form และ DTPA-extractable form ในชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมแต่ละสายพันธุ์สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียต้านทานแคดเมียม และในสถานะที่มีการเติมสารอาหารให้มีค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 10:1, 10:2 และ 20:1 พบว่าการเติมสารอาหารให้มีค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 ช่วยส่งเสริมกิจกรรมของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์ในการช่วยเพิ่มการละลายของแคดเมียมในดินได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมแต่ไม่มีการเติมสารอาหาร แต่การเติมสารอาหารให้มีค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 10:1 และ 10:2 ไม่มีผลในการส่งเสริมกิจกรรมของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในการเพิ่มการละลายแคดเมียมในดิน โดยส่วนใหญ่มีค่าแคดเมียมในดินในรูป DTPA-extractable form ต่ำกว่าดินที่ไม่มีการเติมสารอาหาร นอกจากนี้ ยังพบว่าแคดเมียมในดินในรูป Water-soluble form (0.13 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และ DTPA-extractable form (37.83 ± 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) มีค่าสูงที่สุดในดินที่มีการเติม *Arthrobacter* sp. TM6 และการเติมสารอาหารให้มีค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 แสดงว่าการกระตุ้นทางชีวภาพโดยเติมคาร์บอนมีผลช่วยส่งเสริมความสามารถของแบคทีเรียในการละลายแคดเมียมในดินได้ดีขึ้น

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในการเพิ่มการละลายของแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อนทั้งในสถานะที่มีและไม่มีสารอาหาร

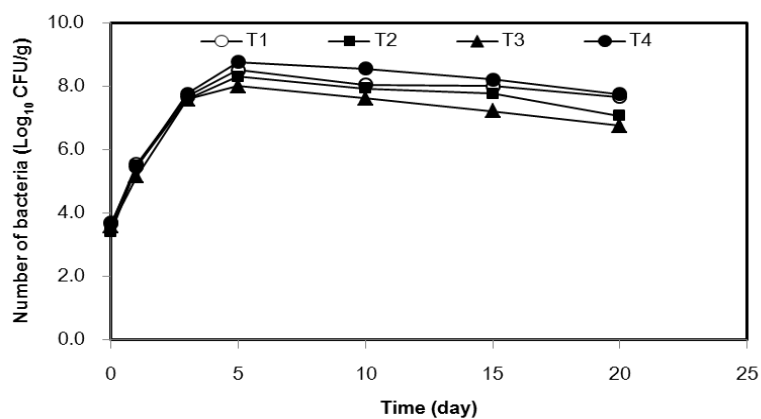
Treatment	Biostimulation (C/N ratio)	Cadmium concentration (mg/kg)		
		Water-soluble form	DTPA-extractable form	Acid-digested form
Without	w/o	0.03 ± 0.01	22.57 ± 0.68	51.87 ± 1.49
bacteria	10:1	0.08 ± 0.03	22.17 ± 0.15	50.60 ± 1.21
(Control)	10:2	0.07 ± 0.03	22.97 ± 0.49	49.17 ± 0.76
	20:1	0.09 ± 0.02	22.90 ± 0.32	51.38 ± 1.95
<i>Micrococcus</i>	w/o	0.06 ± 0.05	27.77 ± 0.64	52.65 ± 0.28
sp. MU1	10:1	0.07 ± 0.02	26.16 ± 1.00	52.52 ± 0.06
	10:2	0.07 ± 0.03	25.70 ± 1.72	56.25 ± 1.11
	20:1	0.06 ± 0.02	28.83 ± 0.75	52.80 ± 1.79
<i>Pseudomonas</i>	w/o	0.05 ± 0.02	27.83 ± 1.23	52.97 ± 0.18
sp. PM2	10:1	0.07 ± 0.01	25.53 ± 0.93	54.38 ± 0.53
	10:2	0.06 ± 0.02	26.17 ± 0.90	54.72 ± 0.99
	20:1	0.09 ± 0.01	28.10 ± 0.87	48.65 ± 0.78
<i>Arthrobacter</i>	w/o	0.10 ± 0.01	28.83 ± 0.95	52.45 ± 1.47
sp. TM6	10:1	0.08 ± 0.02	26.10 ± 1.17	53.07 ± 1.77
	10:2	0.07 ± 0.01	25.23 ± 1.57	53.83 ± 1.17
	20:1	0.13 ± 0.02	37.83 ± 0.75	49.23 ± 1.54

3.4 การรอดชีวิตของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในดินปนเปื้อนแคดเมียมทั้งในสถานะที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหาร

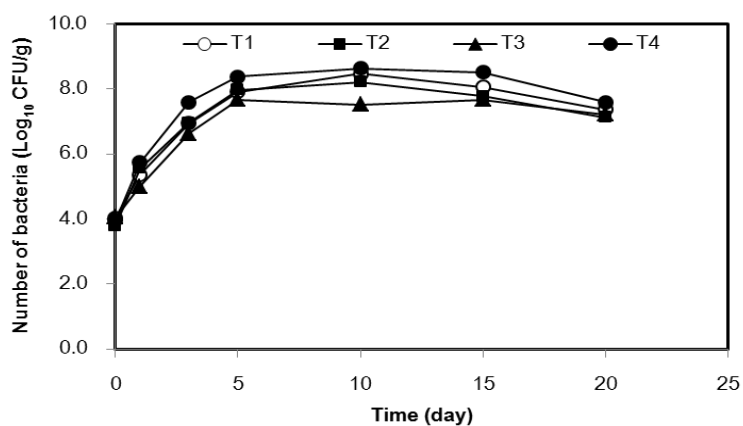
ผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในดินปนเปื้อนทั้งในสถานะที่มีการเติมและไม่มีการเติมสารอาหารเป็นเวลา 20 วัน โดยทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในวันที่ 1, 3, 5, 10, 15 และ 20 วัน ตามลำดับ ได้ผลการรอดชีวิตของ *Micrococcus* sp. MU1, *Pseudomonas* sp. PM2 และ *Arthrobacter* sp. TM6 ในดินที่ไม่มีการเติมสารอาหาร (T1) และดินที่มีการเติมสารอาหารให้มีค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 10:1 (T2), 10:2 (T3) และ 20:1 (T4) ดังแสดงในรูปที่ 8, 9 และ 10 ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์ มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกจนถึงวันที่ 5 หลังการเพาะเลี้ยงในดินปนเปื้อน จากนั้นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มคงที่และลดจำนวนลง โดย *Micrococcus* sp. MU1 มีการลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 10 ส่วน *Pseudomonas* sp. PM2 และ *Arthrobacter* sp. TM6 ค่อยๆ ลดจำนวนลง โดยจำนวนเซลล์ของ *Arthrobacter* sp. TM6 ค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 15 และพบว่าจำนวนแบคทีเรียในดินที่เติมสารอาหารให้มีค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 มีค่าสูงกว่าดินที่ไม่เติมสารอาหารและดินที่เติมสารอาหารให้มีค่า C/N ratio เท่ากับ 10:1 และ 10:2 โดยจะเห็นได้ว่าการเติมคาร์บอนเพิ่มขึ้นช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในดินปนเปื้อน



รูปที่ 8 การรอดชีวิตของ *Micrococcus* sp. MU1 ในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติมและไม่มีการเติมสารอาหาร



รูปที่ 9 การรอดชีวิตของ *Pseudomonas* sp. PM2 ในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติมและไม่มีการเติมสารอาหาร



รูปที่ 10 การรอดชีวิตของ *Arthrobacter* sp. TM6 ในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติมและไม่มีการเติมสารอาหาร

3.5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการเติบโตของข้าวโพดในดินปนเปื้อนและไม่ปนเปื้อนแคดเมียมและการสะสมแคดเมียมของข้าวโพด

จากประสิทธิภาพของ *Micrococcus* sp. MU1 ในการส่งเสริมความยาวของรากข้าวโพด จึงมีการนำ *Micrococcus* sp. MU1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเติบโตและการสะสมแคดเมียมในข้าวโพด โดยปลูกต้นกล้าข้าวโพดในดินที่ไม่ปนเปื้อนแคดเมียมและดินที่ปนเปื้อนแคดเมียมในระดับสูง โดยการเติมสารละลายแคดเมียมลงในดิน สำหรับสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินที่นำมาใช้แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินที่นำมาใช้ทดสอบ

Property	Value
Particle size distribution	
- Sand (%)	30.0
- Silt (%)	23.3
- Clay (%)	46.7
Soil texture	Clay
pH (1:1 w/v H ₂ O)	7.55 ± 0.03
Electrical conductivity (1:5) (dS/m)	0.18 ± 0.07
Cation exchange capacity (cmol/kg)	10.89 ± 0.44
Organic matter (%)	4.43 ± 0.61
Total nitrogen (%)	0.23 ± 0.02
Available phosphorous (mg/kg)	13.49 ± 1.05
Extractable potassium (mg/kg)	43.47 ± 0.91
Total cadmium (mg/kg)	90.35 ± 3.32
Bioavailable cadmium (mg/kg)	21.16 ± 0.20

เมื่อทำการปลูกต้นกล้าข้าวโพดอายุ 4 สัปดาห์ ที่มีความสูงเริ่มต้นประมาณ 50 เซนติเมตร ในดินและมีการเติม *Micrococcus* sp. MU1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย และเก็บตัวอย่างพืชมาวัดการเติบโตหลังจากการปลูกเป็นเวลา 2, 4, 6 และ 12 สัปดาห์ ซึ่งได้ผลความยาวราก ความสูงต้น และน้ำหนักแห้งของข้าวโพดในตารางที่ 4 โดยพบว่า *Micrococcus* sp. MU1 สามารถส่งเสริมการเติบโตของข้าวโพดที่ปลูกในดินไม่ปนเปื้อนและดินปนเปื้อนแคดเมียมในทุกระยะเวลาการเก็บเกี่ยว แต่ข้าวโพดที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมมีความยาวราก ความสูงต้นและน้ำหนักแห้งต่ำกว่าข้าวโพดที่ปลูกในดินไม่ปนเปื้อนแคดเมียม แต่ไม่แสดงอาการพิษของแคดเมียม (Cadmium toxicity) ที่เด่นชัด เช่น ใบเหลือง ต้นแคระแกร็น การศึกษาของ Anjum และคณะ (2014) พบว่าน้ำหนักแห้งของ *Brassica campestris* และ *Vigna radiate* ลดลงเมื่อปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

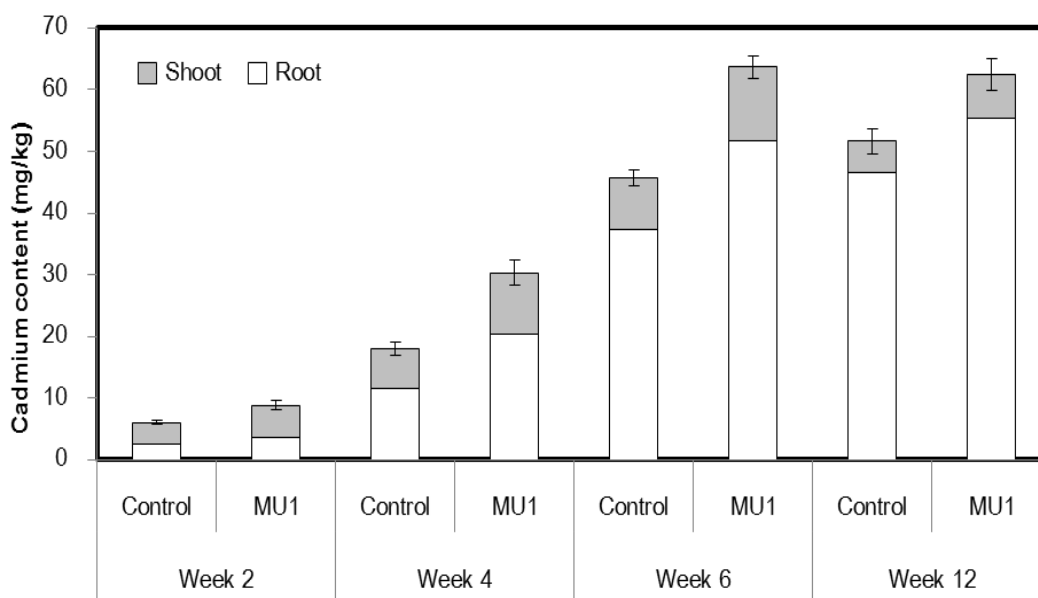
ตารางที่ 4 ผลของ *Micrococcus* sp. MU1 ต่อการเติบโตของต้นข้าวโพดที่ปลูกในดินที่ไม่ปนเปื้อนและปนเปื้อนแคดเมียม

Parameter	Uncontaminated soil		Cadmium-contaminated soil	
	Uninoculated control	MU1	Uninoculated control	MU1
Root length (cm)				
- 2 weeks	18.1 ± 1.6	23.2 ± 2.0	14.8 ± 0.2	17.4 ± 0.7
- 4 weeks	22.0 ± 1.0	28.7 ± 0.8	18.7 ± 1.5	20.3 ± 1.5
- 6 weeks	32.7 ± 0.6	38.2 ± 1.1	23.7 ± 1.5	28.7 ± 0.8
- 12 weeks	37.0 ± 0.8	47.6 ± 0.7	25.5 ± 1.4	32.0 ± 1.7
Shoot length (cm)				
- 2 weeks	59.7 ± 1.6	67.1 ± 2.3	51.2 ± 1.6	54.9 ± 0.2
- 4 weeks	78.7 ± 2.5	89.1 ± 3.1	63.7 ± 2.5	72.7 ± 2.5
- 6 weeks	133.7 ± 1.5	151.4 ± 2.7	86.3 ± 2.1	100.3 ± 1.5
- 12 weeks	221.0 ± 4.4	240.8 ± 2.6	195.5 ± 1.7	211.0 ± 4.2
Dry biomass of whole plant (g/plant)				
- 2 weeks	0.49 ± 0.01	0.67 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.51 ± 0.04
- 4 weeks	4.74 ± 0.13	6.21 ± 0.34	0.52 ± 0.09	1.00 ± 0.04
- 6 weeks	28.72 ± 3.07	35.14 ± 3.20	5.62 ± 2.21	10.16 ± 1.07
- 12 weeks	204.01 ± 14.14	252.50 ± 13.80	137.97 ± 11.27	170.62 ± 9.11

เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณแคดเมียมที่สะสมในส่วนรากและส่วนยอดของข้าวโพดที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่ระยะเวลาต่างๆ ได้ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 11 โดยพบว่าในช่วงแรกของการปลูก (2 สัปดาห์) ข้าวโพดมีการสะสมแคดเมียมในส่วนยอด (ใบ) มากกว่าส่วนราก และในระยะเวลาการปลูกตั้งแต่ 4 สัปดาห์ถึง 12 สัปดาห์ ปริมาณแคดเมียมสะสมในส่วนรากมากกว่าในส่วนยอดแตกต่างกันมาก นอกจากนี้ ยังพบว่าการเติม *Micrococcus* sp. MU1 ในการปลูกพืชช่วยส่งเสริมให้ข้าวโพดสะสมแคดเมียมได้มากขึ้นทั้งในส่วนรากและส่วนยอด โดยข้าวโพดที่ระยะการปลูกที่ 6 สัปดาห์มีปริมาณแคดเมียมสะสมสูงที่สุด

เมื่อนำค่าความเข้มข้นของแคดเมียมในดินทั้ง 2 รูป และปริมาณแคดเมียมในส่วนรากและส่วนยอดของข้าวโพดมาคำนวณค่า Phytoextraction coefficient (PEC) ค่า Bioaccumulation factor (BAF) และค่า Translocation factor (TF) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าชุดทดลองที่มีการเติม *Micrococcus* sp. MU1 ทำให้ข้าวโพดมีค่า PEC, BAF และ TF สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย ข้าวโพดมีค่า PEC ประมาณ 1.0 และค่า BAF มากกว่า 1.0 ในช่วงการเก็บเกี่ยวในสัปดาห์ที่ 12 และตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ตามลำดับ ซึ่งค่า PEC และค่า BAF มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเติบโตของข้าวโพด ซึ่งพืชที่มีค่า PEC และ BAF มากกว่า 1.0 จัดเป็นพืชที่มีศักยภาพสำหรับ Phytoextraction (Sun et al., 2009; Khaokaew and Landrot, 2015) ในทางตรงกันข้ามค่า TF ของข้าวโพดลดลงตามระยะเวลาการเจริญ ซึ่ง

ส่งผลดีต่อการลดปริมาณการสะสมแคดเมียมในเมล็ดข้าวโพด และค่า TF ของข้าวโพดในระยะเวลาการเก็บเกี่ยวในสัปดาห์ที่ 2 มีค่ามากกว่า 1.0 เนื่องจากการที่ *Micrococcus* sp. MU1 ไปช่วยเพิ่มการละลายของแคดเมียมในดิน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเพิ่มค่า Bioavailable ของโลหะหนักในดินช่วยเพิ่มการเคลื่อนย้ายของโลหะหนักจากรากสู่ยอดของพืชได้ (Chiu et al., 2005) และพืชที่มีค่า TF มากกว่า 1.0 จัดเป็นพืชที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการ Phytoextraction (Yoon et al., 2006; Ali et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามค่า TF ของข้าวโพดในช่วงการเก็บเกี่ยวในสัปดาห์ที่ 6 และ 12 มีค่าลดลงต่ำมาก ดังนั้น ข้าวโพด จึงจัดเป็นพืชที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นพืชบำบัดแคดเมียมโดยอาศัยกระบวนการ Phytoextraction ได้ดีในช่วงแรก แต่ช่วงหลังกระบวนการบำบัดแคดเมียมของข้าวโพดอาศัยกระบวนการ Phytostabilization นอกจากนี้ ยังต้องคำนึงถึงการนำผักและเมล็ดข้าวโพดไปใช้ประโยชน์ เพราะมีแคดเมียมบางส่วนสะสมในผักและเมล็ดของข้าวโพด

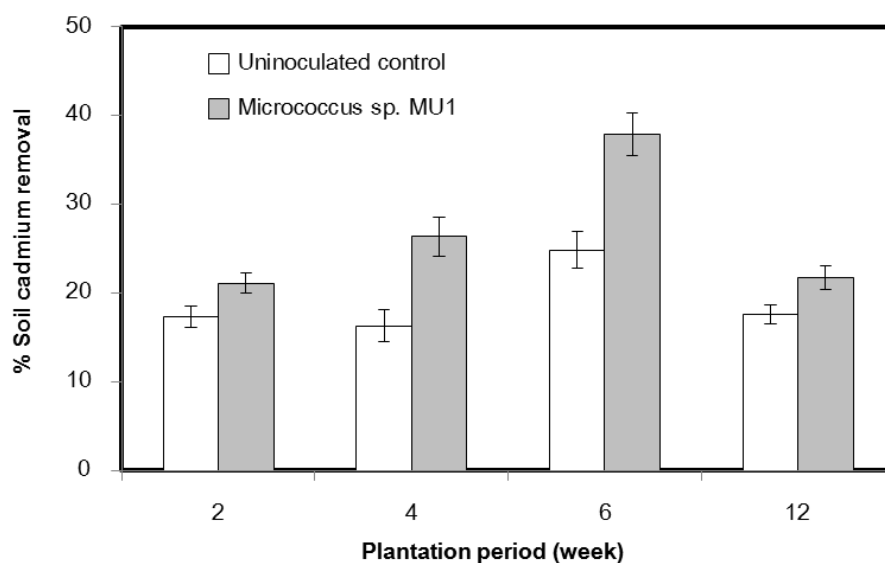


รูปที่ 11 ความเข้มข้นของแคดเมียมที่สะสมในส่วนรากและยอดของข้าวโพดที่เก็บเกี่ยวในช่วงระยะเวลาต่างๆ หลังจากปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม

สำหรับประสิทธิภาพของข้าวโพดในการกำจัดแคดเมียมออกจากดินแสดงในรูปที่ 12 โดยพบว่าชุดทดลองที่มีการเติม *Micrococcus* sp. MU1 มีร้อยละการบำบัดแคดเมียมออกจากดินได้มากกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับค่าปริมาณแคดเมียมที่สะสมในข้าวโพด เพราะข้าวโพดมีน้ำหนักชีวมวลมากขึ้น จึงสะสมแคดเมียมได้มากขึ้น ซึ่งมีงานวิจัยหลายเรื่องรายงานว่าการกลุ่มแบคทีเรียต้านทานโลหะหนักที่ส่งเสริมการเติบโตของพืช (Heavy metal-resistant PGPB) สามารถส่งเสริมการเติบโตของพืชได้หลายชนิด ได้แก่ *Brassica napus*, *Lolium multiflorum*, *Sedum alfredii*, *edicago sativa* เป็นต้น (Chen et al., 2013; Guo et al., 2014; Liu et al., 2015)

ตารางที่ 5 ค่า PEC, BAF และ TF ของข้าวโพดที่ปลูกในดินปนเปื้อนที่มีการเติมและไม่เติม *Micrococcus* sp. MU1

Parameter	Uninoculated control	<i>Micrococcus</i> sp. MU1
Phytoextraction coefficient (PEC)		
- 2 weeks	0.05 ± 0.01	0.10 ± 0.01
- 4 weeks	0.09 ± 0.02	0.20 ± 0.02
- 6 weeks	0.36 ± 0.04	0.63 ± 0.05
- 12 weeks	0.77 ± 0.05	0.99 ± 0.08
Bioaccumulation factor (BAF)		
- 2 weeks	0.30 ± 0.04	0.48 ± 0.04
- 4 weeks	0.46 ± 0.07	0.97 ± 0.10
- 6 weeks	1.25 ± 0.21	1.84 ± 0.34
- 12 weeks	2.25 ± 0.14	2.49 ± 0.28
Translocation factor (TF)		
- 2 weeks	1.40 ± 0.09	1.70 ± 0.08
- 4 weeks	0.71 ± 0.04	0.91 ± 0.07
- 6 weeks	0.23 ± 0.05	0.41 ± 0.03
- 12 weeks	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.03



รูปที่ 12 การกำจัดแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อนของข้าวโพดที่มีการเติม *Micrococcus* sp. MU1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียในช่วงระยะเวลาต่างๆ

3.6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินของ ว่านเศรษฐีและถั่วเหลืองในสภาวะที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหาร

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม อำเภอมะสอ จังหวัดตาก และนำมาเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 และนำตัวอย่างดินมากระตุ้นทางชีวภาพโดยปรับสารอาหารให้มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ในดินเท่ากับ 20:1 ก่อนนำดินปนเปื้อนมาใช้ในการปลูกพืชคือ ว่านเศรษฐี (เป็นตัวแทนของพืช Hyperaccumulator จากการทบทวนวรรณกรรม) และถั่วเหลือง (เป็นตัวแทนของพืชไร่ที่ปลูกในพื้นที่ปนเปื้อน)

ตารางที่ 6 สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินปนเปื้อนแคดเมียมที่เก็บจากพื้นที่ปนเปื้อนในอำเภอมะสอ จังหวัดตาก

Property	Value
Particle size distribution	
- Sand (%)	57
- Silt (%)	24
- Clay (%)	19
Soil texture	Sandy loam
pH (1:1 w/v H ₂ O)	7.5
Electrical conductivity (1:5) (dS/m)	0.2
Cation exchange capacity (cmol/kg)	9.8
Organic matter (%)	1.52
Total nitrogen (%)	0.07
Available phosphorous (mg/kg)	31
Extractable potassium (mg/kg)	88
Extractable calcium (mg/kg)	3893
Extractable magnesium (mg/kg)	238
Total cadmium (mg/kg)	50.35
Bioavailable cadmium (mg/kg)	9.18

3.6.1) ประสิทธิภาพของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัด แคดเมียมในดินโดยใช้ว่านเศรษฐี

ผลการบำบัดดินปนเปื้อนแคดเมียมโดยว่านเศรษฐี (อายุ 6 เดือน) ในดินที่ไม่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและไม่มีการเติมแบคทีเรีย (T1) และดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการปรับค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 และมีการเติมแบคทีเรียต้านทานแคดเมียม คือ *Micrococcus* sp. MU1 (T3), *Pseudomonas* sp. PM2 (T4) และ *Arthrobacter* sp. TM6 (T5) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย (T2) ผลการศึกษาการเติบโตของว่านเศรษฐีอายุ 6 เดือนที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมแสดง

ในตารางที่ 7 พบว่าวุ้นเชื้ออายุ 6 เดือน แสดงอาการจากความเป็นพิษของแคดเมียมเล็กน้อย เช่น ใบเหลือง และวุ้นเชื้อมีความยาวราก ความยาวยอด (ใบ) และน้ำหนักแห้งของชีวมวลของวุ้นเชื้อทั้งต้นสูงสุดในดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Micrococcus* sp. MU1 ในทุกระยะของการเก็บตัวอย่าง และการเติบโตของวุ้นเชื้อที่ปลูกในดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Pseudomonas* sp. PM2 เพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย แต่ไม่พบการส่งเสริมการเติบโตของวุ้นเชื้อในดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Arthrobacter* sp. TM6 เนื่องจาก *Micrococcus* sp. MU1 เป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดอินโดล-3-อะซิติก ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเติบโตของพืช โดยมีงานวิจัยหลายชิ้นที่รายงานการใช้แบคทีเรียในกลุ่มส่งเสริมการเติบโตของพืช หรือ PGPB(R) ในการช่วยเพิ่มการเติบโตของพืชที่นำมาใช้บำบัดโลหะหนัก (Ma et al., 2009; Guo and Chi, 2014; Liu et al., 2015) อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าความยาวรากของวุ้นเชื้อในแต่ละระยะเวลาการเก็บเกี่ยวไม่แตกต่างกันมาก เพราะลักษณะรากของวุ้นเชื้อเป็นหัวขนาดเล็ก (Tuberous rhizomes) ความแตกต่างในการเติบโตของวุ้นเชื้อจะเห็นได้ชัดเจนจากค่าน้ำหนักแห้งของชีวมวลของวุ้นเชื้อ

ตารางที่ 7 ผลของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมต่อการเติบโตของวุ้นเชื้อที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม

Treatment	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Total dry weight (g)
3 weeks			
T1: Uninoculated control	9.0 ± 0.1	22.7 ± 0.5	7.46 ± 0.30
T2: C/N + Uninoculated control	9.0 ± 0.1	23.5 ± 0.5	7.81 ± 0.41
T3: C/N + MU1	9.6 ± 0.1	26.7 ± 0.1	9.21 ± 0.71
T4: C/N + PM2	9.2 ± 0.1	25.0 ± 0.9	8.48 ± 0.80
T5: C/N + TM6	9.0 ± 0.2	23.0 ± 0.3	7.64 ± 0.53
6 weeks			
T1: Uninoculated control	9.5 ± 0.4	23.0 ± 0.6	11.13 ± 0.42
T2: C/N + Uninoculated control	9.7 ± 0.6	23.7 ± 0.8	11.56 ± 0.70
T3: C/N + MU1	10.7 ± 0.6	27.3 ± 0.6	13.11 ± 0.81
T4: C/N + PM2	10.3 ± 0.7	25.7 ± 0.8	12.40 ± 0.80
T5: C/N + TM6	10.0 ± 0.6	24.0 ± 0.2	11.83 ± 0.85
9 weeks			
T1: Uninoculated control	10.0 ± 0.4	26.0 ± 0.1	11.02 ± 0.55
T2: C/N + Uninoculated control	10.5 ± 0.6	26.7 ± 0.1	11.71 ± 0.81
T3: C/N + MU1	11.3 ± 0.3	29.0 ± 0.6	13.27 ± 0.84
T4: C/N + PM2	10.8 ± 0.5	28.0 ± 0.9	12.55 ± 1.01
T5: C/N + TM6	10.5 ± 0.9	26.0 ± 0.3	11.83 ± 0.92

ส่วนผลการสะสมแคดเมียมในวุ้นเชื้อแสดงในตารางที่ 8 พบว่าวุ้นเชื้ออายุ 6 เดือนที่ปลูกในดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Arthrobacter* sp. TM6 มีการสะสมแคดเมียมได้สูงสุด โดยเฉพาะในสัปดาห์ที่ 9 หลังการปลูกวุ้นเชื้อในดินปนเปื้อนแคดเมียม พบว่าวุ้นเชื้อสามารถสะสมแคดเมียมในส่วนรากและส่วนยอด (ใบ) ได้สูงถึง 6.37 ± 0.48 และ 4.90 ± 0.83 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักแห้งของพืช ตามลำดับ แคดเมียมสะสมในวุ้นเชื้อรองลงมาคือ วุ้นเชื้อที่ปลูกในดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Micrococcus* sp. MU1 เนื่องจากวุ้นเชื้อมีชีวมวลสูงจึงทำให้มีแคดเมียมสะสมในวุ้นเชื้อสูงด้วย และพบว่าวุ้นเชื้อที่มีการสะสมแคดเมียมในรากสูงกว่าในส่วนยอดในทุกระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าพืชบางชนิดที่มีความสามารถในการสะสมโลหะหนักได้ต่ำ แต่เป็นพืชที่เติบโตได้เร็วและมีชีวมวลมาก ก็มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็นพืชบำบัดได้ เพราะการเติบโตเร็วทำให้พืชมีชีวมวลมาก สามารถช่วยขจัดความสามารถในการสะสมโลหะหนักได้ (Phaenark et al., 2009)

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของแคดเมียมที่สะสมในวุ้นเชื้อหลังปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม

Treatment	Cadmium concentration (mg/kg DW)		Cd conc. in 1 plant (µg/plant)
	Root	Shoot	
3 weeks			
T1: Uninoculated control	1.72 ± 0.20	1.05 ± 0.08	9.24 ± 0.94
T2: C/N + Uninoculated control	2.20 ± 0.20	1.50 ± 0.10	13.32 ± 1.22
T3: C/N + MU1	2.73 ± 0.30	2.47 ± 0.14	23.41 ± 2.30
T4: C/N + PM2	2.60 ± 0.26	2.20 ± 0.12	19.49 ± 1.87
T5: C/N + TM6	3.03 ± 0.48	3.01 ± 0.17	24.05 ± 1.56
6 weeks			
T1: Uninoculated control	2.60 ± 0.22	1.37 ± 0.12	22.08 ± 2.50
T2: C/N + Uninoculated control	2.77 ± 0.22	1.57 ± 0.20	24.99 ± 1.78
T3: C/N + MU1	3.33 ± 0.30	2.10 ± 0.18	35.42 ± 3.21
T4: C/N + PM2	3.17 ± 0.54	2.00 ± 0.21	32.02 ± 1.65
T5: C/N + TM6	3.63 ± 0.37	2.60 ± 0.40	36.56 ± 1.90
9 weeks			
T1: Uninoculated control	4.65 ± 0.50	2.80 ± 0.33	41.90 ± 4.80
T2: C/N + Uninoculated control	4.97 ± 0.32	3.07 ± 0.52	49.27 ± 8.67
T3: C/N + MU1	5.80 ± 0.72	4.13 ± 0.48	68.41 ± 11.01
T4: C/N + PM2	5.68 ± 0.21	4.07 ± 0.70	63.45 ± 4.51
T5: C/N + TM6	6.37 ± 0.48	4.90 ± 0.83	69.06 ± 6.77

เมื่อนำค่าแคดเมียมในส่วนต่างๆ ของว่านเศรษฐีและในดินมาคำนวณค่า Phytoextraction coefficient (PEC) Bioaccumulation factor (BAF) และ Translocation factor (TF) (ตารางที่ 9) พบว่าว่านเศรษฐีมีค่า PEC และ BAF ต่ำมาก แต่ค่า PEC และ BAF มีค่ามากขึ้นเมื่อว่านเศรษฐีมีอายุมากขึ้น ดังนั้น ว่านเศรษฐีสายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยจึงไม่จัดเป็น Cadmium hyperaccumulator ซึ่งให้ผลแตกต่างจากงานวิจัยของ Wang และคณะ (2012) ที่รายงานว่าว่านเศรษฐีเป็น Cadmium hyperaccumulator อย่างไรก็ตาม ว่านเศรษฐีที่ปลูกในดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Arthrobacter* sp. TM6 มีค่า TF มากกว่า 1.0 แสดงว่าว่านเศรษฐีสามารถเคลื่อนย้ายแคดเมียมที่สะสมในรากไปสู่ยอดได้ดี และค่า TF ในเกือบทุกชุดการทดลองและทุกช่วงระยะเวลาเก็บตัวอย่างมีค่ามากกว่า 0.5 ยกเว้น ตัวอย่างว่านเศรษฐีในช่วงการเก็บเกี่ยวสัปดาห์ที่ 9 ของชุดควบคุม (T1) ดังนั้น ว่านเศรษฐีจึงเป็นพืชที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็นพืชบำบัดโดยอาศัยกระบวนการ Phytoextraction รวมทั้งว่านเศรษฐีเป็นไม้ประดับที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและไม่มีส่วนของผลผลิตที่จะเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร จึงปลอดภัยในการนำไปใช้เป็นพืชบำบัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดิน

ตารางที่ 9 ค่า PEC, BAF และ TF ของว่านเศรษฐีที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม

Treatment	PEC	BAF	TF
3 weeks			
T1: Uninoculated control	0.03	0.09	0.63
T2: C/N + Uninoculated control	0.04	0.11	0.72
T3: C/N + MU1	0.06	0.15	0.91
T4: C/N + PM2	0.05	0.13	0.89
T5: C/N + TM6	0.07	0.18	1.01
6 weeks			
T1: Uninoculated control	0.05	0.12	0.53
T2: C/N + Uninoculated control	0.05	0.14	0.57
T3: C/N + MU1	0.07	0.20	0.64
T4: C/N + PM2	0.06	0.18	0.63
T5: C/N + TM6	0.08	0.22	0.73
9 weeks			
T1: Uninoculated control	0.09	0.26	0.45
T2: C/N + Uninoculated control	0.10	0.33	0.63
T3: C/N + MU1	0.13	0.61	0.71
T4: C/N + PM2	0.13	0.60	0.73
T5: C/N + TM6	0.16	0.68	0.76

3.6.2) ประสิทธิภาพของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัด แคดเมียมในดินโดยใช้ถั่วเหลือง

ผลการบำบัดดินปนเปื้อนแคดเมียมโดยใช้ถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) ที่ได้รับการเพาะเมล็ดอายุ 2 สัปดาห์ ซึ่งถั่วเหลืองสายพันธุ์ที่นำทดสอบนี้เป็นสายพันธุ์ที่นิยมปลูกกันในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียมในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ร่วมกับการใช้แบคทีเรียด้านทานแคดเมียม 3 สายพันธุ์ และการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการปรับค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 โดยเก็บถั่วเหลืองหลังการปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม 1 เดือน (ระยะเริ่มออกดอก) 2 เดือน (ระยะเริ่มออกฝัก) และ 3 เดือน (ระยะออกเมล็ดสมบูรณ์) ตามลำดับ ผลการศึกษา พบว่าถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม (50.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ไม่แสดงอาการจากความเป็นพิษของแคดเมียม ซึ่งมีรายงานว่าแคดเมียมที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมถึงจะส่งผลลดความสูงต้นและน้ำหนักแห้งของถั่วเหลือง (Shute and Macfie, 2006) ซึ่งแสดงผลการเติบโตและการสะสมแคดเมียมในถั่วเหลืองที่ระยะเวลาการเติบโตช่วงต่างๆ ในตารางที่ 10 และ 11 ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ผลของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมต่อการเติบโตของถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อน
แคดเมียม

Treatment	Root length (cm)	Stem height (cm)	Total dry weight (g)
1 month			
T1: Uninoculated control	8.09 ± 0.90	69.67 ± 2.03	0.55 ± 0.03
T2: C/N + Uninoculated control	8.95 ± 0.57	66.00 ± 4.90	0.61 ± 0.01
T3: C/N + MU1	16.73 ± 1.53	75.50 ± 0.71	1.18 ± 0.08
T4: C/N + PM2	11.75 ± 0.35	71.00 ± 1.41	1.07 ± 0.02
T5: C/N + TM6	9.50 ± 0.71	70.00 ± 2.83	0.70 ± 0.05
2 months			
T1: Uninoculated control	11.00 ± 1.60	87.67 ± 2.81	0.67 ± 0.03
T2: C/N + Uninoculated control	11.25 ± 0.35	90.50 ± 2.12	0.66 ± 0.01
T3: C/N + MU1	17.50 ± 0.71	106.00 ± 5.53	1.41 ± 0.11
T4: C/N + PM2	16.10 ± 1.02	108.10 ± 2.17	1.15 ± 0.05
T5: C/N + TM6	15.00 ± 1.41	92.50 ± 3.54	0.71 ± 0.09
3 months			
T1: Uninoculated control	12.50 ± 1.32	69.67 ± 4.04	0.72 ± 0.08
T2: C/N + Uninoculated control	12.33 ± 1.53	72.33 ± 2.52	0.86 ± 0.06
T3: C/N + MU1	25.83 ± 1.76	111.50 ± 9.19	1.37 ± 0.08
T4: C/N + PM2	18.33 ± 1.53	98.67 ± 23.16	1.27 ± 0.04
T5: C/N + TM6	16.67 ± 1.14	94.00 ± 2.65	0.88 ± 0.08

จากผลการเติบโตของถั่วเหลืองในตารางที่ 10 พบว่าถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อนที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Micrococcus* sp. MU1 มีการเติบโตสูงสุดทุกระยะการเก็บตัวอย่างในเดือนที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ รองลงมาคือ ถั่วเหลืองที่ปลูกในดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Pseudomonas* sp. PM2 อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาพบว่าถั่วเหลืองที่ปลูกในดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Arthrobacter* sp. TM6 มีการเติบโตสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย ถึงแม้ว่า *Arthrobacter* sp. TM6 สร้างกรดอินโดล-3-อะซิติกและสารไซโตไคน์ในปริมาณที่ต่ำมาก แต่อาจเป็นไปได้ว่าสาร Exopolymer ที่สร้างจาก *Arthrobacter* sp. TM6 ช่วยในการละลายธาตุอาหารอื่นๆ ในดินให้ถั่วเหลืองนำธาตุอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้ง่ายขึ้น และการปรับค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 เป็นส่วนช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียในดิน และมีรายงานการวิจัยหลายเรื่องเกี่ยวกับการเติมแบคทีเรียกลุ่ม PGPR(B) สามารถช่วยเร่งการเติบโตของพืชที่ปลูกในดินปนเปื้อนโลหะหนัก (Ma et al., 2009; Guo and Chi, 2014; Liu et al., 2015)

ตารางที่ 11 ความเข้มข้นของแคดเมียมที่สะสมในถั่วเหลืองหลังปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม

Treatment	Cadmium concentration (mg/kg DW)			Cd conc. in
	Root	Stem	Leaf	1 plant (µg/plant)
1 month				
T1: Uninoculated control	79.90 ± 1.14	8.15 ± 0.07	7.05 ± 0.07	6.41 ± 1.29
T2: C/N + Uninoculated control	82.49 ± 1.01	9.50 ± 0.71	9.00 ± 0.12	7.82 ± 1.09
T3: C/N + MU1	98.35 ± 2.94	10.10 ± 0.05	9.41 ± 0.04	17.55 ± 1.43
T4: C/N + PM2	88.68 ± 1.04	9.40 ± 0.31	8.80 ± 0.15	14.59 ± 1.45
T5: C/N + TM6	98.50 ± 2.28	11.20 ± 0.67	10.50 ± 0.23	16.98 ± 1.14
2 months				
T1: Uninoculated control	90.01 ± 9.44	33.09 ± 1.17	20.00 ± 2.83	21.69 ± 1.15
T2: C/N + Uninoculated control	92.04 ± 6.63	36.74 ± 1.76	22.01 ± 1.04	25.25 ± 1.39
T3: C/N + MU1	171.50 ± 13.00	74.15 ± 4.75	57.86 ± 3.91	81.42 ± 4.08
T4: C/N + PM2	131.04 ± 6.78	44.28 ± 4.66	39.09 ± 2.57	59.27 ± 3.60
T5: C/N + TM6	327.50 ± 8.61	84.95 ± 3.22	61.64 ± 1.67	84.83 ± 2.08
3 months				
T1: Uninoculated control	203.04 ± 4.39	11.97 ± 1.31	23.17 ± 1.75	27.36 ± 1.41
T2: C/N + Uninoculated control	237.69 ± 2.85	13.20 ± 0.40	26.83 ± 1.29	32.10 ± 2.15
T3: C/N + MU1	285.67 ± 3.51	22.85 ± 0.53	32.73 ± 1.70	69.13 ± 2.82
T4: C/N + PM2	302.08 ± 9.01	20.33 ± 0.58	30.84 ± 0.40	62.66 ± 3.13
T5: C/N + TM6	348.50 ± 12.15	23.47 ± 0.79	32.13 ± 1.37	72.60 ± 4.45

ส่วนผลการสะสมแคดเมียมในถั่วเหลืองในตารางที่ 11 พบว่าถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อนและมีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Arthrobacter* sp. TM6 มีการสะสมแคดเมียมได้สูงสุดทุกระยะการเก็บตัวอย่าง รองลงมาคือ ถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อนที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม

Micrococcus sp. MU1 โดยถั่วเหลืองในทุกชุดการทดลองสะสมแคดเมียมในรากสูงกว่าในส่วนใบและส่วนต้นหลายเท่า และถั่วเหลืองสะสมแคดเมียมได้สูงสุดในระยะหลังการปลูกในดินปนเปื้อน 2 เดือน (ระยะเริ่มออกฝัก) เนื่องจากเป็นระยะที่ถั่วเหลืองต้องการสารอาหารมากในการมาสร้างฝัก ทำให้มีการดูดดึงแร่ธาตุสารอาหารจากดินในอัตราสูง ทำให้มีการดูดดึงแคดเมียมผ่านทางรากมาด้วย ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Ishikawa และคณะ (2005) นอกจากนี้ ยังพบการสะสมแคดเมียมปริมาณสูงในส่วนฝักและเมล็ดของถั่วเหลืองด้วย (มีความเข้มข้นในช่วง 26.36 - 32.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) โดยพบแคดเมียมสูงสุดในเมล็ดของถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อนและมีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Arthrobacter* sp. TM6 ถึง 32.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อย่างไรก็ตาม ปริมาณแคดเมียมในเมล็ดถั่วเหลืองเกินค่ามาตรฐานการปนเปื้อนของแคดเมียมในเมล็ดพืชตระกูลถั่ว ที่กำหนดไว้ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามเกณฑ์มาตรฐานข้อกำหนดของสหภาพยุโรป [Regulation EC No. 420/2011 of 29 April 2011; amending EC No. 1881/2006] (สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช, 2556) หลายกระบวนการทางสรีรวิทยาของถั่วเหลืองมีผลต่อการสะสมแคดเมียมในเมล็ดถั่วเหลือง ได้แก่ อัตราการดูดดึงแคดเมียมจากดินของถั่วเหลือง การเคลื่อนย้ายแคดเมียมจากรากสู่ยอดผ่านทางไซเลม และการเคลื่อนย้ายแคดเมียมผ่านทางโฟลเอ็มเข้าไปในเมล็ดถั่วเหลืองในช่วงที่เติบโตเต็มที่ (Sugiyama et al., 2007)

ตารางที่ 12 ค่า PEC, BAF และ TF ของถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม

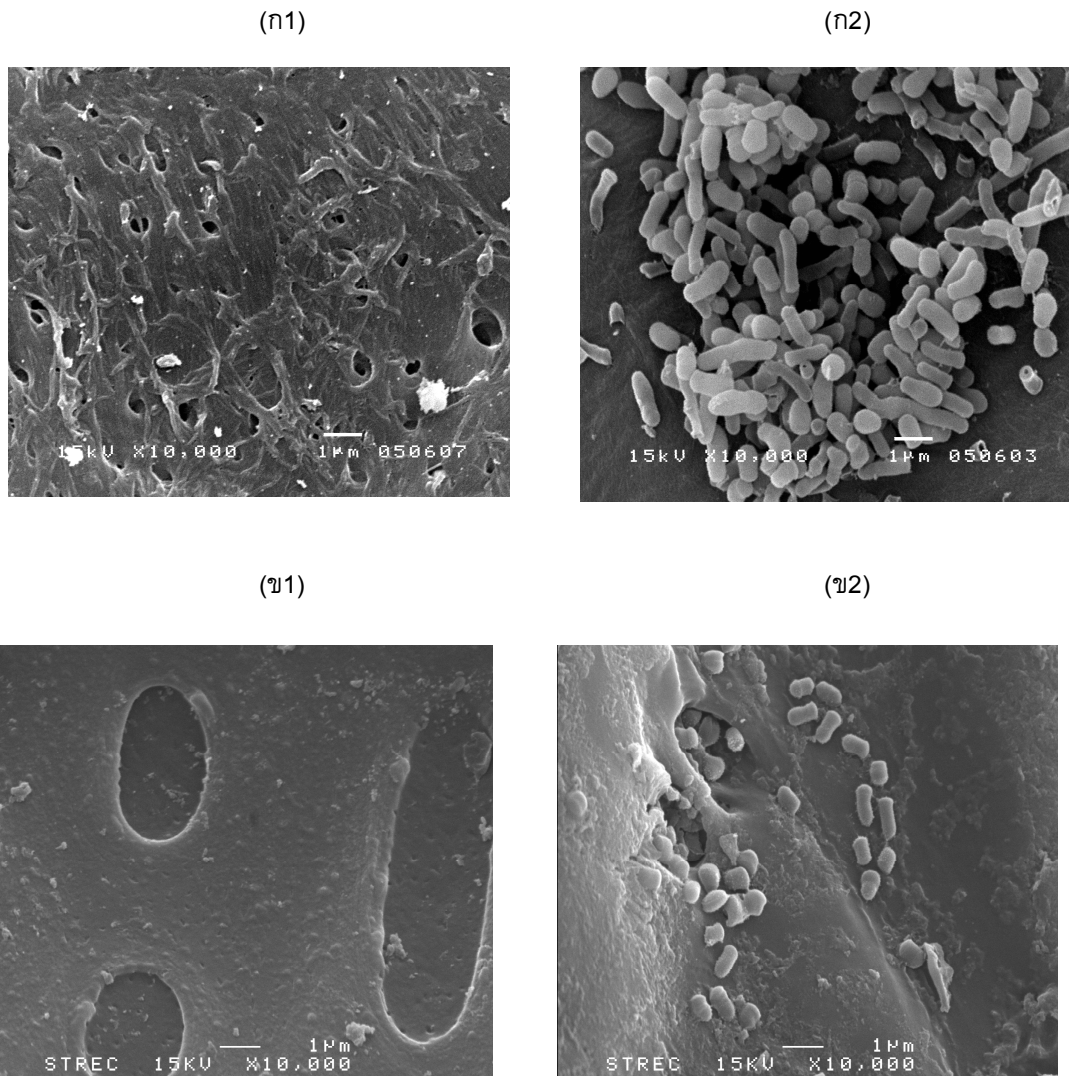
Treatment	PEC	BAF	TF
1 month			
T1: Uninoculated control	0.26	0.97	0.10
T2: C/N + Uninoculated control	0.28	1.08	0.11
T3: C/N + MU1	0.33	1.59	0.10
T4: C/N + PM2	0.29	1.19	0.09
T5: C/N + TM6	0.34	2.05	0.11
2 months			
T1: Uninoculated control	0.71	1.63	0.24
T2: C/N + Uninoculated control	0.82	1.91	0.28
T3: C/N + MU1	1.83	5.90	0.32
T4: C/N + PM2	0.93	2.27	0.27
T5: C/N + TM6	3.05	6.75	0.39
3 months			
T1: Uninoculated control	0.96	1.51	0.09
T2: C/N + Uninoculated control	0.91	1.69	0.09
T3: C/N + MU1	1.38	3.38	0.11
T4: C/N + PM2	1.20	2.03	0.10
T5: C/N + TM6	1.42	3.50	0.12

เนื่องจากถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีการสะสมแคดเมียมได้สูงมาก เมื่อนำค่าแคดเมียมในดิน และแคดเมียมในถั่วเหลืองมาคำนวณค่า PEC, BAF และ TF ดังแสดงผลในตารางที่ 12 โดยพบว่าถั่วเหลืองมีค่า PEC สูง โดยเฉพาะถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อนที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Arthrobacter* sp. TM6 เป็นเวลา 2 เดือน มีค่า PEC สูงสุดถึง 3.05 และค่า BAF สูงถึง 6.75 ซึ่งการสะสมแคดเมียมในถั่วเหลืองพบมากในช่วงระยะเวลาการเก็บเกี่ยวพืชในเดือนที่ 2 ซึ่งเป็นระยะที่ถั่วเหลืองเติบโตเต็มที่ก่อนเข้าสู่ระยะ Reproductive stage เริ่มออกฝัก (The beginning pod stage) (R3) และค่า PEC และ BAF ลดลงเมื่อถั่วเหลืองเข้าสู่ระยะออกเมล็ดสมบูรณ์แล้ว (The full seed stage) (R6) พืชที่มีค่า PEC และ BAF มากกว่า 1.0 จัดเป็นพืชที่มีการสะสมโลหะหนักได้ดี (Taiwo et al., 2016) แต่พบว่าถั่วเหลืองทุกชุดการทดลองมีการสะสมแคดเมียมปริมาณสูงในบริเวณรากมากกว่าบริเวณส่วนต้นและใบ จึงส่งผลให้ค่า TF ของถั่วเหลืองต่ำมาก (ประมาณ 0.1) Aroa และคณะ (2003) รายงานว่าเมล็ดของถั่วเหลืองมีการสะสมแคดเมียมในปริมาณต่ำ เพราะส่วนยอด (Aboveground tissue) สะสมแคดเมียมได้น้อย โดยพืชอาจมีกลไกในการป้องกันไม่ให้แคดเมียมมีการเคลื่อนย้ายจากรากมาสู่ยอด

ดังนั้น ถึงแม้ว่าถั่วเหลืองมีความสามารถในการดูดซับและสะสมแคดเมียมได้สูง แต่แคดเมียมส่วนใหญ่สะสมอยู่ในบริเวณรากไม่มีการเคลื่อนย้ายไปสู่ส่วนยอด ถั่วเหลืองจึงเหมาะสำหรับนำไปเป็นพืชบำบัดแคดเมียม โดยอาศัยกระบวนการ Phytostabilization มากกว่า Phytoextraction แต่อย่างไรก็ตาม ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการเพาะปลูกถั่วเหลืองเพื่อบำบัดดินปนเปื้อนแคดเมียมไม่ควรนำมาเกี่ยวข้องกับห่วงโซ่อาหาร โดยเฉพาะเมล็ดถั่วเหลือง เพราะมีแคดเมียมในปริมาณสูง ซึ่งต้องมีการป้องกันอย่างเข้มงวด เพื่อไม่ให้นำถั่วเหลืองไปใช้ประโยชน์ในเชิงอาหาร แต่อาจนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงของการนำไปผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซลได้ หรือการนำเมล็ดถั่วเหลืองไปเป็นเมล็ดพันธุ์สำหรับนำไปปลูกในพื้นที่อื่นที่ไม่มีการปนเปื้อนแคดเมียม เพราะผลผลิตที่เกิดจากถั่วเหลืองต้นใหม่ที่ปลูกในดินไม่ปนเปื้อนจะไม่มีแคดเมียมสะสมอยู่

3.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ตรึงแบคทีเรียด้านทานแคดเมียม

จากผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์ในการช่วยส่งเสริมการละลายแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อน พบว่า *Arthrobacter* sp. TM6 มีความสามารถดีที่สุดใน การช่วยการละลายแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อน และทำให้พืชทั้งวุ้นและถั่วเหลืองมีการสะสมแคดเมียมได้มากขึ้น ดังนั้นจึงเลือก *Arthrobacter* sp. TM6 ใช้ในการตรึงเซลล์ด้วยไคโตซานและถ่านชีวภาพ และนำวัสดุตรึงคือไคโตซานและถ่านชีวภาพ และเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนไคโตซาน และถ่านชีวภาพไปส่องดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้อง SEM ได้ผลการศึกษาในรูปที่ 13 และเมื่อนำวัสดุตรึงคือไคโตซานและถ่านชีวภาพไปวิเคราะห์ค่าพื้นที่ผิว ปริมาตรรูพรุน และ ขนาดรูพรุน โดยใช้เครื่อง Brunauer–Emmett–Teller (BET) ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 13 จากผลการศึกษาพบว่าไคโตซานที่ขนาดรูพรุน (Pore size) มากกว่าถ่านชีวภาพ Gentili และคณะ (2006) รายงานว่าพื้นที่ผิวของไคโตซานเป็นแหล่งการเจริญที่เหมาะสมของแบคทีเรีย



รูปที่ 13 ลักษณะทางกายภาพของวัสดุจริง (ก1) ไคโตซาน และ (ข1) ถ่านชีวภาพ และเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บน (ก2) ไคโตซานและ (ข2) ถ่านชีวภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 10000 เท่า

ตารางที่ 13 พื้นที่ผิว ปริมาตรรูพรุน และ ขนาดรูพรุนของไคโตซานและถ่านชีวภาพ

Sample	Surface area (m ² /g)	Pore Volume (cm ³ /g)	Pore size (nm)
Chitosan flake	1.975	7.02 x 10 ⁻⁴	19.15
Biochar	2.184	7.76 x 10 ⁻⁴	9.034

3.8 ผลการรอดชีวิตของเซลล์ตรึงแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมภายหลังการเก็บรักษาและการรอดชีวิตของเซลล์ตรึงแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในดินปนเปื้อนแคดเมียม

เมื่อนำเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนไคโตซานและถ่านชีวภาพมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ อยู่บนวัสดุตรึงทั้ง 2 ชนิด พบว่าจำนวน *Arthrobacter* sp. TM6 บนวัสดุตรึงไคโตซานและถ่านชีวภาพมี จำนวนเท่ากับ $9.89 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$ ต่อกรัมไคโตซาน ($7.7 \times 10^9 \text{ CFU}$ ต่อกรัม) และ $7.63 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$ ต่อ กรัมถ่านชีวภาพ ($4.3 \times 10^7 \text{ CFU}$ ต่อกรัม) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์แบคทีเรียสามารถตรึงบนไคโต ซานได้ดีกว่าบนถ่านชีวภาพ อาจเนื่องมาจากรูพรุนของถ่านชีวภาพ (ตารางที่ 13) มีขนาดเล็ก (9.034 นา โนเมตร) มากกว่าขนาดของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียเข้าไปเกาะภายในรูพรุนถ่านชีวภาพได้ยาก และเมื่อ นำมาเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Arthrobacter* sp. TM6 บนไคโตซานลดลงเหลือ $7.34 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$ ต่อกรัมไคโตซาน ($2.2 \times 10^7 \text{ CFU}$ ต่อ กรัม) หรือคิดเป็นร้อยละการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตบนไคโตซานเท่ากับ 25.8 ส่วนจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Arthrobacter* sp. TM6 บนถ่านชีวภาพก็มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน โดยลดลงเหลือ $6.62 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$ ต่อ กรัมถ่านชีวภาพ ($4.2 \times 10^6 \text{ CFU}$ ต่อกรัม) หรือคิดเป็นร้อยละการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตบนถ่านชีวภาพ เท่ากับ 13.2

ส่วนผลการรอดชีวิตของเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนไคโตซานและถ่านชีวภาพในดิน ปนเปื้อนแคดเมียม (ตารางที่ 14) พบว่าเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนไคโตซานในช่วงวันแรกจนถึง 5 วันเซลล์ของ *Arthrobacter* sp. TM6 มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้น แล้วคงที่ ก่อนจะลดลงในช่วงวันที่ 15 หลังการบ่มในดินปนเปื้อนแคดเมียม ส่วนผลของการรอดชีวิตของเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บน ถ่านชีวภาพ ถึงแม้ว่ามีปริมาณเซลล์น้อยกว่าเซลล์ตรึงบนไคโตซาน แต่เซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นไปจนถึง วันที่ 15 และลดลงในวันที่ 20 แสดงให้เห็นว่า *Arthrobacter* sp. TM6 ที่ตรึงบนวัสดุตรึงสามารถมีการเจริญ เพิ่มจำนวนได้ในดินปนเปื้อนแคดเมียม ซึ่งการตรึงเซลล์สามารถช่วยในการป้องกันเซลล์ให้มีชีวิตรอดใน สภาวะที่มีสารมลพิษ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการ Bioremediation (Dzionek et al., 2016)

ตารางที่ 14 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนไคโตซานและถ่านชีวภาพใน ดินปนเปื้อนแคดเมียม

Time (Day)	Viable cells ($\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$)	
	Chitosan flake	Biochar
0	8.75	6.15
3	9.56	7.01
5	9.15	7.34
10	8.78	8.38
15	8.19	8.53
20	8.05	7.48

3.9 ผลของเซลล์ตรึงแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมต่อการละลาย หรือค่า Bioavailability ของแคดเมียมในดิน

เมื่อนำเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนไคโตซานและเซลล์ตรึงบนถ่านชีวภาพมาทดสอบความสามารถในการช่วยละลายแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อน ได้ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่าการเติมเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนไคโตซาน (T3) และถ่านชีวภาพ (T5) ลงในดินปนเปื้อนแคดเมียมสามารถช่วยเพิ่มการละลายแคดเมียมออกจากดินให้อยู่ในรูป Water soluble และ DTPA-extractable forms สูงขึ้น หรือเป็นการเพิ่มค่า Bioavailability ของแคดเมียมในดิน โดยเฉพาะการใช้เซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนไคโตซาน (T3) ช่วยเพิ่มค่า DTPA-extractable form มากที่สุด (16.84 ± 0.37 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) อาจเนื่องจากว่าปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียบนไคโตซานมีมากกว่าบนถ่านชีวภาพ

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระ *Arthrobacter* sp. TM6 (ตารางที่ 2) พบว่าการใช้เซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 ทั้งบนไคโตซาน (T3) และถ่านชีวภาพ (T5) ช่วยในการเพิ่มค่าความเข้มข้น Water-soluble form ได้ใกล้เคียงกับการใช้เซลล์อิสระ แต่การใช้เซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 ทั้งบนไคโตซาน (T3) และถ่านชีวภาพ (T5) ช่วยเพิ่มค่าความเข้มข้นของ DTPA-extractable form ได้น้อยกว่าการใช้เซลล์อิสระ อาจเนื่องมาจากว่าเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในวัสดุตรึงจึงไม่ได้มีการสัมผัสโดยตรงกับดินปนเปื้อนแคดเมียม ทำให้ประสิทธิภาพของการใช้เซลล์ตรึงไม่ดีเท่ากับการใช้เซลล์อิสระ เนื่องจากการเพิ่มการละลายแคดเมียมในดินโดยการเติมเซลล์ *Arthrobacter* sp. ต้องอาศัยหลักการของการจับกันระหว่างแคดเมียมในดินกับ Exopolymer ที่สร้างจากแบคทีเรีย หรือจับกับผนังเซลล์ที่มีประจุลบของแบคทีเรีย (Khonsue et al., 2013) นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดยังสามารถเปลี่ยนรูปโลหะให้ละลายหรืออยู่ในรูป Bioavailable form ผ่านกลไกต่างๆ ได้แก่ การสร้างสารไซเดอโรฟออร์ กรดอินทรีย์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ รวมทั้งการเกิดกระบวนการ Demethylation และกระบวนการรีดอกซ์ เป็นต้น (Ullah et al., 2015)

ตารางที่ 15 ผลของเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 ในการส่งเสริมการละลายแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อน

Treatment	Cadmium concentration (mg/kg)		
	Water-soluble form	DTPA-extractable form	Total cadmium form
T1: Control (w/o bacterial cells)	0.06 ± 0.00	4.16 ± 0.09	53.23 ± 1.13
T2: Chitosan flake	0.09 ± 0.00	4.35 ± 0.18	52.95 ± 1.42
T3: Chitosan flake immobilized TM6	0.08 ± 0.01	5.53 ± 0.17	48.43 ± 0.96
T4: Biochar	0.08 ± 0.00	4.37 ± 0.56	49.75 ± 2.67
T5: Biochar immobilized TM6	0.10 ± 0.01	4.87 ± 0.22	49.23 ± 2.12

3.10 ประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงแบคทีเรียที่เรียด้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินโดยใช้ว่านเศรษฐี

เมื่อนำว่านเศรษฐีอายุ 2 เดือนมาปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมแล้วเติมเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนไคโตซานและบนถ่านชีวภาพ และเก็บตัวอย่างพืชและดินทุก 3 สัปดาห์เพื่อนำมาตรวจวัดการเติบโตและแคดเมียมในพืช และปริมาณแคดเมียมในดิน ได้ผลการศึกษาในตารางที่ 16 และ 17 ตามลำดับ

ตารางที่ 16 ผลของเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนไคโตซานและถ่านชีวภาพต่อการเติบโตของว่านเศรษฐีที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม

Treatment	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Total dry weight (g)
3 weeks			
T1: Chitosan	9.2 ± 0.2	18.2 ± 0.5	3.52 ± 0.50
T2: Biochar	9.3 ± 2.6	18.8 ± 2.2	3.55 ± 0.21
T3: Free cell TM6	9.1 ± 1.3	18.0 ± 0.7	3.62 ± 0.15
T4: Chitosan-immobilized TM6	9.0 ± 0.3	17.8 ± 0.1	3.66 ± 0.45
T5: Biochar-immobilized TM6	9.0 ± 1.3	18.5 ± 0.8	3.21 ± 0.24
6 weeks			
T1: Chitosan	8.8 ± 0.1	19.0 ± 0.6	4.18 ± 0.61
T2: Biochar	8.3 ± 2.0	20.3 ± 0.5	3.89 ± 0.42
T3: Free cell TM6	9.5 ± 0.8	19.5 ± 1.2	4.31 ± 0.63
T4: Chitosan-immobilized TM6	9.3 ± 0.4	19.3 ± 0.9	4.43 ± 0.23
T5: Biochar-immobilized TM6	9.2 ± 0.5	18.6 ± 1.5	4.09 ± 0.10
9 weeks			
T1: Chitosan	10.0 ± 0.2	19.2 ± 0.1	4.66 ± 0.76
T2: Biochar	9.5 ± 1.8	19.8 ± 2.0	4.22 ± 0.17
T3: Free cell TM6	10.5 ± 1.4	19.0 ± 1.9	4.56 ± 0.25
T4: Chitosan-immobilized TM6	10.3 ± 0.6	20.0 ± 0.5	4.68 ± 0.38
T5: Biochar-immobilized TM6	9.8 ± 0.5	20.0 ± 2.0	4.30 ± 0.15

ผลการเติบโตของว่านเศรษฐีอายุ 2 เดือนในดินปนเปื้อนแคดเมียม (ตารางที่ 16) พบว่าว่านเศรษฐีแสดงอาการจากความเป็นพิษของแคดเมียมเล็กน้อย เช่น ใบเหลือง หลังปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมประมาณ 2-3 สัปดาห์ แคดเมียมที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีผลยับยั้งการเติบโตบางส่วนของว่านเศรษฐีเรื้อนใน (*Chlorophytum comosum*) (Wang et al., 2012) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการเติมเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 ทั้งบนไคโตซาน (T4) และเซลล์ตรึงบนถ่านชีวภาพ (T5) ให้ผลการเติบโตของว่านเศรษฐีไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่เติมเฉพาะไคโตซาน (T1) หรือถ่านชีวภาพ

(T2) และชุดทดลองที่เติมเซลล์อิสระ *Arthrobacter* sp. TM6 (T3) เนื่องจาก *Arthrobacter* sp. TM6 ไม่ได้มีบทบาทหลักของการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเติบโตของพืช อย่างไรก็ตาม จะเห็นความยาวของรากว่านเศรษฐกิจที่อายุเริ่มต้นต่างกันคือ 2 เดือน (ตารางที่ 16) และอายุเริ่มต้น 6 เดือน (ตารางที่ 7) มีความยาวที่ไม่แตกต่างกันมาก เพราะรากของว่านเศรษฐกิจมีลักษณะเป็นหัวขนาดเล็ก (Tuberous rhizomes) จึงทำให้การศึกษาการเติบโตของว่านเศรษฐกิจโดยการวัดความยาวรากและยอด (ใบ) มีข้อจำกัดเพราะลักษณะการเติบโตของว่านเศรษฐกิจเป็นลักษณะการแตกกอออกแนวด้านข้างและลักษณะรากเป็นหัวขนาดเล็ก ทำให้ไม่เห็นความแตกต่างของความยาวรากและใบในแต่ละชุดทดลองตามอายุพืชที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการศึกษาการเติบโตของว่านเศรษฐกิจจึงควรตรวจวัดจากน้ำหนักแห้งรวมของต้นทั้งหมด ซึ่งการเติมและไม่เติม *Arthrobacter* sp. TM6 ไม่มีผลต่อน้ำหนักแห้งของว่านเศรษฐกิจ

ตารางที่ 17 ความเข้มข้นของแคดเมียมที่สะสมในว่านเศรษฐกิจหลังปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติมเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนไคโตซานและถ่านชีวภาพ

Treatment	Cadmium concentration (mg/kg DW)		Cd conc. in 1 plant (µg/plant)
	Root	Shoot	
3 weeks			
T1: Chitosan	12.50 ± 1.04	5.21 ± 1.17	38.24 ± 1.47
T2: Biochar	13.10 ± 2.36	4.67 ± 1.12	43.38 ± 4.63
T3: Free cell TM6	23.70 ± 1.54	13.27 ± 0.74	65.21 ± 4.95
T4: Chitosan-immobilized TM6	19.90 ± 1.69	11.03 ± 1.16	49.14 ± 3.59
T5: Biochar-immobilized TM6	17.90 ± 1.04	10.15 ± 3.63	42.67 ± 6.61
6 weeks			
T1: Chitosan	14.01 ± 1.54	7.90 ± 0.35	50.77 ± 4.69
T2: Biochar	15.40 ± 1.56	7.80 ± 1.57	51.67 ± 1.55
T3: Free cell TM6	26.05 ± 1.25	17.20 ± 1.11	75.44 ± 5.18
T4: Chitosan-immobilized TM6	22.83 ± 2.07	14.50 ± 0.57	63.01 ± 2.95
T5: Biochar-immobilized TM6	19.75 ± 0.95	11.50 ± 1.85	53.38 ± 1.66
9 weeks			
T1: Chitosan	16.20 ± 0.99	10.40 ± 1.08	76.48 ± 6.18
T2: Biochar	20.40 ± 2.39	8.70 ± 1.08	82.71 ± 2.97
T3: Free cell TM6	22.04 ± 1.41	19.95 ± 0.68	109.42 ± 2.12
T4: Chitosan-immobilized TM6	21.60 ± 1.02	17.60 ± 1.14	108.60 ± 4.32
T5: Biochar-immobilized TM6	24.70 ± 2.33	13.60 ± 1.05	94.45 ± 1.64

ผลการสะสมแคดเมียมในส่วนต่างๆ ของวุ้นเครษฐีในตารางที่ 17 พบว่าวุ้นเครษฐีสามารถสะสมแคดเมียมในส่วนรากมากกว่าส่วนยอด (ใบ) เพราะลักษณะรากของวุ้นเครษฐีเป็นหัวขนาดเล็ก รากพืชสามารถสะสมแคดเมียมได้ในส่วน Vacuoles และส่วนเซลล์ที่ตายแล้วบริเวณราก ทำให้มีการเคลื่อนที่ของแคดเมียมจากรากสู่ยอดได้น้อย (Grant et al., 1998; Shute and Macfie, 2006) นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่าการใช้วุ้นเครษฐีอายุเริ่มต้น 2 เดือน มีประสิทธิภาพในการสะสมแคดเมียมได้ดีกว่าการใช้วุ้นเครษฐีอายุเริ่มต้น 6 เดือน (ตารางที่ 8) เพราะช่วงอายุ 2 เดือน เป็นช่วงที่วุ้นเครษฐีกำลังเข้าสู่การเติบโตเต็มที่ (ก่อนช่วงการออกดอกครั้งแรกประมาณ 1.5 ถึง 2 เดือน) และยังพบว่าการสะสมแคดเมียมในส่วนยอด (ใบ) เพิ่มขึ้นตามอายุของวุ้นเครษฐี การศึกษาของ Ghosh และ Singh (2005) รายงานว่าพืชบางชนิดจะดึงแคดเมียมออกจากดินและเคลื่อนที่ผ่านทางไซเลมไปยังส่วนยอดของพืชและสะสมที่ยอด โดยพบการสะสมแคดเมียมสูงสุดในรากของวุ้นเครษฐีที่มีการเติมเซลล์อิสระ *Arthrobacter* sp. TM6 (T3) รองมาคือ รากวุ้นเครษฐีที่เติมเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโคซาน (T4) หลังการปลูกวุ้นเครษฐีในดินปนเปื้อนแคดเมียมเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการเติมเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโคซานหรือถ่านชีวภาพในการปลูกวุ้นเครษฐีมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการสะสมแคดเมียมในวุ้นเครษฐีได้น้อยกว่าการใช้เซลล์อิสระ โดยเฉพาะในช่วงแรกของการเก็บตัวอย่าง แต่ในระยะเวลาการเก็บตัวอย่างพืชในสัปดาห์ที่ 9 พบว่าเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโคซานมีประสิทธิภาพส่งเสริมให้วุ้นเครษฐีสะสมแคดเมียมได้ใกล้เคียงกับการใช้เซลล์อิสระ แต่อย่างไรก็ตาม การใช้เซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนถ่านชีวภาพมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมพืชให้เติบโตและสะสมแคดเมียมได้น้อยกว่าการใช้เซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโคซาน

อาจเนื่องมาจากเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโคซานหรือถ่านชีวภาพต้องการระยะเวลาในการปรับตัวและเพิ่มจำนวนในดินปนเปื้อน เพราะแบคทีเรียในวัสดุตรึงอาจได้รับสารอาหารในดินได้ยากกว่าเซลล์อิสระที่อาศัยในดิน ผลการศึกษานี้แตกต่างจากการใช้เซลล์ตรึงแบคทีเรียบนโคโคซานในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ซึ่งพบว่าเซลล์ตรึงแบคทีเรียบนโคโคซานมีการรอดชีวิตและกิจกรรมในการย่อยน้ำมันดิบในน้ำทะเลได้ดีกว่าเซลล์อิสระ (Gentili et al. 2006) อาจเนื่องมาจากน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนที่สนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียที่อาศัยในวัสดุตรึงได้ ในขณะที่แคดเมียมไม่ได้เป็นแหล่งสารอาหารใดๆ ของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า การเติมเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของแบคทีเรียย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมในการปลูกพืช *Sesbania cannabina* ไม่มีผลส่งเสริมให้พืชมีการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมได้มากขึ้น (Maqbool et al., 2012)

ส่วนผลประสิทธิภาพในการสะสมแคดเมียมและการเคลื่อนย้ายแคดเมียมจากรากสู่ยอดของวุ้นเครษฐีในชุดการทดลองต่างๆ (ตารางที่ 18) พบว่าวุ้นเครษฐีมีค่า PEC ต่ำกว่า 1.0 จึงไม่จัดว่าเป็น Hyperaccumulating plant ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Wang และคณะ (2012) ที่ศึกษาในวุ้นเครษฐีเรื่อนิน (C. comosum) ที่ระบุว่าเป็น Hyperaccumulating plant เนื่องจากเป็นพืชต่างสปีชีส์กับวุ้นเครษฐีเรื่อนินนอกที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ และการศึกษาของ Wang และคณะ (2012) ทดสอบในดินที่มีปริมาณแคดเมียมน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งการทดสอบในดินที่มีปริมาณแคดเมียมสูงอาจมีผลทำให้พืชมีการดูดตั้งและการเคลื่อนย้ายแคดเมียมเข้าสู่พืชได้ต่ำ เพราะพืชมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากความเป็นพิษของแคดเมียม อย่างไรก็ตาม ค่า BAF และ TF ของวุ้นเครษฐีมีค่าเพิ่มขึ้นตามอายุของพืช โดยเฉพาะในสัปดาห์ที่ 9 หลังการเพาะปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมของชุดการทดลองที่มีการเติมเซลล์

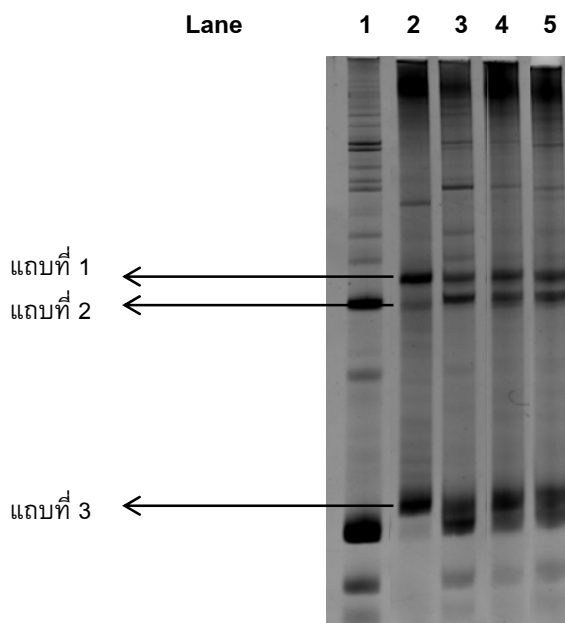
อิสระหรือเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 มีค่า BAF มากกว่า 1.0 และมีค่า TF 0.8 – 0.9 ดังนั้น ว่านเศรษฐกิจจึงจัดเป็นพืชที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นพืชบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนโดยอาศัยกระบวนการ Phytoextraction รวมทั้งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดแคดเมียมของว่านเศรษฐกิจได้โดยการเติมเซลล์อิสระหรือเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพในการส่งเสริมการสะสมแคดเมียมในว่านเศรษฐกิจของการใช้เซลล์ตรึงแบคทีเรียน้อยกว่าการใช้เซลล์อิสระ แต่ข้อดีของการใช้เซลล์ตรึงแบคทีเรียคือ สามารถเก็บรักษาและนำเซลล์ตรึงแบคทีเรียไปใช้ในพื้นที่ปนเปื้อนได้สะดวกกว่าการใช้เซลล์อิสระ รวมทั้งการตรึงเซลล์แบคทีเรียเป็นการช่วยปกป้องแบคทีเรียในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Dzionek et al., 2016) ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการเร่งการเจริญเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่อาศัยในวัสดุตรึง เมื่อนำเซลล์ตรึงแบคทีเรียเติมลงในดินปนเปื้อนควรมีการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 18 ค่า PEC, BAF และ TF ของว่านเศรษฐกิจที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติมเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนไคโตซานและถ่านชีวภาพ

Treatment	PEC	BAF	TF
3 weeks			
T1: Chitosan	0.13	0.46	0.42
T2: Biochar	0.14	0.63	0.38
T3: Free cell TM6	0.27	1.03	0.56
T4: Chitosan-immobilized TM6	0.24	0.86	0.55
T5: Biochar-immobilized TM6	0.18	0.76	0.52
6 weeks			
T1: Chitosan	0.17	0.60	0.56
T2: Biochar	0.18	0.76	0.43
T3: Free cell TM6	0.33	1.28	0.66
T4: Chitosan-immobilized TM6	0.32	1.18	0.64
T5: Biochar-immobilized TM6	0.21	1.15	0.58
9 weeks			
T1: Chitosan	0.21	0.86	0.64
T2: Biochar	0.24	1.07	0.59
T3: Free cell TM6	0.33	1.37	0.90
T4: Chitosan-immobilized TM6	0.33	1.28	0.81
T5: Biochar-immobilized TM6	0.32	1.13	0.71

3.11 กลุ่มประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนแคดเมียม

จากการศึกษากลุ่มประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติมเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 ในการปลูกว่านเศรษฐกิจในดินปนเปื้อนแคดเมียมเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยวิธี PCR-Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE) พบว่าดินปนเปื้อนแคดเมียมที่นำมาปลูกว่านเศรษฐกิจมีกลุ่มแบคทีเรียที่หลากหลาย และพบแถบดีเอ็นเอเด่นจำนวน 3 แถบ (Bands) (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 โครงสร้างประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนแคดเมียมจากการวิเคราะห์โดยวิธี PCR-DGGE

Lane 1: Pure culture of *Arthrobacter* sp. TM6

Lane 2: Cadmium-contaminated soil

Lane 3: Soil inoculated with *Arthrobacter* sp. TM6 free cells

Lane 4: Soil inoculated with chitosan-immobilized *Arthrobacter* sp. TM6

Lane 5: Soil inoculated with biochar-immobilized *Arthrobacter* sp. TM6

จากผลการศึกษาชนิดของแบคทีเรียเด่นจากแถบดีเอ็นเอเด่นทั้ง 3 แถบ จาก DGGE profile โดยทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA บางส่วน (Partial sequence) ของแถบดีเอ็นเอทั้ง 3 แถบ และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่าดินปนเปื้อนแคดเมียมหลังปลูกว่านเศรษฐกิจที่ไม่มีการเติม *Arthrobacter* sp. TM6 ลงไป (ชุดควบคุม) มีกลุ่มแบคทีเรียเด่น (Dominant) ที่วิเคราะห์จาก 3 แถบดีเอ็นเอ (Lane 2) ของ DGGE profile เรียงตามลำดับคือ แถบที่ 1, 2 และ 3 พบ Closest bacteria คือ *Salmonella subterranean*, *Arthrobacter phenanthrenivorans* และ *Achromobacter denitrificans* ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 19 ส่วนในดินปนเปื้อนแคดเมียมหลังปลูก

ว่านเศรษฐกิจในชุดการทดลองที่มีการเติมเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของ *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโคซาน และถ่านชีวภาพ (Lane 3, 4 และ 5 ตามลำดับ) พบแบคทีเรียเด่นเช่นเดียวกับดินที่ไม่มีการเติม *Arthrobacter* sp. TM6 และยังสามารถตรวจพบ *Arthrobacter* sp. TM6 ได้ในดิน (เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของ Pure culture ของ *Arthrobacter* sp. TM6 ใน Lane 1)

ตารางที่ 19 สายพันธุ์ของแบคทีเรียจากแถบดีเอ็นเอเด่นจากการวิเคราะห์ด้วย PCR-DGGE

Band	Closest match in GenBank database (Accession number)	% Similarity (Length of nucleotides)	Taxonomic group
1	<i>Salmonella subterranean</i> FRC1 (NR115224)	97 % (198 bp)	γ -Proteobacteria
2	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3 (NR074770)	99 % (178 bp)	Actinobacteria
3	<i>Achromobacter denitrificans</i> DSM30026 (NR042021)	97 % (198 bp)	β -Proteobacteria

บทที่ 4

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดแคดเมียมและส่งเสริมความยาวรากพืช การส่งเสริมการละลายของแคดเมียมในดินปนเปื้อน การส่งเสริมการเติบโตและการสะสมแคดเมียมในพืชบำบัดได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง และวุ้นเศรษฐกิจ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเซลล์ตรึงแบคทีเรียบนโคโคซานและถ่านชีวภาพ เพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมวุ้นเศรษฐกิจในการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อน โดยสามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

4.1.1 การสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดแคดเมียมของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียม

Micrococcus sp. MU1 สร้างกรด IAA ได้สูงสุด 561.43 ± 11.93 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมงของการเจริญ ส่วน *Pseudomonas* sp. PM2 สามารถสร้างสารไซเดอโรฟอร์ได้สูงสุด 71.75 ± 1.11 μM of deferroxamine mesylate equivalents ที่ 48 ชั่วโมงของการเจริญ และ *Arthrobacter* sp. TM6 สร้าง Exopolymer ได้สูงสุด 19.64 ± 0.19 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมงของการเจริญ และพบว่า *Micrococcus* sp. MU1 ช่วยส่งเสริมความยาวรากของถั่วเหลืองได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีแคดเมียม ในขณะที่ *Pseudomonas* sp. PM2 และ *Arthrobacter* sp. TM6 ไม่มีผลต่อความยาวของรากถั่วเหลือง

4.1.2 ผลของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมต่อการละลายแคดเมียมในดินและการรอดชีวิตของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในดินปนเปื้อนแคดเมียมในสภาวะที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหาร

เมื่อนำแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์มาทดสอบการส่งเสริมการละลายหรือการเพิ่มค่า Bioavailability ของแคดเมียมในดิน พบว่าแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์ช่วยเพิ่มการละลายของแคดเมียมในดินได้ และพบว่าการเติมสารอาหารให้มีค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 ช่วยส่งเสริมกิจกรรมของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์ในการเพิ่มการละลายของแคดเมียมในดินได้มากขึ้น โดยเฉพาะการเติม *Arthrobacter* sp. TM6 และเติมสารอาหารให้มีค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 ช่วยในการละลายแคดเมียมในดินปนเปื้อนได้สูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนและรอดชีวิตในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมสูงถึง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมได้ และการเจริญเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในดินปนเปื้อนที่มีการเติมสารอาหารให้มีค่า C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 มีมากกว่าดินปนเปื้อนที่ไม่มีการเติมสารอาหาร

4.1.3 ผลของ *Micrococcus* sp. MU1 ต่อการส่งเสริมการเติบโตและการบำบัดแคดเมียมของข้าวโพด

Micrococcus sp. MU1 สามารถช่วยส่งเสริมการเติบโตของข้าวโพดที่ปลูกในดินไม่ปนเปื้อนและดินปนเปื้อนแคดเมียมในทุกระยะเวลาการเก็บเกี่ยว แต่ข้าวโพดที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม (90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) มีความยาวราก ความสูงต้นและน้ำหนักแห้งต่ำกว่าข้าวโพดที่ปลูกในดินไม่ปนเปื้อนแคดเมียม แต่ไม่แสดงอาการพิษของแคดเมียมอย่างเด่นชัด นอกจากนี้ ยังพบว่าในช่วงแรกของการปลูก (2 สัปดาห์) ข้าวโพดมีการสะสมแคดเมียมในส่วนยอด (ใบ) มากกว่าส่วนราก และในระยะเวลาการปลูกตั้งแต่ 4 สัปดาห์ถึง 12 สัปดาห์ ปริมาณแคดเมียมในส่วนรากมากกว่าในส่วนยอด ซึ่งการเติม *Micrococcus* sp. MU1 ในการปลูกพืชช่วยส่งเสริมให้ข้าวโพดสะสมแคดเมียมได้มากขึ้นทั้งในส่วนรากและส่วนยอด โดยข้าวโพดที่ระยะการปลูกที่ 6 สัปดาห์มีปริมาณแคดเมียมสะสมสูงสุด และข้าวโพดมีค่า PEC ประมาณ 1.0 และค่า BAF มากกว่า 1.0 และค่า PEC และ BAF มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเติบโตของข้าวโพด แต่ค่า TF ของข้าวโพดมากกว่า 1.0 เฉพาะใน 2 สัปดาห์แรกที่เพาะปลูกในดินปนเปื้อน และค่า TF ลดลงต่ำมาก ดังนั้น ข้าวโพดจึงเหมาะสำหรับการนำมาใช้เป็นพืชบำบัดแคดเมียมโดยอาศัยกระบวนการ Phytoextraction ได้ดีเฉพาะในช่วงแรก แต่ช่วงหลังกระบวนการบำบัดแคดเมียมของข้าวโพดอาศัยกระบวนการ Phytostabilization

4.1.4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินของว่านเศรษฐีและถั่วเหลืองในสภาวะที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพ

เมื่อปลูกว่านเศรษฐีอายุ 6 เดือนในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่เก็บจากพื้นที่ปนเปื้อน (50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) แสดงอาการจากความเป็นพิษของแคดเมียมเล็กน้อย เช่น ใบเหลือง และพบว่าการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหาร C/N ratio ในดินเท่ากับ 20:1 และการเติม *Micrococcus* sp. MU1 ช่วยส่งเสริมให้ว่านเศรษฐีมีความยาวราก ความยาวยอด (ใบ) และน้ำหนักแห้งของชีวมวลสูงสุด และการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหารและการเติม *Arthrobacter* sp. TM6 ช่วยส่งเสริมให้ว่านเศรษฐีมีการสะสมแคดเมียมได้สูงสุด โดยเฉพาะในสัปดาห์ที่ 9 หลังการปลูกว่านเศรษฐีในดินปนเปื้อนแคดเมียม พบว่าว่านเศรษฐีสามารถสะสมแคดเมียมในส่วนรากและส่วนยอด (ใบ) ได้สูงสุด และพบว่าว่านเศรษฐีมีค่า PEC และ BAF ต่ำมาก แต่ค่า PEC และ BAF มีค่ามากขึ้นเมื่อว่านเศรษฐีมีอายุมากขึ้น นอกจากนี้ ยังพบว่าว่านเศรษฐีที่ปลูกในดินที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและการเติม *Arthrobacter* sp. TM6 มีค่า TF มากกว่า 1.0 แสดงว่าว่านเศรษฐีสามารถเคลื่อนย้ายแคดเมียมที่สะสมในรากไปสู่ยอดได้ดี จึงเหมาะสำหรับการนำว่านเศรษฐีไปใช้ในการบำบัดแคดเมียมในดินโดยอาศัยกระบวนการ Phytoextraction

ส่วนผลของการเติมแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมและการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหารต่อการเติบโตและการบำบัดแคดเมียมของถั่วเหลือง พบว่าถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อนที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Micrococcus* sp. MU1 มีการเติบโตสูงสุดทุกระยะการเก็บตัวอย่าง และถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อนและมีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Arthrobacter* sp. TM6 มีการสะสมแคดเมียมได้สูงสุดทุกระยะการเก็บตัวอย่าง โดยถั่วเหลืองมีการสะสมแคดเมียมในรากสูงกว่าในส่วนใบและส่วนต้นหลายเท่า โดยถั่วเหลืองสะสมแคดเมียมได้สูงสุดในระยะหลังการปลูกในดินปนเปื้อน 2 เดือน นอกจากนี้ ยังพบว่า ถั่วเหลืองมีค่า PEC และ BAF สูงในช่วง 2 เดือนหลังปลูกในดินปนเปื้อน โดยเฉพาะ

ถั่วเหลืองถั่วเหลืองที่ปลูกในดินปนเปื้อนที่มีการกระตุ้นทางชีวภาพและเติม *Arthrobacter* sp. TM6 และค่า PEC และ BAF ลดลงเมื่อถั่วเหลืองเข้าสู่ระยะออกเมล็ดสมบูรณ์แล้ว (3 เดือนหลังปลูก) และถั่วเหลืองมีค่า TF ต่ำมาก ดังนั้น ถั่วเหลืองจึงเหมาะสำหรับนำไปเป็นพืชบำบัดโดยอาศัยกระบวนการ Phytostabilization

4.1.5 ความสามารถในการรอดชีวิตและการละลายแคดเมียมในดินปนเปื้อนของเซลล์ ตรึงแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมบนโคโคซานและถ่านชีวภาพ

เมื่อนำเซลล์ *Arthrobacter* sp. TM6 มาตรึงบนโคโคซานและถ่านชีวภาพ และนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าแบคทีเรียสามารถเกาะบนพื้นผิวของวัสดุตรึงได้ และเมื่อนำเซลล์ตรึงมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต พบว่าจำนวน *Arthrobacter* sp. TM6 บนวัสดุตรึงโคโคซานมีมากกว่าบนถ่านชีวภาพ อาจเนื่องมาจากรูพรุนของถ่านชีวภาพมีขนาดเล็กกว่าขนาดของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียเข้าไปเกาะภายในรูพรุนถ่านชีวภาพได้ยาก และเมื่อนำมาเก็บในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโคซานและถ่านชีวภาพลดลงร้อยละ 25.8 และ 13.2 ตามลำดับ และพบว่าเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 บนโคโคซานและถ่านชีวภาพในดินปนเปื้อนแคดเมียมมีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นในช่วงแรก และค่อย ๆ ลดลงในช่วงวันที่ 15 - 20 วัน หลังการบ่มในดินปนเปื้อนแคดเมียม

4.1.6 ประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัด แคดเมียมในดินของว่านเศรษฐี

ผลการเติบโตของว่านเศรษฐีอายุ 2 เดือนในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติมเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 ทั้งบนโคโคซาน (T4) และเซลล์ตรึงบนถ่านชีวภาพ พบว่าการเติมเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 ทั้งบนโคโคซาน หรือถ่านชีวภาพ ไม่มีผลต่อการเติบโตของว่านเศรษฐี แต่การเติมเซลล์ตรึง *Arthrobacter* sp. TM6 ทั้งบนโคโคซาน หรือถ่านชีวภาพมีผลช่วยส่งเสริมการสะสมแคดเมียมในว่านเศรษฐี แต่การเติมเซลล์อิสระ *Arthrobacter* sp. TM6 ช่วยเพิ่มการสะสมแคดเมียมในว่านเศรษฐีมากกว่าการใช้เซลล์ตรึงแบคทีเรีย ยกเว้นในช่วงสัปดาห์ที่ 9 ของการเก็บเกี่ยวพืช ที่การใช้เซลล์ตรึงแบคทีเรียบนโคโคซานช่วยส่งผลในการส่งเสริมการสะสมแคดเมียมในว่านเศรษฐีได้ใกล้เคียงกับการใช้เซลล์อิสระ *Arthrobacter* sp. TM6 ส่วนค่า PEC ของว่านเศรษฐีมีค่าต่ำ แต่ค่า BAF และ TF ของว่านเศรษฐีมีค่าเพิ่มขึ้นตามอายุของพืช โดยเฉพาะในสัปดาห์ที่ 9 หลังการเพาะปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมของชุดการทดลองที่มีการเติมเซลล์อิสระ *Arthrobacter* sp. TM6 มีค่า BAF และค่า TF สูงสุด ดังนั้น ว่านเศรษฐีจึงจัดเป็นพืชที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้作为พืชบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนโดยอาศัยกระบวนการ Phytoextraction

4.1.7 กลุ่มประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการบำบัดโดยการปลูกว่าน เศรษฐีและเติมแบคทีเรียด้านทานแคดเมียม

ผลการศึกษาประชาคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการปลูกว่านเศรษฐีโดยใช้เทคนิค PCR-DGGE พบว่าดินปนเปื้อนแคดเมียมหลังจากปลูกว่านเศรษฐีและไม่มีการเติม *Arthrobacter* sp. TM6 มีกลุ่มแบคทีเรียเด่นคือ *Salmonella subterranean*, *Arthrobacter phenanthrenivorans* และ

Achromobacter denitrificans ส่วนในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่มีการเติม *Arthrobacter* sp. TM6 ทั้งแบบเซลล์อิสระหรือเซลล์ตรึงบนไคโตซานและถ่านชีวภาพหลังปลูกว่านเศรษฐกิจ ยังสามารถตรวจพบ *Arthrobacter* sp. TM6 ได้ในดินร่วมกับการพบแบคทีเรียเด่นกลุ่มเดียวกับดินชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม *Arthrobacter* sp. TM6

4.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยที่ได้จากการศึกษานี้สามารถให้ข้อเสนอแนะสำหรับการทำวิจัยต่อไปในประเด็นที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนโดยใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมและการกระตุ้นทางชีวภาพโดยการเติมสารอาหาร รวมทั้งการใช้เซลล์ตรึงแบคทีเรียในกระบวนการเติมแบคทีเรียในดินปนเปื้อน ได้ดังนี้

4.2.1 ควรศึกษาพืชกลุ่มอื่นๆ ที่มีศักยภาพการบำบัดเป็นทั้งแบบ Phytoextraction และ Phytostabilization และควรเป็นพืชที่ไม่เกี่ยวข้องกับพืชอาหาร รวมทั้งเลือกชนิดพืชที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ เช่น พืชพลังงาน

4.2.2 ควรพัฒนารูปแบบเซลล์ตรึงแบคทีเรียที่สามารถตรึงเซลล์แบคทีเรียได้ในปริมาณสูง และมีอัตราการรอดชีวิตสูง รวมทั้งศึกษาสภาวะที่ช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียในวัสดุตรึงสามารถปรับตัวกลับมาเจริญเพิ่มจำนวนได้ดี เมื่อมีการนำเซลล์ตรึงแบคทีเรียไปเติมในดินปนเปื้อน

4.2.3 ควรศึกษารูปแบบของการปลูกพืชบำบัดร่วมกับการใช้แบคทีเรียต้านทานโลหะหนักแบบ Plant co-cropping เพื่อช่วยเร่งกระบวนการบำบัดโลหะหนักในดินได้ดีขึ้น รวมทั้งการนำเทคโนโลยีการบำบัดโลหะหนักโดยใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียไปศึกษาในพื้นที่ปนเปื้อนจริง

4.2.4 ควรศึกษาการปนเปื้อนโลหะหนักในรูปแบบ Co-contamination ร่วมกับสารมลพิษสิ่งแวดล้อมชนิดอื่นๆ เช่น น้ำมันปิโตรเลียม สารปราบศัตรูพืช

4.4.5 การพัฒนาเทคโนโลยีการบำบัดโลหะหนักโดยใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียไปใช้ในการป้องกันการแพร่กระจายของโลหะหนักออกจากพื้นที่ที่มีความเสี่ยงในการแพร่กระจายโลหะหนักออกสู่สิ่งแวดล้อม ได้แก่ โรงงานแปรรูปโลหะหนัก บ่อฝังกลบขยะอันตราย เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- เบญจภรณ์ ประภักดี และจิรวิทย์ แสงทอง. แนวทางการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียมด้วยวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม: จากขบวนการทดลองสู่พื้นที่จริง. วารสารสิ่งแวดล้อม. 2559; 20(1): 1-13.
- สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช. หลักเกณฑ์และมาตรฐานประกอบการตรวจรับรองสินค้าเกษตรด้านพืช. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ, 2556.
- Ahmad I, Akhtar MJ, Zahir ZA, Naveed M, Mitter B, Sessitsch A. Cadmium-tolerant bacteria induce metal stress tolerance in cereals. Environ. Sci. Pollut. Res. 2014; 21: 11054–11065.
- Ali H, Khan E, Sajad MA. Phytoremediation of heavy metals: Concepts and applications. Chemosphere. 2013; 91: 869–881.
- Amico E, Lucia C, Andreoni V. Improvement of *Brassica napus* under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. Soil Biol. Biochem. 2008; 40: 74–78.
- Anjum NA, Umar S, Iqbal M. Assessment of cadmium accumulation, toxicity, and tolerance in Brassicaceae and Fabaceae plants: Implications for phytoremediation. Environ. Sci. Pollut. Res. 2014; 21:10286–10293.
- Arao T, Ae N, Sugiyama M, Takahashi M. Genotypic differences in cadmium uptake and distribution in soybeans. Plant Soil. 2003; 251: 247–253.
- Belimov AA, Hontzeas N, Safronova VI, Demchinskaya SV, Piluzza G, Bullitta S, Glick BR. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). Soil Biol. Biochem. 2005; 37: 241–250.
- Braud A, Jézéquel K, Bazot S, Lebeau T. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. Chemosphere. 2009; 74: 280–286.
- Chang D, Fukushima K, Gosh S. Simulation of activated sludge cultures for enhanced heavy metals removal. Water Environ. Res. 1995; 67: 822–827.
- Chen YX, He YF, Luo YM, Yu YL, Lin Q, Wong MH. Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. Chemosphere. 2003; 50: 789–793.
- Chen ZJ, Sheng XF, He LY, Huang Z, Zhang WH. Effects of root inoculation with bacteria on the growth, Cd uptake and bacterial communities associated with rape grown in Cd-contaminated soil. J. Hazard. Mater. 2013; 244–245: 709–717.
- Chiu KK, Ye ZH, Wong MH. Enhanced uptake of As, Zn, and Cu by *Vetiveria zizanioides* and *Zea mays* using chelating agents. Chemosphere. 2005; 60: 1365–1375.

- Duangboobpha S, Prapagdee B, Kumsopa A and Wongthanate J. Isolation and screening of cadmium resistant rhizobacteria and their ability on siderophore and biosurfactant production. Proceedings in the 39th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok: Thailand, 2013, pp.1035–1040.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 1956; 28: 350–356.
- Dzionic A, Wojcieszynska D, Guzik U. Natural carriers in bioremediation: A review. Electron. J. Biotechnol. 2016; 23: 28–36.
- Faust MB, Christians NE. Copper reduces shoot growth and root development of creeping bent grass. Crop Sci. 2000; 40: 498–502.
- Gentili A.R., Cubitto M.A., Ferrero M. and Rodríguez M.S. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. Int. Biodeter. Biodegrad. 2006; 57: 222–228.
- Ghosh M, Singh SP. A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species. Environ. Poll. 2005; 133: 365–371.
- Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiol. 1951; 26: 192–195.
- Grant CA, Buckley WT, Bailey LD, Selles F. Cadmium accumulation in crops. Can. J. Plant Sci. 1998; 78: 1–17.
- Guo J, Chi J. Effect of Cd-tolerant plant growth-promoting rhizobium on plant growth and Cd uptake by *Lolium multiflorum* Lam. and *Glycine max* (L.) Merr. in Cd-contaminated soil. Plant Soil. 2014; 375: 205–214.
- Guo J, Feng R, Ding Y, Wang R. Applying carbon dioxide, plant growth-promoting rhizobacterium and EDTA can enhance the phytoremediation efficiency of ryegrass in a soil polluted with zinc, arsenic, cadmium and lead. J. Environ. Manage. 2014; 141: 1–8.
- Huff J, Lunn RM, Waalkes MP, Tomatis L, Infante PF. 2007 Cadmium-induced cancers in animals and in humans. Int. J. Occup. Env. Heal. 13: 202–212.
- Ishikawa S, Ae N, Sugiyama M, Murakami M, Arao T. Genotypic variation in shoot cadmium concentration in rice and soybean in soils with different levels of cadmium contamination. Soil Sci. Plant Nutr. 2005; 51: 101–108.
- Joseph P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009; 238: 272–279.
- Khaokaew S, Landrot G. A field-scale study of cadmium phytoremediation in a contaminated agricultural soil at Mae Sot district, Tak province, Thailand: (1) Determination of Cd-hyperaccumulating plants. Chemosphere. 2015; 138: 883–886.

- Khonsue N, Kittisuwan K, Kumsopa A, Tawinteung N, Prapagdee B. Inoculation of soil with cadmium-resistant bacteria enhances cadmium phytoextraction by *Vetiveria nemoralis* and *Ocimum gratissimum*. *Water Air Soil Pollut.* 2013; 224: 1696.
- Kumar PBAN, Dushenkov V, Motto H, Raskin I. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol.* 1995; 29: 1232–1238.
- Kunito T, Saeki K, Nagaoka K, Oyaizu K, Mutsumoto S. Characterization of Cu-resistant bacterial communities in Cu-contaminated soils. *Eur. J. Soil. Biol.* 2001; 37: 95–102.
- Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 238: 209–214.
- Liu Z, Ge H, Li C, Zhao Z, Song F, Hu S. Enhanced phytoextraction of heavy metals from contaminated soil by plant co-cropping associated with PGPR. *Water Air Soil Pollut.* 2015; 226: 29.
- Ma Y, Rajkumar M, Freitas H. Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel-plant-growth promoting bacteria. *J. Hazard. Mater.* 2009; 166: 1154–1161.
- Maqbool F, Wang Z, Xu Y, Zhao J, Gao D, Zhao YG, Bhatti ZA, Xing B. Rhizodegradation of petroleum hydrocarbons by *Sesbania cannabina* in bioaugmented soil with free and immobilized consortium. *J. Hazard. Mater.* 2012; 237–238: 262–269.
- Mattina MJ, Lannucci-Berger W, Musante C, White JC. Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environ. Poll.* 2003; 124: 375–378.
- McGrath SP, Cunliffe CH. A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co and Mn from soils and sewage sludges. *J. Sci. Food Agric.* 1985; 36: 794–798.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction– amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59: 695–700.
- Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Cur. Opi. Microbiol.* 1999; 2: 317–322.
- Phaenark C, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, Ngernsarsaruy C. Cd and Zn accumulation in plants from the Padaeng zinc mine area. *Int. J. Phytoremediat.* 2009; 11: 479–495.
- Prapagdee B, Chanprasert M, Mongkolsuk S. Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus*. *Chemosphere.* 2013; 92: 659–666.
- Prapagdee B, Chumphonwong N, Khonsue N and Mongkolsuk S. Influence of cadmium resistant bacteria on promoting plant root elongation and increasing cadmium mobilization in contaminated soil. *Fresen. Environ. Bull.* 2012; 21(5): 1186–1191.

- Quevauviller P, Lachica M, Barahona E, Gomez A, Rauret G, Ure A, Muntau H. Certified reference material for the quality control of EDTA- and DTPA-extractable trace metal contents in calcareous soil (CRM 600). *Fresen. J. Anal. Chem.* 1998; 360: 505–511.
- Rajkumar M, Freitas H. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere.* 2008; 71: 834–842.
- Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 1986; 140: 47–56.
- Sheng XF, Xia JJ, Jiang CY, He LY, Qian M. Characterization of heavy metal resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ. Pollut.* 2008; 156: 1164–1170.
- Shute T, Macfie SM. Cadmium and zinc accumulation in soybean: A threat to food safety? *Sci. Total Environ.* 2006; 371: 63–73.
- Simmons RW, Pongsakul P, Chaney L, Saiyasitpanich D, Klinphoklap S, Nobuntou W. The relative exclusion of zinc and iron from rice grain in relation to rice grain cadmium as compared to soybean: Implications for human health. *Plant Soil.* 2003; 257: 163–170.
- Sugiyama M, Ae N, Arao T. Role of roots in differences in seed cadmium concentration among soybean cultivars—proof by grafting experiment. *Plant Soil.* 2007; 295: 1–11.
- Sun Y, Zhou Q, Wang L, Liu W. Cadmium tolerance and accumulation characteristics of *Bidens pilosa* L. as a potential Cd-hyperaccumulator. *J. Hazard. Mater.* 2009; 161: 808–814.
- Taiwo AM, Gbadebo AM, Oyedepo JA, Ojekunle ZO, Alo OM, Oyeniran AA, Onalaja OJ, Ogunjimi D, Taiwo OT. Bioremediation of industrially contaminated soil using compost and plant technology. *J. Hazard. Mater.* 2016; 304: 166–172.
- Thawornchaisit U, Polprasert C. Evaluation of phosphate fertilizers for the stabilization of cadmium in highly contaminated soils. *J. Hazard. Mater.* 2009; 165: 1109–1113.
- Waalkes MP. 2000. Cadmium carcinogenesis in review. *J. Inorg. Biochem.* 79: 241–244.
- Wang Y, Yan A, Dai J, Wang N, Wu D. Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in *Chlorophytum comosum*: a popular ornamental plant and potential Cd hyperaccumulator. *Environ. Monitor. Assess.* 2012; 184(2): 929–937.
- Ullah A, Heng S, Munis MFH, Fahad S, Yang X. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environ Exp Bot.* 2015; 117: 28–40.
- U.S. Environmental Protection Agency. Method 3052: Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous Matrices, and Organic Matrices. 1996.
- Yoon J, Cao X, Zhou Q, Ma L. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci. Total Environ.* 2006; 368:456–464.

ภาคผนวก
การเผยแพร่ผลงานวิจัย

บทความวิจัยที่ตีพิมพ์/ตอบรับให้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 4 เรื่อง

- 1) Sangthong C, Duangboobpha S and **Prapagdee B***. Cadmium removal from water and soil by a cadmium-resistant rhizobacterium and its effect on plant root elongation. *EnvironmentAsia*. **2015**; 8(1): 94-100. (Q3; Scopus)
- 2) **Prapagdee B*** and Khonsue N. Bacterial-assisted cadmium phytoremediation by *Ocimum gratissimum* L. in polluted agricultural soil: A field trial experiment. *International Journal of Environmental Science and Technology*. **2015**; 12(12): 3843-3852. (Q1; JIF = 2.344)
- 3) Sangthong C, Setkit K and **Prapagdee B***. Improvement of cadmium phytoremediation after soil inoculation with a cadmium resistant *Micrococcus* sp. *Environmental Science and Pollution Research*. **2016**; 23(1): 756-764. (Q1; JIF 2.760)
- 4) **Prapagdee B*** and Wankumpha J. Phytoremediation of cadmium-polluted soil by *Chlorophytum laxum* combined with chitosan-immobilized cadmium-resistant bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*. **2017**. DOI: 10.1007/s11356-017-9591-3 (Q1; JIF 2.760)

บทความวิจัยที่อยู่ในระหว่างการแก้ไข เพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง

- 1) Rojjanateeranaj P, Sangthong C and **Prapagdee B***. Enhanced cadmium phytoremediation of *Glycine max* L. through bioaugmentation of cadmium-resistant bacteria assisted by biostimulation. *Chemosphere*. **2017**. (CHEM43585R1) (Q1; JIF 3.698) (Revised on 12 June 2017)

Cadmium Removal from Water and Soil by a Cadmium-Resistant Rhizobacterium and Its Effect on Plant Root Elongation

Chirawee Sangthong, Siranan Duangboobpha and Benjaphorn Prapagdee

*Laboratory of Environmental Biotechnology, Faculty of Environment and Resource Studies,
Mahidol University, Nakhonpathom 73170, Thailand*

Abstract

A cadmium resistant rhizobacterium, *Pseudomonas* sp. PM2, was isolated from plant roots. It is highly resistant to cadmium toxicity. The minimum inhibitory concentrations of cadmium for *Pseudomonas* sp. PM2 is 2100 mg/L. *Pseudomonas* sp. PM2 produced high levels of siderophore and rhamnolipid biosurfactant in 74.88 μ M of deferroxamine mesylate equivalents and 329.54 mg/L, respectively. It was able to remove cadmium ion in an aqueous solution by 69.84% at the initial cadmium ion concentration of 25 mg/L. *Pseudomonas* sp. PM2 significantly increased cadmium bioavailability in contaminated soil by increasing DTPA-extractable cadmium concentration or a bioavailable form of cadmium. The increase in cadmium bioavailability in soil helps to promote cadmium uptake by plants for cadmium phytoextraction. In addition, *Pseudomonas* sp. PM2 had no positive or negative effects on seed germination and root elongation of *Glycine max* L. under the absence and presence of cadmium. Our findings suggest that *Pseudomonas* sp. PM2 could be useful in the further development of biological treatment of cadmium in contaminated water and soil.

Keywords: cadmium; siderophore; biosurfactant; *Pseudomonas* sp.; *Glycine max* L.

1. Introduction

Cadmium (Cd) contamination in water and soil is one of an important environmental problem because it is not biodegradable and persists indefinitely in the environment. It causes adverse effects on human health and other living organisms by disintegrating cell organelles and disrupting the membranes and the physiological process (Khan *et al.*, 2009). Several treatments have been applied to clean-up water and soil that are contaminated by cadmium. Biological treatment is the use of plants and microorganisms to remove cadmium, which is considered as the best-environmental friendly method for treatment of cadmium in contaminated water and soil. Phytoextraction is the use of living green plants to uptake and accumulate heavy metals from the soil or water into the roots and shoots of the plants (Kumar *et al.*, 1995). However, cadmium phytoextraction has some limitations, in particular a low cadmium bioavailability in soil and a slow plant growth rate due to cadmium toxicity (Glick, 2010).

Rhizobacteria are root-colonizing bacteria which inhabit many plants. Rhizobacteria have facilitated plant growth and development via direct and indirect mechanisms which are called plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) (Glick, 2010). They can promote plant growth in several ways e.g., fix nitrogen,

solubilization of mineral phosphate and other nutrients, and production of siderophores, plant growth hormones and antimicrobial metabolites (Bloemberg and Lugtenberg, 2001). In particular, siderophores, iron-chelating agent, are secreted by microorganisms under iron-starved conditions and solubilize iron for increasing iron uptake for plant growth (Burd *et al.*, 2000). They not only bind to iron, but they also bind to other divalent heavy metals e.g. zinc, copper, lead and cadmium and result in increasing metal solubilization or bioavailability in soil, thus enhancing heavy metal uptake by plants (Nair *et al.*, 2007; Braud *et al.*, 2009; Rajkumar *et al.*, 2010). Apart from siderophores, biosurfactant can bind to metals and increase metal solubilization (Thavasi *et al.*, 2008). Removal of zinc and cadmium from soil by immobilized biosurfactant-producing bacteria has been reported by Sarin and Sarin (2010).

Pseudomonas sp. PM2, a cadmium-resistant rhizobacterium, was isolated from the root of *Brussus flabellifer* Linn. by Duangboobpha *et al.* (2013). It can grow well in the culture medium containing cadmium. This research focuses on the production of siderophores and biosurfactant by *Pseudomonas* sp. PM2 and the correlation between the cell growth and siderophores and biosurfactant production. Other plant growth-promoting properties, including phosphorous solubilization and indole-3-acetic acid (IAA) production were

also assessed. The abilities of this strain on removal of cadmium from aqueous solution and increasing cadmium bioavailability in contaminated soil were evaluated. In addition, the effects of *Pseudomonas* sp. PM2 on the seed germination and root elongation of *Glycine max* L. under cadmium toxic conditions were also investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Cultivation of a cadmium-resistant rhizobacterium and its minimum inhibitory concentration of cadmium

Pseudomonas sp. PM2 was cultured in Luria-Bertani (LB) agar (Criterion, USA) amended with 3 mM of cadmium nitrate. The long-term preservation of this strain was performed in LB broth supplemented with glycerol at -70°C (Watcharamusik *et al.*, 2008). The minimum inhibitory concentration (MIC) of cadmium was determined according to the method of Raja *et al.* (2006) with some modification.

2.2. Quantitative determination of the levels of siderophores and biosurfactant production at different growth phases

The levels of siderophores produced from *Pseudomonas* sp. PM2 which was cultivated in M9 minimal medium (Difco, USA) were determined in the form of deferrioxamine mesylate (DFAM), one of the hydroxamate siderophores (Amico *et al.*, 2008) according to the method of Schwyn and Neilands (1986). To determine the levels of biosurfactant production in form of rhamnolipid, *Pseudomonas* sp. PM2 was cultured in modified minimal medium (Pacheco *et al.*, 2010) at 28°C with conditional shaking. The level of rhamnolipid biosurfactant was determined by orcinol assay (Chandrasekaran and Bemiller, 1980). In addition, bacterial growth was monitored by measuring cell density or optical density (OD) using spectrophotometer at wavelength 600 nm (OD₆₀₀).

2.3. Biosorption of cadmium ion from aqueous solution by a cadmium-resistant rhizobacterium

The cadmium biosorption experiment was carried out by the method as described previously by Prapagdee *et al.* (2013). Briefly, *Pseudomonas* sp. PM2 was inoculated in LB broth and shook overnight. Bacterial cells were harvested by centrifugation and washed twice with a sterile 50 mM phosphate buffer. Cell pellets were re-suspended in different concentrations of cadmium ion, including 25, 50 and

75 mg/L, and shaken for 10 h at room temperature. Bacterial cells were separated from cadmium solution by centrifugation at 10,000 rpm for 20 min. The supernatant was digested by nitric acid using open tube digestion method. Cadmium concentration was analysed by Flame Atomic Absorption Spectrophotometer (FAAS) (Varian spectra model AA240FS, USA) and the percentage of cadmium removal efficiency was calculated.

2.4. Effects of a cadmium-resistant rhizobacterium on the increasing of cadmium bioavailability in contaminated soil

Cadmium-contaminated soil was collected from an agricultural area at Mae Sot district, Tak province, northern Thailand. Soil was digested by hot plate method of 3050B US.EPA (1996). The digested sample was filtrated through Whatman filter paper No. 41 before analysis of total cadmium concentration using FAAS. The bioavailable or extractable form of cadmium in soil was extracted by diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA)-triethanolamine (TEA) solution (Faust and Christians, 2000) and analysed by FAAS. The method for testing cadmium solubilization in contaminated soil was previously described by Kijawatworawet *et al.* (2014).

2.5. Study of plant growth-promoting properties in a cadmium-resistant rhizobacterium

The ability on phosphorous solubilization in *Pseudomonas* sp. PM2 was assayed using the method of Picovskaya's (1948). Briefly, overnight cells of *Pseudomonas* sp. PM2 were dropped on Picovskaya's agar plate and incubated at 28°C for 7 days. The diameter of the halo zone which appeared on Picovskaya's agar was measured. The levels of indole-3-acetic acid (IAA) produced from *Pseudomonas* sp. PM2 at different growth phased were analyzed according to the method of Bric *et al.* (1991) with some modification. Briefly, a 1 mL of cell-free supernatant was mixed vigorously with 2 mL of Salkowski's reagent and allowed to stand for 20 min before measuring the absorbance at a wavelength of 530 nm. The levels of IAA were determined using a standard calibration curve generated from analytical grade IAA (Sigma, USA).

2.6. Plant root elongation assay on filter paper culture

Preparation of bacterial cells and an *in vivo* root elongation assay were conducted according to the methods of Prapagdee *et al.* (2013). The seeds of *G. max* L. were surface sterilized with a mixture of an

equal volume of absolute ethanol and 30% hydrogen peroxide and washed twice with sterile distilled water. Various concentrations of cadmium ion, including 0, 25, 50 and 75 mg/L, were applied to sterile filter paper in a Petri dish. *G. max* L. seedlings were soaked with *Pseudomonas* sp. PM2 and aseptically placed on a sterile filter paper containing different concentrations of cadmium ion. *G. max* L. seedlings which were soaked in a sterile 50 mM phosphate buffer were carried out as a control experiment. Petri dishes were incubated at room temperature in dark condition for 10 days. The seed germination, root length and root fresh weight of these seedlings were observed and measured.

3. Results and Discussion

3.1. Growth and a MIC of cadmium

Pseudomonas sp. PM2 grew well on LB agar amended with 3 mM cadmium nitrate. The number of viable cells in LB broth supplemented with 3 mM cadmium nitrate was 2.0×10^8 CFU/mL. The MIC value of cadmium for *Pseudomonas* sp. PM2 was 2100 mg/L. MIC represents the resistant ability of bacteria to a specific substance that causes inhibition of bacterial growth. Kijawatworawet *et al.*, (2014) reported that MIC value of cadmium for *Pseudomonas* sp. TS32, a siderophores-producing bacterium, was 400 mg/L. *Pseudomonas aeruginosa* BS15 resisted to 500 mg/L of cadmium and it had resistant ability against other heavy metals e.g. chromium, lead, nickel (Raja *et al.*,

2006). It indicates that *Pseudomonas* sp. PM2 has a high tolerance to cadmium toxicity.

3.2. Levels of siderophore and biosurfactant produced from a cadmium-resistant rhizobacterium

The yield of siderophores in *Pseudomonas* sp. PM2 was slightly low in the beginning of a growth period (the lag phase) and sharply increased with an exponential phase of growth. The high levels of siderophores produced from *Pseudomonas* sp. PM2 were observed when cells entered the stationary phase of growth (24 h) and siderophore production stabilized throughout the incubation period (69.02-74.88 μ M) (Fig. 1). The results found that the highest level of siderophores produced from *Pseudomonas* sp. PM2 was observed at the stationary phase of growth. Similar to the study of Kijawatworawet *et al.* (2014), the highest level of siderophores produced by *Pseudomonas* sp. TS32 (59.19 μ M) was observed at the stationary phase. *Pseudomonas azotoformans* produced the highest siderophores after 48 h of incubation (Nair *et al.*, 2007). The pH and the presence of iron and other heavy metals have an influence on siderophore production (Rajkumar *et al.*, 2010). Siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* strain KUCd1, a cadmium-resistant bacterium was induced by cadmium (Sinha and Mukherjee, 2008).

Pseudomonas sp. PM2 produced the highest level of rhamnolipid biosurfactant by 329.54 mg/L at 96 h of incubation period in modified minimal medium (Fig. 2).

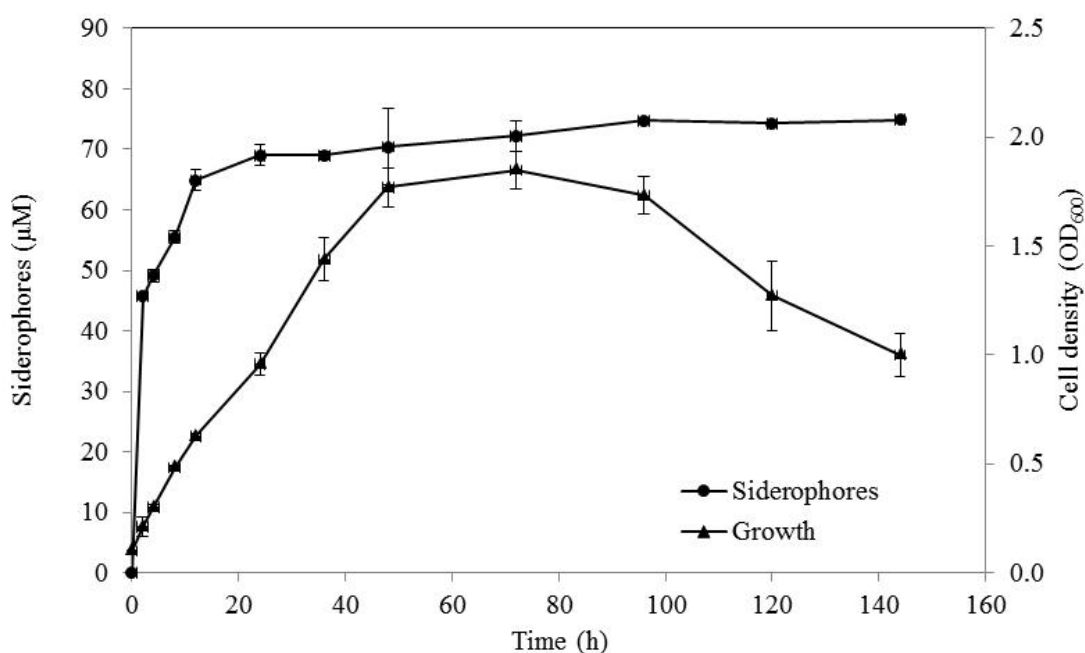


Figure 1. Time-course experiments of siderophores production and growth of *Pseudomonas* sp. PM2 cultured in a M9 minimal medium

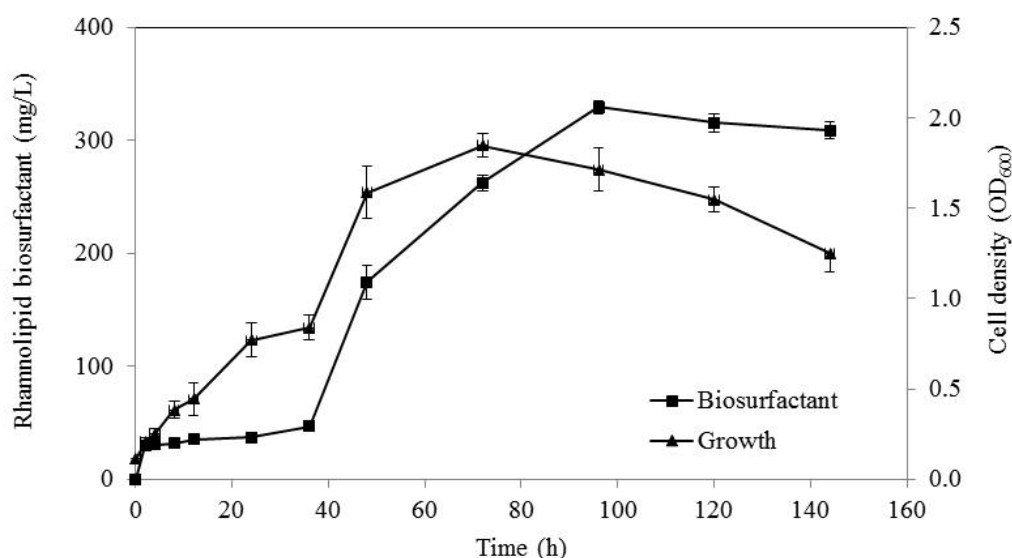


Figure 2. Time-course experiments of rhamnolipid biosurfactant production and growth of *Pseudomonas* sp. PM2 cultured in a modified minimal medium

The yields of rhamnolipid biosurfactant production sharply increased after 36 h of growth period (the exponential phase). Rhamnolipid biosurfactant which produced mainly by *P. aeruginosa* and *Burkholderia* spp. consists of one or two rhamnoses linked to one or two chains of β -hydroxy fatty acid (Perfumo *et al.*, 2006). Rosa *et al.* (2010) reported that *P. aeruginosa* LBM10 produced rhamnolipid biosurfactant by 4500 mg/L. Modified minimal medium contains glycerol, a simple fatty acid precursor, which served as a carbon source for bacterial growth (Silva *et al.*, 2010). The suitable sources of carbon for rhamnolipid production in *P. aeruginosa* are glycerol, glucose, n-alkanes and triglycerides (Lang and Wullbrandt, 1999).

3.3. Ability of a cadmium-resistant rhizobacterium on cadmium removal in aqueous solution

The percentages of cadmium removal in aqueous solution by *Pseudomonas* sp. PM2 at cadmium ion concentrations of 25, 75 and 100 mg/L were 69.84, 47.86 and 41.68%, respectively. It indicates that *Pseudomonas* sp. PM2 acts as cadmium biosorbent to remove the cadmium ion from an aqueous solution. Heavy metals can bind to bacterial cell walls and extracellular polymeric substances and precipitated in aqueous solution (Ahalya *et al.*, 2003). The percentages of arsenic removal using *P. azotoformans*, a siderophore-producing bacterium, diaminetetra acetic acid (EDTA) and citric acid were 92.8, 77.3 and 70.0%, respectively (Nair *et al.*, 2007). In addition, Huang and Liu (2013) reported that *Pseudomonas* sp. LKS06, a biosurfactant-producing bacterium was able to remove cadmium and lead ions from aqueous solution. Our

findings indicate that the efficiency of cadmium ion removal in aqueous solution by *Pseudomonas* sp. PM2 involved the actions of siderophore and biosurfactant.

3.4. Increasing of cadmium bioavailability in contaminated soil by a cadmium-resistant rhizobacterium

Pseudomonas sp. PM2 was added in a sterilized cadmium contaminated soil at the initial soil cadmium concentration of 46.37 mg/kg for 7 days compared to the uninoculated control. The results of concentrations of soil cadmium, water soluble cadmium and DTPA-extractable cadmium are presented in Table 1. Concentrations of soil cadmium and water-soluble cadmium in soil with *Pseudomonas* sp. PM2 inoculation and the uninoculated control were not significant difference ($p < 0.05$). Interestingly, concentration of DTPA-extractable cadmium in soil with *Pseudomonas* sp. PM2 inoculation was higher than that of the uninoculated control soil. DTPA-extractable fraction is suitable for assessing the bioavailability of cadmium in soil (Prokop *et al.*, 2003). DTPA, a chelating agent, has the potential to increase the bioavailability of unavailable heavy metal fractions (Karami and Shamsuddin, 2010). Our result indicates that *Pseudomonas* sp. PM2 was able to increase cadmium bioavailability in contaminated soil. The bioavailable form of cadmium is easily uptaken by plants (Sheng and Xia, 2006). Several investigations have reported the application of siderophore or biosurfactant-producing bacteria for improving heavy metal bioavailability and heavy metal phytoextraction in contaminated soil (Braud *et al.*, 2009; Rajkumar *et al.*, 2010; Sarin and Sarin, 2010; Rufino *et al.*, 2012).

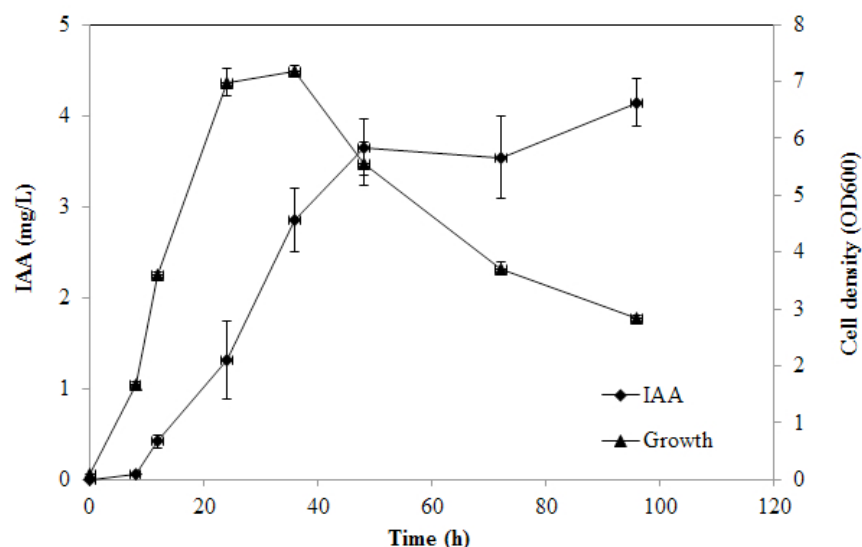


Figure 3. Time-course experiments of IAA production and growth of *Pseudomonas* sp. PM2 cultured in LB broth

3.5. Other plant growth promoting properties of by a cadmium-resistant rhizobacterium and its effects on seed germination and root elongation of *G. max* L. under cadmium toxic condition

Pseudomonas sp. PM2 was not able to solubilize phosphate and produced very low levels of IAA (Fig. 3). The ability of rhizobacteria on phosphate solubilization and IAA production are important properties of plant-growth promoting rhizobacteria. It suggests that *Pseudomonas* sp. PM2 did not have these plant-growth promoting properties. In order to apply *Pseudomonas* sp. PM2 for cadmium phytoextraction, the effects of this cadmium-resistant rhizobacterium on seed germination and plant root elongation were assessed. The results found that *Pseudomonas* sp. PM2 had no effect on seed germination of *G. max* L. compared to the uninoculated control. The root length and root fresh weight of *G. max* L. seedlings decreased with increasing cadmium concentrations. Root length and root fresh weight of *G. max* L. seedlings at toxic concentrations of cadmium were not significantly increased by *Pseudomonas* sp. PM2 (Fig. 4). It was due to the fact that, *Pseudomonas* sp. PM2 did not produce high amounts of IAA. IAA promotes root elongation and cell division in plants that enhances nutrient uptake.

It has been reported that IAA-producing rhizobacteria promoted root elongation in *Helianthus annuus* L. seedlings under cadmium toxic conditions (Prapagdee et al., 2013). Neither positive nor negative effects on root elongation of *G. max* L. seedlings by *Pseudomonas* sp. PM2 were observed under the absence or presence of cadmium. Our findings suggest that *Pseudomonas* sp. PM2 can be safely used for improving cadmium bioavailability in contaminated soil for cadmium phytoextraction.

4. Conclusion

Pseudomonas sp. PM2, a cadmium-resistant rhizobacteria, produced siderophore and rhamnolipid biosurfactant. It was able to remove cadmium ion in aqueous solution. In addition, this strain effectively increased cadmium bioavailability in cadmium contaminated soil resulting in increasing cadmium uptake by plants. *Pseudomonas* sp. PM2 neither inhibited nor promoted the seed germination and root elongation of *G. max* L. under the absence and presence of cadmium. Our findings clearly demonstrate that *Pseudomonas* sp. PM2 could be useful for further development of biological treatment of cadmium in polluted water and soil.

Table 1. Cadmium concentrations in contaminated soil

Treatment	Cadmium concentration (mg/kg)		
	Soil cadmium	Water-soluble cadmium	DTPA-extractable cadmium
No bacteria added (Control)	42.43 ± 1.97 ^a	0.77 ± 0.06 ^a	26.13 ± 0.45 ^a
<i>Pseudomonas</i> sp. TS32	40.37 ± 2.13 ^a	0.75 ± 0.00 ^a	28.73 ± 0.15 ^b

Means and the S.E. (n = 5) followed by the different letter within columns were significantly different ($p < 0.05$) according to Duncan's multiple range test.

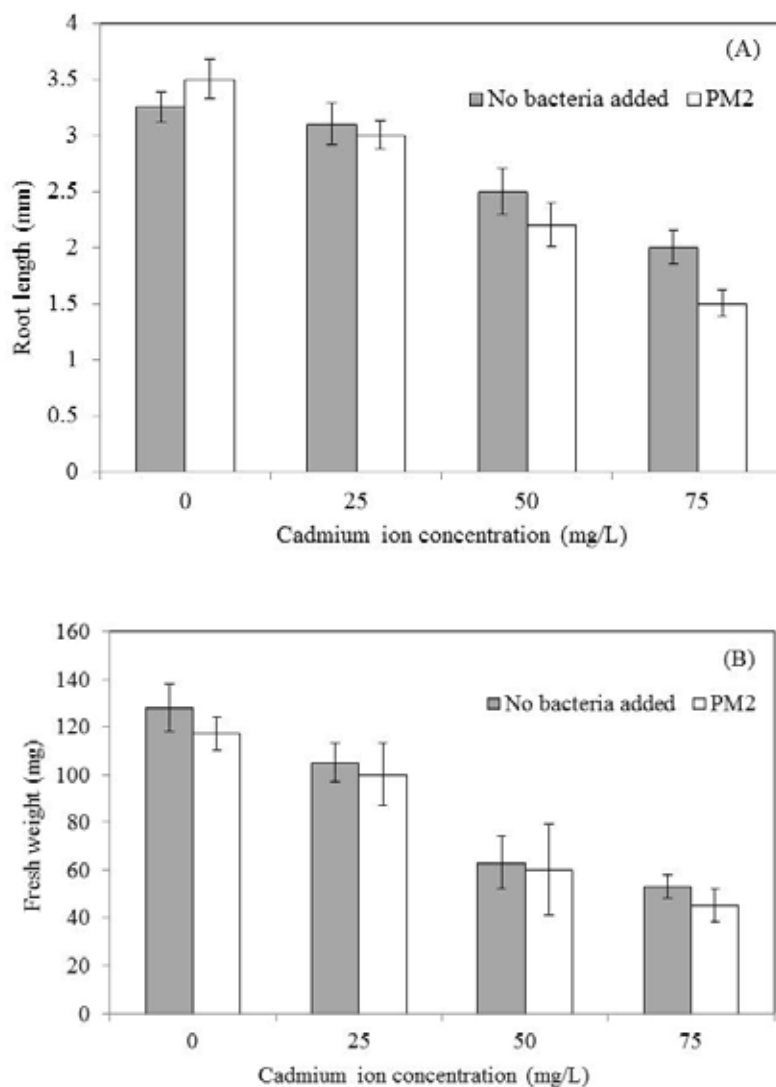


Figure 4. Effects of *Pseudomonas* sp. PM2 on the (A) root length and (B) fresh weight of *G. max* L. seedlings under cadmium toxic condition after incubation for 10 days. Means and the S.E. ($n = 10$) were not significantly different ($p < 0.05$) according to the analysis of variance.

Acknowledgements

This research was supported by the grant from Thailand Research Fund (Grant no. RSA5780026). The authors thank K. Kijawatworawet for her technical assistance.

References

- Ahalya N, Ramachandra TV, Kanamadi RD. Biosorption of heavy metals. *Research Journal of Chemistry and Environment* 2003; 7(4): 71-78.
- Amico ED, Cavalca L, Andreoni V. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 2008; 40(1): 74-78.
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 2001; 4(4): 343-50.
- Braud A, Jézéquel K, Bazot S, Lebeau T. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* 2009; 74(2): 280-86.
- Bric JM, Bostock RM, Silversone SE. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; 57(2): 535-38.
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology* 2000; 46(3): 237-45.
- Chandrasekaran EV, Bemiller JN. Constituent analyses of glycosaminoglycans. (Ed: Whistler RL). *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press: New York, 1980; 89-96.
- Duangboobpha S, Prapagdee B, Kumsopa A, Wongthanate J. Isolation and screening of cadmium resistant rhizobacteria and their ability on siderophore and biosurfactant production. *Proceedings in the 39th Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok: Thailand. 2013; 1035-40.

- Faust MB, Christians NE. Copper reduces shoot growth and root development of creeping bentgrass. *Crop Science* 2000; 40: 495-502.
- Glick BR. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances* 2010; 28(3): 367-74.
- Huang W, Liu Z. Biosorption of Cd(II)/Pb(II) from aqueous solution by biosurfactant-producing bacteria: Isotherm kinetic characteristic and mechanism studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013; 105: 113-19.
- Karami A, Shamsuddin ZH. Phytoremediation of heavy metals with several efficiency enhancer methods. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9(25): 3689-98.
- Kijawatworawet K, Wongthanate J, Prapagdee B. Role of cadmium-resistant siderophore-producing rhizobacteria in increasing cadmium bioavailability in contaminated soils. *International Journal of Integrative Biology* 2014; 15(1): 1-6.
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environmental Chemistry Letters* 2009; 7(1): 1-19.
- Kumar PBAN, Dushenkov V, Motto H, Raskin I. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 1995; 29(5): 1232-38.
- Lang S, Wullbrandt D. Rhamnolipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999; 51(1): 22-32.
- Nair A, Juwarkar AA, Singh SK. Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 2007; 180(1-4): 199-211.
- Pacheco GJ, Ciapina EMP, Gomes EB, Junior NP. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and its application to oil removal. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; 41(3): 685-93.
- Perfumo A, Banat IM, Canganella F, Marchant R. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006; 72(1): 132-38.
- Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorous in soil in the connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 1948; 17: 362-70.
- Prapagdee B, Chanprasert M, Mongkolsuk S. Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus*. *Chemosphere* 2013; 92(6): 659-66.
- Prokop Z, Cupr P, Zlevorova-Zlamalikova V, Komarek J, Dusek L, Holoubek I. Mobility, bioavailability, and toxic effects of cadmium in soil samples. *Environmental Research* 2003; 91(2): 119-26.
- Raja CH, Anbazhagan K, Selvam GS. Isolation and characterization of a metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2006; 22(6): 577-85.
- Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology* 2010; 28(3): 142-49.
- Rosa CFC, Micheron M, Burkert JFM, Kalil SJ, Burkert CAV. Production of rhamnolipid-type biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 grown on glycerol. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9(53): 9012-17.
- Rufino RD, Luna JM, Campos-Takaki GM, Ferreira SRM, Sarubbo LA. Application of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* in the remediation of heavy metals. *Chemical Engineering Transactions* 2012; 27: 61-66.
- Sarin C, Sarin S. Removal of cadmium and zinc from soil using immobilized cell of biosurfactant producing bacteria. *EnvironmentAsia* 2010; 3(2): 49-53.
- Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 1987; 160(1): 47-56.
- Sheng XF, Xia JJ. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere* 2006; 64(4): 1036-42.
- Silva SNRL, Faria CBB, Rufino RD, Luna JM, Sarubbo LA. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010; 79(1): 174-83.
- Sinha S, Mukherjee SK. Cadmium-induced siderophore production by a high Cd-resistant bacterial strain relieved Cd toxicity in plants through root colonization. *Current Microbiology* 2008; 56(1): 55-60.
- Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, Ibrahim MB. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008; 24(7): 917-25.
- Watcharamusik A, Prapagdee B, Thavipoke P, Boontanon N. The role of exopolymers in protection of *Ralstonia* sp., a cadmium-resistant bacterium, from cadmium toxicity. *EnvironmentAsia* 2008; 1(2): 37-42.

Received 5 August 2014

Accepted 25 October 2014

Correspondence to

Associate Professor Dr. Benjaphorn Prapagdee
Faculty of Environment and Resource Studies,
Mahidol University,
Nakhonpathom 73170,
Thailand
Tel: 662 441 5000 ext. 1319
Fax: 662 441 9509-10
Email: benjaphorn.pra@mahidol.ac.th

Bacterial-assisted cadmium phytoremediation by *Ocimum gratissimum* L. in polluted agricultural soil: a field trial experiment

B. Prapagdee¹ · N. Khonsue¹

Received: 4 April 2014/Revised: 7 January 2015/Accepted: 19 April 2015/Published online: 30 April 2015
© Islamic Azad University (IAU) 2015

Abstract A field study of cadmium phytoremediation by *Ocimum gratissimum* L. and the potential enhancement by two cadmium-resistant bacteria, *Ralstonia* sp. TISTR 2219 and *Arthrobacter* sp. TISTR 2220, were explored in a cadmium-polluted agricultural area. The results demonstrated the ability of one of the bacterial strains to promote cadmium accumulation in *O. gratissimum* L. planted in soil with cadmium concentrations till 65.2 mg kg^{-1} . After transplantation in contaminated soil for 2 months, soil inoculation with *Arthrobacter* sp. enhanced cadmium accumulation in the roots, above-ground tissues, and whole plant of *O. gratissimum* L. by 1.2-fold, 1.4-fold, and 1.1-fold, respectively, compared with the untreated control. The presence of *Arthrobacter* sp. in soil facilitated cadmium phytoremediation in *O. gratissimum* L. similar to that of an EDTA application. Seeds of *O. gratissimum* L. grown in polluted soil contained undetectable to negligible concentrations of cadmium. Significant increases in the bioconcentration and translocation factors of *O. gratissimum* L. were observed in *Arthrobacter* sp.-inoculated plants at only 2 months post-transplant compared with the uninoculated control. The highest percentage of cadmium removal was found in soil used to cultivate EDTA-treated *O. gratissimum* L., followed by an *Arthrobacter* sp.-inoculated plant. Our findings suggest that the synergistic use of *Arthrobacter* sp. with *O. gratissimum* L., an essential oil-producing crop, could be a feasible economic and

environmental option for the reclamation of cadmium-polluted areas.

Keywords Cadmium-contaminated soil · Phytoremediation · African basil · *Arthrobacter* · *Ralstonia*

Introduction

Cadmium is a non-essential metal with the potential to be highly toxic to living organisms. Important sources of cadmium contamination in the environment are zinc mines and smelting plants. Agricultural soil surrounding zinc mining areas in the northern part of Thailand has a high cadmium concentration (Phaenark et al. 2009). Several edible crops in cadmium-contaminated soil can easily take up and accumulate cadmium, thus passing the contamination to consumers via the food chain (Moreno et al. 2002). Excessive intake of cadmium-contaminated food causes Itai-itai disease (Makino et al. 2007). More than 10 % of the villagers who live in this area had higher cadmium concentrations in their blood and urine than what is considered safe (Department of Environmental Quality Promotion 2011). According to the standard of the World Health Organization (WHO), cadmium concentrations in blood and urine that are considered safe levels are no more than $5 \mu\text{g L}^{-1}$ and $5 \mu\text{g g}^{-1}$ of creatinine, respectively. The cleanup methods have been urgently developed for the reclamation of this cadmium-polluted agricultural site. Phytoremediation is an alternative green technique that uses plants to remove heavy metals from the environment or to render them harmless by an uptake of contaminants from the root to other parts of the plants (Kumar et al. 1995). In comparison with other remediation technologies, phytoremediation is considered an efficient, low-cost, eco-

✉ B. Prapagdee
benjaphorn.pra@mahidol.ac.th

¹ Laboratory of Environmental Biotechnology, Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom 73170, Thailand

friendly, solar-driven, and socially acceptable technology (Weis and Weis 2004; Ali et al. 2013).

Ocimum gratissimum L., or African basil, is an essential oil-producing or aromatic crop. Essential oil is used as an aromatic agent in several non-food industries as a high-value product (Zheljazkov et al. 2008a). Some aromatic crops can accumulate cadmium, copper, and lead, but these heavy metals do not pass from plant tissues to the extracted essential oils (Zheljazkov et al. 2006). Thus, this plant could be grown safely as a cash crop in cadmium-polluted soil without cadmium contamination in its essential oil. However, there is an important limitation in solely relying on plants for the phytoextraction of metal-contaminated soils, as the degree to which plants are able to take up cadmium also depends on the bioavailability of cadmium in the soil (Benavides et al. 2005). To solve this problem, soil bioaugmentation with bacteria that assists heavy metal phytoremediation is a promising method for cleaning up contaminated soil (Lebeau et al. 2008). Some bacteria are able to increase metal mobility and bioavailability to plants by producing exopolymers (Prapagdee et al. 2012). Exopolymers bind to heavy metals and increase heavy metal mobility in contaminated soil (Jensen-Spaulding et al. 2004). An increase in metal solubility or mobility in the soil leads to better metal uptake by the plant and enhances phytoremediation in contaminated soil.

Current research is lacking in field experimental evidence on the effectiveness of bacterial-assisted cadmium phytoremediation. Our previous research reports that two strains of cadmium-resistant bacteria, *Ralstonia* sp. TISTR 2219 (formerly strain TAK1) and *Arthrobacter* sp. TISTR 2220 (formerly strain TM6), increase the water solubility of cadmium in the soil (Prapagdee et al. 2012). In addition, *Arthrobacter* sp. TISTR 2220 was able to increase cadmium uptake and accumulation in *O. gratissimum* L. in controlled pot experiments (Khonsue et al. 2013). Hence, this is the first experimental study to document the feasibility of using cadmium-resistant bacteria to assist cadmium phytoremediation by aromatic *O. gratissimum* L. crops in a real-world cadmium-polluted agricultural area. This research was performed at a cadmium-contaminated area located in Mae Sot district, Tak Province, northern Thailand, between February 2013 and January 2014.

Materials and methods

Bacterial strains and inocula preparation

Ralstonia sp. TISTR 2219 and *Arthrobacter* sp. TISTR 2220, cadmium-resistant bacteria, were isolated from cadmium-contaminated soil as described by Prapagdee and Watcharamusik (2009) and Prapagdee et al. (2012). These

bacteria were cultivated in Luria–Bertani (LB) broth (Criterion, USA) at 30 °C with 150 rpm shaking. Bacterial inocula were prepared according to the methods described by Prapagdee et al. (2013). The cell turbidity of the prepared bacterial cells was adjusted to an optical density of 0.2 at 600 nm (OD₆₀₀), and the viable cell numbers of each bacterial strain were approximately 2×10^{10} CFU mL⁻¹.

Cultivar of *O. gratissimum* L.

Ocimum gratissimum L. seedlings were grown in 25 cm diameter of plastic pots containing garden soil for 3 months under greenhouse conditions. The stem height of 3-month-old *O. gratissimum* L. plants was approximately 20 cm. The plants were transplanted into cadmium-contaminated soil at the study site.

Description of the experimental study site

This study site is located near zinc mines and smelting plants in Mae Sot district, Tak Province, northern Thailand (N 16° 40.593, E 098° 37.630) (Fig. 1). The main use of the land at this site is to grow edible crops such as rice, maize, mung bean, and soybean. Cadmium contamination in this area has been detected in soil and crops since 2000. Polluted agricultural soil containing cadmium at a concentration of 65.2 ± 2.2 mg kg⁻¹ was selected for this study. The concentration of cadmium bioavailability (DTPA-extractable concentration) was 26.13 ± 0.45 mg kg⁻¹. The physical and chemical characteristics of soil at this site were as follows: loamy soil texture, pH (1:1 w/v H₂O) 7.2, electrical conductivity (1:5) of 0.20 mS cm⁻¹, cation exchange capacity of 13.8 cmol kg⁻¹, 3.8 % organic matter, 0.19 % total nitrogen, 10.7 mg kg⁻¹ available phosphorous, 80 mg kg⁻¹ extractable potassium, 363 mg kg⁻¹ extractable sodium, 5155 mg kg⁻¹ extractable calcium, and 555 mg kg⁻¹ extractable magnesium (Prapagdee et al. 2013). The bulk density of this agricultural soil was 1.7 g cm⁻³. The number of indigenous, viable soil bacteria in the contaminated soil was determined by spreading onto LB agar supplemented with 3 mM cadmium nitrate (Cd(NO₃)₂), and the number of indigenous viable soil bacteria was 1.4×10^3 CFU g⁻¹ ($3.2 \log_{10}$ CFU g⁻¹).

Field trial experiments

Preparation of plots for plant cultivation and experimental design

The experimental plot was 30 m² with a width of 5 m and a length of 6 m. The soil was ridged at a width of 50 cm, a length of 6 m, and a height of 15 cm for four rows. Each

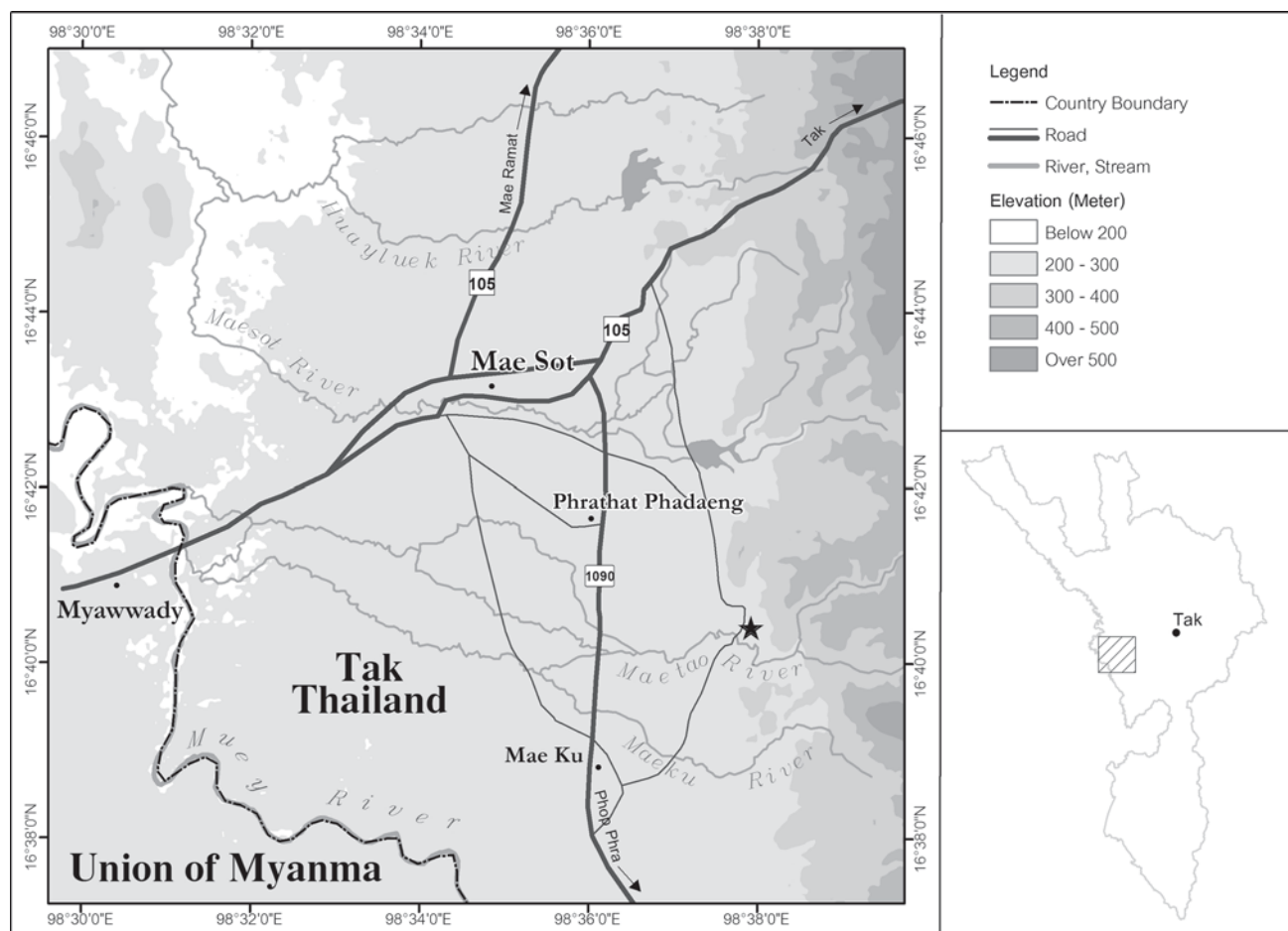


Fig. 1 Location map of cadmium-polluted site (star symbol) at Mae Sot District, Tak Province, northern Thailand

row was divided into two sub-rows and set for one treatment. There were a total of four treatments with eight sub-rows. Eight of 3-month-old *O. gratissimum* plants were transplanted into each sub-row with a 35-cm interval between each plant. The first row was a control treatment with no bacterial inoculation. The second and third rows were inoculated with *Ralstonia* sp. TISTR 2219 and *Arthrobacter* sp. TISTR 2220, respectively. The size of the bacterial inoculum applied to the soil of each treatment was 1 % (v/w). A suspension of each bacterial inoculum was directly sprayed in the soil at the area of the plant root zone and mixed thoroughly before plantation. A synthetic chelating agent, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), was added to the fourth row at a concentration of 30 mg kg⁻¹ as a positive chemical control. The total volume of bacterial inocula and EDTA added to the soil was calculated based on the bulk density of soil at 20 cm depth based on the plant root. Plants were watered daily and sprayed with insecticide weekly for 6 months. The water pH for irrigation was 7.85. Cadmium concentration in water used in this experiment was below 0.01 mg L⁻¹, the

detection limit of a flame atomic adsorption spectrophotometer (FAAS; Varian spectra model AA240FS, USA).

Plant and soil analysis

At least three plant samples were randomly selected from each sub-row at 2 and 6 months after transplantation. Rhizosphere soil was aseptically collected, and the number of viable rhizobacteria was determined by spreading on LB agar containing 3 mM Cd(NO₃)₂. Harvested plants were thoroughly washed with tap water and rinsed twice with deionized water. The plants were divided into root and shoot parts and oven-dried at 80 °C before being weighed. Plant growth was evaluated by measuring the stem height, root length, and dry weight. Cadmium concentration in each part of the dried plants was acidic digested in 2:1 of HNO₃ and HClO₄ by volume with the microwave digestion method (Milestone model Ethos One, Italy) according to the methods of US EPA method 3052 and Simmons et al. (2003). Cadmium concentrations in digested samples of soil and plants were analyzed by a FAAS. Soil samples



were also collected at 2 and 6 months. Each soil sample was digested in a mixture of concentrated HNO_3 and concentrated HCl (1:3 by volume) with the microwave digestion method (McGrath and Cunliffe 1985). Cadmium concentration in acid-digested soil was measured by FAAS.

Data analysis

The ratio of dry weight roots to dry weight shoots was calculated for comparison of plant growth in each treatment (Chiu et al. 2006). The bioconcentration factor (BCF) was determined by calculating the ratio of metal concentration in the plant to that in the soil around the plant roots (Kumar et al. 1995). The translocation factor (TF) was calculated by dividing metal concentration in the above-ground tissues with that in the roots (Mattina et al. 2003). The total cadmium accumulation in plants was calculated by multiplying cadmium concentration in plant tissues with dry weight biomass.

Statistical analysis

Each experiment was performed at least in triplicate. The mean ($\bar{x}$) and standard error (SE) of plant growth and cadmium concentration in plants and soil for all treatment groups were calculated. We report the results based on the one-way analysis of variance followed by the Duncan multiple range test at 95 % confidence intervals.

Results and discussion

Effects of cadmium-resistant bacteria on the growth performance of *O. gratissimum* L. transplanted into cadmium-polluted soil

We conducted this study over a period of 6 months. The results showed that all *O. gratissimum* L. plants grew normally in the heavily cadmium-contaminated soil ($65.2 \pm 2.2 \text{ mg kg}^{-1}$) without suffering from phytotoxicity. There was no sign of growth retardation during plantation in cadmium-contaminated soil. Main visible symptoms of cadmium toxicity such as chlorosis, leaf rolls, and stunting, were not observed in *O. gratissimum* L. The results of the plant growth and biomass measurements are presented in Table 1. The root length, shoot height, and total dry biomass of *O. gratissimum* L. did not significantly increase ($p < 0.05$) after the bacterial or EDTA applications compared with the control group during both the 2- and 6-month periods. Both growth rate and plant yield of *O. gratissimum* L. are high under these experimental conditions. The dry plant biomass at 6 months after transplant

in all treatments increased by 6.5-fold–8.1-fold in comparison with plants at 2 months after transplant.

In addition, the root-to-shoot ratios of plants inoculated with *Ralstonia* sp., *Arthrobacter* sp., and EDTA were not significantly different from the control group. Higher shoot dry weights were observed for all treatments at 6 months after transplant, resulting in a lower root-to-shoot ratio compared with the ratios at 2 months post-transplant. Previous studies have been shown that the root-to-shoot ratio is high in stressful environments and nutrient-deficient conditions, and shoot tissues are more sensitive to heavy metal toxicity than are root tissues (Chiu et al. 2006). In general, cadmium inhibits root and shoot lengths as well as overall plant growth and interferes with nutrient uptake (Belimov et al. 2005; Benavides et al. 2005). However, some plants have evolved mechanisms to control the uptake, accumulation, and detoxification of heavy metals, including the use of phytochelatins and metallothioneins (Benavides et al. 2005). Our findings indicated that *O. gratissimum* L. tolerated cadmium toxicity in soil at a cadmium concentration till 65.2 mg kg^{-1} .

These results revealed that none of the tested bacterial strains directly promoted plant growth. It was due to *Ralstonia* sp. and *Arthrobacter* sp. that produced very low levels of a plant growth hormone, indole-3-acetic acid (IAA) (Khonsue et al. 2013). In contrast, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) can promote plant growth when cultivated in heavy metal-contaminated soil. Copper-resistant *Achromobacter xylosoxidans* Ax10, which produced IAA and solubilized phosphate, can promote an increase in the root length, shoot length, fresh weight, and dry weight of Indian mustard (*Brassica juncea*) (Ma et al. 2009). Cadmium-resistant PGPR promoted the growth of rape (*Brassica napus*) (Sheng and Xia 2006; Dell' Amico et al. 2008) and sunflower (*Helianthus annuus*) (Prapagdee et al. 2013). However, some PGPR facilitated the growth of one plant but failed to promote the growth of others. The heavy metal-resistant strain *Burkholderia* sp. J62 promoted the growth of maize (*Zea mays*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) but was not able to promote the growth of *B. juncea* due to its ability to colonize the root of its host plant (Jiang et al. 2008).

Enhanced cadmium bioaccumulation in *O. gratissimum* L. after soil inoculation with cadmium-resistant bacterium

The ability of these bacteria to enhance cadmium phytoextraction by *O. gratissimum* L. planted in the field investigations is shown in Table 2. *O. gratissimum* L. grown in cadmium-contaminated soil can accumulate cadmium in the roots and above-ground tissues. At 2 months post-

Table 1 Growth performances of *O. gratissimum* L. planted in cadmium-polluted soil for 2 and 6 months

Treatment	Root length (cm)		Stem height (cm)		Dry weight of whole plant (g)		Root:shoot ratio	
	Month 2	Month 6	Month 2	Month 6	Month 2	Month 6	Month 2	Month 6
No bacterial inoculation	21.0 ± 1.6	27.7 ± 0.6	65.7 ± 8.1	157.0 ± 11.2	61.3 ± 5.7	460.3 ± 25.2	0.24 ± 0.03	0.10 ± 0.06
<i>Ralstonia</i> sp.	24.0 ± 1.9	28.3 ± 7.1	71.0 ± 4.6	173.7 ± 14.0	67.6 ± 6.8	441.7 ± 38.4	0.21 ± 0.05	0.10 ± 0.05
<i>Arthrobacter</i> sp.	23.3 ± 1.7	24.7 ± 7.5	66.3 ± 7.5	182.3 ± 14.6	59.5 ± 8.2	485.8 ± 28.0	0.21 ± 0.03	0.09 ± 0.04
EDTA	21.7 ± 2.9	28.3 ± 4.7	62.2 ± 6.4	165.1 ± 12.4	62.3 ± 2.8	476.1 ± 30.5	0.19 ± 0.04	0.08 ± 0.04

The means and the SE ($n = 3$) were not significantly different ($p < 0.05$) according to the one-way analysis of variance

Table 2 Cadmium accumulation in each part of *O. gratissimum* L. planted in cadmium-polluted soil for 2 and 6 months

Treatment	Cadmium content ($\mu\text{g g}^{-1}$ plant dry weight)						Total cadmium accumulation (mg plant tissue $^{-1}$)	
	Root		Above-ground tissue		Whole plant		Month 2	Month 6
	Month 2	Month 6	Month 2	Month 6	Month 2	Month 6		
No bacterial inoculation	8.55 ± 0.43 ^a	12.35 ± 0.63 ^a	4.05 ± 0.28 ^a	2.81 ± 0.48 ^a	5.40 ± 0.24 ^a	4.14 ± 0.21 ^a	0.30 ± 0.02 ^a	1.81 ± 0.32 ^a
<i>Ralstonia</i> sp.	9.40 ± 0.57 ^a	11.85 ± 0.84 ^a	4.28 ± 0.50 ^a	2.99 ± 0.37 ^a	5.39 ± 0.10 ^a	4.50 ± 0.37 ^a	0.31 ± 0.03 ^a	2.08 ± 0.28 ^a
<i>Arthrobacter</i> sp.	10.53 ± 0.25 ^b	11.60 ± 0.42 ^a	5.80 ± 0.34 ^b	3.23 ± 0.34 ^a	6.07 ± 0.34 ^b	4.02 ± 0.39 ^a	0.41 ± 0.04 ^b	2.01 ± 0.19 ^a
EDTA	10.80 ± 0.37 ^b	14.10 ± 0.29 ^b	5.57 ± 0.55 ^b	3.70 ± 0.61 ^a	5.95 ± 0.28 ^b	5.37 ± 0.35 ^b	0.39 ± 0.02 ^b	2.16 ± 0.49 ^a

The means and the SE ($n = 3$) followed by the same lowercase letter within column were not significantly different ($p < 0.05$) according to Duncan's multiple range test

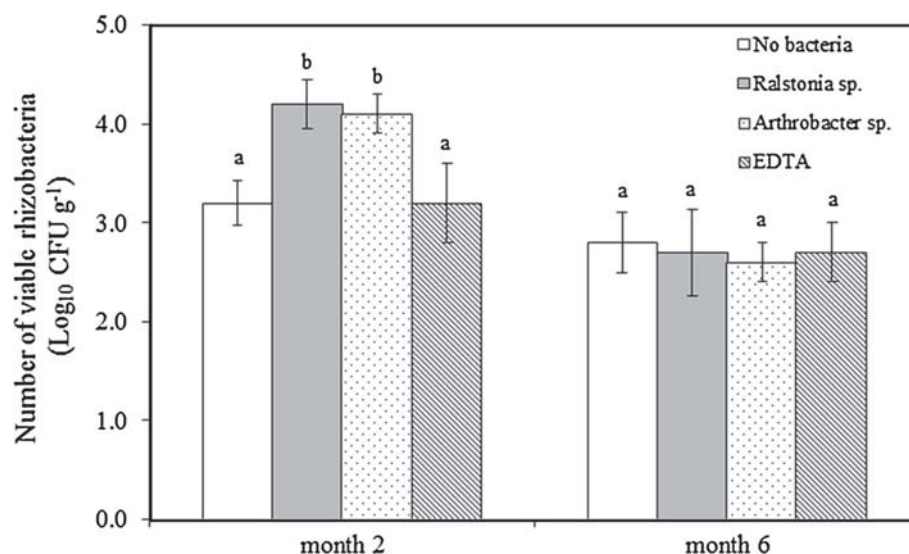
transplant, the presence of *Arthrobacter* sp. in cadmium-contaminated soil significantly enhanced cadmium contents in the roots, above-ground tissues, and whole plant of *O. gratissimum* L. by 1.2-fold, 1.4-fold, and 1.1-fold, respectively, compared with the untreated control (Table 2). The synergistic effect of *Arthrobacter* sp. on promoting cadmium accumulation in *O. gratissimum* L. was similar to that of an EDTA application. However, cadmium accumulation in each plant part and in the whole plant of *O. gratissimum* L. inoculated with *Ralstonia* sp. was not significantly different ($p \geq 0.05$) compared with the uninoculated control.

These results highlighted the fact that soil inoculation with *Arthrobacter* sp. was an effective approach to enhance the cadmium accumulation in *O. gratissimum* L. at 2 months after transplant. Other studies also showed that cadmium-resistant bacteria can enhance cadmium uptake by plants. Specifically, the cadmium-resistant bacteria *Pseudomonas* sp. RJ10 and *Bacillus* sp. RJ16 increased cadmium uptake in cadmium-hyperaccumulating tomatoes (*L. esculentum*) (He et al. 2009). Cadmium-resistant PGPR promoted cadmium accumulation in *H. annuus* (Prapagdee et al. 2013). The co-application of citric acid and metal-resistant microorganisms increased cadmium accumulation by 25–35 % in black nightshade (*Solanum nigrum*), a cadmium hyperaccumulator (Gao et al. 2012).

Unfortunately, there was no increase in the cadmium uptake of *O. gratissimum* following soil inoculation with tested bacteria at 6 months after transplant, except EDTA application (Table 2). Cadmium accumulation in the above-ground tissues at 6 months after transplant was lower than that at 2 months, indicating less cadmium translocation from roots to shoots. There are highly uptake nutrients and other metal ions during the blossom and seed-filling stages. In general, plants uptake metal ions from soil either by passive transport with the mass flow of water into the roots or by active transport whereby the contaminants cross the plasma membrane of root epidermal cells (Kim et al. 2003). Further evidence to this conclusion is that decreasing numbers of viable rhizobacteria were present in the soil over time (Fig. 2). In addition, the survivability of *Ralstonia* sp. and *Arthrobacter* sp. in the sterile cadmium-contaminated soil before applying them in the pot experiment was monitored. The results found that the number of *Ralstonia* sp. in the sterile cadmium-contaminated soil was changed from 6.7×10^7 on the first day to 3.7×10^5 CFU g^{-1} at 10 days after incubation. The number of *Arthrobacter* sp. in the sterile cadmium-contaminated soil from the first day to the tenth day was from 8.7×10^7 to 5.5×10^5 CFU g^{-1} . The highest numbers of viable cells of *Ralstonia* sp. and *Arthrobacter* sp. in the sterile cadmium-contaminated soil were 1.3×10^{10} and



Fig. 2 Number of viable rhizobacteria in the rhizosphere soil of *O. gratissimum* L. in the treatments that were inoculated with *Ralstonia* sp. or *Arthrobacter* sp. and supplemented with EDTA compared with the uninoculated control at 2 and 6 months after transplant in cadmium-polluted soil. The error bars represent the SE ($n = 3$), and the lowercase letter above the bar graph denotes a significant difference ($p < 0.05$) compared with the control treatment



8.3×10^9 CFU g^{-1} at the fourth day of incubation, respectively. These results suggested that periodically repeated soil inoculation with *Arthrobacter* sp. every week is required to prolong the cadmium phytoextraction efficiency. In addition, soil inoculation with immobilized bacterial cells offers enormous advantages in cell protection and survival in contaminated soil.

The cadmium contents in the roots and in whole *O. gratissimum* L. plants treated with EDTA were higher than those that were inoculated with cadmium-resistant bacteria, increased by 1.1-fold and 1.3-fold, respectively, compared with the uninoculated control. The bioavailability of heavy metals is an indicator of the plant's ability to accumulate heavy metals from the soil (Branquinho et al. 2007). EDTA increases the solubility and bioavailability of heavy metals in soil, resulting in increased plant uptake of heavy metals (Evangelou et al. 2007). Our finding is consistent with other studies. The application of EDTA in soil increased the cadmium solubility, and the cadmium concentration in the shoots of *Z. mays* and white bean (*Phaseolus vulgaris*) was reported by Luo et al. (2005). Prapagdee et al. (2013) show that cadmium accumulation in the whole *H. annuus* treated with EDTA was higher than that of *H. annuus* inoculated with cadmium-resistant PGPR.

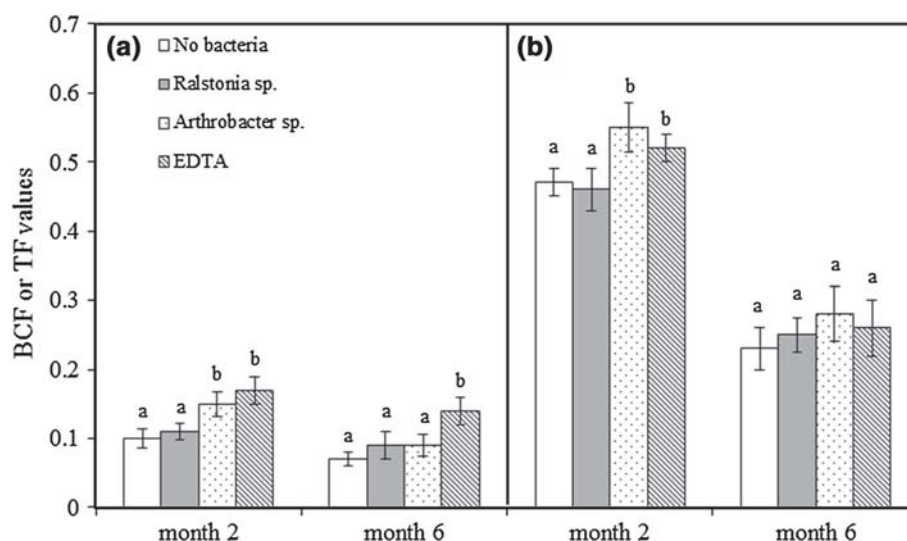
In contrast, there was no significant difference ($p < 0.05$) in the cadmium contents of the above-ground tissues from *O. gratissimum* L. in all treatments after 6 months of cultivation (Table 2). On comparing the total cadmium accumulation in *O. gratissimum* L. at 2 and 6 months post-transplant, the total cadmium accumulation in each plant (mg plant tissue $^{-1}$) for all treatments was higher at the 6-month harvest than at the 2-month harvest by approximately fivefold–sixfold due to a significant increase in plant biomass during the 6-month harvest period

(Table 1). Interestingly, *O. gratissimum* L. seeds had very low to undetectable cadmium concentrations. The maximum cadmium content ($0.03 \mu g g^{-1}$) was detectable only in the seeds from *O. gratissimum* L. plants treated with EDTA. Cadmium contents in the seeds of other treatments were lower than $0.01 \mu g g^{-1}$. The cadmium accumulation in each plant part decreased in the order of root > stem > leaf > fruit > seed (Benavides et al. 2005). In Japan, the paddy fields that have produced rice grains containing cadmium at concentrations $>1 \mu g g^{-1}$ are designated as contaminated paddy fields (Makino et al. 2007). Zheljaskov et al. (2006) found that there was no detectable cadmium, copper, or lead contents in the oils of dill (*Anethum graveolens*), peppermint (*Mentha × piperita*), or basil (*Ocimum basilicum*) that were grown in soils amended with these heavy metals with no alterations of oil composition. There was also no risk of transferring heavy metals to the oils of these crops. Our results suggested that *O. gratissimum* L. could be grown as an alternative to edible plants in cadmium-polluted agricultural soil. The improvement in the interactions between plants and cadmium-resistant bacteria for the enhancement of cadmium uptake by aromatic crops is considered an important strategy for cadmium phytoextraction in polluted soil.

Cadmium-resistant bacterium facilitates cadmium accumulation and translocation in *O. gratissimum* L.

The results in Fig. 3a show that the BCF of *O. gratissimum* L. treated with *Arthrobacter* sp. and EDTA at 2 months post-transplant was higher than that of the untreated control. However, no increase was observed in the BCF of *O. gratissimum* L. at 6 months after transplant with *Arthrobacter* sp. This result concurred with the observation

Fig. 3 Bioconcentration (a) and translocation (b) factors of cadmium in *O. gratissimum* L. planted in cadmium-polluted soil inoculated with *Ralstonia* sp. or *Arthrobacter* sp. and supplemented with EDTA compared with the uninoculated control for 2 and 6 months. The error bars represent the SE ($n = 3$), and the lowercase letter above the bar graph denotes a significant difference ($p < 0.05$) compared with the control treatment



of cadmium accumulation in each plant part as well as with whole *O. gratissimum* L. inoculated with *Arthrobacter* sp. during the 6 months of growth (Table 2). *O. gratissimum* L. had a low BCF in both harvested periods. The BCFs observed in this field study were slightly low due to the high cadmium concentration and low cadmium availability in the soil. The bioavailability factor in some medicinal plants planted in heavy metal-contaminated soil increased with decreasing cadmium concentrations in the soil (Zheljzkov et al. 2008b). The causative factor leading to a low BCF might be due to cadmium competition with other metals in the soil. During uptake, cadmium ions compete for the same transmembrane carrier used by other metal ions such as zinc, copper, iron, manganese, and nickel (Benavides et al. 2005). Agricultural soil in this study area contained not only cadmium but also high concentrations of zinc (826.0 mg kg^{-1}). Accumulated metals in plant roots and their translocation into plant tissues decrease in the order of zinc > cadmium > lead (Boruvka et al. 1997).

The TFs of *O. gratissimum* L. at 2 months after transplant were higher than those of *O. gratissimum* L. at 6 months for all treatments (Fig. 3b). The highest TF was found in plants inoculated with *Arthrobacter* sp. during the 2-month growth period; however, there was no significant difference ($p \geq 0.05$) between this group and the EDTA-treated *O. gratissimum*. In the 6-month growth period, the TFs of all *O. gratissimum* L. treatment groups were not significantly different ($p < 0.05$). The TFs of *O. gratissimum* L. were still quite low in comparison with other cadmium-hyperaccumulating plants (Sun et al. 2008; Phaenark et al. 2009). Heavy metal phytoextraction required the translocation of heavy metals to the easily harvestable plant parts (Kim et al. 2003). EDTA in the soil stimulated cadmium translocation from the roots to the shoots of *B. juncea* by changing the cadmium solubility

and bioavailability of cadmium in the soil (Jiang et al. 2003). Similar results noting increased cadmium translocation from the roots to the shoots in other plants after soil inoculation with cadmium-resistant bacteria were reported in other studies (Prapagdee et al. 2013; Khonsue et al. 2013). In general, cadmium is accumulated primarily in the root tissue; only small amounts of cadmium are translocated to the shoot tissue (Benavides et al. 2005). A higher degree of cadmium accumulation in the roots versus in the shoots led to less translocation of cadmium from the root to the shoot system. According to this study, the cadmium content in the roots was higher than that of above-ground tissues for both harvest periods (Table 2). Zheljzkov et al. (2008b) reported that cadmium, lead, and copper accumulated primarily in the roots, whereas higher concentrations of manganese and zinc were found in the leaves of several medicinal plants.

The efficiency of cadmium phytoremediation is also dependent on the cadmium removal from contaminated soil. Two and six months after transplant, the cadmium concentrations in contaminated soil were decreased for all treatment groups. The percentages of cadmium removal from the soil planted with *O. gratissimum* L. alone or treated with *Ralstonia* sp., *Arthrobacter* sp., and EDTA during the 2-month harvest periods were 18.9, 20.4, 25.4, and 31.3 %, respectively. The amount of cadmium that was removed by *O. gratissimum* L. inoculated with *Arthrobacter* sp. and EDTA was significantly higher than that removed by *O. gratissimum* L. inoculated with *Ralstonia* sp. and the uninoculated control. The amounts of cadmium in the soil after transplant with *O. gratissimum* L. for 6 months in all treatments, including the plants uninoculated and inoculated with *Ralstonia* sp., *Arthrobacter* sp., and EDTA, were decreased by 17.0, 18.1, 20.2, and 22.4 %, respectively. The percentages of soil



cadmium removal were less than those observed 2 months after transplant. Plants had a lower root-to-shoot ratio at 6 months than that at 2 months, because this growth stage is the declining stage. As previously indicated, cadmium highly accumulated in root tissue. Plants exhibit no significant release of cadmium after cadmium exposure; however, wetland plants may excrete the metals through salt glands (Hardy and O’Keeffe 1985; Weis and Weis 2004). However, it was a possibility that dead root tissue was decomposed by indigenous microorganisms and returned cadmium to the soil environment. Our results confirmed the results of other reports of the ability of EDTA to enhance the phytoremediation of heavy metals (Jiang et al. 2003; Luo et al. 2005). The results of this study clearly indicate that the ability of *Arthrobacter* sp. to improve cadmium phytoremediation by *O. gratissimum* L. was nearly as efficient as that of EDTA application. EDTA is hardly to degrade in the environment, and it can be toxic to plants and soil microorganisms (Luo et al. 2006). Thus, soil inoculation with *Arthrobacter* sp. is much more environmentally sound compared with EDTA application. The role of *Arthrobacter* sp. increased soil cadmium solubility and is related to the production of exopolysaccharide (EPS) (Prapagdee et al. 2012). EPS forms complexes with metal cations by electrostatic interaction and promotes metal plant uptake (Chen et al. 1995; Pal and Paul 2008). Therefore, the cultivation of aromatic *O. gratissimum* L. plants coupled with *Arthrobacter* sp. as a co-bioremediator in contaminated agricultural soil is a feasible option for remediating cadmium-polluted soil.

To study mass balance of cadmium in soil and the whole plant, the volume of soil was estimated based on the bulk density of soil and the area of plant root boundary at $20 \times 20 \times 20$ cm ($W \times L \times D$). The sum of cadmium accumulated in the whole plant and cadmium that remained in the soil after plantation was less than the initial cadmium concentration in the soil (Table 3). The loss of cadmium after transplantation was calculated in terms of percentage. The highest percentage of cadmium loss was found in

treatment with EDTA application at both harvested periods. EDTA can increase the metal solubility and promote the leaching of soil metals (Jiang et al. 2003; Evangelou et al. 2007). The loss of soil cadmium in treatment with EDTA application would involve the leaching to underground water. However, the effect of leaching during watering of plants might be low, because the water for irrigation is slightly alkaline (pH 7.84) and cadmium is more soluble and leaching in acid condition. Our explanation is confirmed by the study by Ok et al. (2004) which reported that water-soluble fraction of cadmium in contaminated soil is very low. The main fractions of soil cadmium are exchangeable and acid-digested fractions. Moreover, the high organic matter contents showed the low water-soluble cadmium concentration in soil (Crommentuyn et al. 1997). Our tested soil had a slightly high% organic matter (3.8 %); therefore, the leaching of soil cadmium should be low. In addition, the percentages of cadmium loss in soil inoculation with *Ralstonia* sp. and *Arthrobacter* sp. were higher than those of the uninoculated control. These results corresponded well to the study of Khonsue et al. (2013), who claimed that *Ralstonia* sp. and *Arthrobacter* sp. promote cadmium solubility in soil.

Because of the low rate of cadmium removal from contaminated soil, more time to repeat cultivation would be required to remediate a polluted site. The time required for remediation ranges from 1 to 20 years depending on the type and concentration of heavy metals, the heavy metal removal efficiency of plants, and the plant growth rate (Padmavathiamma and Li 2007). In general, the use of heavy metal-hyperaccumulating plants has been recommended for phytoextraction of soil contaminated with heavy metals (Wang et al. 2008). *O. gratissimum* L. is not a heavy metal-hyperaccumulating plant; however, it could be grown as a high-value aromatic crop in contaminated agricultural soil without cadmium contamination in its oil products. Thus, cadmium phytostabilization using *O. gratissimum* L. would have been a better option for phytoremediation. Several aromatic and medicinal crops may

Table 3 Sum of cadmium content in soil ($n = 3$) and the whole plant ($n = 3$) before and after transplantation for 2 and 6 months

Treatment	Month 2		Month 6	
	Cadmium content (mg)	Cadmium loss (%)	Cadmium content (mg)	Cadmium loss (%)
Before transplantation (only in soil)	886.7	–	886.7	–
After transplantation				
No bacterial inoculation	718.4	19.0	781.5	11.9
<i>Ralstonia</i> sp.	670.9	24.3	720.0	18.8
<i>Arthrobacter</i> sp.	688.1	22.4	736.3	17.0
EDTA	609.2	31.3	707.6	20.2

offer an alternative phytoremediation option for mild-to-moderate contaminated soils without contamination of their marketable products (Zheljaskov et al. 2008a, b). In fact, soils are often contaminated with multiple heavy metals. Therefore, the performance of *O. gratissimum* L. for phytoremediation of other heavy metals should be further evaluated. In addition, we suggest that a combined bioaugmentation with *Arthrobacter* sp. and PGPR strain in contaminated soil would be suitable for stimulating cadmium uptake and plant growth.

Conclusion

Ralstonia sp. and *Arthrobacter* sp. did not promote the growth of *O. gratissimum* L. The root-to-shoot ratio of *O. gratissimum* L. at 2 months after transplantation was higher than that at 6 months. Soil inoculation of an *Arthrobacter* sp. can enhance cadmium accumulation and translocation of cadmium from the roots to the shoots of *O. gratissimum* L. during a 2-month harvest period. However, no increase in the cadmium accumulation and translocation in *O. gratissimum* L. was observed at 6 months after transplantation in contaminated soil. Numbers of viable rhizobacteria in rhizosphere soil at 6 months after transplant decreased with time. Repeated soil inoculation with the *Arthrobacter* sp. would be required for the continuous stimulation of phytoremediation efficiency. Seeds of *O. gratissimum* L. contained undetectable to negligible concentrations of cadmium. Soil with such a high level of cadmium contamination should be used only for the cultivation of aromatic crop plants. This work was to explore the synergistic ability of plants and cadmium-resistant bacteria to enhance the cadmium phytoremediation efficiency in a cadmium-polluted field site.

Acknowledgments This research was supported by the grant from Thailand Research Fund and Mahidol University (Grant No. RSA5780026). The authors thank K. Kittisuwan and M. Chanprasert for their valuable technical assistance.

References

- Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere* 91:869–881
- Belimov AA, Hontzas N, Safronova VI, Demchinskaya SV, Piluzza G, Bullitta S, Glick BR (2005) Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biol Biochem* 37:241–250
- Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2005) Cadmium toxicity in plant. *Braz J Plant Physiol* 17:21–34
- Boruvka L, Kozak J, Kristoufkova S (1997) Heavy metal accumulation in plants grown in heavily polluted soils. *Folia Microbiol* 42:524–526
- Branquinho C, Serrano HC, Pinto MJ, Martins-Loução MA (2007) Revisiting the plant hyperaccumulation criteria to rare plants and earth abundant elements. *Environ Pollut* 146:437–443
- Chen JH, Czaika D, Lion L, Shuler M, Ghiorse W (1995) Trace metal mobilization in soil by bacterial polymer. *Environ Health Perspect* 103:52–58
- Chiu KK, Ye ZH, Wong MH (2006) Growth of *Vetiveria zizanioides* and *Phragmites australis* on Pb/Zn and Cu mine tailings amended with manure compost and sewage sludge: a greenhouse study. *Bioresour Technol* 97:158–170
- Crommentuijn T, Doornekamp A, Van Gestel CAM (1997) Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter. *Appl Soil Ecol* 5:261–271
- Dell' Amico E, Cavalca L, Andreoni V (2008) Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biol Biochem* 40:74–84
- Department of Environmental Quality Promotion (2011) Mineral mining bonanza or bust: green line. Ministry of Natural Resources and Environment, Bangkok
- Evangelou MWH, Ebel M, Schaeffer A (2007) Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil: effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* 68:989–1003
- Gao Y, Miao C, Wang Y, Xia J, Zhou P (2012) Metal-resistant microorganisms and metal chelators synergistically enhance the phytoextraction efficiency of *Solanum nigrum* L. in Cd- and Pb-contaminated soil. *Environ Technol* 33:1383–1389
- Hardy JK, O'Keeffe DH (1985) Cadmium uptake by the water hyacinth: effects of root mass, solution volume, complexers and other metal ions. *Chemosphere* 14:417–426
- He LY, Chen ZJ, Ren GD, Zhang YF, Qian M, Sheng XF (2009) Increased cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1343–1348
- Jensen-Spaulding A, Shuler ML, Lion LW (2004) Mobilization of adsorbed copper and lead from naturally aged soil by bacterial extracellular polymers. *Water Res* 38:1121–1128
- Jiang XJ, Luo YM, Zhao QG, Baker AJM, Christie P, Wong MH (2003) Soil Cd availability to Indian mustard and environmental risk following EDTA addition to Cd-contaminated soil. *Chemosphere* 50:813–818
- Jiang CY, Sheng XF, Qian M, Wang QY (2008) Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere* 72:157–164
- Khonsue N, Kittisuwan K, Kumsopa A, Tawinteung N, Prapagdee B (2013) Inoculation of soil with cadmium-resistant bacteria enhances cadmium phytoextraction by *Vetiveria nemoralis* and *Ocimum gratissimum*. *Water Air Soil Pollut* 224:1696. doi:10.1007/s11270-013-1696-9
- Kim IS, Kang KH, Johnson-Green P, Lee EJ (2003) Investigation of heavy metal accumulation in *Polygonum thunbergii* for phytoextraction. *Environ Pollut* 126:235–243
- Kumar PBAN, Dushenkov V, Motto H, Raskin I (1995) Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ Sci Technol* 29:1232–1238
- Lebeau T, Braud A, Jezequel K (2008) Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environ Pollut* 153:497–522
- Luo C, Shen Z, Li X (2005) Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS. *Chemosphere* 59:1–11
- Luo C, Shen Z, Li X, Baker AJM (2006) Enhanced phytoextraction of Pb and other metals from artificially contaminated soils through the combined application of EDTA and EDDS. *Chemosphere* 63:1773–1784



- Ma Y, Rajkumar M, Freitas H (2009) Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *J Environ Manag* 90:831–837
- Makino T, Kamiya T, Takano H, Itou T, Sekiya N, Sasaki K, Maejima Y, Sugahara K (2007) Remediation of cadmium-contaminated paddy soils by washing with calcium chloride: verification of on-site washing. *Environ Pollut* 147:112–119
- Mattina MJ, Lannucci-Berger W, Musante C, White JC (2003) Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environ Pollut* 124:375–378
- McGrath SP, Cunliffe CH (1985) A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co and Mn from soils and sewage sludges. *J Sci Food Agric* 36:794–798
- Moreno JL, Hernandez T, Perez A, Garcia C (2002) Toxicity of cadmium to soil microbial activity: effect of sewage sludge addition to soil on the ecological dose. *Appl Soil Ecol* 21:149–158
- Ok YS, Lee H, Jung J, Song H, Chung N, Lim S, Kim JG (2004) Chemical characterization and bioavailability of cadmium in artificially and naturally contaminated soils. *Agric Chem Biotechnol* 47:143–146
- Padmavathiamma PK, Li LY (2007) Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Water Air Soil Pollut* 184:105–126
- Pal A, Paul AK (2008) Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Ind J Microbiol* 48:49–64
- Phaenark C, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, Ngernsarsaruy C (2009) Cd and Zn accumulation in plants from the Padaeng zinc mine area. *Int J Phytoremediat* 11:479–495
- Prapagdee B, Watcharamusik A (2009) Adaptive and cross-protective responses against cadmium and zinc toxicity in cadmium-resistant bacterium isolated from a zinc mine. *Braz J Microbiol* 40:838–845
- Prapagdee B, Chumphonwong N, Khonsue N, Mongkolsuk S (2012) Influence of cadmium resistant bacteria on promoting plant root elongation and increasing cadmium mobilization in contaminated soil. *Fresen Environ Bull* 21:1186–1191
- Prapagdee B, Chanprasert M, Mongkolsuk S (2013) Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus*. *Chemosphere* 92:659–666
- Sheng XF, Xia JJ (2006) Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere* 64:1036–1042
- Simmons RW, Pongsakul P, Chaney L, Saiyasitpanich D, Klinphoklap S, Nobuntou W (2003) The relative exclusion of zinc and iron from rice grain in relation to rice grain cadmium as compared to soybean: implications for human health. *Plant Soil* 257:163–170
- Sun Y, Zhou Q, Diao C (2008) Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresour Technol* 99:1103–1110
- Wang L, Zhou Q, Ding L, Sun Y (2008) Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *J Hazard Mater* 154:818–825
- Weis JS, Weis P (2004) Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environ Int* 30:685–700
- Zheljazkov VD, Craker LE, Xing B (2006) Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil. *Environ Exp Bot* 58:9–16
- Zheljazkov VD, Craker LE, Xing B, Nielsen NE, Wilcox A (2008a) Aromatic plant production on metal contaminated soils. *Sci Total Environ* 395:51–62
- Zheljazkov VD, Jeliakova EA, Kovacheva N, Dzhurmanski A (2008b) Metal uptake by medicinal plant species grown in soils contaminated by a smelter. *Environ Exp Bot* 64:207–216



*Improvement of cadmium phytoremediation after soil inoculation with a cadmium-resistant *Micrococcus* sp.*

**Chirawee Sangthong, Kunchaya Setkit &
Benjaphorn Prapagdee**

**Environmental Science and Pollution
Research**

ISSN 0944-1344

Volume 23

Number 1

Environ Sci Pollut Res (2016) 23:756-764

DOI 10.1007/s11356-015-5318-5



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

RESEARCH ARTICLE

Improvement of cadmium phytoremediation after soil inoculation with a cadmium-resistant *Micrococcus* sp.

Chirawee Sangthong¹ · Kunchaya Setkit¹ · Benjaphorn Prapagdee¹

Received: 5 May 2015 / Accepted: 25 August 2015 / Published online: 4 September 2015
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Cadmium-resistant *Micrococcus* sp. TISTR2221, a plant growth-promoting bacterium, has stimulatory effects on the root lengths of *Zea mays* L. seedlings under toxic cadmium conditions compared to uninoculated seedlings. The performance of *Micrococcus* sp. TISTR2221 on promoting growth and cadmium accumulation in *Z. mays* L. was investigated in a pot experiment. The results indicated that *Micrococcus* sp. TISTR2221 significantly promoted the root length, shoot length, and dry biomass of *Z. mays* L. transplanted in both uncontaminated and cadmium-contaminated soils. *Micrococcus* sp. TISTR2221 significantly increased cadmium accumulation in the roots and shoots of *Z. mays* L. compared to uninoculated plants. At the beginning of the planting period, cadmium accumulated mainly in the shoots. With a prolonged duration of cultivation, cadmium content increased in the roots. As expected, little cadmium was found in maize grains. Soil cadmium was significantly reduced with time, and the highest percentage of cadmium removal was found in the bacterial-inoculated *Z. mays* L. after transplantation for 6 weeks. We conclude that *Micrococcus* sp. TISTR2221 is a potent bioaugmenting agent, facilitating cadmium phytoextraction in *Z. mays* L.

Keywords Cadmium · Phytoextraction · Indole-3-acetic acid · *Micrococcus* sp. · *Zea mays* L.

Responsible editor: Elena Maestri

✉ Benjaphorn Prapagdee
 benjaphorn.pra@mahidol.ac.th

¹ Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom 73170, Thailand

Introduction

Cadmium has been recognized as one of the most problematic heavy metals contaminating soils and is of worldwide concern due to its high toxicity (Ali et al. 2013). Widespread soil contamination with cadmium has dramatically increased due to the discharge of waste and wastewater from several anthropogenic activities, e.g., mining and smelting activities. Soil contaminated with cadmium is caused by the mismanagement of mining wastes (Thawornchaisit and Polprasert 2009). Cadmium in the soil is easily taken up by crop plants growing in polluted areas, contributing to bioaccumulation in plant tissues. It poses a serious health risk to people upon consumption of contaminated plant products (Guo et al. 2014). Several diseases are caused by cadmium exposure, e.g., renal dysfunction, osteoporosis, chronic anemia, bone fractures, and tumors (Liu et al. 2009). To prevent the passing of soil cadmium into the food chain, remediation of cadmium contamination in agricultural soil deserves special attention.

Among the available remediation technologies, phytoremediation, a green technology to remediate soil contaminated with toxic metals, has received much attention for over a decade (Chaney et al. 1997). The phytoextraction step of phytoremediation involves the extraction of toxic heavy metals in soils and the accumulation of heavy metals in plant tissues that are easy to harvest (Vangronsveld et al. 2009; Ali et al. 2013). However, the important limitations of heavy metal phytoextraction are a slow plant growth rate and a low plant biomass (Lebeau et al. 2008; Jiang et al. 2008). A high concentration of heavy metals accumulated in plants causes irreversible damage to plant tissues resulting in plant growth retardation (Barocsi et al. 2003). To improve phytoextraction performance, plant growth rate should be promoted. Bacterial

augmentation-assisted phytoextraction is a promising new remediation technology for the reclamation of polluted areas (Teixeira et al. 2014). Several investigators found that heavy metal-resistant bacteria can promote plant growth and heavy metal uptake (He et al. 2009; Prapagdee et al. 2013; Guo et al. 2014).

In general, indole-3-acetic acid (IAA)-producing bacteria are classified as plant growth-promoting bacteria (PGPB) able to stimulate plant growth (Glick 2010). Various bacterial genera have been reported to produce IAA, e.g., *Azotobacter*, fluorescent *Pseudomonas*, *Mesorhizobium*, and *Bacillus* (Ahmad et al. 2008). *Micrococcus* sp. TISTR2221 (formerly strain MU1) is a cadmium-resistant PGPB that is a high producer of IAA during the late stationary phase of growth (Prapagdee et al. 2013). This bacterial strain was isolated from the plant roots of *Glycine max* L. collected from a cadmium-polluted site by Chanprasert et al. (2011). Its ability to promote root elongation, growth, and cadmium uptake in cadmium-polluted soil by *Helianthus annuus* L., a dicotyledonous plant, has been reported by Prapagdee et al. (2013). Two types of plants have been commonly used for heavy metal phytoextraction, including (1) hyperaccumulator and (2) high-yielding biomass plants (Wang et al. 2007). *Zea mays* L., or maize, a monocotyledonous plant, is an agronomic crop worldwide with a high biomass. It has been found to accumulate several heavy metals, e.g., cadmium, lead, and copper (Meers et al. 2005; Wang et al. 2007).

To our knowledge, the ability of a cadmium-resistant PGPB to promote the growth and cadmium uptake by *Z. mays* L. cultivated in highly cadmium-contaminated soil has not been reported elsewhere. Several investigators reported cadmium phytoextraction by *Z. mays* L. in the low to medium concentrations of cadmium in contaminated soil (Meers et al. 2005; Murakami et al. 2007; Moreira et al. 2014). In general, cadmium concentrations in uncontaminated soils are below 0.5 to 3.0 mg kg⁻¹ and cadmium concentrations in Thai soils range from 0.002 to 0.141 mg kg⁻¹ (Pongsakul and Attajarusit 1999; Wang et al. 2007). However, cadmium concentration in the contaminated paddy soils in Thailand was up to 284 mg kg⁻¹ (Simmons et al. 2005). Therefore, the bacterial-assisted cadmium phytoextraction by *Z. mays* L. in highly cadmium-contaminated soil was investigated. *Micrococcus* sp. TISTR2221 was inoculated in the rhizosphere soil to increase the number of cadmium-resistant PGPB in the zone surrounding the plant roots. This method has the potential to contribute to beneficial plant and microorganism interactions to improve cadmium phytoextraction efficiency. This bacterial strengthening of cadmium phytoextraction by *Z. mays* L. would overcome the major limitations in cadmium phytoextraction and lead to the development of practical management strategies to remediate polluted areas.

Materials and methods

Bacterial strain and inoculum preparation

Micrococcus sp. TISTR2221, a cadmium-resistant PGPB, was cultured in Luria Bertani (LB) agar (Criterion, USA) containing 3 mM cadmium nitrate (Cd(NO₃)₂) (Ajax, Australia) and incubated at 28 °C. A bacterial inoculum was prepared in broth culture according to the methods of Prapagdee et al. (2013) and adjusted to an OD₆₀₀ of 0.2. Viable cells in the culture broth were counted by spreading on LB agar. An approximate viable cell number of TISTR2221 in the inoculum before and after an OD₆₀₀ adjustment to 0.2 were 1.8 × 10¹⁰ and 1.3 × 10⁸ CFU mL⁻¹, respectively.

In vivo root elongation assay

Seeds of *Z. mays* L. cv. CPDK 888 (purchased from Crop Integration Business C.P. Group, Thailand) were surface-sterilized in a mixture of absolute ethanol and 30 % hydrogen peroxide (1:1) for 15 min and washed twice with sterile distilled water. A root elongation assay on filter paper was carried out using a method similar to that previously described by Prapagdee et al. (2013), with 20 replicates. Various cadmium ion concentrations in the form of cadmium nitrate, including 0, 50, 100, and 150 mg L⁻¹, were applied to sterile filter paper before the placement of surface-sterilized seeds. Then 0.1 mL of bacterial suspension at an OD₆₀₀ of 0.2 was added with 9.9 mL of sterile normal saline before pouring on sterile filter paper. The root length of the seedlings was measured after incubation at room temperature in the dark for 5 days.

Bioaugmentation-assisted growth and cadmium phytoextraction in *Z. mays* L.

Preparation of a spiked cadmium-contaminated soil and analysis of soil properties

Garden soil was collected from the surface at a 15-cm depth. It was air-dried, ground, passed through a 2-mm sieve, and homogenized. The background cadmium content in the garden surface soil was 1.14 ± 0.12 mg kg⁻¹. To prepare the spiked cadmium-contaminated soil, the air-dried soil was added to cadmium nitrate solution to yield a concentration of approximately 90 mg kg⁻¹ and mixed well by shaking. The spiked cadmium-contaminated soil was kept at room temperature for 4 weeks with frequent thorough mixing before use according to the methods of Thawornchaisit and Polprasert (2009). The physical and chemical characteristics of spiked cadmium-contaminated soil, including soil texture, soil pH, electrical conductivity, cation exchange capacity, organic matter, total nitrogen, available phosphorous, and extractable potassium, are presented in Table 1. To analyze the total cadmium

Table 1 Physical and chemical properties of spiked cadmium-contaminated soil

Property	Value
Particle size distribution	
Sand (%)	30.0
Silt (%)	23.3
Clay (%)	46.7
Soil texture	Clay
pH (1:1 w/v H ₂ O)	7.55±0.03
Electrical conductivity (1:5) (dS m ⁻¹)	0.18±0.07
Cation exchange capacity (cmol kg ⁻¹)	10.89±0.44
Organic matter (%)	4.43±0.61
Total nitrogen (%)	0.23±0.02
Available phosphorous (mg kg ⁻¹)	13.49±1.05
Extractable potassium (mg kg ⁻¹)	43.47±0.91
Total cadmium (mg kg ⁻¹)	90.35±3.32
Bioavailable cadmium (mg kg ⁻¹)	21.16±0.20

concentration in soil, prepared soil was digested with a mixture of 1:3 by volume of concentrated nitric acid (HNO₃) (Merck, Germany) and concentrated hydrochloric acid (HCl) (Merck, Germany) in a microwave oven (Milestone model Ethos One, Italy) (McGrath and Cunliffe 1985). In addition, bioavailable cadmium in soil was extracted using diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) (Ajax, Australia) (Faust and Christians 2000). Total and bioavailable cadmium concentrations were measured using flame atomic adsorption spectrophotometry (FAAS) (Varian spectra model AA240FS, USA).

Preparation of *Z. mays* L. seedlings

Seeds of *Z. mays* L. cv. CPDK 888 were surface-sterilized and sown in uncontaminated agricultural soil in a 25-cm-diameter plastic pot at a density of 10 seeds per pot. After germination for 4 weeks, *Z. mays* L. seedlings at an approximate height of 50 cm were individually transplanted in both uncontaminated and cadmium-contaminated soil in plastic pots filled with 3.0 kg of soil. The bottoms of the pots were sealed off to avoid leaching of cadmium.

Bioaugmentation in the pot experiment

The experimental procedure of bioaugmentation with a cadmium-resistant PGPB in *Z. mays* L. seedlings followed the method of Jiang et al. (2008) and Ma et al. (2009) with some modification. This pot experiment was a completely randomized design and consisted of four treatments with five replicates, including (1) *Z. mays* L. seedlings planted in uncontaminated soil without bacterial inoculation, (2) *Z. mays* L.

seedlings planted in uncontaminated soil with TISTR2221 inoculation, (3) *Z. mays* L. seedlings planted in cadmium-contaminated soil without bacterial inoculation, and (4) *Z. mays* L. seedlings planted in cadmium-contaminated soil with TISTR2221 inoculation. Before transplanting, the suspension of TISTR2221 inoculum was applied in the soil (only in treatments 2 and 4) at the area of the plant root zone and homogeneously mixed to yield an inoculation size of approximately 10⁶ CFU g⁻¹ soil. The bacterial suspension was repeatedly inoculated in the soil at 2, 4, and 6 weeks. Each plastic pot was placed in the greenhouse and watered daily. Plant samples were collected at 2, 4, and 6 weeks and completely harvested at the seedling stage (12 weeks after transplantation). The ages of *Z. mays* L. at 2, 4, 6, and 12 weeks after transplantation were 6, 8, 10, and 16 weeks old, respectively. During the cultivation period, the plants were fertilized with a chemical fertilizer solution to avoid limiting nutritional conditions.

Sample collection and analysis

Each plant was carefully harvested from the soil and rinsed several times with deionized water to remove soil from the surface. Plant growth was determined by root length, shoot length, and dry biomass yield. The plants were divided into shoots and roots and oven-dried at 80 °C for 24 h before being weighed. Dried plant samples (shoots and roots) were ground and acid digested in concentrated HNO₃ and perchloric acid (HClO₄) (Merck, Germany) at a ratio of 2:1 by volume (Simmons et al. 2003) in a microwave oven. Cadmium concentrations in digested plant samples were analyzed by FAAS. A soil sample was collected from each pot. Total and bioavailable cadmium concentrations in soil were extracted and analyzed as described above.

Data interpretation and statistical analysis

To evaluate the performance of cadmium phytoextraction and cadmium translocation in plant tissues, the phytoextraction coefficient (PEC), the bioaccumulation factor (BAF), and the translocation factor (TF) were calculated. The PEC is the ratio of the metal concentration in plants to that in soil (Kumar et al. 1995). The BAF is the ratio of the metal concentration in plants to the bioavailable metal concentration in the soil (Khaokaew and Landrot 2014). The TF is the ratio of the metal concentration in the shoots to the concentration in the roots (Mattina et al. 2003). The data for plant growth, cadmium content of each plant part, PEC, BAF, and TF were calculated as the mean ($\bar{x}$) and standard error (SE). The differences in the means for plant growth and cadmium content in plants between the control group and the bacterial-treated group were statistically analyzed using an independent *t* test at a significance level of 0.05.

Results and discussion

Promotion of plant root elongation by a cadmium-resistant PGPB under cadmium toxic conditions

An in vivo root elongation assay under various cadmium concentrations found that the root lengths of *Z. mays* L. seedlings inoculated with *Micrococcus* sp. TISTR2221 significantly increased compared to the uninoculated control seedlings at all cadmium concentrations (Fig. 1). The increases in the root lengths of bacterial-inoculated *Z. mays* L. seedlings in the cadmium ion concentrations of 0, 50, 100, and 150 mg L⁻¹ compared to the uninoculated control seedlings were 71.3, 65.7, 66.3, and 48.2 %, respectively. The root length of the bacterial-inoculated *Z. mays* L. seedlings in the absence of cadmium ion was higher than those in the presence of cadmium ion. Similar results were also found in the uninoculated *Z. mays* L. seedlings. However, there was no significant difference ($p < 0.05$) in the root length of the uninoculated *Z. mays* L. seedlings among the different cadmium ion concentrations. In addition, the inoculation of *Micrococcus* sp. TISTR2221 in *Z. mays* L. seedlings in the presence of cadmium ion could recover the retardation of root growth by cadmium toxicity. These findings indicate that *Micrococcus* sp. TISTR2221 was able to increase the root lengths of *Z. mays* L. seedlings under cadmium toxicity conditions.

Our previous study reported that *Micrococcus* sp. TISTR2221 was a high producer of IAA even at high

concentrations of cadmium and that it promoted the root elongation of cadmium-treated seedlings of *H. annuus* L. (Prapagdee et al. 2013). The study of Yokota et al. (2010) found that IAA produced from *Streptomyces* sp. CMU-H009 plays a role in promoting seed germination and root elongation in *Z. mays* L. In general, cadmium is toxic to plants at high concentrations in a range of 11.2 to 1123.6 mg L⁻¹ cadmium ion by inhibiting root growth and cell division (Liu et al. 2003). Maize is more sensitive to cadmium than other crops, e.g., wheat (Ahmad et al. 2014). More inhibition of root growth was observed when the cadmium concentration was increased (Chen et al. 2003; Liu et al. 2003). These results are in good agreement with the study on the effect of cadmium on the root growth of *Z. mays* L. seedlings (Wang et al. 2007).

Promotion of plant growth cultivated in uncontaminated and spiked cadmium-contaminated soils by the addition of a cadmium-resistant PGPB

To further understand the effect of cadmium and *Micrococcus* sp. TISTR2221 on plant growth, *Z. mays* L. seedlings were transplanted in the greenhouse in both uncontaminated soil and spiked cadmium-contaminated soil. The root and shoot lengths and dry biomass of *Z. mays* L. transplanted in uncontaminated soil both with and without bacterial inoculations were higher than those in spiked cadmium-contaminated soil (Table 2). Although the growth of *Z. mays* L. transplanted in spiked cadmium-contaminated soil was slightly retarded by cadmium, there were no obvious cadmium toxicity symptoms. The highest plant dry biomass was found in bacterial-inoculated *Z. mays* L. cultivated in uncontaminated soil for 12 weeks, followed by the uninoculated plants. At 12 weeks after transplantation, the cadmium in soil obviously decreased the dry biomasses of bacterial-inoculated and uninoculated *Z. mays* L. by 32.4 and 32.3 %, respectively, compared to those transplanted in uncontaminated soil.

It was clearly observed that the growth of *Z. mays* L. was decreased by cadmium in contaminated soil compared to the growth of *Z. mays* L. in uncontaminated soil. Our findings corresponded well with the study of Ahmad et al. (2014), who claimed that cadmium decreased the shoot and root dry biomass of *Z. mays* L. planted in cadmium-contaminated soil at 80 mg kg⁻¹ compared to the uncontaminated control. The dry biomasses of *Brassica campestris* and *Vigna radiata* were lower when planted in cadmium-contaminated soil at 50 mg kg⁻¹ (Anjum et al. 2014). It was due to cadmium phytotoxicity to plant growth. Cadmium produces oxidative stress, induces lipid peroxidation, inhibits several antioxidative enzymes, and inhibits chlorophyll synthesis in plants (Sanità di Toppi and Gabbriellini 1999; Benavides et al. 2005).

Considering the effect of *Micrococcus* sp. TISTR2221 on plant growth, the results revealed that *Micrococcus* sp. TISTR2221 was able to increase the root and shoot lengths

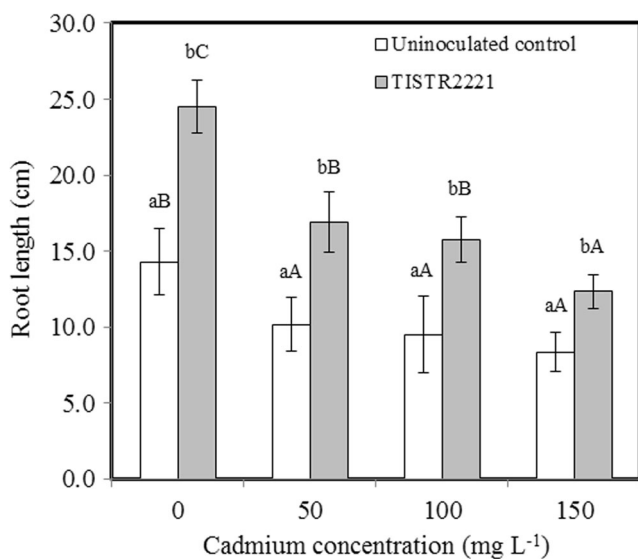


Fig. 1 Root lengths of *Z. mays* L. cultivated in the absence or presence of cadmium at various concentrations after germination for 5 days. The error bars are the SE ($n=20$), and a different lowercase letter denotes significant difference at $p < 0.05$ between uninoculated seedlings and bacterial-inoculated seedlings at each cadmium concentration. A different uppercase letter indicates a significant difference at $p < 0.05$ among different cadmium concentrations

Table 2 Growth of *Z. mays* L. after transplantation in uncontaminated soil and spiked cadmium-contaminated soil

Parameter	Uncontaminated soil		Cadmium-contaminated soil	
	Uninoculated control	TISTR2221	Uninoculated control	TISTR2221
Root length (cm)				
2 weeks	18.1±1.6 ^{abA}	23.2±2.0 ^{bbA}	14.8±0.2 ^{aaA}	17.4±0.7 ^{baA}
4 weeks	22.0±1.0 ^{abA}	28.7±0.8 ^{bbB}	18.7±1.5 ^{aaB}	20.3±1.5 ^{baB}
6 weeks	32.7±0.6 ^{abB}	38.2±1.1 ^{bbC}	23.7±1.5 ^{aaC}	28.7±0.8 ^{baC}
12 weeks	37.0±0.8 ^{abC}	47.6±0.7 ^{bbD}	25.5±1.4 ^{aaC}	32.0±1.7 ^{baD}
Shoot length (cm)				
2 weeks	59.7±1.6 ^{abA}	67.1±2.3 ^{bbA}	51.2±1.6 ^{aaA}	54.9±0.2 ^{baA}
4 weeks	78.7±2.5 ^{abB}	89.1±3.1 ^{bbB}	63.7±2.5 ^{aaB}	72.7±2.5 ^{baB}
6 weeks	133.7±1.5 ^{abC}	151.4±2.7 ^{bbC}	86.3±2.1 ^{aaC}	100.3±1.5 ^{baC}
12 weeks	221.0±4.4 ^{abD}	240.8±2.6 ^{bbD}	195.5±1.7 ^{aaD}	211.0±4.2 ^{baD}
Dry biomass of whole plant (g plant ⁻¹)				
2 weeks	0.49±0.01 ^{abA}	0.67±0.01 ^{bbA}	0.35±0.01 ^{aaA}	0.51±0.04 ^{baA}
4 weeks	4.74±0.13 ^{abB}	6.21±0.34 ^{bbB}	0.52±0.09 ^{aaA}	1.00±0.04 ^{baB}
6 weeks	28.72±3.07 ^{abC}	35.14±3.20 ^{bbC}	5.62±2.21 ^{aaB}	10.16±1.07 ^{baC}
12 weeks	204.01±14.14 ^{abD}	252.50±13.80 ^{bbD}	137.97±11.27 ^{aaC}	170.62±9.11 ^{baD}

The means and SE ($n=5$) followed by a different lowercase letter within the same row denote a significant difference at $p < 0.05$ between the uninoculated control and the bacterial-inoculated treatment in either uncontaminated soil or spiked cadmium-contaminated soil, respectively, at each planting period. A different underlined lowercase letter within the same row indicates a significant difference at $p < 0.05$ between uncontaminated soil and a spiked cadmium-contaminated soil of either the uninoculated control or the bacterial-inoculated treatment, respectively, at each planting period. A different uppercase letter within the same column indicates a significant difference at $p < 0.05$ among different planting periods of each parameter.

and the dry biomass of *Z. mays* L. transplanted in both soils at all harvested periods (Table 2). In uncontaminated soil, the increases in root length, shoot length, and dry biomass of bacterial-inoculated *Z. mays* L. at 12 weeks after transplantation compared to the uninoculated *Z. mays* L. were 28.6, 9.0, and 23.8 %, respectively. A similar result of promoting plant growth by *Micrococcus* sp. TISTR2221 has been observed in the *Z. mays* L. transplanted in a spiked cadmium-contaminated soil. The root length, shoot length, and dry biomass of bacterial-inoculated *Z. mays* L. at 12 weeks after transplantation in spiked cadmium-contaminated soil increased by 24.5, 7.9, and 23.7 %, respectively, in comparison with the uninoculated *Z. mays* L.

It should be noted that *Micrococcus* sp. TISTR2221 significantly promoted the growth of *Z. mays* L. transplanted in both uncontaminated and spiked cadmium-contaminated soils. The explanation for this is based on a finding from our previous study in *H. annuus* L. (Prapagdee et al. 2013). We speculated that the high levels of IAA produced by *Micrococcus* sp. TISTR2221 play an important role in promoting plant growth (Prapagdee et al. 2013). The most important mechanism to promote the growth of *Z. mays* L. and *Triticum aestivum* L. is the production of plant growth hormones by PGPB (Ahmad et al. 2014). The growth promotion by heavy metal-resistant PGPB in many plant species, e.g., *Brassica napus*, *Lolium multiflorum*, *Sedum alfredii*, and *Medicago sativa*, has been

reported (Chen et al. 2013; Guo et al. 2014; Liu et al. 2015). The potential plants for heavy metal phytoextraction should have high biomass yields (Barocsi et al. 2003). Bacterial-inoculated *Z. mays* L. transplanted in spiked cadmium-contaminated soil had a high dry biomass yield, suggesting that *Z. mays* L. could be a candidate for cadmium phytoextraction.

Performance of a cadmium-resistant PGPB to increase cadmium accumulation in plant tissues

Owing to the positive effect of *Micrococcus* sp. TISTR2221 on plant growth in spiked cadmium-contaminated soil, the enhancement of cadmium uptake by *Z. mays* L. inoculated with *Micrococcus* sp. TISTR2221 was studied. Before inoculating *Micrococcus* sp. TISTR2221 in the pot experiment, the survival of *Micrococcus* sp. TISTR2221 in a sterile spiked cadmium-contaminated soil was evaluated for 15 days. The number of viable cells increased from 1.5×10^6 on the first day to 9.0×10^8 CFU g⁻¹ at 5 days after inoculation. Bacterial cells slightly reduced to 1.3×10^8 CFU g⁻¹ at 10 days and sharply decreased to 2.0×10^5 CFU g⁻¹ at 15 days after inoculation. Cadmium concentrations in both the roots and shoots in bacterial-inoculated *Z. mays* L. were significantly higher than in the uninoculated control (Fig. 2). The highest cadmium content accumulated in the shoots and roots was found in

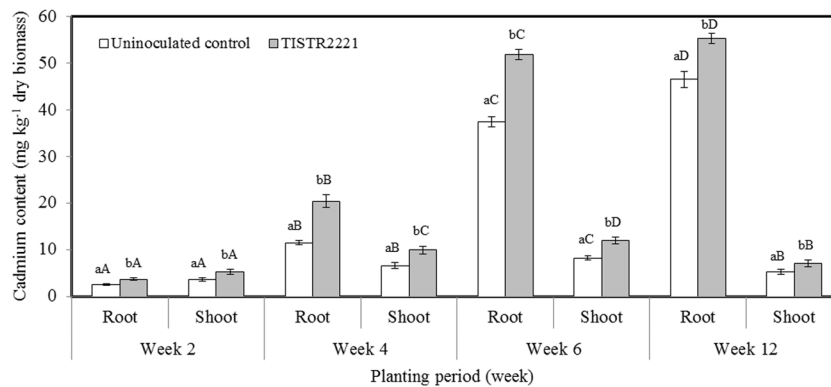


Fig. 2 Cadmium concentrations in the root and shoot tissues of *Z. mays* L. after transplantation in spiked cadmium-contaminated soil. The error bars are the SE ($n=5$), and a lowercase letter denotes a significant difference at $p < 0.05$ between the uninoculated control and the

bacterial-inoculated treatment at each planting period. A different uppercase letter indicates a significant difference at $p < 0.05$ of cadmium concentrations in either roots or shoots among different planting periods

bacterial-inoculated *Z. mays* L. at 6 and 12 weeks after transplantation, respectively. In comparison with the uninoculated control, cadmium accumulations in the shoots of bacterial-inoculated *Z. mays* L. after 2, 4, 6, and 12 weeks increased by 45.7, 52.3, 45.5, and 36.0 %, respectively. Significant increases in cadmium accumulation in the roots of bacterial-inoculated *Z. mays* L. after 2, 4, 6, and 12 weeks compared to the uninoculated control were 47.0, 77.9, 38.5, and 19.0 %, respectively. The highest stimulatory effect on cadmium accumulation in *Z. mays* L. by *Micrococcus* sp. TISTR2221 was found at 4 weeks after transplantation.

At 2 weeks after transplantation of bacterial-inoculated and uninoculated *Z. mays* L., the shoots accumulated more cadmium than the roots. More cadmium was retained in the shoots of bacterial-inoculated and uninoculated *Z. mays* L. than in the roots by 1.5 and 1.4 times, respectively. During 4 to 12 weeks after transplantation, the roots harbored high amounts of cadmium. In contrast, the cadmium concentration increased in plant roots during the vigorous growth stage and lower in the late growth stage (Zhang et al. 2012). Murakami et al. (2007) reported that the shoots of *Z. mays* L. accumulated more cadmium than those of *Glycine max* L. and *Oryza sativa* L. In general, cadmium mainly accumulates in the roots, and only small amounts are translocated to the shoots (Sanità di Toppi and Gabbrielli 1999). The highest cadmium content in the shoots (11.93 mg kg^{-1}) and roots (55.35 mg kg^{-1}) was found in bacterial-inoculated *Z. mays* L. after transplantation for 6 and 12 weeks, respectively.

Our findings indicate that the growth stage of *Z. mays* L. for cadmium accumulation in the shoot tissue is the vegetative stage (6 weeks) which is suitable for cadmium phytoextraction. A higher cadmium accumulation in the shoots of plants modulates the efficiency of plants for heavy metal extraction (Anjum et al. 2014). At the reproductive stage (up to 9 weeks), a high amount of cadmium is retained in the root tissue that brings about a lower cadmium accumulation in maize grains. The cadmium contents of maize grains

from bacterial-inoculated and uninoculated *Z. mays* L. at the seedling stage (12 weeks after transplantation) were 0.21 ± 0.03 and $0.17 \pm 0.02 \text{ mg kg}^{-1}$, respectively. A similar result was reported by Benavides et al. (2005), who found that the cadmium concentration in each part of the plant decreased in the order root>stem>leaf>fruit>grain. However, the maize grains should be used for biodiesel production in order to prevent the health risk from cadmium by consumption of the maize grains.

Although *Z. mays* L. had a low accumulation of heavy metals in the shoots compared to *Bidens pilosa* L., a cadmium-hyperaccumulating plant (Sun et al. 2009), it is still used for heavy metal phytoextraction purposes because it has higher biomass yields of up to 2.54 times that of other plant species, such as *Brassica rapa*, *Cannabis sativa*, and *H. annuus* (Meers et al. 2005). The ideal plant characteristics for metal phytoextraction are not only a high accumulation of metals but also fast growth, easy propagation, a deep root system, high biomass production, and metal tolerance (Chiu et al. 2005; Vangronsveld et al. 2009). We also observed that both bacterial-inoculated and uninoculated *Z. mays* L. at 4, 6, and 12 weeks after transplantation had cadmium contents in the roots more than 10 mg kg^{-1} . The threshold value of the cadmium-hyperaccumulating plant was 10 mg kg^{-1} (Wang et al. 2012). Therefore, *Z. mays* L. could be a potential cadmium-accumulating plant because it possesses the advantages of fast growth, high biomass yield, and a dense root.

Additionally, Table 3 presents the cadmium contents in whole *Z. mays* L. after transplantation in spiked cadmium-contaminated soil. Cadmium contents in the entire bacterial-inoculated *Z. mays* L. after transplantation for 2, 4, 6, and 12 weeks were higher than the uninoculated control by 1.6, 3.0, 2.5, and 1.2 times, respectively. It should be noted that the highest differences of cadmium contents in the whole plants between bacterial-inoculated and uninoculated *Z. mays* L. at 4 and 6 weeks after transplantation were found. One possible explanation for this would involve more differences of

Table 3 Cadmium contents (μg) in whole *Z. mays* L. after transplantation in spiked cadmium-contaminated soil at different planting periods

Planting period	Uninoculated control	TISTR2221
2 weeks	1.23 $\pm$ 0.01 ^{aA}	2.63 $\pm$ 0.42 ^{bA}
4 weeks	3.81 $\pm$ 0.76 ^{aB}	11.13 $\pm$ 2.02 ^{bB}
6 weeks	58.98 $\pm$ 7.80 ^{aC}	145.96 $\pm$ 19.56 ^{bC}
12 weeks	2584.61 $\pm$ 138.66 ^{aD}	3282.11 $\pm$ 201.92 ^{bD}

The means and SE ($n=5$) followed by a different lowercase letter within the same row denote significant difference at $p < 0.05$ between the uninoculated control and the bacterial-inoculated treatment at each planting period. A different uppercase letter within a column indicates a significant difference at $p < 0.05$ among different planting periods

biomass of whole plant between bacterial-inoculated and uninoculated *Z. mays* L. at these planting periods compared to other planting periods (Table 2). The highest cadmium content of whole *Z. mays* L. was observed in the bacterial-inoculated plant at 12 weeks after transplantation following the uninoculated plant due to the highest biomass yields. Our findings suggest that *Micrococcus* sp. TISTR2221 greatly increased cadmium accumulations in *Z. mays* L. roots and shoots. This would indicate that *Micrococcus* sp. TISTR2221 could solubilize soil cadmium, consequently increasing cadmium bioavailability and easy uptake by plants. An explanation for this relates to the findings from our previous study in *H. annuus* L. inoculated with *Micrococcus* sp. (Prapagdee et al. 2013). The results obtained from our experiment also correspond well with other studies. For example, *Bacillus megaterium*, a phosphate-solubilizing bacterium, significantly increased cadmium bioavailability in soil and cadmium accumulation in *Brassica juncea* (Jeong et al. 2012). Inoculation with metal-resistant bacteria significantly increased the water-soluble cadmium concentration in the rhizosphere soils and promoted cadmium uptake in *B. napus* (Chen et al. 2013). In addition, several investigators have demonstrated that bacteria significantly increase heavy metal bioavailability in the rhizosphere soil (Jiang et al. 2008; He et al. 2009; Ma et al. 2009; Sheng et al. 2012).

Bioaugmentation-assisted cadmium phytoextraction performance in *Z. mays* L.

Phytoextraction performance in bacterial-inoculated and uninoculated *Z. mays* L. was assessed using the values of PEC, BAF, and TF. PEC and BAF indicated the ability of the plant to remove a target metal from soil and the accumulation of bioavailable metal in plant tissues, respectively (Phaenark et al. 2009; Khaokaew and Landrot 2014). The TF is used to measure the effectiveness of a plant in transferring a metal from the roots to the shoots (Wang et al. 2012). Our results showed that the PEC, BAF, and TF values of bacterial-

Table 4 PEC, BAF, and TF of *Z. mays* L. after transplantation in spiked cadmium-contaminated soil at different planting periods

Parameter	Uninoculated control	TISTR2221
Phytoextraction coefficient (PEC)		
2 weeks	0.05 $\pm$ 0.01 ^{aA}	0.10 $\pm$ 0.01 ^{bA}
4 weeks	0.09 $\pm$ 0.02 ^{aA}	0.20 $\pm$ 0.02 ^{bB}
6 weeks	0.36 $\pm$ 0.04 ^{aB}	0.63 $\pm$ 0.05 ^{bC}
12 weeks	0.77 $\pm$ 0.05 ^{aC}	0.99 $\pm$ 0.08 ^{bD}
Bioaccumulation factor (BAF)		
2 weeks	0.30 $\pm$ 0.04 ^{aA}	0.48 $\pm$ 0.04 ^{bA}
4 weeks	0.46 $\pm$ 0.07 ^{aA}	0.97 $\pm$ 0.10 ^{bB}
6 weeks	1.25 $\pm$ 0.21 ^{aB}	1.84 $\pm$ 0.34 ^{bC}
12 weeks	2.25 $\pm$ 0.14 ^{aC}	2.49 $\pm$ 0.28 ^{bD}
Translocation factor (TF)		
2 weeks	1.40 $\pm$ 0.09 ^{aD}	1.70 $\pm$ 0.08 ^{bD}
4 weeks	0.71 $\pm$ 0.04 ^{aC}	0.91 $\pm$ 0.07 ^{bC}
6 weeks	0.23 $\pm$ 0.05 ^{aB}	0.41 $\pm$ 0.03 ^{bB}
12 weeks	0.07 $\pm$ 0.01 ^{aA}	0.12 $\pm$ 0.03 ^{bA}

The means and SE ($n=5$) followed by a different lowercase letter within the same row denote significant difference at $p < 0.05$ between the uninoculated control and the bacterial-inoculated treatment at each planting period. A different uppercase letter within a column indicates a significant difference at $p < 0.05$ among different planting periods of each parameter

inoculated and uninoculated *Z. mays* L. were significantly higher than those in uninoculated plant (Table 4). The PEC and BAF of both bacterial-inoculated and uninoculated *Z. mays* L. increased with time. The highest PEC (0.99) and BAF (2.49) values were found in bacterial-inoculated *Z. mays* L. after transplantation for 12 weeks. In contrast with the PEC and BAF, the TF of both bacterial-inoculated and uninoculated *Z. mays* L. decreased with time. At 2 weeks after transplantation, the TF values of both bacterial-inoculated and

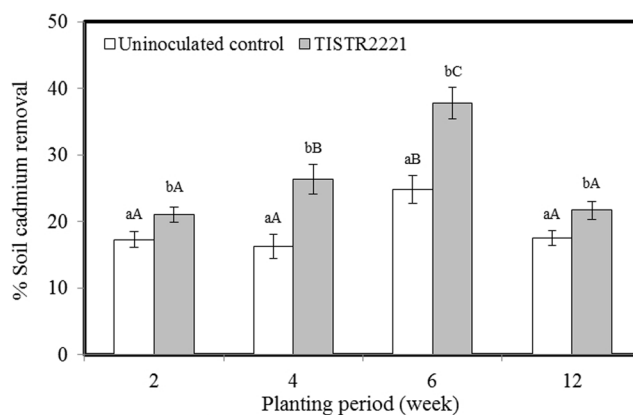


Fig. 3 Cadmium removal from contaminated soil after transplantation of bacterial-inoculated and uninoculated *Z. mays* L. for 12 weeks. The error bars are the SE ($n=5$), and a different lowercase letter denotes a significant difference at $p < 0.05$ between the uninoculated control and the bacterial-inoculated treatment at each planting period. A different uppercase letter indicates a significant difference at $p < 0.05$ among different planting periods

uninoculated *Z. mays* L. were higher than 1.0. The results suggest that *Z. mays* L. is effective at translocating cadmium from the roots to the shoots.

In general, metallophytes accumulate higher concentrations of a target metal than that in the soil (Ali et al. 2013). Therefore, plants with PEC and BAF values greater than 1.0 have the potential to be used for metal phytoextraction (Sun et al. 2009; Khaokaew and Landrot 2014). In addition, plants with TF values higher than 1.0 are recommended for metal phytoextraction (Yoon et al. 2006; Ali et al. 2013). In the phytoextraction process, a target metal could be translocated to the easily harvestable plant parts, e.g., the shoot tissues (Yoon et al. 2006). According to our results, bioaugmentation with *Micrococcus* sp. TISTR2221 significantly enhanced the PEC, BAF, and TF values in *Z. mays* L. even at high cadmium concentrations in the soil. The increase in these values could be the result of the increasing cadmium bioavailability by *Micrococcus* sp. TISTR2221. The change in soil metals into bioavailable forms can increase metal translocation from the roots to the shoots (Chiu et al. 2005).

The percentages of cadmium removal from contaminated soil by bacterial-inoculated *Z. mays* L. were higher than those in uninoculated *Z. mays* L. at all harvested periods (Fig. 3). The highest percentages of cadmium removal from uninoculated and bacterial-inoculated soils were found at 6 weeks after transplantation. From an economic point of view, Sheng et al. (2012) offers a good perspective to use *Z. mays* L. as an energy crop for metal phytoextraction. Therefore, *Z. mays* L. could be offered as a good candidate for a cadmium-accumulating plant. In addition, a combined approach using plants and microbes to mediate cadmium phytoextraction has been accepted as an effective, environmentally friendly, and low-cost cleanup option (Ali et al. 2013). It should be realized that inoculation of *Z. mays* L. with cadmium-resistant PGPB seems to be a valuable approach to mediate cadmium phytoextraction.

Conclusion

This work explores the application of a cadmium-resistant PGPB to promote plant yields and assist in cadmium accumulation in plant tissues. *Micrococcus* sp. TISTR2221 promoted the root elongation of *Z. mays* L. seedlings in the presence and absence of cadmium. Cadmium in soil had a slight effect on the plant growth in terms of root and shoot lengths and dry biomass. However, soil inoculation with *Micrococcus* sp. TISTR2221 can solve this problem because it had a stimulatory effect on plant growth. It increased plant uptake and the accumulation of cadmium in *Z. mays* L. roots and shoots. In addition, *Z. mays* L. is applicable for cadmium phytoextraction purposes because it had fast growth, a large biomass yield, and a high TF at the beginning of the growth

stage. It can be speculated that plant and microbe interactions play an important role in the bioremediation of cadmium-polluted soil. In conclusion, *Micrococcus* sp. TISTR2221 facilitates cadmium phytoextraction in *Z. mays* L.

Acknowledgments This research project was supported by the grant from Thailand Research Fund and Mahidol University (grant no. RSA5780026).

References

- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163:173–181
- Ahmad I, Akhtar MJ, Zahir ZA, Naveed M, Mitter B, Sessitsch A (2014) Cadmium-tolerant bacteria induce metal stress tolerance in cereals. *Environ Sci Pollut Res* 21:11054–11065
- Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals: concepts and applications. *Chemosphere* 91:869–881
- Anjum NA, Umar S, Iqbal M (2014) Assessment of cadmium accumulation, toxicity, and tolerance in Brassicaceae and Fabaceae plants: implications for phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res* 21:10286–10293
- Barocsi A, Csintalan Z, Kocsanyi L, Dushenkov S, Kuperberg JM, Kucharski R, Richter PI (2003) Optimizing phytoremediation of heavy metal-contaminated soil by exploiting plants' stress adaptation. *Int J Phytoremediation* 5:13–23
- Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2005) Cadmium toxicity in plant. *Braz J Plant Physiol* 17:21–34
- Chaney RL, Malik M, Lim YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, Baker AJM (1997) Phytoremediation of soil metals. *Curr Opin Biotechnol* 8:279–284
- Chanprasert M, Prapagdee B, Wongthanate J, Eiamphungporn W (2011) Isolation and screening of IAA-producing rhizobacteria from heavy metal contaminated areas, Proceedings in the 8th KU-KPS conference. Kasetsart University, Bangkok, pp 737–744
- Chen YX, He YF, Luo YM, Yu YL, Lin Q, Wong MH (2003) Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. *Chemosphere* 50:789–793
- Chen ZJ, Sheng XF, He LY, Huang Z, Zhang WH (2013) Effects of root inoculation with bacteria on the growth, Cd uptake and bacterial communities associated with rape grown in Cd-contaminated soil. *J Hazard Mater* 244–245:709–717
- Chiu KK, Ye ZH, Wong MH (2005) Enhanced uptake of As, Zn, and Cu by *Vetiveria zizanioides* and *Zea mays* using chelating agents. *Chemosphere* 60:1365–1375
- Faust MB, Christians NE (2000) Copper reduces shoot growth and root development of creeping bent grass. *Crop Sci* 40:498–502
- Glick BR (2010) Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol Adv* 28:367–374
- Guo J, Feng R, Ding Y, Wang R (2014) Applying carbon dioxide, plant growth-promoting rhizobacterium and EDTA can enhance the phytoremediation efficiency of ryegrass in a soil polluted with zinc, arsenic, cadmium and lead. *J Environ Manag* 141:1–8
- He LY, Chen ZJ, Ren GD, Zhang YF, Qian M, Sheng XF (2009) Increased cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1343–1348
- Jeong S, Moon HS, Nam K, Kim JY, Kim TS (2012) Application of phosphate solubilizing bacteria for enhancing bioavailability and phytoextraction of cadmium (Cd) from polluted soil. *Chemosphere* 88:204–210

- Jiang CY, Sheng XF, Qian M, Wang QY (2008) Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere* 72:157–164
- Khaokaew S, Landrot G (2014) A field-scale study of cadmium phytoremediation in a contaminated agricultural soil at Mae Sot district, Tak province, Thailand: (1) Determination of Cd-hyperaccumulating plants. *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.09.108
- Kumar P, Dushenkov V, Motto H, Raskin I (1995) Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ Sci Technol* 29:1232–1238
- Lebeau T, Braud A, Jezequel K (2008) Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environ Pollut* 153:497–522
- Liu DH, Jiang WS, Gao XZ (2003) Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic. *Biol Plant* 47:79–83
- Liu J, Qu W, Kadiiska MB (2009) Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:209–214
- Liu Z, Ge H, Li C, Zhao Z, Song F, Hu S (2015) Enhanced phytoextraction of heavy metals from contaminated soil by plant co-cropping associated with PGPR. *Water Air Soil Pollut* 226:29
- Ma Y, Rajkumar M, Freitas H (2009) Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *J Environ Manag* 90:831–837
- Mattina MJI, Lannucci-Berger W, Musante C, White JC (2003) Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environ Pollut* 124:375–378
- McGrath SP, Cunliffe CH (1985) A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co and Mn from soils and sewage sludges. *J Sci Food Agric* 36:794–798
- Meers E, Ruttens A, Hopgood M, Lesage E, Tack FMG (2005) Potential of *Brassica rapa*, *Cannabis sativa*, *Helianthus annuus* and *Zea mays* for phytoextraction of heavy metals from calcareous dredged sediment derived soils. *Chemosphere* 61:561–572
- Moreira H, Marques APMC, Franco AR, Rangel AOSS, Castro PML (2014) Phytomanagement of Cd-contaminated soils using maize (*Zea mays* L.) assisted by plant growth-promoting rhizobacteria. *Environ Sci Pollut Res* 21:9742–9753
- Murakami M, Ae N, Ishikawa S (2007) Phytoextraction of cadmium by rice (*Oryza sativa* L.), soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), and maize (*Zea mays* L.). *Environ Pollut* 145:96–103
- Phaenark C, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, Ngernsarsaruy C (2009) Cd and Zn accumulation in plants from the Padaeng zinc mine area. *Int J Phytoremediation* 11:479–495
- Pongsakul P, Attajarusit S (1999) Assessment of heavy metal contaminations in soil. *Thai J Soils Fertil* 21:71–82 (in Thai)
- Prapagdee B, Chanprasert M, Mongkolsuk S (2013) Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus*. *Chemosphere* 92:659–666
- Sanità di Toppi L, Gabbriellini R (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* 41:105–130
- Sheng XF, Sun LN, Huang Z, He LY, Zhang WH, Chen ZJ (2012) Promotion of growth and Cu accumulation of bio-energy crop (*Zea mays*) by bacteria: implications for energy plant biomass production and phytoremediation. *J Environ Manag* 103:58–64
- Simmons RW, Pongsakul P, Chaney L, Saiyasitpanich D, Klinphoklap S, Nobuntou W (2003) The relative exclusion of zinc and iron from rice grain in relation to rice grain cadmium as compared to soybean: implications for human health. *Plant Soil* 257:163–170
- Simmons RW, Pongsakul P, Saiyasitpanich D, Klinphoklap S (2005) Elevated levels of cadmium and zinc in paddy soils and elevated levels of cadmium in rice grain downstream of a zinc mineralized area in Thailand: implications for public health. *Environ Geochem Health* 27:501–511
- Sun Y, Zhou Q, Wang L, Liu W (2009) Cadmium tolerance and accumulation characteristics of *Bidens pilosa* L. as a potential Cd-hyperaccumulator. *J Hazard Mater* 161:808–814
- Teixeira C, Almeida MR, da Silva MN, Bordalo AA, Mucha AP (2014) Development of autochthonous microbial consortia for enhanced phytoremediation of salt-marsh sediments contaminated with cadmium. *Sci Total Environ* 493:757–765
- Thawornchaisit U, Polprasert C (2009) Evaluation of phosphate fertilizers for the stabilization of cadmium in highly contaminated soils. *J Hazard Mater* 165:1109–1113
- Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, Boulet J, Adriaensen K, Ruttens A, Thewys T, Vassilev A, Meers E, Nehnevajova E, Van der Lelie D, Mench M (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ Sci Pollut Res* 16: 765–794
- Wang M, Zou J, Duan A, Jiang W, Liu D (2007) Cadmium accumulation and its effects on metal uptake in maize (*Zea mays* L.). *Bioresour Technol* 98:82–88
- Wang Y, Yan A, Dai J, Wang NN, Wu D (2012) Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in *Chlorophytum comosum*: a popular ornamental plant and potential Cd hyperaccumulator. *Environ Monit Assess* 184:929–937
- Yokota A, Khamna S, Peberdy JF, Lumyong S (2010) Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *Eurasia J Biosci* 4:23–32
- Yoon J, Cao X, Zhou Q, Ma L (2006) Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci Total Environ* 368:456–464
- Zhang S, Li T, Huang H, Zou T, Zhang X, Yu H, Zheng Z, Wang Y (2012) Cd accumulation and phytostabilization potential of dominant plants surrounding mining tailings. *Environ Sci Pollut Res* 19:3879–3888

Phytoremediation of cadmium-polluted soil by *Chlorophytum laxum* combined with chitosan-immobilized cadmium-resistant bacteria

Benjaphorn Prapagdee¹ · Jiraporn Wankumpha¹

Received: 18 January 2017 / Accepted: 20 June 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract This study examined the performance of the chitosan-immobilized cadmium-resistant bacteria *Arthrobacter* sp. and *Micrococcus* sp. on cadmium phytoremediation by *Chlorophytum laxum* in cadmium-polluted soil. These immobilized cadmium-resistant bacteria can survive in cadmium-contaminated soil and significantly increased soil cadmium solubility, but the ability of chitosan-immobilized cells to increase cadmium solubility was lower than that of free cells. A pot experiment demonstrated that chitosan-immobilized *Micrococcus* sp. promoted the growth of *C. laxum* planted in cadmium-contaminated soil. A significant increase in the cadmium concentration in the roots and aboveground parts of *C. laxum* was found in plants inoculated with free and chitosan-immobilized cells of these bacteria. The performance of *Arthrobacter* sp. free cells to augment cadmium accumulation in *C. laxum* was a little bit better than that of chitosan-immobilized *Arthrobacter* sp., except at 9 weeks after planting. The phytoextraction coefficient, bioaccumulation factor, and translocation factor of *C. laxum* inoculated with free and chitosan-immobilized cells of cadmium-resistant bacteria were higher than those of the uninoculated control and increased with time. Our findings suggest that chitosan-immobilized cells can be exploited to enhance the efficiency of cadmium phytoremediation by *C. laxum*.

Keywords Cadmium-resistant bacteria · Phytoremediation · *Chlorophytum Laxum* · Chitosan flakes · Cell immobilization

Introduction

Cadmium (Cd) is a heavy metal that is well-known to be toxic to most living organisms when present at an excessive concentration. Cadmium has been implicated in food safety issues; prolonged consumption of crops and their products grown in cadmium-polluted soil has significant deleterious effects on human health due to its high toxicity (Li et al. 2006). Agricultural sites worldwide have been contaminated by cadmium due to mining and smelting activity. In Thailand, a cadmium-contaminated agricultural area located in the Mae Sot district, Tak province (Northern Thailand), showed a cadmium concentration in the agricultural soils as high as 284 mg kg⁻¹ (Simmons et al. 2005), which exceeded the Thailand standard for cadmium (37 mg kg⁻¹) in agricultural soil. Agricultural soil and grains of crop plants (e.g., rice and soybeans) in close proximity to a mining area have been found to be highly contaminated with cadmium associated with the suspended sediment transported to the agricultural land via irrigation (Simmons et al. 2003, 2005).

The problem of cadmium contamination in arable soil and in food crops planted in this area deserves special attention and an urgent solution. To date, several researchers have developed natural, environment-friendly, cost-effective technologies that have high public acceptance to clean up heavy metal-polluted areas. Biological remediation is the use of plants and microorganisms to remove toxic contaminants from the environment and is considered to be the most effective method (Ullah et al. 2015). Phytoremediation has the potential to remediate cadmium-polluted soil. Many plants have been used for phytoremediation of cadmium-

Responsible editor: Elena Maestri

✉ Benjaphorn Prapagdee
benjaphorn.pra@mahidol.ac.th

¹ Laboratory of Environmental Biotechnology, Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom 73170, Thailand

68	contaminated soil, e.g., <i>Solanum nigrum</i> L. (Wei et al. 2010),	strategy to improve cadmium phytoremediation by using	121
69	<i>Lolium perenne</i> L. (Lambrechts et al. 2011), and <i>Helianthus</i>	chitosan-immobilized bacterial cells for soil bioaugmentation	122
70	<i>annuus</i> L. (Prapagdee et al. 2013).	in cadmium-polluted sites.	123
71	Due to concerns about food safety in phytoremediation, the		
72	use of ornamental plants for the phytoremediation of		
73	cadmium-contaminated soil has become a new, promising		
74	technique. The use of ornamental plants to clean up contam-	Materials and methods	124
75	inated soil can simultaneously mitigate contaminated soil and		
76	beautify the environment (Liu et al. 2008). Some ornamental	Cadmium-resistant bacteria	125
77	plants have been tested for heavy metal phytoextraction, e.g.,		
78	<i>Chlorophytum comosum</i> (Wang et al. 2012), <i>Tagetes patula</i>	Two strains of cadmium-resistant bacteria, the exopolymer-	126
79	(Sun et al. 2011), <i>Calendula officinalis</i> , and <i>Althaea rosea</i>	producing <i>Arthrobacter</i> sp. TISTR2219 (Prapagdee et al.	127
80	(Liu et al. 2008). However, the efficiency of heavy metal	2012) and indole-3-acetic acid (IAA)-producing	128
81	phytoextraction has limitations (Ali et al. 2013). Heavy metal	<i>Micrococcus</i> sp. TISTR2220 (Prapagdee et al. 2013), were	129
82	ions are tightly bound to soil particles, resulting in the limited	grown in Luria Bertani (LB) broth (Criterion, USA) according	130
83	bioavailability of contaminants in soil, and heavy metal tox-	to a method previously described by Prapagdee et al. (2013).	131
84	icity can retard plant growth (Lambrechts et al. 2011; Mahar		
85	et al. 2016). Increasing the bioavailable fraction of cadmium	Preparation of the chitosan-immobilized bacterial cells	132
86	in the rhizosphere and enhancing cadmium accumulation in	and their survival in storage	133
87	plant tissues and plant growth via inoculation with cadmium-		
88	resistant bacteria have been reported by several investigators	To prepare chitosan-immobilized bacterial cells, flake chito-	134
89	(Sheng and Xia 2006; He et al. 2009).	san (Taming Enterprises Co. Ltd., Thailand) with a 98% de-	135
90	Microbial bioaugmentation in phytoremediation technolo-	gree of deacetylation was prepared by grinding and sieving to	136
91	gy has been reported by several investigators (Rajkumar et al.	a 2-mm-diameter. The surface area and average pore size of	137
92	2012; Khonsue et al. 2013; Sangthong et al. 2016). One prob-	the flake chitosan before immobilization were determined ac-	138
93	lem encountered during microbial bioaugmentation is stress	cording to the Brunauer–Emmett–Teller (BET) surface area	139
94	imposed by cadmium toxicity. In addition, free bacterial cells	and porosity. Each strain of cadmium-resistant bacteria was	140
95	are not suitable for direct use in heavy metal-contaminated soil	cultured with flake chitosan according to the method of	141
96	because they must compete with the indigenous soil microflora.	Gentili et al. (2006) and Khondee et al. (2012) with	142
97	Additionally, a fresh cell preparation is complicated, opti-	modifications.	143
98	mal conditions are necessary for cultivation, and cells are eas-	Briefly, an overnight bacterial inoculum was inoculated in	144
99	ily contaminated. Immobilization methods have recently been	M9 minimal medium and adjusted to pH 6.5, and 2% (w/v) of	145
100	employed for bioremediation processes because immobiliza-	flake chitosan was added to give an OD ₆₀₀ of ~0.1. The cul-	146
101	tion improves microbial resistance to stressful conditions and	ture was incubated at 150 rpm and 28 °C in a rotary shaker for	147
102	promotes the efficiency of bioremediation (Dzionek et al.	3 days. The culture was filtrated through Whatman filter paper	148
103	2016). Chitosan is a biodegradable and non-toxic material that	No. 4 and washed twice with 50 mM phosphate buffer	149
104	chelates heavy metal ions because it contains free amino	(pH 7.0) to remove unattached cells. Chitosan-immobilized	150
105	groups, and chitosan has been widely used for the removal	bacterial cells were air-dried in a biological safety cabinet	151
106	of heavy metals that contaminate water (Wang et al. 2007).	for 4 h. Chitosan-immobilized bacterial cells were kept in a	152
107	The development of bacterial cells immobilized on a bio-	sterile polypropylene tube at 4 °C. To test the survival rate of	153
108	carrier material is necessary. Immobilized cells can tolerate a	chitosan-immobilized bacterial cells before and after storage	154
109	suboptimal environment and are protected against the indige-	at 4 °C for 2 and 4 weeks, viable cells adsorbed on the flake	155
110	nous soil microflora (Jézéquel et al. 2005).	chitosan were enumerated according to Gentili et al. (2006). In	156
111	This study aimed to evaluate the efficiency of chitosan-	addition, the surface appearance of chitosan-immobilized bac-	157
112	immobilized cadmium-resistant bacteria on increasing cadmi-	terial cells was observed under a scanning electron micro-	158
113	um bioavailability in polluted soil and promoting cadmium	scope (SEM) (JSM-5410 LV, JEOL, Japan). Briefly, the sam-	159
114	phytoremediation by <i>Chlorophytum laxum</i> var. <i>bichetii</i> or	ples were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate	160
115	<i>Chlorophytum bichetii</i> , a popular ornamental foliage plant,	buffer (pH 7.2) for 1 h and washed with phosphate buffer,	161
116	compared to that of the free bacterial cells. This is the first	followed by distilled water. The samples were dehydrated by	162
117	study that elucidated the role of chitosan-immobilized cadmi-	using a series of ethanol at concentrations ranging from 30 to	163
118	um-resistant bacteria on the promotion of plant growth with a	99.99% for 15 min, respectively. The samples were dried by	164
119	concurrent increase in cadmium accumulation by <i>C. laxum</i> in	critical point dryer, and desiccated samples were coated with	165
120	pot experiments. This study intended to develop a novel	gold and mounted on a stub with graphite tape.	166

167	Cadmium-contaminated soil collection	
168	The cadmium-contaminated soil was collected from a	
169	highly cadmium-contaminated agricultural field in the	
170	Mae Sot district, Tak province (Northern Thailand) (N	
171	16° 40.593, E 098° 37.630). Cadmium-contaminated	
172	soil was air-dried at room temperature for 3 weeks;	
173	then, the soil was sieved through a 2-mm sieve before	
174	its physical and chemical property analysis. In addition,	
175	the concentration of the bioavailable cadmium and total	
176	cadmium was also analyzed. To determine the total cad-	
177	mium, the soil was extracted with a mixture of 1:3 v/v	
178	concentrated nitric acid (HNO ₃) (Merck, Germany) and	
179	concentrated hydrochloric acid (HCl) (Merck, Germany).	
180	To determine the bioavailable cadmium, the soil was	
181	extracted with diethylenetriamine pentaacetic acid	
182	(DTPA) (Ajax, Australia) (Quevauviller et al. 1998;	
183	Faust and Christians 2000). The total cadmium and bio-	
184	available cadmium concentrations were determined by	
185	flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS)	
186	(Varian spectra model AA240FS, USA). The detection	
187	limit of cadmium by FAAS was 0.01 mg kg ⁻¹ .	
188	The ability of chitosan-immobilized bacteria to survive	
189	and increase cadmium solubility	
190	in cadmium-contaminated soil	
191	The cadmium-contaminated soil was sterilized by autoclaving	
192	at 121 °C, 30 min for two times with a daily interval.	
193	Chitosan-immobilized bacteria were individually inoculated	
194	in the sterile cadmium-contaminated soil in a sterile 50-mL	
195	polypropylene tube. All of the tubes were incubated at room	
196	temperature with shaking in the dark. The number of viable	
197	bacterial cells in cadmium-contaminated soil was monitored at	
198	3, 5, 10, 15, and 20 days from inoculation using the standard	
199	plate count method on LB agar.	
200	To test the effect of chitosan-immobilized bacteria on	
201	increasing cadmium solubility, each strain of chitosan-	
202	immobilized bacteria was inoculated in the cadmium-	
203	contaminated soil. To compare chitosan-immobilized	
204	bacteria, the free cells of each cadmium-resistant bacte-	
205	rium were inoculated in the cadmium-contaminated soil.	
206	Soil without bacterial inoculation and soil added with	
207	chitosan flakes were carried out as the control treat-	
208	ments. After incubation for 10 days, the soil was col-	
209	lected and separated into two parts to analyze the total	
210	cadmium concentration (acid-digested) and bioavailable	
211	(DTPA-extractable) cadmium. The soil cadmium concen-	
212	tration was expressed in terms of the bioavailable and	
213	non-bioavailable forms. The concentration of the non-	
214	bioavailable forms was calculated by subtracting the	
215	concentration of bioavailable cadmium from the total	
216	cadmium concentration.	
	Pot experiments of cadmium phytoremediation	217
	augmented with chitosan-immobilized bacteria	218
	<i>Preparation of C. laxum</i>	219
	<i>C. laxum</i> was propagated from the hypogeal part of the mature	220
	plants and planted in uncontaminated garden soil for 2 months	221
	before transplantation to cadmium-contaminated soil. Plants	222
	were grown in the greenhouse with natural light and watered	223
	daily. The fresh weight and the lengths of root and above-	224
	ground parts of 2-month-old <i>C. laxum</i> were measured before	225
	planting.	226
	<i>Experimental setup of cadmium phytoremediation</i>	227
	<i>by C. laxum</i>	228
	Pot experiments to evaluate cadmium phytoremediation by	229
	<i>C. laxum</i> augmented with chitosan-immobilized bacterial	230
	cells compared to free bacterial cells were carried out accord-	231
	ing to Sangthong et al. (2016). Free cell inoculants of	232
	<i>Arthrobacter</i> sp. and <i>Micrococcus</i> sp. were prepared for soil	233
	bioaugmentation according to a previously described method	234
	by Prapagdee et al. (2013). The inoculum concentration of	235
	<i>Arthrobacter</i> sp. and <i>Micrococcus</i> sp. in cadmium-	236
	contaminated soil was approximately 10 ⁶ CFU g ⁻¹ soil (Liu	237
	et al. 2015). One plant was planted in each plastic pot filled	238
	with 3.0 kg of cadmium-contaminated soil.	239
	Six treatments in triplicate were performed in a completely	240
	randomized design and included (i) 2-month-old <i>C. laxum</i>	241
	planted in cadmium-contaminated soil (uninoculated control)	242
	(UC); (ii) 2-month-old <i>C. laxum</i> planted in cadmium-	243
	contaminated soil with 0.1% (w/w) chitosan flakes (CH);	244
	(iii) 2-month-old <i>C. laxum</i> planted in cadmium-	245
	contaminated soil inoculated with free cells of <i>Arthrobacter</i>	246
	sp. (<i>Arthrobacter</i> sp.); (iv) 2-month-old <i>C. laxum</i> planted in	247
	cadmium-contaminated soil inoculated with free cells of	248
	<i>Micrococcus</i> sp. (<i>Micrococcus</i> sp.); (v) 2-month-old	249
	<i>C. laxum</i> planted in cadmium-contaminated soil inoculated	250
	with chitosan-immobilized <i>Arthrobacter</i> sp. (CH-	251
	<i>Arthrobacter</i> sp.); and (vi) 2-month-old <i>C. laxum</i> planted in	252
	cadmium-contaminated soil inoculated with chitosan-	253
	immobilized <i>Micrococcus</i> sp. (CH- <i>Micrococcus</i> sp.).	254
	Before planting, the inoculants of free cells and chitosan-	255
	immobilized cells of <i>Arthrobacter</i> sp. and <i>Micrococcus</i> sp.	256
	were applied in the soil (except UC and CH) in the area of	257
	the plant root zone and homogeneously mixed. Free bacterial	258
	cells and chitosan-immobilized cells were repeatedly inocu-	259
	lated into the soil at 3 and 6 weeks from the start of the exper-	260
	iment. The plastic pots were randomly placed in a green-	261
	house with natural light during the daytime at an aver-	262
	age temperature of 32.1 ± 0.8 °C and relative humidity	263
	of 69.6 ± 5.8%.	264

Collection and analysis of plants and soil

Plant and soil samples were harvested at 3, 6, and 9 weeks after planting in contaminated soil. At the same day of the harvest periods of 3 and 6 weeks, free cells and chitosan-immobilized cells were re-inoculated in the soil of the remaining pots which were collected at 6 and 9 weeks. The flowering stage of *C. laxum* is approximately 4 months or before the last harvest period (9 weeks). The plants were carefully removed from the pots and rinsed with running tap water, followed by several rinses with distilled water, and then soaked in 0.01 M hydrochloric acid for 5 s, followed by a distilled water rinse (Zhang et al. 2014). The roots and aboveground part of the plants were separated, and their length was measured; then, they were oven-dried at 70 °C for 48 h before being weighted. The dried roots and the aboveground parts were ground and acid-digested according to Sangthong et al. (2016). The contaminated soil around the plant root zone was collected. The total and bioavailable cadmium concentrations in the soil were determined by the methods described above. The cadmium concentrations in the soil and plant samples were used to determine the phytoextraction coefficient (PEC) (Kumar et al. 1995), bioaccumulation factor (BAF) (Khaokaew and Landrot 2015), and translocation factor (TF) (Mattina et al. 2003).

Statistical analysis

The data of cadmium solubilization and cadmium phytoremediation in pot experiments were expressed as mean values and standard errors at least in triplicate. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare different treatments at 95% confidence, and Duncan's multiple range test was performed to determine the statistical significance at a significance ($p < 0.05$) using the SPSS 17 software.

Results and discussion

External characteristics and external morphology of the chitosan flakes and chitosan-immobilized cadmium-resistant bacteria

The external morphology of the chitosan flakes without bacterial cells (Fig. 1a) and chitosan-immobilized *Arthrobacter* sp. (Fig. 1b) and *Micrococcus* sp. (Fig. 1c) was observed under SEM at a 10,000× magnification. The surface area and pore size of the chitosan flakes as determined by BET were 4.268 m² g⁻¹ and 19.15 nm, respectively. According to the pore size categorization of Rouquerol et al. (1994), these chitosan flakes had meso-pores (i.e., between 2 and 50 nm). The large numbers of bacterial cells adhered to the surface of the chitosan flakes can be seen in the SEM micrographs shown in Fig. 1b, c. Gentili et al. (2006) found that the best

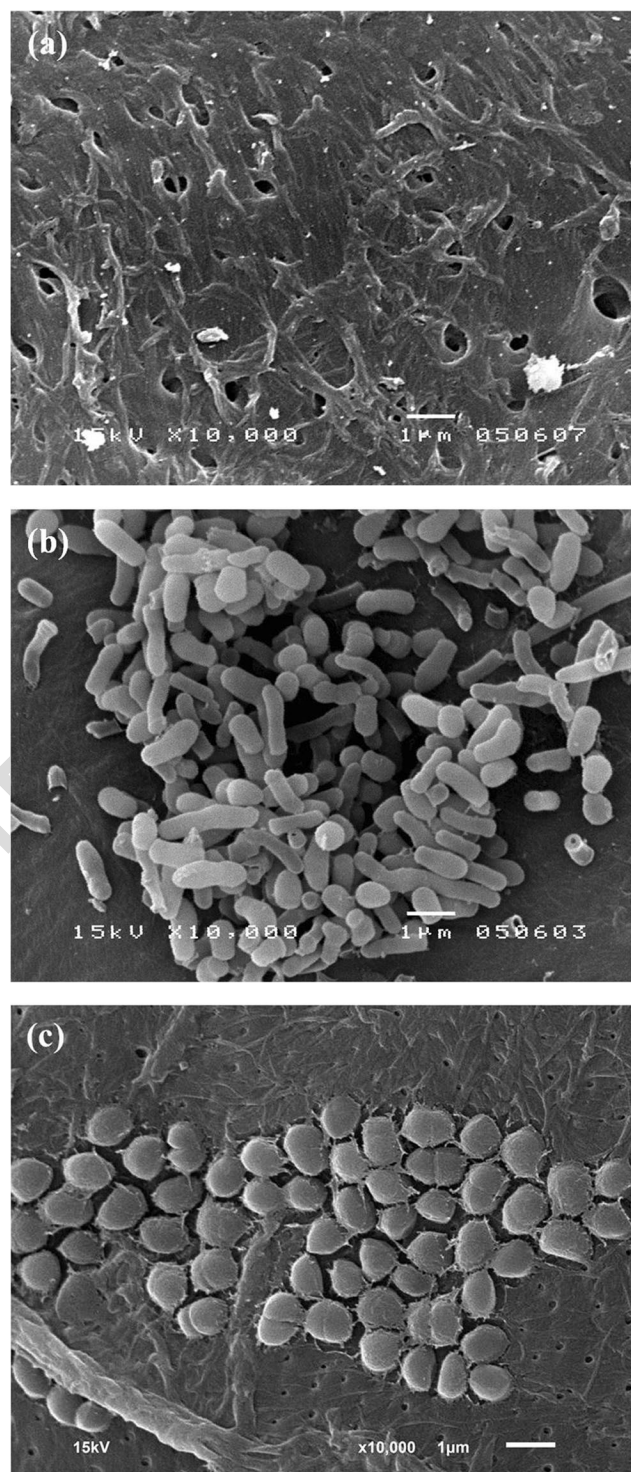


Fig. 1 Scanning electron micrographs of **a** chitosan flakes and **b** chitosan flake-immobilized *Arthrobacter* sp. and **c** chitosan flake-immobilized *Micrococcus* sp. at a 10,000 magnification

growth condition for bacteria was on the chitosan surface. The bacterial cells were immobilized on chitosan flakes via adsorption due to electrostatic binding between the cells and chitosan surface, but the cells could not pass through the chitosan pores due to the very small pore size. Electrostatic binding on the

surface of a material is similar to physical adsorption, but the probability of microorganisms leaking from the surface is low (Dzionek et al. 2016). In addition, Kumar et al. (2005) reported that the chito-oligosaccharide molecule (low molecular weight) has free-NH₃⁺ and binds to the negative charges on the bacterial cell surface to bring about antibacterial activity against *Bacillus cereus*. However, the high molecular weight of native chitosan has low antibacterial activity, and it is a suitable natural carrier for cell immobilization (Gentili et al. 2006; Aider 2010). *Candida tropicalis* PHB5 was immobilized on sugarcane bagasse by electrostatic forces or covalent bonding between yeast cells and the carrier surface and was embedded within the porous stalks of sugarcane bagasse (Basak et al. 2014).

The viability of chitosan-immobilized cadmium-resistant bacteria during storage and in cadmium-contaminated soil

The viable cell numbers of *Arthrobacter* sp. and *Micrococcus* sp. adhered to the chitosan flakes were 9.89 and 9.32 log₁₀ CFU g⁻¹, respectively. Chitosan-immobilized bacteria were kept in a refrigerator at 4 °C, and their viability was monitored at 2 and 4 weeks after storage at 4 °C. The viable cell numbers of CH-*Arthrobacter* sp. after storage for 2 and 4 weeks were 8.68 and 7.34 log₁₀ CFU g⁻¹, respectively. The viable cell numbers of CH-*Micrococcus* sp. after 2 and 4 weeks of storage were 8.70 and 7.45 log₁₀ CFU g⁻¹, respectively. The number of viable cells of both bacteria decreased with storage time. The cell number reduction percentages for CH-*Arthrobacter* sp. and CH-*Micrococcus* sp. after 4 weeks of storage were 25.8 and 20.1%, respectively. These immobilized cells of both cadmium-resistant bacteria had good viability (more than 70% survival) after storage at 4 °C for 1 month, probably because the microbial metabolism was reduced by the low temperature, which resulted in high survival. *Rhodopseudomonas palustris* PS3, a plant growth-promoting rhizobacterium, stored at 4 °C for 1 month had a survival rate greater than 70%, but the survival rate decreased to less than 60% at 25 °C (Lee et al. 2016). Our findings suggested that chitosan flakes could be a suitable carrier for bacterial immobilization because the viable cells in chitosan-immobilized bacterial cells were not too much more declined after storage. Gentili et al. (2006) reported that chitosan was a good material for the immobilization of *Rhodococcus corynebacterioides*.

The physical and chemical properties of the contaminated soil were as follows: a sandy loam soil texture, 2.02% organic matter, 0.10% total nitrogen, a cation exchange capacity of 9.8 cmol kg⁻¹, pH 7.5, 13.2 mg kg⁻¹ available phosphorus, 88.1 mg kg⁻¹ extractable potassium, 3893 mg kg⁻¹ extractable calcium, 239 mg kg⁻¹ extractable magnesium, 18 mg kg⁻¹ extractable sodium, 50.35 mg of total cadmium kg⁻¹, and 9.18 mg of bioavailable cadmium kg⁻¹. The viable cell numbers of CH-*Arthrobacter* sp. and CH-*Micrococcus* sp. in

cadmium-contaminated soil, respectively, increased from 6.75 and 6.35 log₁₀ CFU g⁻¹ of soil on the first day of inoculation to 8.15 and 7.60 log₁₀ CFU g⁻¹ of soil after 5 days (Fig. 2). The decreasing percentages of viable cells of CH-*Arthrobacter* sp. and CH-*Micrococcus* sp. in contaminated soil at 20 days of incubation were 10.4 and 30.1%, respectively. Our results indicated that the survival of CH-*Micrococcus* sp. in contaminated soil was less than that of CH-*Arthrobacter* sp. due to the higher cadmium resistance of *Arthrobacter* sp. compared to *Micrococcus* sp. The higher cadmium resistance of *Arthrobacter* sp. was indicated by a higher minimum inhibitory concentration (MIC) of cadmium (1200 mg L⁻¹) (Prapagdee et al. 2012) than for *Micrococcus* sp. (1000 mg L⁻¹) (Prapagdee et al. 2013). Cell immobilization assists in preserving cell viability and cellular activity by increasing the cell tolerance to a high pollutant concentration, which results in an increase in the bioremediation efficiency (Dzionek et al. 2016).

Increased cadmium solubility in contaminated soil by chitosan-immobilized cadmium-resistant bacteria

Table 1 shows the concentrations of the bioavailable and non-bioavailable forms of cadmium in soil with and without inoculation with chitosan-immobilized cells compared to inoculation with free cells. The highest concentration of bioavailable cadmium was found in soil inoculated with *Arthrobacter* sp. free cells and was higher than the uninoculated control by 46.2%. The performance of *Micrococcus* sp. free cells and CH-*Arthrobacter* sp. in terms of increased cadmium solubility was not different. The activity of CH-*Arthrobacter* sp. and CH-*Micrococcus* sp. in terms of increased cadmium bioavailability was lower than that of free cells of *Arthrobacter* sp. and *Micrococcus* sp. by 9.1 and 12%, respectively. The results indicated that chitosan-immobilized cells were less able to promote cadmium solubility than free cells, possibly because free cells are in direct contact with cadmium on soil particles, while immobilized cells are adhered to the chitosan surface (Fig. 1b, c), making it more difficult to bind cadmium. The

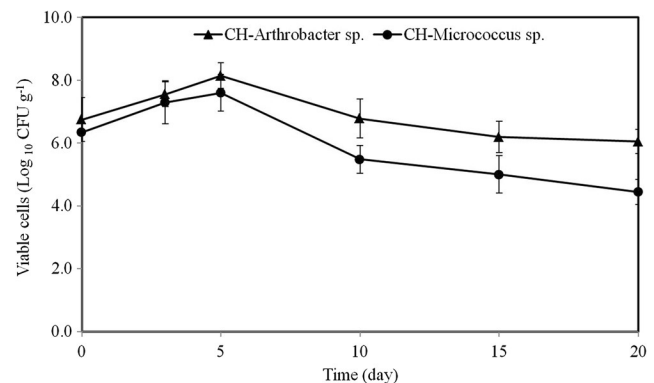


Fig. 2 Viability of chitosan-immobilized cadmium-resistant bacteria inoculated in the cadmium-contaminated soil

Table 1 Cadmium concentration (non-bioavailable and bioavailable forms) (mg kg^{-1}) in the cadmium-contaminated soil as affected by different treatments

Treatment	Soil cadmium concentration (mg kg^{-1})	
	Non-bioavailable form	Bioavailable form
UC	53.28 ± 1.13^c	4.22 ± 0.19^a
CH	52.95 ± 1.42^c	4.44 ± 0.18^a
<i>Arthrobacter</i> sp.	47.23 ± 1.16^a	6.17 ± 0.22^d
<i>Micrococcus</i> sp.	49.62 ± 2.09^{ab}	5.74 ± 0.13^c
CH- <i>Arthrobacter</i> sp.	48.43 ± 0.96^{ab}	5.61 ± 0.17^c
CH- <i>Micrococcus</i> sp.	51.20 ± 1.04^{bc}	5.05 ± 0.21^b

Mean values and SE ($n = 3$) followed by the same letter within the same column are not significantly different ($p < 0.05$) according to Duncan's multiple range test

increased bioavailable cadmium in soil due to *Arthrobacter* sp. and *Micrococcus* sp. might involve cadmium binding to exopolymers and the bacterial cell wall, as previously mentioned by Khonsue et al. (2013) and Prapagdee et al. (2013), respectively. In addition, some bacteria can transform metals in soil into soluble or bioavailable forms via mechanisms involving siderophores, organic acids, biosurfactants, biomethylation, and redox processes (Ullah et al. 2015).

Effects of chitosan-immobilized bacteria inoculation on plant growth

A pot experiment determined the effects of free cells and chitosan-immobilized cell inoculation on the growth of *C. laxum* in cadmium-contaminated soil. The average fresh weight and the lengths of the roots and aboveground parts of 2-month-old *C. laxum* before planting were 40.33 ± 3.66 g, 18.9 ± 2.3 cm, and 29.3 ± 1.6 cm, respectively. A significant increase in the root and aboveground part lengths of *C. laxum* inoculated with free cells and immobilized cells of

Arthrobacter sp. and *Micrococcus* sp. compared to the uninoculated control was not seen at any time after planting (data not shown). A cadmium concentration of up to 20 mg kg^{-1} has been shown to inhibit some growth indicators of *Chlorophytum comosum* (Wang et al. 2012). In addition, we also found that the density of the roots and leaves of plants inoculated with CH-*Micrococcus* sp. or *Micrococcus* sp. free cells was higher than that of the uninoculated control. *Micrococcus* sp. had a stimulatory effect on the horizontal or lateral root and aboveground part growth of *C. laxum* planted in cadmium-contaminated soil, as evidenced by the dry weight results for the roots and aboveground parts shown in Table 2 at 6 and 9 weeks.

Significantly ($p < 0.05$) higher dry weights of the roots and aboveground parts were found for *C. laxum* inoculated with either *Micrococcus* sp. free cells or CH-*Micrococcus* sp., except at 3 weeks after planting. At 9 weeks after planting, *C. laxum* inoculated with CH-*Micrococcus* sp. increased the dry weights of the roots and aboveground parts by 1.5- and 1.2-fold compared to *C. laxum* applied with chitosan, respectively. There was no significant difference ($p < 0.05$) on increasing of dry weights of the roots and aboveground parts between *Micrococcus* sp. free cells and CH-*Micrococcus* sp. at 9 weeks. The *C. laxum* root dry weights were higher than the aboveground part dry weights for all treatments at all times after planting, probably because of the tuberous hypogeal part of *C. laxum*. The increase in plant biomass of *C. laxum* inoculated with CH-*Micrococcus* sp. or *Micrococcus* sp. free cells could be due to the action of IAA produced by *Micrococcus* sp. (Prapagdee et al. 2013). IAA produced by cadmium-resistant bacteria can augment plant cadmium stress responses and stimulate plant growth (He et al. 2009; Chen et al. 2010; Sangthong et al. 2016). In addition, no effect of the chitosan flakes on plant growth was observed, which corresponded well to the results of Wang et al. (2007), who found that chitosan application did not affect the growth of *Elsholtzia splendens* plants or the activity of mycorrhizal fungi.

Table 2 Dry biomass of *C. laxum* cultivated in the cadmium-contaminated soil for 3, 6, and 9 weeks in the different treatments

Treatment	Root dry weight (g^{-1})			Aboveground part dry weight (g^{-1})		
	3 weeks	6 weeks	9 weeks	3 weeks	6 weeks	9 weeks
UC	2.01 ± 0.08^{aB}	2.62 ± 0.21^{aB}	2.80 ± 0.17^{aB}	1.56 ± 0.23^{aA}	1.72 ± 0.42^{aA}	1.80 ± 0.35^{aA}
CH	1.97 ± 0.13^{aB}	2.49 ± 0.14^{aB}	2.81 ± 0.24^{aB}	1.55 ± 0.15^{aA}	1.69 ± 0.08^{aA}	1.85 ± 0.13^{aA}
<i>Arthrobacter</i> sp.	1.96 ± 0.08^{aB}	2.53 ± 0.17^{aB}	2.78 ± 0.13^{aB}	1.66 ± 0.09^{aA}	1.78 ± 0.16^{aA}	1.88 ± 0.12^{aA}
<i>Micrococcus</i> sp.	2.13 ± 0.15^{aB}	3.01 ± 0.15^{bB}	4.31 ± 0.27^{bB}	1.85 ± 0.21^{aA}	2.18 ± 0.14^{bA}	2.32 ± 0.17^{bA}
CH- <i>Arthrobacter</i> sp.	2.03 ± 0.14^{aB}	2.75 ± 0.13^{aB}	2.91 ± 0.10^{aB}	1.63 ± 0.14^{aA}	1.68 ± 0.12^{aA}	1.87 ± 0.06^{aA}
CH- <i>Micrococcus</i> sp.	2.15 ± 0.14^{aB}	3.26 ± 0.11^{cB}	4.25 ± 0.17^{bB}	1.82 ± 0.15^{aA}	2.13 ± 0.29^{bA}	2.28 ± 0.08^{bA}

Mean values and SE ($n = 3$) followed by a different lowercase letter within the same column indicate a significant difference at $p < 0.05$ among different treatments. A different uppercase letter within the same row indicates a significant difference at $p < 0.05$ of dry weights of the roots and the aboveground parts at each time after planting according to Duncan's multiple range test

Inoculation with chitosan-immobilized bacteria enhanced cadmium uptake by *C. laxum*

In all treatments, *C. laxum* took up considerable amounts of cadmium, particularly in the roots (Table 3). The cadmium concentration in the roots slightly increased with time, except that of *C. laxum* inoculated with free cells of *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp., and CH-*Arthrobacter* sp. which had the highest cadmium concentrations at 6 weeks. The cadmium concentration in the aboveground part of *C. laxum* increased with time in most cases. Ghosh and Singh (2005) stated that plants can extract cadmium from the soil and transport it via the xylem into the aboveground part, where it accumulates. This suggests that cadmium could accumulate in *C. laxum* until a certain toxic cadmium level is reached. Because cadmium toxicity retards plant growth, cadmium translocation to the aboveground parts of the plant substantially decreases when the plant accumulates a high cadmium concentration (Wang et al. 2012). More cadmium was accumulated in the roots of *C. laxum* because the typical morphology of the hypogeal part is a tuberous rhizome, which is thickened and fusiform. In addition, a large amount of cadmium can be absorbed and stored in the vacuoles in root cells as well as in dead cells, which results in a low translocation rate of cadmium to the aboveground parts of the plant (Grant et al. 1998; Shute and Macfie 2006).

The cadmium content in the roots and aboveground parts of *C. laxum* inoculated with either free cells or immobilized cells of *Arthrobacter* sp. or *Micrococcus* sp. significantly increased ($p < 0.05$) compared to the uninoculated control and *C. laxum* applied with chitosan alone (Table 3). The highest cadmium concentrations in the roots and aboveground parts of *C. laxum* were found in *C. laxum* inoculated with *Arthrobacter* sp. free cells ($26.05 \pm 1.25 \text{ mg kg}^{-1}$ at 6 weeks and $19.95 \pm 0.70 \text{ mg kg}^{-1}$ at 9 weeks). Nine weeks after exposure to cadmium, cadmium accumulation in the root and aboveground parts of *C. laxum* inoculated with

Arthrobacter sp. free cells was higher than for *C. laxum* inoculated with *Micrococcus* sp. free cells by 1.2- and 1.3-fold, respectively. This finding was also supported by the ability of *Arthrobacter* sp. to increase cadmium solubility in cadmium-contaminated soil. This phenomenon could be explained by the production of exopolymers by *Arthrobacter* sp. (Khonsue et al. 2013) that can bind to anionic metals and enhance metal solubility in soil (Chen et al. 1995).

Table 3 shows the effect of chitosan-immobilized cells on cadmium accumulation in the roots and aboveground parts of *C. laxum*; it was obviously seen that the cadmium concentrations in the roots and aboveground parts in the different treatments at 6 weeks after planting were in the following order: UC = CH < CH-*Micrococcus* sp. < *Micrococcus* sp. = CH-*Arthrobacter* sp. < *Arthrobacter* sp. However, the enhancement of cadmium accumulation in the roots of *C. laxum* by the free cells and chitosan-immobilized cells of either cadmium-resistant bacterium at 9 weeks was not significantly different ($p < 0.05$) and agreed with the cadmium content in an entire *C. laxum*, as illustrated in Fig. 3. The highest cadmium content in an entire plant at 3 and 6 weeks was found in *C. laxum* inoculated with *Arthrobacter* sp. free cells, while the cadmium content in an entire plant inoculated with *Arthrobacter* sp. free cells was not significantly different ($p < 0.05$) from that of *C. laxum* inoculated with CH-*Arthrobacter* sp. at 9 weeks after planting.

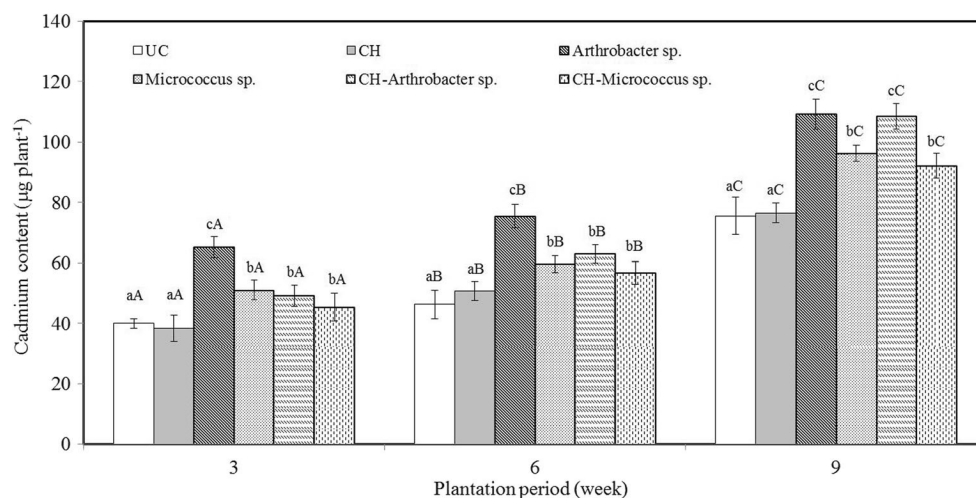
It can be speculated that chitosan-immobilized cells need more time to adapt to proliferate compared to free cells because it is difficult to obtain nutrients to support their growth while being immobilized on chitosan. Unlike chitosan-immobilized bacteria used for crude oil biodegradation, the survival and activity of the chitosan-immobilized bacteria were improved in crude oil-contaminated seawater (Gentili et al. 2006), possibly because crude oil can act as a carbon source for microbial growth, but cadmium cannot. However, rhizosphere bioaugmentation with free or immobilized cells of petroleum hydrocarbon-degrading bacteria in *Sesbania*

Table 3 Cadmium accumulation in *C. laxum* cultivated in the cadmium-contaminated soil for 3, 6, and 9 weeks in the different treatments

Treatment	Cadmium in root (mg kg ⁻¹ DW)			Cadmium in aboveground part (mg kg ⁻¹ DW)		
	3 weeks	6 weeks	9 weeks	3 weeks	6 weeks	9 weeks
UC	13.00 ± 1.65 ^{aA}	12.95 ± 1.48 ^{aA}	14.70 ± 1.14 ^{aA}	5.90 ± 0.70 ^{aA}	7.35 ± 0.58 ^{aB}	8.95 ± 1.34 ^{aC}
CH	12.50 ± 1.04 ^{aA}	14.01 ± 1.54 ^{aAB}	16.20 ± 0.99 ^{aB}	5.21 ± 1.17 ^{aA}	7.90 ± 0.35 ^{aB}	10.40 ± 1.08 ^{aC}
<i>Arthrobacter</i> sp.	23.70 ± 1.54 ^{dA}	26.05 ± 1.25 ^{dB}	22.04 ± 1.41 ^{cA}	13.27 ± 0.74 ^{cA}	17.20 ± 1.11 ^{dB}	19.95 ± 0.68 ^{dC}
<i>Micrococcus</i> sp.	21.00 ± 2.04 ^{cdA}	21.77 ± 2.12 ^{cA}	19.10 ± 0.37 ^{bA}	10.65 ± 1.21 ^{bA}	15.10 ± 0.71 ^{cB}	15.67 ± 1.02 ^{bB}
CH- <i>Arthrobacter</i> sp.	19.90 ± 1.69 ^{cA}	22.83 ± 2.07 ^{cA}	21.60 ± 1.02 ^{cA}	11.03 ± 1.16 ^{bA}	14.50 ± 0.57 ^{cB}	17.60 ± 1.14 ^{cdC}
CH- <i>Micrococcus</i> sp.	16.30 ± 0.90 ^{bA}	17.55 ± 0.70 ^{bAB}	18.87 ± 1.04 ^{bB}	10.15 ± 1.06 ^{bA}	11.60 ± 1.20 ^{bB}	14.60 ± 0.67 ^{bB}

Mean values and SE ($n = 3$) followed by a different lowercase letter within the same column denote a significant difference at $p < 0.05$ among different treatments. A different uppercase letter indicates a significant difference at $p < 0.05$ of cadmium concentrations in either the roots or shoots at different times after planting according to Duncan's multiple range test

Fig. 3 Cadmium content (mean values) of whole *C. laxum* cultivated in the cadmium-contaminated soil for 3, 6, and 9 weeks of different treatments. The error bars are the SE ($n = 3$), and a different lowercase letter above a bar in the graph denotes a significant difference at $p < 0.05$ among different treatments. A different uppercase letter indicates a significant difference, at $p < 0.05$, among different periods after planting according to Duncan's multiple range test



cannabina plant did not enhance petroleum hydrocarbon degradation (Maqbool et al. 2012). In addition, immobilization of cells protects microorganisms against an unfavorable environment (Dzionek et al. 2016). The optimum environmental conditions for the re-growth and activation of immobilized bacterial cells and use of protective agents to preserve cell viability should be further studied.

In addition, the cadmium contents in the roots and above-ground parts of *C. laxum* treated with chitosan alone were not significantly different from the uninoculated control ($p < 0.05$) (Table 3). Our results indicated the absence of a synergistic effect between the bacterial cells and chitosan on cadmium phytoextraction due to the low amount of chitosan applied to the soil. In contrast to the results of Wang et al. (2007), chitosan application improved zinc, lead, and cadmium accumulation in the shoots of *E. splendens*, but not of copper, and chitosan exhibited a synergistic effect in mycorrhizal fungi and *Penicillium* spp. for zinc, lead, and cadmium phytoextraction. Several factors might have affected the plant uptake and accumulation of heavy metals, including different rhizobacteria, plant species, soil characteristics, and climatic conditions (Chunilall et al. 2005).

Phytoremediation performance of *C. laxum*

The phytoextraction coefficient (PEC), bioaccumulation factor (BAF), and translocation factor (TF) were used to evaluate the performance of *C. laxum* on cadmium phytoremediation. The experimental results in Table 4 demonstrate that the PEC, BAF, and TF values of *C. laxum* inoculated with free cells or immobilized cells were significantly higher than those of the uninoculated control at all times after planting. The PEC values of *C. laxum* were low (no more than 0.33) and slightly increased with time. The PEC values of *C. laxum* inoculated with free cells or immobilized cells of either cadmium-resistant bacterium were not significantly different ($p < 0.05$), except the PEC of *C. laxum* inoculated with *Micrococcus* sp. and CH-*Micrococcus* sp. at 6 weeks after planting. Similar to the results for the PEC, the BAF values increased with time, but the BAF of *C. laxum* inoculated with *Arthrobacter* sp. free cells was higher than that of *C. laxum* inoculated with CH-*Arthrobacter* sp., except at 9 weeks. At 9 weeks after planting, *C. laxum* inoculated with *Arthrobacter* sp. free cells or CH-*Arthrobacter* sp. had a higher BAF than

Table 4 PEC, BAF, and TF of *C. laxum* cultivated in the cadmium-contaminated soil for 3, 6, and 9 weeks in the different treatments

Treatment	PEC			BAF			TF		
	3 weeks	6 weeks	9 week	3 weeks	6 weeks	9 week	3 weeks	6 weeks	9 week
UC	0.14 ± 0.02 ^a	0.15 ± 0.01 ^a	0.19 ± 0.03 ^a	0.54 ± 0.04 ^a	0.61 ± 0.05 ^a	0.76 ± 0.07 ^a	0.45 ± 0.05 ^a	0.57 ± 0.01 ^a	0.61 ± 0.04 ^a
CH	0.13 ± 0.04 ^a	0.17 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.03 ^a	0.46 ± 0.06 ^a	0.60 ± 0.08 ^a	0.86 ± 0.04 ^a	0.42 ± 0.02 ^a	0.56 ± 0.04 ^a	0.64 ± 0.07 ^a
<i>Arthrobacter</i> sp.	0.27 ± 0.05 ^c	0.33 ± 0.03 ^c	0.33 ± 0.05 ^b	1.03 ± 0.03 ^c	1.28 ± 0.12 ^d	1.37 ± 0.07 ^c	0.56 ± 0.05 ^b	0.66 ± 0.06 ^b	0.91 ± 0.09 ^c
<i>Micrococcus</i> sp.	0.23 ± 0.01 ^b	0.29 ± 0.02 ^c	0.27 ± 0.04 ^b	0.85 ± 0.07 ^b	1.18 ± 0.04 ^c	1.12 ± 0.10 ^b	0.51 ± 0.06 ^b	0.69 ± 0.11 ^b	0.82 ± 0.07 ^{bc}
CH- <i>Arthrobacter</i> sp.	0.24 ± 0.02 ^{bc}	0.32 ± 0.04 ^c	0.33 ± 0.06 ^b	0.86 ± 0.07 ^b	1.18 ± 0.07 ^c	1.28 ± 0.09 ^c	0.55 ± 0.09 ^b	0.64 ± 0.04 ^b	0.81 ± 0.04 ^b
CH- <i>Micrococcus</i> sp.	0.20 ± 0.02 ^b	0.23 ± 0.03 ^b	0.26 ± 0.03 ^b	0.75 ± 0.08 ^b	0.92 ± 0.05 ^b	1.14 ± 0.06 ^b	0.62 ± 0.11 ^b	0.66 ± 0.09 ^b	0.77 ± 0.03 ^b

Mean values and SE ($n = 3$) followed by a different lowercase letter within the same column denote a significant difference at $p < 0.05$ among different treatments according to Duncan's multiple range test

the uninoculated control by 1.8- and 1.7-fold, respectively. These results corresponded to the results for the cadmium content of an entire *C. laxum*. Our results indicated that *C. laxum* is not a cadmium hyperaccumulating plant compared to *C. comosum*, which has been shown to be a cadmium hyperaccumulating plant (Wang et al. 2012).

Soil inoculation with either free cells or chitosan-immobilized cells of cadmium-resistant bacteria increased the TF values in *C. laxum* compared to the uninoculated control (Table 4), indicating that cadmium-resistant bacteria enhanced cadmium translocation from the roots to the aboveground part of *C. laxum*. No significant difference ($p < 0.05$) was found in the TF values of *C. laxum* inoculated with free cells or immobilized cells of either cadmium-resistant bacterium at 3 or 6 weeks. The TF values for all treatments ranged from 0.61 ± 0.04 to 0.91 ± 0.09 . A TF of less than one implies a poor ability to translocate cadmium from the roots to the aboveground parts of *C. laxum*, which was expected due to the high cadmium concentration in the soil (50.35 mg kg^{-1}). According to Wang et al. (2012), *C. comosum* translocated a high amount of cadmium to the aboveground parts of the plant in soil with a cadmium concentration less than 50 mg kg^{-1} . The plant reduces cadmium translocation to the aboveground parts when a high cadmium content accumulates in the plant to protect itself from cadmium toxicity and to ensure normal plant growth. Interestingly, *C. laxum* inoculated with the *Arthrobacter* sp. free cells had the highest TF at 9 weeks, suggesting that inoculation with *Arthrobacter* sp. improved cadmium translocation in *C. laxum*. Yoon et al. (2006) stated that plants with a TF greater than one are desirable for effective heavy metal phytoextraction. Phytoextraction is considered to be a promising and alternative method to remediate heavy metal-polluted soils (Mahar et al. 2016).

Conclusion

This study investigated the effects of the inoculation of chitosan-immobilized bacteria on cadmium phyto remediation by *C. laxum* in the cadmium-polluted soil. The viability of chitosan-immobilized cadmium-resistant bacteria after storage at 4°C decreased with time. Chitosan-immobilized bacteria survived and significantly increased bioavailable cadmium in a highly cadmium-polluted soil. Cell immobilization could protect bacterial cells and allow survival under stressful conditions. The results from the pot experiment indicated that the inoculation of free cells and immobilized cells of *Arthrobacter* sp. and *Micrococcus* sp. improved cadmium accumulation in *C. laxum* planted in a highly cadmium-contaminated soil. The highest cadmium accumulation in the roots and aboveground parts was found in *C. laxum* inoculated with *Arthrobacter* sp. free cells, followed by CH-*Arthrobacter* sp. and *Micrococcus* sp. free cells at 6 weeks after planting.

Free cells and immobilized cells of *Micrococcus* sp. not only promoted plant growth but also simultaneously accelerated cadmium uptake and accumulation in the roots and aboveground parts of *C. laxum*, leading to the conclusion that the combined use of chitosan-immobilized bacteria and *C. laxum* may improve the efficiency of cadmium phytoextraction.

Acknowledgements This research was supported by the grant from Thailand Research Fund and Mahidol University (Grant no.RSA5780026). The authors thank V. Vanitshavit, A. Nisairongsrisug, N. Siribanchachai, and C. Sangthong for their valuable technical assistance.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aider M (2010) Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: review. LWT-Food Sci Technol 43:837–842
- Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals: concepts and applications. Chemosphere 91:869–881
- Basak B, Bhunia B, Dey A (2014) Studies on the potential use of sugarcane bagasse as carrier matrix for immobilization of *Candida tropicalis* PHB5 for phenol biodegradation. Int Biodeter Biodegr 93:107–117
- Chen JH, Czaika D, Lion L, Shuler M, Ghiorse W (1995) Trace metal mobilization in soil by bacterial polymer. Environ Health Persp 103:52–58
- Chen L, Luo S, Xiao X, Guo H, Chen J, Wan Y, Li B, Xu T, Xi Q, Rao C, Liu C, Zeng G (2010) Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. Appl Soil Ecol 46:383–389
- Chunilall V, Kindness A, Jonnalagadda SB (2005) Heavy metal uptake by two edible *Amaranthus* herbs grown on soils contaminated with lead, mercury, cadmium and nickel. J Environ Sci Health B 40:375–384
- Dzionek A, Wojcieszynska D, Guzik U (2016) Natural carriers in bioremediation: a review. Electron J Biotechnol 23:28–36
- Faust MB, Christians NE (2000) Copper reduces shoot growth and root development of creeping bent grass. Crop Sci 40:498–502
- Gentili AR, Cubitto MA, Ferrero M, Rodríguez MS (2006) Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. Int Biodeter Biodegr 57:222–228
- Ghosh M, Singh SP (2005) A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species. Environ Pollut 133:365–371
- Grant CA, Buckley WT, Bailey LD, Selles F (1998) Cadmium accumulation in crops. Can J Plant Sci 78:1–17
- He LY, Chen ZJ, Ren GD, Zhang YF, Qian M, Sheng XF (2009) Increased cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria. Ecotox Environ Safe 72:1343–1348
- Jézéquel K, Perrin J, Lebeau T (2005) Bioaugmentation with a *Bacillus* sp. to reduce the phytoavailable Cd of an agricultural soil: comparison of free and immobilized microbial inocula. Chemosphere 59:1323–1331

- 680 Khaokaew S, Landrot G (2015) A field-scale study of cadmium
681 phytoremediation in a contaminated agricultural soil at Mae Sot
682 district, Tak province, Thailand: (1) determination of cd-
683 hyperaccumulating plants. *Chemosphere* 138:883–887
- 684 Khondee N, Tathong S, Pinyakong O, Powtongsook S, Chatchupong T,
685 Ruangchainikom C, Luepromchai E (2012) Airlift bioreactor con-
686 taining chitosan-immobilized *Sphingobium* sp. P2 for treatment of
687 lubricants in wastewater. *J Hazard Mater* 213–214:466–473
- 688 Khonsue N, Kittisuwan K, Kumsopa A, Tawinteung N, Prapagdee B
689 (2013) Inoculation of soil with cadmium-resistant bacteria enhances
690 cadmium phytoextraction by *Vetiveria nemoralis* and *Ocimum*
691 *gratissimum*. *Water Air Soil Pollut* 224:1696
- 692 Kumar P, Dushenkov V, Motto H, Raskin I (1995) Phytoextraction: the
693 use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ Sci*
694 *Technol* 29:1232–1238
- 695 Kumar ABV, Varadaraj MC, Gowda LR, Tharanathan RN (2005)
696 Characterization of chito-oligosaccharides prepared by
697 chitosan analysis with the aid of papain and Pronase, and their bacteri-
698 cidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochem J*
699 391:165–175
- 700 Lambrechts T, Gustot Q, Couder E, Houben D, Iserentant A, Lutts S
701 (2011) Comparison of EDTA-enhanced phytoextraction and
702 phytostabilisation strategies with *Lolium perenne* on a heavy metal
703 contaminated soil. *Chemosphere* 85:1290–1298
- 704 Lee SK, Lur HS, Lo KJ, Cheng KC, Chuang CC, Tang SJ, Yang ZW, Liu
705 CT (2016) Evaluation of the effects of different liquid inoculant
706 formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency
707 of *Rhodospseudomonas palustris* strain PS3. *Appl Microbiol*
708 *Biotechnol* 100:7977–7987
- 709 Li JT, Qiu JW, Wang XW, Zhong Y, Lan CY, Shu WS (2006) Cadmium
710 contamination in orchard soils and fruit trees and its potential health
711 risk in Guangzhou, China. *Environ Pollut* 143:159–165
- 712 Liu J, Zhou Q, Sun T, Ma LQ, Wang S (2008) Growth responses of three
713 ornamental plants to cd and cd–Pb stress and their metal accumula-
714 tion characteristics. *J Hazard Mater* 151:261–267
- 715 Liu ZF, Ge HG, Li C, Zhao ZP, Song FM, Hu SB (2015) Enhanced
716 phytoextraction of heavy metals from contaminated soil by plant
717 co-cropping associated with PGPR. *Water Air Soil Pollut* 226:29
- 718 Mahar A, Wang P, Ali A, Awasthi MK, Lahori AH, Wang Q, Li R, Zhang
719 Z (2016) Challenges and opportunities in the phytoremediation of
720 heavy metals contaminated soils: a review. *Ecotoxicol Environ Saf*
721 126:111–121
- 722 Maqbool F, Wang Z, Xu Y, Zhao J, Gao D, Zhao YG, Bhatti ZA, Xing B
723 (2012) Rhizodegradation of petroleum hydrocarbons by *Sesbania*
724 *cannabina* in bioaugmented soil with free and immobilized consor-
725 tium. *J Hazard Mater* 237–238: 262–269
- 726 Mattina MJI, Lannucci-Berger W, Musante C, White JC (2003)
727 Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pol-
728 lutants from soil. *Environ Pollut* 124:375–378
- 729 Prapagdee B, Chanprasert M, Mongkolsuk S (2013) Bioaugmentation
730 with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to as-
731 sist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus*. *Chemosphere*
732 92:659–666
- 733 Prapagdee B, Chumphonwong N, Khonsue N, Mongkolsuk S (2012)
734 Influence of cadmium resistant bacteria on promoting plant root
735 elongation and increasing cadmium mobilization in contaminated
736 soil. *Fresenius Environ Bull* 21:1186–1191
- 737 Quevauviller P, Lachica M, Barahona E, Gomez A, Rauret G, Ure A,
738 Muntau H (1998) Certified reference material for the quality control
739 of EDTA- and DTPA-extractable trace metal contents in calcareous
740 soil (CRM 600). *Fresen J Anal Chem* 360:505–511
- 741 Rajkumar M, Sandhya S, Prasad MNV, Freitas H (2012) Perspectives of
742 plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation.
743 *Biotechnol Adv* 30:1562–1574
- 744 Rouquerol J, Avnir D, Fairbridge CW, Everett DH, Haynes JM,
745 Pernicone N, Ramsay JDF, Sing KSW, Unger KK (1994)
746 Recommendations for the characterization of porous solids. *Pure*
747 *Appl Chem* 66:1739–1758
- 748 Sangthong C, Setkit K, Prapagdee B (2016) Improvement of cadmium
749 phytoremediation after soil inoculation with a cadmium resistant
750 *Micrococcus* sp. *Environ Sci Pollut Res* 23:756–764
- 751 Sheng XF, Xia JJ (2006) Improvement of rape (*Brassica napus*) plant
752 growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria.
753 *Chemosphere* 64:1036–1042
- 754 Shute T, Macfie SM (2006) Cadmium and zinc accumulation in soybean:
755 a threat to food safety? *Sci Total Environ* 371:63–73
- 756 Simmons RW, Pongsakul P, Chaney L, Saiyasitpanich D, Klinphoklap S,
757 Nobuntou W (2003) The relative exclusion of zinc and iron from
758 rice grain in relation to rice grain cadmium as compared to soybean:
759 implications for human health. *Plant Soil* 257:163–170
- 760 Simmons RW, Pongsakul P, Saiyasitpanich D, Klinphoklap S (2005)
761 Elevated levels of cadmium and zinc in paddy soils and elevated
762 levels of cadmium in rice grain downstream of a zinc mineralized
763 area in Thailand: implications for public health. *Environ Geochem*
764 *HLth* 27:501–511
- 765 Sun Y, Zhou Q, Xu Y, Wang L, Liang X (2011) Phytoremediation for co-
766 contaminated soils of benzo[a]pyrene (B[a]P) and heavy metals
767 using ornamental plant *Tagetes patula*. *J Hazard Mater* 186:2075–
768 2082
- 769 Ullah A, Heng S, Munis MFH, Fahad S, Yang X (2015)
770 Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promot-
771 ing (PGP) bacteria: a review. *Environ Exp Bot* 117:28–40
- 772 Wang FY, Lin XG, Yin R (2007) Role of microbial inoculation and
773 chitosan in phytoextraction of cu, Zn, Pb and cd by *Elsholtzia*
774 *splendens*: a field case. *Environ Pollut* 147:248–255
- 775 Wang Y, Yan A, Dai J, Wang N, Wu D (2012) Accumulation and toler-
776 ance characteristics of cadmium in *Chlorophytum comosum*: a pop-
777 ular ornamental plant and potential cd hyperaccumulator. *Environ*
778 *Monit Assess* 184:929–937
- 779 Wei S, Li Y, Zhou Q, Srivastava M, Chiu S, Zhan J, Wu Z, Sun T (2010)
780 Effect of fertilizer amendments on phytoremediation of cd-
781 contaminated soil by a newly discovered hyperaccumulator
782 *Solanum nigrum* L. *J Hazard Mater* 176:269–273
- 783 Yoon J, Cao X, Zhou Q, Ma LQ (2006) Accumulation of Pb, cu, and Zn
784 in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci Total*
785 *Environ* 368:456–464
- 786 Zhang C, Sale PWG, Doronila AI, Clark GJ, Livesay C, Tang C (2014)
787 Australian native plant species *Carpobrotus rossii* (haw.) Schwantes
788 shows the potential of cadmium phytoremediation. *Environ Sci*
789 *Pollut Res* 21:9843–9851

CHEM43585R1: Acknowledgement revision

eesserver@eesmail.elsevier.com

Sent: Monday, June 12, 2017 12:48 PM**To:** Benjaphorn Prapagdee

Ref.: "Enhanced cadmium phytoremediation of Glycine max L. through bioaugmentation of cadmium-resistant bacteria assisted by biostimulation" (Dr. Benjaphorn Prapagdee)

Dear Dr. Prapagdee,

We have received your revised submission.

You may check the status of your manuscript at <https://ees.elsevier.com/chem/> as Author.

Kind regards,

Editorial Office Staff
Chemosphere

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Chemosphere

Elsevier Editorial System(tm) for

Manuscript Draft

Manuscript Number: CHEM43585R1

Title: Enhanced cadmium phytoremediation of Glycine max L. through
bioaugmentation of cadmium-resistant bacteria assisted by biostimulation

Article Type: Research paper

Section/Category: Treatment and Remediation

Keywords: Cadmium-resistant bacteria; Nutrient addition;
Phytoremediation; Glycine max L.

Corresponding Author: Dr. Benjaphorn Prapagdee,

Corresponding Author's Institution: Faculty of Environment and Resource
Studies, Mahidol University

First Author: Pongsarun Rojjanateeranaaj

Order of Authors: Pongsarun Rojjanateeranaaj; Chirawee Sangthong;
Benjaphorn Prapagdee

Revised MS No. CHEM43585_R1

**Enhanced cadmium phytoremediation of *Glycine max* L. through
bioaugmentation of cadmium-resistant bacteria assisted by biostimulation**

Pongsarun Rojjanateeranaj, Chirawee Sangthong and Benjaphorn Prapagdee*

*Laboratory of Environmental Biotechnology, Faculty of Environment and Resource Studies,
Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom 73170, Thailand*

*** Corresponding author.** Tel.: +66 2441 5000 ext.1319; fax: +66 2441 9509

E-mail address: benjaphorn.pra@mahidol.ac.th (B. Prapagdee)

Abstract

This study examined the potential of three strains of cadmium-resistant bacteria, including *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp. and *Arthrobacter* sp., to promote root elongation of *Glycine max* L. seedlings, soil cadmium solubility and cadmium phytoremediation in *G. max* L. planted in soil highly polluted with cadmium with and without nutrient biostimulation. *Micrococcus* sp. promoted root length in *G. max* L. seedlings under toxic cadmium conditions. Soil inoculation with *Arthrobacter* sp. increased the bioavailable fraction of soil cadmium, particularly in soil amended with a C:N ratio of 20:1. Pot culture experiments observed that the highest plant growth was in *Micrococcus* sp.-inoculated plants with nutrient biostimulation. Cadmium accumulation in the roots, stems and leaves of *G. max* L. was significantly enhanced by *Arthrobacter* sp. with nutrient biostimulation. A combined use of *G. max* L. and *Arthrobacter* sp. with nutrient biostimulation accelerated cadmium phytoremediation. In addition, cadmium was retained in roots more than in stems and leaves and *G. max* L. had the lowest translocation factor at all growth stages, suggesting that *G. max* L. is a phytostabilizing plant. We concluded that biostimulation-assisted bioaugmentation is an important strategy for improving cadmium phytoremediation efficiency.

Keywords: Cadmium-resistant bacteria; Nutrient addition; Phytoremediation; *Glycine max* L.

51 **1. Introduction**

52 Although the background level of cadmium (Cd) in soil (from 0.5 to 3.0 mg kg⁻¹) has
53 no direct effect on living organisms (Wang et al., 2007), several human activities (e.g.,
54 mining, industrial waste, smelting of ores, sewage sludge) bring about the spread and
55 contamination of soil with heavy metals (Mahar et al., 2016). Cadmium pollution in
56 agricultural areas has become a serious environmental issue and is most frequently detected
57 in agricultural soil in many countries (e.g., Thailand, South Korea, China) (Simmons et al.,
58 2003; Kim et al., 2003; Wang et al., 2014a). In particular, the Mae Sot district of Tak
59 province in northern Thailand is the first reported cadmium-polluted area with nonferrous
60 mineralization adjacent to rice-based agricultural systems (Simmons et al., 2003).

61 Physical and chemical remediation technologies can rapidly remediate cadmium-
62 contaminated soil but are expensive and disturb soil functions and properties. In comparison,
63 phytoremediation technology has been successfully applied to clean heavy metal-
64 contaminated soil because it is an environmentally friendly and cost-effective technology that
65 induces fewer changes to land use patterns (Wan et al., 2016). Heavy metal phytoremediation
66 requires the growth of a plant that can accumulate heavy metals in their tissues (Ullah et al.,
67 2015). However, plants that are grown in soil with high concentrations of heavy metals
68 experience plant stress and irreversible damage due to heavy metal toxicity. Low heavy metal
69 bioavailability in soil caused by strong binding of heavy metals to soil particles affects heavy
70 metal phytoremediation (Ali et al., 2013). Therefore, techniques to solve these limitations to
71 phytoremediation performance should be developed.

72 Several studies have reported the potential of microorganisms to increase the
73 bioavailability of heavy metals in soil, which results in increased plant uptake abilities
74 (Prokop et al., 2003; Bolan et al., 2014; Khonsue et al., 2013). Various (rhizo)bacteria have
75 been successfully implicated in promoting plant growth and decreasing toxicity or stress

when plants are grown in cadmium-contaminated soils (Glick, 2010; Guo and Chi, 2014; Sangthong et al., 2016). Certain soil bacteria can also transform heavy metals into soluble and bioavailable forms by altering the chemical properties of heavy metals using binding compounds such as exopolymers, siderophores, organic acids, and biosurfactants (Prapagdee et al., 2012; Bolan et al., 2014; Ullah et al., 2015). Therefore, the coupled use of accumulating plants and bioaugmented bacteria to clean heavy-metal contaminated areas is a promising technique to improve phytoremediation performance. However, nutrient deficiency in polluted areas retards the growth of bioaugmenting bacteria. Bacterial activity and proliferation in contaminated soil can be stimulated by biostimulation with nutrients (Tyagi et al., 2011). Biostimulation with nutrients to accelerate the microbial growth and activity has been widely studied in bioremediation of both organic and heavy metal pollutants (El-Bestawy and Albrechtsen, 2007; Wang et al., 2014a; Mahbub et al., 2017).

There have been several studies on the use of bioaugmentation assisted by biostimulation (BAB) technology for heavy metal bioremediation in contaminated soil (Wang et al., 2014a; Wang et al., 2014b). The study of Mahbub et al. (2017) reported that the mercury removal was significantly increased in contaminated soil inoculated with *Sphingobium* sp. SA2 and nutrient amendment compared to the untreated contaminated soil.

To date, few studies have applied BAB technology to cadmium phytoremediation by crop plants in real, highly cadmium-polluted soil. Soybean (*Glycine max* L.), an annual crop that is commonly grown in cadmium-polluted areas in Tak province, Thailand was used in this study. The effects of biostimulation with nutrients (carbon and nitrogen) in cadmium-contaminated soil on the growth of three strains of cadmium-resistant bacteria and their performance on increasing soil cadmium bioavailability were studied. The effects of soil inoculation with cadmium-resistant bacteria on plant growth and cadmium accumulation by

G. max L. planted in cadmium-contaminated soil under non-biostimulation and biostimulation conditions were also investigated.

2. Materials and Methods

2.1 Strains of cadmium-resistant bacteria and preparation of bacterial inocula

The three strains of cadmium-resistant bacteria used as bioaugmenting bacteria were indole-3-acetic acid (IAA)-producing *Micrococcus* sp. TISTR2221 (formerly strain MU1) (Prapagdee et al., 2013), siderophore-producing *Pseudomonas* sp. PM2 (Sangthong et al., 2015) and exopolymer-producing *Arthrobacter* sp. TISTR2219 (formerly strain TM6) (Prapagdee et al., 2012). These strains were isolated from rhizosphere soil and plant roots collected from cadmium-polluted areas. Cell suspensions of these cadmium-resistant bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) broth (Criterion, USA) as previously described by Prapagdee et al. (2013). The cell turbidity of each bacterial suspension was adjusted to OD₆₀₀ ~0.2 for further experiments. The approximate number of viable cells of *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp. and *Arthrobacter* sp. were 1.4×10^8 , 1.1×10^8 and 1.5×10^8 CFU mL⁻¹, respectively.

2.2 Cadmium-contaminated soil preparation and analysis

Soil was collected in a highly cadmium-contaminated agricultural field at Mae Tao subcatchment, Mae Sot district, Tak province, Thailand. The soil was air-dried, ground, and passed through a 2-mm sieve before analysis of physical and chemical properties, which are presented in Table 1. Each soil sample was divided into two subsamples. The first was extracted with a mixture of 1:3 (by volume) concentrated nitric acid (HNO₃) (Merck, Germany) and concentrated hydrochloric acid (HCl) (Merck, Germany) for analysis of total cadmium. The second subsample was extracted with diethylenetriamine

pentaacetic acid (DTPA) (Ajax, Australia) for analysis of bioavailable cadmium or DTPA-extractable cadmium (Faust and Christians, 2000). Prokop et al. (2003) reported that the DTPA-extractable fraction is suitable for measuring bioavailable cadmium in contaminated soil. Concentrations of total and bioavailable cadmium were analyzed using flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS) (Varian spectra model AA240FS, USA). The quantification detection limit of cadmium by FAAS was 0.01 mg kg⁻¹. The organic matter and total nitrogen were analyzed by the wet oxidation method of Walkley and Black (1947) and the Kjeldahl method, respectively. The available phosphorus was measured using the Bray II extraction method and the extractable potassium, extractable calcium and extractable magnesium were determined after leaching the soils with ammonium acetate (Carter and Gregorich 2008).

2.3 Plant-root elongation assay

To evaluate the capability of cadmium-resistant bacteria to promote root elongation of *G. max* L. under toxic cadmium conditions, an *in vivo* root elongation assay of *G. max* L. was carried out according to the method of Prapagdee et al. (2013). Surface-sterilized seeds of *G. max* L. were placed on filter paper soaked with various cadmium ion concentrations in the form of cadmium nitrate, including 0, 25, 50 and 75 mg L⁻¹, respectively. Each strain of bacterial suspension was overlaid on the surface of *G. max* L. seeds. The root length of the seedlings was measured after incubation at room temperature in the dark for 5 d. The root lengths of seedlings were averaged from at least 20 replicates.

2.4 Effects of biostimulation with nutrients on bacterial growth and cadmium bioavailability in cadmium-contaminated soil

Various concentrations of carbon in the form of glucose ($C_6H_{12}O_6$) and nitrogen in form of ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$) were added to sterilized cadmium-contaminated soil to reach C:N ratios of 5:1, 10:1 and 20:1. Soil with nutrient addition was randomly collected to analyze and calculate actual C:N ratios. Each strain of bacterial inocula was individually inoculated into sterilized contaminated soil with and without biostimulation and incubated at 30 °C with continuous shaking at 180 rpm. In addition, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) was added into sterilized contaminated soil as an axenic control treatment. To determine bacterial viability in sterilized contaminated soil, soil samples were collected at 1, 3, 5, 10, 15 and 20 d, and viable cell numbers of inoculated bacteria were counted using the standard plate count method. To measure soil cadmium solubility, soil samples were collected after incubation for 10 d and separated into two parts for analysis of total cadmium (Acid-digested) and bioavailable cadmium (DTPA-extractable) according to the methods described above. DTPA is applied to estimate the metal concentration for plant uptake (Quevauviller et al., 1998). It uses to extract heavy metals as a potential indicator of plant-bioavailable heavy metals from soils (Prokop et al., 2003). Soil cadmium concentration was presented in terms of bioavailable and non-bioavailable forms. The concentration of non-bioavailable forms was calculated by subtracting DTPA-extractable cadmium from the concentration of total cadmium.

2.5 Greenhouse study of bioaugmentation and biostimulation experiments

2.5.1 Preparation of *G. max* L. seedlings

G. max L. seeds were purchased from local agriculturalists at the contaminated area, Tak province, Thailand. *G. max* L. seedlings were prepared by planting in garden soil without cadmium contamination for two weeks. Two-week-old *G. max* L. seedlings at an

approximate height of 20 cm were individually transplanted to plastic pots filled with 3 kg of cadmium-contaminated soil.

2.5.2 Experimental setup

Two sets of pot experiments of *G. max* L. were established, including non-biostimulation and biostimulation experiments. Each set was divided into four treatments as follows: i) *G. max* L. (the uninoculated control); ii) *G. max* L. + *Micrococcus* sp.; iii) *G. max* L. + *Pseudomonas* sp.; and iv) *G. max* L. + *Arthrobacter* sp. The soil was amended with carbon and nitrogen sources for biostimulation experiments. A suspension of bacterial inoculum was inoculated into the non-sterilized cadmium-contaminated soil and manually mixed well to reach an inoculum size of approximately 10^6 CFU g⁻¹ before transplantation (Liu et al., 2015). A total of eight treatments of *G. max* L. transplanted to cadmium-contaminated soil were prepared in 25-cm-diameter round plastic pots. All pots were placed at random in the greenhouse with natural light and watered daily with the same volume of deionized water in the morning for three months. An average temperature and relative humidity in the greenhouse were 32.4 ± 0.8 °C and of 71.3 ± 6.3 %.

2.5.3 Plant and soil sample collection and analysis

Plant and soil samples were collected every month to represent each stage of plant growth after transplantation for one month (before the flowering stage), two months (the beginning pods stage) and three months (the full seed stage), respectively. Plants were harvested from soil and rinsed several times with deionized water to remove cadmium bound to the root surface. Root length, stem height, and plant dry weight were measured. For cadmium content determination, dry plant samples (root, stem and leaf) were ground and acid-digested with a mixture of 2:1 (by volume) concentrated HNO₃ and concentrated

perchloric acid (HClO₄) (Merck, Germany) before analyzing with FAAS. Cadmium content in plants was calculated on a dry weight basis. Concentrations of total cadmium (acid-digested) and bioavailable cadmium in soil were extracted and analyzed using the methods described above.

2.6 Data and statistical analysis

The cadmium content in plant tissue and soil was used to calculate the phytoextraction coefficient (PEC), the bioaccumulation factor (BAF) and the translocation factor (TF) according to the previously mentioned equations used by [Kumar et al. \(1995\)](#), [Khaokaew and Landrot \(2015\)](#), and [Mattina et al. \(2003\)](#), respectively. The PEC is calculated by dividing cadmium concentration in the whole plant with that in the soil surrounding the plant roots. The BAF is estimated by calculating the ratio of cadmium concentration in the whole plant to the bioavailable metal concentration in the soil surrounding the plant roots. The TF is the ratio of cadmium concentration in above-ground plant tissues (shoots) to that in underground plant tissues (roots). All analytical results were expressed as means and standard errors from data collected at least in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the means of different treatments at 95% confidence, and DMRT was performed to determine the statistical significance at a significance level of 0.05 for the plant root elongation and greenhouse experimental data using the SPSS 17 software.

3. Results and Discussion

3.1 Promotion of root lengths of *G. max* L. by cadmium-resistant bacteria under toxic cadmium conditions

Seeds of *G. max* L. were soaked in a cell suspension of each cadmium-resistant bacterium in the presence and absence of cadmium. [Fig. 1](#) showed that the root lengths of *G.*

max L. seedlings in the absence of cadmium were higher than those in the presence of cadmium both with and without bacterial inoculation. Increased cadmium concentrations decreased the root length of *G. max* L due to the toxic effects of cadmium. Significant percent increases in the root length of inoculated *G. max* L. seedlings at cadmium concentrations of 0, 25, 50 and 75 mg L⁻¹ compared to the uninoculated control seedlings were found only for *G. max* L. seedlings inoculated with *Micrococcus* sp. (by 31.9, 26.2, 22.6, and 21.7%, respectively). Only *Micrococcus* sp. had a positive effect on root elongation of *G. max* L.; no significant effect was found for *Pseudomonas* sp. and *Arthrobacter* sp. Our previous studies reported that *Micrococcus* sp. is a high producer of IAA, up to 402 ± 13 mg L⁻¹, and promote the root elongation of *Helianthus annuus* L. (Prapagdee et al., 2013) and *Zea mays* L. (Sangthong et al., 2016) seedlings under toxic cadmium conditions.

3.2 Survival of cadmium-resistant bacteria in cadmium-contaminated soil with and without nutrient biostimulation

The growth of cadmium-resistant bacteria was monitored in sterilized cadmium-contaminated soil at cadmium concentrations of 50.35 ± 2.87 mg kg⁻¹ and biostimulated with nutrients at C:N ratios of 5:1, 10:1 and 20:1, compared to control treatment without biostimulation (initial C:N ratio of 11.7:1). The highest growth among all strains was observed five days after inoculation and slightly decreased until 20 days of incubation (Fig. 2). Plants grew well in sterilized cadmium-contaminated soil due to cadmium-resistant capabilities. Our previous study reported that these three strains of cadmium-resistant bacteria were resistant up to a cadmium concentration of 1000 mg L⁻¹ (Prapagdee et al., 2012; Prapagdee et al., 2013; Sangthong et al., 2015). Some bacterial strains isolated from contaminated sites possess the excellent metal-scavenging capability and high resistance to heavy metals (Malik, 2004).

The numbers of viable cells of *Pseudomonas* sp. (Fig. 2b) and *Arthrobacter* sp. (Fig. 2c) in sterilized cadmium-contaminated soil amended with all C:N ratios did not significantly differ. However, the highest amounts of viable cells of *Pseudomonas* sp. and *Arthrobacter* sp. were found at five days of incubation in sterilized cadmium-contaminated soil amended with a C:N ratio of 20:1 by 8.78 and 8.38 log₁₀ CFU g⁻¹ of soil, respectively. In addition, the numbers of *Micrococcus* sp. after inoculation in sterilized cadmium-contaminated soil amended with C:N ratio of 20:1 for five days significantly differed from those with other C:N ratios and from the control treatment (Fig. 2a).

Our findings suggest that the addition of carbon is required for biostimulation of bacterial growth in cadmium-contaminated soil, particular soil with low organic carbon content and less bioavailable nutrients. Metal pollutants cannot provide carbon sources for bacterial growth and therefore, the addition of carbon to metal-polluted soils for bacterial growth biostimulation is recommended. In biostimulation for bioremediation of organic pollutants (e.g., polycyclic aromatic hydrocarbons) microorganisms use organic pollutants as sources of carbon and energy for growth and multiplication. Therefore, inorganic macronutrients such as nitrogen and phosphorous are supplied to give a final C:N:P ratio of 100:10:1 (Leys et al., 2005; Xu and Lu, 2010). However, biostimulation of soil microorganisms with nitrogen and phosphorous had less effect on diesel oil biodegradation because of nutrient bioavailability limitation in the soil (Bento et al., 2005).

3.3 Increasing bioavailability of soil cadmium using cadmium-resistant bacteria with nutrient biostimulation

Soil inoculation with cadmium-resistant bacteria in both non-biostimulation and biostimulation conditions increased concentrations of bioavailable cadmium compared to the uninoculated control, except for soil with *Pseudomonas* sp. inoculation at a C:N ratio of 5:1

(Fig. 3a). Among the different C:N ratios, the highest concentrations of bioavailable cadmium in soil were found at a C:N ratio of 20:1 with bacterial inoculation. Soil with *Arthrobacter* sp. inoculation at a C:N ratio of 20:1 had the highest concentration of bioavailable cadmium; 29.4 and 38.2% higher than uninoculated soil with and without nutrient biostimulation, respectively. Nutrient addition at a C:N ratio of 20:1 indirectly facilitated an increase in cadmium solubility. In addition, no significant difference in the concentration of non-bioavailable forms was observed because of the high levels of total cadmium concentration in contaminated soil (Fig. 3b).

Our previous studies explained possible mechanisms by which *Micrococcus* sp. (Prapagdee et al., 2013), *Pseudomonas* sp. (Sangthong et al., 2015) and *Arthrobacter* sp. (Prapagdee et al., 2012) increase cadmium solubility in contaminated soil. Soil inoculation with some bacteria e.g., siderophore-producing bacteria (Rajkumar et al., 2010) and IAA-producing bacteria (Prapagdee et al., 2013) increased heavy metal solubility and bioavailability. In addition, these findings indicate that a high ratio of carbon in contaminated soil can enhance bacterial growth and activity, in particular increasing bioavailable cadmium in soil. An increase in bioavailable cadmium in soil promotes plant cadmium uptake and accumulation. Therefore, nutrient biostimulation at a C:N ratio of 20:1 in contaminated soil was used to accelerate bacterial performance in cadmium phytoremediation experiments.

3.4 Bioaugmentation and biostimulation strategies enhanced the efficiency of cadmium phytoremediation by *G. max* L.

3.4.1 *G. max* L. growth after cultivation in cadmium-contaminated soil

The root length, stem height and dry biomass of *G. max* L. with either *Micrococcus* sp. or *Pseudomonas* sp. inoculation were significantly higher than in uninoculated plants under both non-biostimulation and biostimulation conditions (Table 2). Inoculation with

298 *Arthrobacter* sp. did not increase plant dry biomass compared to the uninoculated control. In
 299 addition, some microorganisms in polluted soil reduce the toxic effects of heavy metals
 300 (Ullah et al., 2015). There were no visual symptoms of cadmium toxicity in *G. max* L.
 301 planted in cadmium-contaminated soil at cadmium concentrations of $50.35 \pm 2.87 \text{ mg kg}^{-1}$.
 302 Cadmium concentrations at 100 mg kg^{-1} reduced shoot height and dry biomass of *G. max* L.
 303 (Shute and Macfie, 2006).

304 Soil at a C:N ratio of 20:1 had no significant increase in plant growth in uninoculated
 305 plants, indicating that non-biostimulated soil had an optimum C:N ratio (11.7:1) for plant
 306 growth. Taiwo et al. (2016) reported that compost with a C:N ratio of $10.1 \pm 3.0:1$ is suitable
 307 for agricultural growth of *Hibiscus cannabinus* for metal bioremediation. Therefore, an
 308 increase in C:N ratio in cadmium-contaminated soil did not positively affect plant growth.
 309 Our findings suggest that nutrient biostimulation at a C:N ratio of 20:1 could stimulate
 310 bacterial growth and activity. This further confirms that root length, stem height and dry
 311 biomass of *Micrococcus* sp.-inoculated *G. max* L. under nutrient biostimulation were higher
 312 than without nutrient biostimulation. The highest plant growth was found in *Micrococcus* sp.-
 313 inoculated plants after transplantation for three months with nutrient biostimulation. The root
 314 length, stem height and dry biomass of *Micrococcus* sp.-inoculated plants with nutrient
 315 biostimulation after transplantation for three months was higher than in uninoculated plants
 316 without biostimulation by 106.6%, 24.3% and 90.3%, respectively.

317 One explanation for these observations relates to a finding in our previous studies of
 318 *H. annuus* L. (Prapagdee et al., 2013) and *Z. mays* L. (Sangthong et al., 2016). *Micrococcus*
 319 sp. has been shown to produce high levels of IAA and promote plant growth under toxic
 320 cadmium conditions (Prapagdee et al., 2013). The use of plant growth promoting
 321 (rhizo)bacteria to improve plant growth in heavy metal-contaminated soil has been well
 322 documented in several publications (Ma et al., 2009; Guo and Chi, 2014; Liu et al., 2015).

Bacteria with certain characteristics (e.g., production of phytohormones, nutrient solubilization) can promote plant growth and alleviate metal toxicity to plants (Glick, 2010). Fast-growing and high biomass-producing plants can be used for phytoremediation because they can compensate lower cadmium accumulation with much higher biomass (Phaenark et al., 2009).

3.4.2 Cadmium uptake and bioaccumulation in *G. max* L.

Table 3 presents concentrations of cadmium that accumulated in each part of *G. max* L. under non-biostimulation and biostimulation conditions. Cadmium content in roots, stems and leaves of *G. max* L. with bacterial inoculation were significantly higher than those in the uninoculated control under both non-biostimulation and biostimulation conditions. The highest cadmium content in the roots, stems and leaves of *G. max* L. were found in *Arthrobacter* sp.-inoculated plants followed by *Micrococcus* sp.-inoculated plants under nutrient biostimulation. The results of the effect of nutrient biostimulation without bacterial inoculation on cadmium accumulation in plants found that cadmium contents in the roots, stems and leaves of uninoculated plants under nutrient biostimulation were slightly higher than in the uninoculated plants. However, cadmium contents in plants with bacterial inoculation both with and without nutrient biostimulation were higher than in the uninoculated plants. It could be postulated that nutrient biostimulation might promote the growth and activity of indigenous soil bacteria, resulting in enhanced soil cadmium solubility and bioavailability. This was supported by the work of Margesin and Schinner (2001), who reported that nutrient biostimulation in diesel-oil-contaminated soil increased in the number of indigenous soil microorganisms and oil degraders.

Nutrient biostimulation promoted cadmium uptake and accumulation in inoculated plants. Under the non-biostimulation condition, cadmium contents in the roots, stems and

leaves of *Arthrobacter* sp.-inoculated plants after transplantation for three months were higher than those of the uninoculated control by 65.1%, 62.1% and 33.9%, respectively. Cadmium contents in the roots, stems and leaves of *Arthrobacter* sp.-inoculated plants after transplantation in soil with nutrient biostimulation for three months were higher than those of the uninoculated control without biostimulation by 71.6%, 96.1% and 43.0%, respectively. Our results correspond with the study of [Mahbub et al. \(2017\)](#) the mercury removal from contaminated soil by *Sphingobium* sp. SA2 was improved when nutrients were added, suggesting that the lack of nutrients in the soil is a limiting factor to activate indigenous or inoculated microbial activities. Unfortunately, cadmium concentrations in *G. max* L pods with seeds in all treatments (from 16.36 to 22.10 mg kg⁻¹) exceeded the standard maximum allowable level of cadmium (0.2 mg kg⁻¹) set by the Codex Alimentarius Commission. Even at relatively low cadmium concentrations in soil, cadmium content in *G. max* L. seeds exhibited levels 3-4-fold higher than the Codex's standard for cadmium in grains for human consumption ([Shute and Macfie, 2006](#)). Several physiological processes of *G. max* L. affect cadmium accumulation in *G. max* L. seeds, including the rate of cadmium uptake from the soil, xylem translocation from root to shoot, and phloem movement into seeds during maturation ([Sugiyama et al., 2007](#)).

In addition, cadmium content in the stems and leaves (above-ground tissue) of *G. max* L. in all treatments after transplantation for two months were higher than those observed for other harvesting periods. The growth of *G. max* L. two months after transplantation enters the beginning pod (reproductive) stage. At this stage, *G. max* L. consumes significant nutrients to promote pod formation and may take up additional metals. This is consistent with the study of [Ishikawa et al. \(2005\)](#), who reported that *G. max* L. roots in the reproductive stage take up significant nutrients from the roots to shoots to maintain pods and coincidentally take up cadmium into plant tissue. However, we found that cadmium accumulated more in roots than

in stems and leaves at all harvesting periods. Cadmium content accumulated in *G. max* L. tissues descending in the order as follows: root > stem > leaf.

In general, plant roots take up heavy metals from the soil by both passive transport of water-soluble heavy metals through the root and active transport across the plasma membrane of root epidermal cells. Heavy metals are then transported via the xylem into the shoots for accumulation (Ghosh and Singh, 2005; Nouri et al., 2011). One possible explanation involves the limiting translocation of cadmium from roots to shoots when high cadmium content has already accumulated in the shoots. At high cadmium concentrations, the root cells bind to cadmium, causing cadmium precipitation and adsorption inside the root cells and resulting in a low translocation rate of cadmium to the shoots via xylem (Shute and Macfie, 2006). In addition, cadmium is accumulated in the vacuoles, which are mainly located in plant roots, and can be stored in dead cells in the root system (Grant et al., 1998). In addition, bacterial cells can absorb cadmium ion from a solution; therefore, some cadmium ions in soil solution might be absorbed by bacterial cells (Prapagdee et al., 2013).

The results of cadmium accumulation in one *G. max* L. plant shown in Fig. 4 corresponded well with those obtained from Table 3. This table clearly shows that cadmium accumulation in one bacterially inoculated *G. max* L. was higher than that in the uninoculated control under both biostimulation and non-biostimulation conditions (Fig. 4). Interestingly, cadmium content in the uninoculated plant under biostimulation conditions was slightly higher than that of the uninoculated plant under non-biostimulation conditions at two and three months after transplantation by 16.4% and 17.3%, respectively. This indicates the stimulation effect of nutrient addition on indigenous microorganisms. It was observed that after transplantation for two months under the biostimulation condition, *Arthrobacter* sp.- and *Micrococcus* sp.-inoculated plants had higher cadmium content than the uninoculated plant, by 3.36- and 3.22-fold, respectively. The increase in cadmium content in bacterial-inoculated

plants after two months of harvesting could result in high biomass yield and high accumulation of cadmium in the stems and leaves of *G. max* L. compared to other harvesting periods.

3.4.3 Phytoremediation performance of cadmium in *G. max* L.

The performance of cadmium phytoremediation by *G. max* L. was evaluated by the values of PEC, BAF and TF shown in [Table 4](#). After transplantation for two months, the inoculated plants demonstrated higher PEC and BAF than uninoculated plants in both biostimulation and non-biostimulation conditions. The maximum PEC and BAF values were found in *Arthrobacter* sp.-inoculated *G. max* L. with nutrient biostimulation after two months, followed by *Micrococcus* sp.-inoculated plants. It is clear that PEC and BAF values differed among the various *G. max* L. growth stages in the order of beginning pod stage (2 months) > full seed stage (3 months) > before flowering stage (1 month).

Cadmium was retained more in roots than shoots at all growth stages, resulting in low TF values. This indicates that *G. max* L. limited translocation of cadmium from the root to shoot. There was no significant difference in TF values between the biostimulation and non-biostimulation conditions. However, higher TF values compared to uninoculated plants were found in *Arthrobacter* sp. and *Micrococcus* sp.-inoculated plants after transplantation for two months, which is related to the high cadmium content in the stems and leaves. [Aroa et al. \(2003\)](#) reported that seeds of the *G. max* L. cultivar with low cadmium content also had low cadmium content in the shoots and high cadmium content in the roots, indicating a plant mechanism that prevents cadmium translocation to the shoots by retaining cadmium in the roots.

Similar high PEC and low TF values have been reported in cadmium phytoremediation of *Vigna radiata* L. by [Prapagdee et al. \(2014\)](#). Plants with PEC or BAF

values greater than 1.0 indicate high heavy metal accumulation (Taiwo et al., 2016). However, plants with low TF values are considered to be useful for phytostabilizing plants (Cui et al., 2007; Prapagdee et al., 2014). Our results indicate that *G. max* L. is a cadmium-accumulating plant that is suitable for cadmium phytostabilization. However, different cultivars of *G. max* L. differentially accumulated cadmium in the roots and shoots, and their potential to translocate cadmium to the shoots and seeds depended on the cadmium tolerance in each plant tissue (Grant et al., 1998; Sugiyama et al., 2007). Our findings suggest that the two important major factors affecting PEC, BAF and TF values of *G. max* L. are the cultivar of *G. max* L. and the bacterial inoculum. *G. max* L. is a cadmium-accumulating plant, suitable for cadmium phytostabilization. In addition, an appropriate solution for the further economical use of contaminated plant biomass is its application as a source of energy (Mahar et al., 2016). Therefore, contaminated *G. max* L. seeds could be used for biodiesel production, and *G. max* L. biomass could be used for fuel via direct combustion under control for air pollution and ash.

4. Conclusions

Arthrobacter sp. facilitated cadmium solubility from the non-bioavailable fraction in the soil, particularly for the biostimulation condition with a C:N ratio of 20:1. *G. max* L. at the beginning pod stage (after transplantation for two months) had the highest level of cadmium accumulation in stems and leaves. However, cadmium accumulated more in the roots than in the stems and leaves of *G. max* L. at all growth stages. *Arthrobacter* sp. exhibited the highest ability to enhance cadmium accumulation in *G. max* L (followed by *Micrococcus* sp.) under biostimulation at a C:N ratio of 20:1. *Arthrobacter* sp. inoculation and nutrient biostimulation increased the highest PEC and BCF values at the beginning pod stage. However, TF values were low in all growth stages, suggesting that *G. max* L. is a

phytostabilizing plant. We concluded that the combined use of nutrient biostimulation and bioaugmentation with *Arthrobacter* sp. and *Micrococcus* sp. is a practical, successful technique for improving cadmium phytoremediation.

Acknowledgements

This research was supported by the grant from Thailand Research Fund and Mahidol University (Grant no.RSA5780026).

References

- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals: Concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869–881.
- Arao, T., Ae, N., Sugiyama, M., Takahashi, M., 2003. Genotypic differences in cadmium uptake and distribution in soybeans. *Plant Soil* 251, 247–253.
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T., 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technol.* 96, 1049–1055.
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M.B., Scheckel, K., 2014. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize? *J. Hazard. Mater.* 266, 141–166.
- Carter, M.R., Gregorich, E.G., 2008. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. 2nd ed. CRC Press:Florida.
- Cui, S., Zhou, Q., Chao, L., 2007. Potential hyperaccumulation of Pb, Zn, Cu and Cd in enduring plants distributed in an old smeltery, northeast China. *Environ. Geol.* 51, 1043–1048.

- 472 El-Bestawy, E., Albrechtsen, H.J., 2007. Effect of nutrient amendments and sterilization on
 473 mineralization and/or biodegradation of ^{14}C -labeled MCPP by soil bacteria under
 474 aerobic conditions. *Int. Biodeter. Biodegr.* 59, 193–201.
- 475 Faust, M.B., Christians, N.E., 2000. Copper reduces shoot growth and root development of
 476 creeping bent grass. *Crop Sci.* 40, 498–502.
- 477 Ghosh, M., Singh, S.P., 2005. A comparative study of cadmium phytoextraction by
 478 accumulator and weed species. *Environ. Pollut.* 133, 365–371.
- 479 Glick, B.R., 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28,
 480 367–374.
- 481 Grant, C.A., Buckley, W.T., Bailey, L.D., Selles, F. 1998. Cadmium accumulation in crops.
 482 *Can. J. Plant Sci.* 78, 1–17.
- 483 Guo, J., Chi, J., 2014. Effect of Cd-tolerant plant growth-promoting rhizobium on plant
 484 growth and Cd uptake by *Lolium multiflorum* Lam. and *Glycine max* (L.) Merr. in
 485 Cd-contaminated soil. *Plant Soil* 375, 205–214.
- 486 Ishikawa, S., Ae, N., Sugiyama, M., Murakami, M., Arai, T., 2005. Genotypic variation in
 487 shoot cadmium concentration in rice and soybean in soils with different levels of
 488 cadmium contamination. *Soil Sci. Plant Nutr.* 51, 101–108.
- 489 Khaokaew, S., Landrot, G., 2015. A field-scale study of cadmium phytoremediation in a
 490 contaminated agricultural soil at Mae Sot district, Tak province, Thailand: (1)
 491 Determination of Cd-hyperaccumulating plants. *Chemosphere* 138, 883–887.
- 492 Khonsue, N., Kittisuwan, K., Kumsopa, A., Tawinteung, N., Prapagdee, B., 2013. Inoculation
 493 of soil with cadmium-resistant bacteria enhances cadmium phytoextraction by
 494 *Vetiveria nemoralis* and *Ocimum gratissimum*. *Water Air Soil Pollut.* 224, 1696.

- 495 Kim, I.S., Kang, K.H., Johnson-Green, P., Lee, E.J., 2003. Investigation of heavy metal
496 accumulation in *Polygonum thunbergii* for phytoextraction. Environ Pollut. 126,
497 235–243.
- 498 Kumar, P., Dushenkov, V., Motto, H., Raskin, I., 1995. Phytoextraction: The use of plants to
499 remove heavy metals from soils. Environ. Sci. Technol. 29, 1232–1238.
- 500 Leys, N.M., Bastiaens, L., Verstraete, W., Springael, D., 2005. Influence of the
501 carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation
502 by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66, 726–
503 736.
- 504 Liu, Z.F., Ge, H.G., Li, C., Zhao, Z.P., Song, F.M., Hu, S.B., 2015. Enhanced
505 phytoextraction of heavy metals from contaminated soil by plant co-cropping
506 associated with PGPR. Water Air Soil Pollut. 226, 29.
- 507 Ma, Y., Rajkumar, M., Freitas, H., 2009. Improvement of plant growth and nickel uptake by
508 nickel-plant-growth promoting bacteria. J. Hazard. Mater. 166, 1154–1161.
- 509 Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M.K., Lahori, A.H., Wang, Q., Li, R., Zhang, Z.,
510 2016. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals
511 contaminated soils: A review. Ecotoxicol. Environ. Safe. 126, 111–121.
- 512 Malik, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. Environ. Int. 30, 261 – 278.
- 513 Mahbub, K.R., Krishnan, K., Andrews, S., Venter, H., Naidu, R., Megharaj, M., 2017. Bio-
514 augmentation and nutrient amendment decrease concentration of mercury in
515 contaminated soil. Sci. Total Environ. 576, 303–309.
- 516 Margesin, R., Schinner, F., 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of
517 diesel-oil-contaminated soil in an Alpine glacier skiing area. Appl. Environ.
518 Microbiol. 67, 3127–3133.

- 519 Mattina, M.J.I., Lannucci-Berger, W., Musante, C., White, J.C., 2003. Concurrent plant
520 uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. Environ. Pollut.
521 124, 375–378.
- 522 Nouri, J., Lorestani, B., Yousefi, N., Khorasani, N., Hasani, A.H., Seif, F., Cheraghi, M.,
523 2011. Phytoremediation potential of native plants grown in the vicinity of Ahangaran
524 lead–zinc mine (Hamedan, Iran). Environ. Earth Sci. 62, 639–644.
- 525 Phaenark, C., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Ngernsansaruay, C., 2009. Cd and Zn
526 accumulation in plants from the Padaeng zinc mine area. Int. J. Phytoremediat. 11,
527 479–495.
- 528 Prapagdee, B., Chanprasert, M., Mongkolsuk, S., 2013. Bioaugmentation with cadmium-
529 resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by
530 *Helianthus annuus*. Chemosphere 92, 659–666.
- 531 Prapagdee, B., Chumphonwong, N., Khonsue, N., Mongkolsuk, S., 2012. Influence of
532 cadmium resistant bacteria on promoting plant root elongation and increasing
533 cadmium mobilization in contaminated soil. Fresen. Environ. Bull. 21, 1186–1191.
- 534 Prapagdee, S., Piyatiratitivorakul, S., Petsom A., Tawinteung N., 2014. Application of
535 biochar for enhancing cadmium and zinc phytostabilization in *Vigna radiata* L.
536 cultivation. Water Air Soil Pollut. 225, 2233.
- 537 Prokop, Z., Cupr, P., Zlevorova-Zlamalikova, V., Komarek, J., Dusek, L., Holoubek I., 2003.
538 Mobility, bioavailability, and toxic effects of cadmium in soil samples. Environ. Res.
539 91, 119–126.
- 540 Quevauviller, P., Lachica, M., Barahona, E., Gomez, A., Rauret, G., Ure, A., Muntau, H.,
541 1998. Certified reference material for the quality control of EDTA- and DTPA-
542 extractable trace metal contents in calcareous soil (CRM 600). Fresen. J. Anal.
543 Chem. 360, 505–511.

- 544 Rajkumar, M., Ael, N., Narasimha, M., Prasad, M.N.V., Freitas, H., 2010. Potential of
545 siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. Trends
546 Biotechnol. 28, 142–149.
- 547 Sangthong, C., Duangboobpha, S., Prapagdee, B., 2015. Cadmium removal from water and
548 soil by a cadmium-resistant rhizobacterium and its effect on plant root elongation.
549 EnvironmentAsia 8, 94–100.
- 550 Sangthong, C., Setkit, K., Prapagdee, B., 2016. Improvement of cadmium phytoremediation
551 after soil inoculation with a cadmium resistant *Micrococcus* sp. Environ. Sci. Pollut.
552 Res. 23, 756–764.
- 553 Shute, T., Macfie, S.M., 2006. Cadmium and zinc accumulation in soybean: A threat to food
554 safety? Sci. Total Environ. 371, 63–73.
- 555 Simmons, R.W., Pongsakul, P., Chaney, L., Saiyasitpanich, D., Klinphoklap, S., Nobuntou,
556 W., 2003. The relative exclusion of zinc and iron from rice grain in relation to rice
557 grain cadmium as compared to soybean: Implications for human health. Plant Soil
558 257, 163–170.
- 559 Sugiyama, M., Ae, N., Arao, T., 2007. Role of roots in differences in seed cadmium
560 concentration among soybean cultivars—proof by grafting experiment. Plant Soil
561 295, 1–11.
- 562 Taiwo, A.M., Gbadebo, A.M., Oyedepo, J.A., Ojekunle, Z.O., Alo, O.M., Oyeniran, A.A.,
563 Onalaja, O.J., Ogunjimi, D., Taiwo, O.T., 2016. Bioremediation of industrially
564 contaminated soil using compost and plant technology. J. Hazard. Mater. 304, 166–
565 172.
- 566 Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R., de Carvalho, C.C.C.R., 2011. Bioaugmentation and
567 biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes.
568 Biodegradation 22, 231–241.

- 569 Ullah, A., Heng, S., Munis, M.F.H., Fahad, S., Yang, X., 2015. Phytoremediation of heavy
570 metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. Environ. Exp.
571 Bot. 117, 28–40.
- 572 Walkley A., Black, I.A., 1947. Chromic acid titration method for determination of soil
573 organic matter. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 63:257.
- 574 Wan, X., Let, M., Chen, T., 2016. Cost–benefit calculation of phytoremediation technology
575 for heavy-metal-contaminated soil. Sci. Total Environ. 563-564:796–802.
- 576 Wang, M., Zou, J., Duan, A., Jiang, W., Liu, D., 2007. Cadmium accumulation and its effects
577 on metal uptake in maize (*Zea mays* L.). Bioresource Technol. 98, 82–88.
- 578 Wang, T., Sun, H., Jiang, C., Mao, H., Zhang, Y., 2014a. Immobilization of Cd in soil and
579 changes of soil microbial community by bioaugmentation of UV-mutated *Bacillus*
580 *subtilis* 38 assisted by biostimulation. Eur. J. Soil Biol. 65, 62–69.
- 581 Wang, T., Sun, H., Jiang, C., Mao, H., Zhang, Y., Wang, C., Zhang, Z., Wang, B., Sun, L.,
582 2014b. The immobilization of heavy metals in soil by bioaugmentation of a UV-
583 mutant *Bacillus subtilis* 38 assisted by NovoGro biostimulation and changes of soil
584 microbial community. J. Hazard. Mater. 278, 483–490.
- 585 Xu Y, Lu M., 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different
586 biostimulation and bioaugmentation treatments. J. Hazard. Mater. 183, 395–401.
- 587
- 588
- 589
- 590
- 591
- 592
- 593

Table 1 Physical and chemical properties of cadmium-contaminated soil

Property	Value
Particle size distribution	
- Sand (%)	57
- Silt (%)	24
- Clay (%)	19
Soil texture	Sandy loam
pH (1:1 w/v H ₂ O)	7.50 ± 0.01
Electrical conductivity (1:5)(dS m ⁻¹)	0.20 ± 0.02
Cation exchange capacity (cmol kg ⁻¹)	9.81 ± 0.32
Organic matter (%)	2.02 ± 0.34
Organic carbon (%)	1.17 ± 0.19
Total nitrogen (%)	0.10 ± 0.02
Available phosphorus (mg kg ⁻¹)	13.19 ± 0.17
Extractable potassium (mg kg ⁻¹)	88.10 ± 0.61
Extractable calcium (mg kg ⁻¹)	3893 ± 84
Extractable magnesium (mg kg ⁻¹)	238.8 ± 1.6
Total cadmium (mg kg ⁻¹)	50.35 ± 2.87
Bioavailable cadmium (mg kg ⁻¹)	9.18 ± 0.54

Table 2 Growth of *G. max* L. planted in cadmium-contaminated soil with and without bioaugmentation and nutrient biostimulation

Treatment	Root length (cm)			Stem height (cm)			Dry biomass (g)		
	1 m	2 m	3 m	1 m	2 m	3 m	1 m	2 m	3 m
<u>Non-biostimulation</u>									
Uninoculated control	8.09±0.90 ^a	11.00±1.60 ^a	12.50±1.32 ^a	69.67±2.03 ^a	87.67±2.81 ^a	89.67±4.04 ^a	0.55±0.03 ^a	0.67±0.03 ^a	0.72±0.08 ^a
<i>Micrococcus</i> sp.	15.50±0.21 ^d	16.50±1.12 ^b	21.67±2.52 ^d	73.67±1.02 ^{bc}	94.00±1.66 ^b	101.33±3.06 ^b	1.05±0.03 ^b	1.26±0.07 ^c	1.25±0.04 ^c
<i>Pseudomonas</i> sp.	13.33±0.58 ^c	13.50±0.71 ^{ab}	17.83±1.76 ^{bc}	71.50±2.12 ^a	91.00±1.41 ^{ab}	94.00±2.65 ^{ab}	1.02±0.01 ^b	1.07±0.04 ^b	1.10±0.05 ^b
<i>Arthrobacter</i> sp.	9.04±0.48 ^a	13.20±1.21 ^{ab}	15.00±1.00 ^{ab}	71.00±1.41 ^a	89.50±2.12 ^a	92.33±2.52 ^{ab}	0.58±0.07 ^a	0.65±0.07 ^a	0.80±0.06 ^a
<u>Biostimulation</u>									
Uninoculated control	8.95±0.07 ^a	11.25±0.35 ^a	12.33±1.53 ^a	66.00±4.90 ^a	90.50±2.12 ^a	92.33 ± 2.52 ^{ab}	0.61 ± 0.04 ^a	0.66 ± 0.01 ^a	0.86 ± 0.03 ^a
<i>Micrococcus</i> sp.	16.73±0.53 ^c	17.50±0.71 ^c	25.83±1.76 ^c	75.50±0.71 ^c	106.70±5.53 ^c	111.50 ± 4.19 ^c	1.18 ± 0.08 ^c	1.41 ± 0.04 ^d	1.37 ± 0.08 ^{cd}
<i>Pseudomonas</i> sp.	11.75±0.35 ^{bc}	16.10±1.02 ^{ac}	18.33±1.53 ^c	71.01±1.41 ^a	108.10±2.17 ^c	98.67 ± 3.16 ^b	1.07 ± 0.02 ^b	1.15 ± 0.05 ^{bc}	1.17 ± 0.04 ^b
<i>Arthrobacter</i> sp.	9.50±0.71 ^a	15.00±1.41 ^{ab}	16.67±1.14 ^b	70.50±2.83 ^a	92.50±3.54 ^{ab}	97.00 ± 2.65 ^b	0.70 ± 0.08 ^a	0.71 ± 0.09 ^a	0.88 ± 0.08 ^a

The means and the SE (n = 3) followed by a different lowercase letter within a same column of both non-biostimulation and biostimulation indicates a significant difference at p < 0.05 according to Duncan’s multiple range test.

Table 3 Cadmium contents in each part of *G. max* L. plants planted in cadmium-contaminated soil with and without bioaugmentation and nutrient biostimulation

Treatment	Cadmium contents (mg kg ⁻¹ plant dry weight)									
	Root			Stem			Leaf			Pod*
	1 m	2 m	3 m	1 m	3 m	2 m	1 m	2 m	3 m	3 m
<u>Non-biostimulation</u>										
Uninoculated control	79.90±1.14 ^a	90.01±5.44 ^a	203.04±4.39 ^a	8.15±0.07 ^a	203.04±4.39 ^a	33.09±1.17 ^a	11.97±1.31 ^a	7.05±0.07 ^a	20.00±2.83 ^a	23.17±0.75 ^a
<i>Micrococcus</i> sp.	87.21±2.11 ^b	156.17±13.33 ^{cd}	244.27±5.04 ^c	10.43±0.04 ^c	244.27±5.04 ^c	65.50±3.77 ^d	18.50±0.39 ^b	9.13±0.01 ^d	46.33±4.93 ^c	29.43±0.80 ^{bc}
<i>Pseudomonas</i> sp.	87.00±2.83 ^b	104.00±4.71 ^b	217.87±2.35 ^b	9.75±0.07 ^b	217.87±2.35 ^b	28.84±2.37 ^a	14.17±0.31 ^a	8.50±0.04 ^b	19.89±3.66 ^a	29.30±1.00 ^{bc}
<i>Arthrobacter</i> sp.	93.05±2.76 ^c	220.33±5.30 ^c	335.20±9.57 ^c	10.80±0.71 ^c	335.20±9.57 ^c	46.04±3.14 ^c	19.40±0.46 ^b	9.15±0.07 ^d	32.89±6.53 ^b	31.03±0.53 ^c
<u>Biostimulation</u>										
Uninoculated control	82.49±1.01 ^a	92.04±6.63 ^a	237.69±2.85 ^c	9.50±0.71 ^b	237.69±2.85 ^c	36.74±1.76 ^b	13.20±0.40 ^a	9.00±0.12 ^c	22.01±1.04 ^a	26.83±1.29 ^b
<i>Micrococcus</i> sp.	98.35±2.94 ^d	171.50±11.00 ^d	285.67±3.51 ^d	10.10±0.05 ^c	285.67±3.51 ^d	74.75±4.15 ^e	22.85±0.53 ^c	9.41±0.04 ^e	57.86±3.91 ^d	32.73±1.70 ^d
<i>Pseudomonas</i> sp.	88.68±1.04 ^b	131.04±6.78 ^c	302.08±9.01 ^d	9.40±0.31 ^b	302.08±9.01 ^d	44.28±4.66 ^c	20.33±0.58 ^b	8.80±0.15 ^c	39.09±2.57 ^b	30.84±0.40 ^c
<i>Arthrobacter</i> sp.	98.50±2.28 ^d	327.50±8.61 ^f	348.50±12.15 ^e	11.20±0.67 ^d	348.50±12.15 ^e	84.95±3.22 ^f	23.47±0.79 ^c	10.50±0.23 ^f	61.64±1.67 ^d	33.13±1.37 ^d

The means and the SE (n = 3) followed by a different lowercase letter within a same column of both non-biostimulation and biostimulation indicates a significant difference at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test. An asterisk (*) indicates pods with seeds of *G. max* L. of combined 3 samples.

Table 4 Performance of *G. max* L. on cadmium phytoextraction, bioaccumulation and translocation with and without bioaugmentation and nutrient biostimulation

3

Treatment	Phytoextraction coefficient (PEC)			Bioaccumulation factor (BAF)			Translocation factor (TF)		
	1 m	2 m	3 m	1 m	2 m	3 m	1 m	2 m	3 m
<u>Non-biostimulation</u>									
Uninoculated control	0.26±0.02 ^a	0.71±0.05 ^a	0.93±0.10 ^a	0.97 ± 0.07 ^a	1.63±0.21 ^a	1.51±0.11 ^a	0.10±0.01 ^a	0.24±0.03 ^a	0.09±0.01 ^a
<i>Micrococcus</i> sp.	0.28±0.04 ^a	1.44±0.14 ^c	0.97±0.06 ^a	1.21 ± 0.11 ^{ab}	4.84±0.40 ^d	2.74±0.14 ^c	0.11±0.01 ^a	0.32±0.01 ^b	0.10±0.01 ^a
<i>Pseudomonas</i> sp.	0.27±0.02 ^a	0.90±0.08 ^b	0.82±0.04 ^a	1.12 ± 0.09 ^a	2.38±0.11 ^b	2.18±0.08 ^b	0.12±0.01 ^a	0.21±0.02 ^a	0.10±0.02 ^a
<i>Arthrobacter</i> sp.	0.32±0.03 ^a	1.16±0.11 ^b	1.03±0.11 ^a	1.31 ± 0.07 ^b	3.78±0.32 ^c	2.89±0.11 ^c	0.11±0.01 ^a	0.38±0.02 ^c	0.11±0.01 ^a
<u>Biostimulation</u>									
Uninoculated control	0.28±0.02 ^a	0.82±0.04 ^a	0.91±0.05 ^a	1.08±0.07 ^a	1.91±0.21 ^a	1.69±0.22 ^a	0.11±0.01 ^a	0.28±0.01 ^a	0.09±0.01 ^a
<i>Micrococcus</i> sp.	0.33±0.01 ^a	1.83±0.11 ^d	1.38±0.19 ^b	1.59±0.10 ^c	5.90±0.26 ^c	3.38±0.31 ^d	0.10±0.02 ^a	0.35±0.02 ^{bc}	0.11±0.01 ^a
<i>Pseudomonas</i> sp.	0.29±0.02 ^a	1.20±0.12 ^c	0.93±0.08 ^a	1.19±0.05 ^{ab}	2.77±0.42 ^b	2.33±0.19 ^b	0.09±0.01 ^a	0.27±0.03 ^a	0.10±0.03 ^a
<i>Arthrobacter</i> sp.	0.34±0.02 ^a	3.05±0.15 ^e	1.42±0.07 ^b	2.05±0.21 ^d	6.75±0.39 ^f	3.50±0.24 ^d	0.11±0.01 ^a	0.39±0.03 ^c	0.12±0.01 ^a

4

The means and the SE (n = 3) followed by a different lowercase letter within a same column of both non-biostimulation and biostimulation indicates a significant difference at p < 0.05 according to Duncan’s multiple range test.

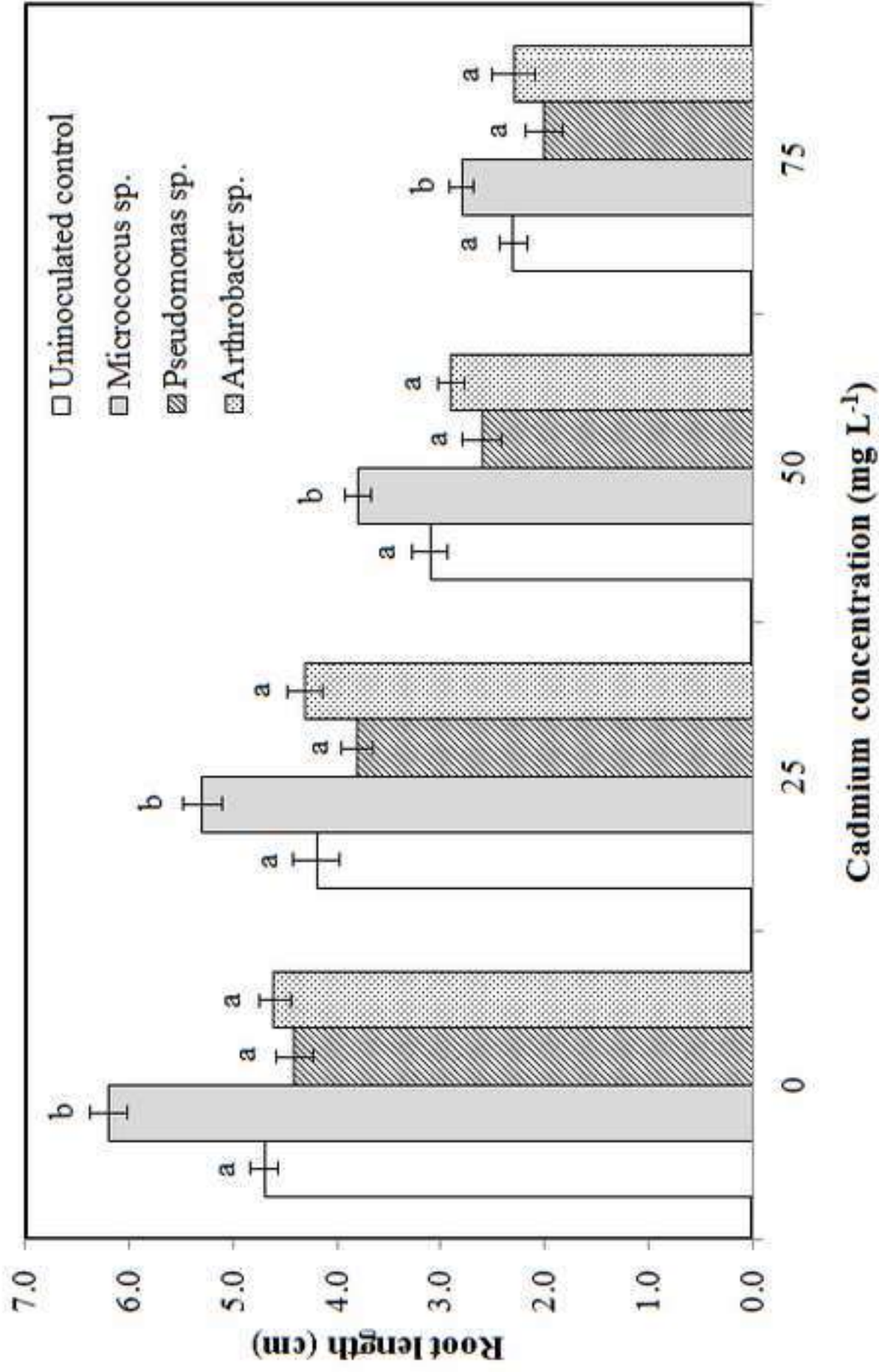


Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

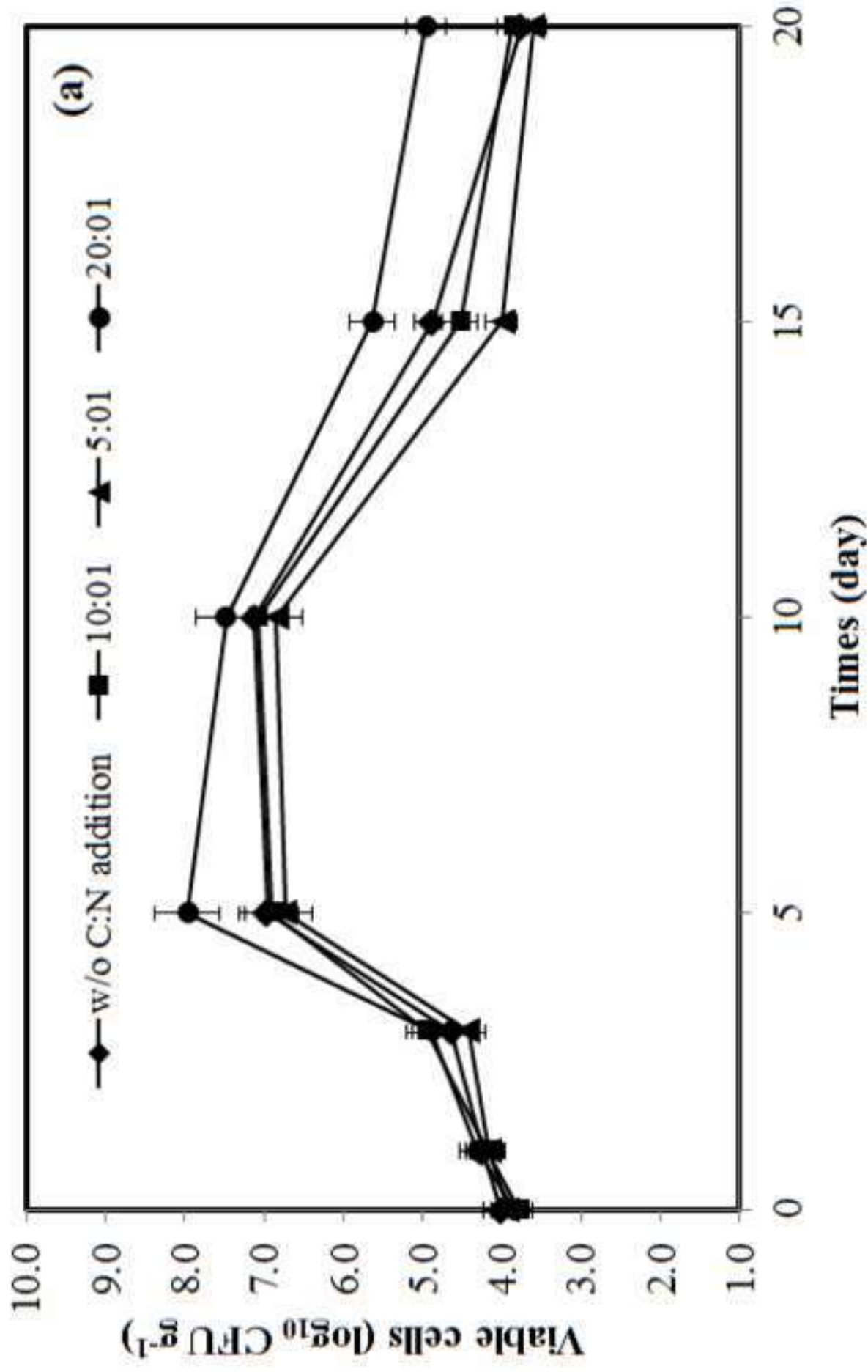


Figure 2a

[Click here to download high resolution image](#)

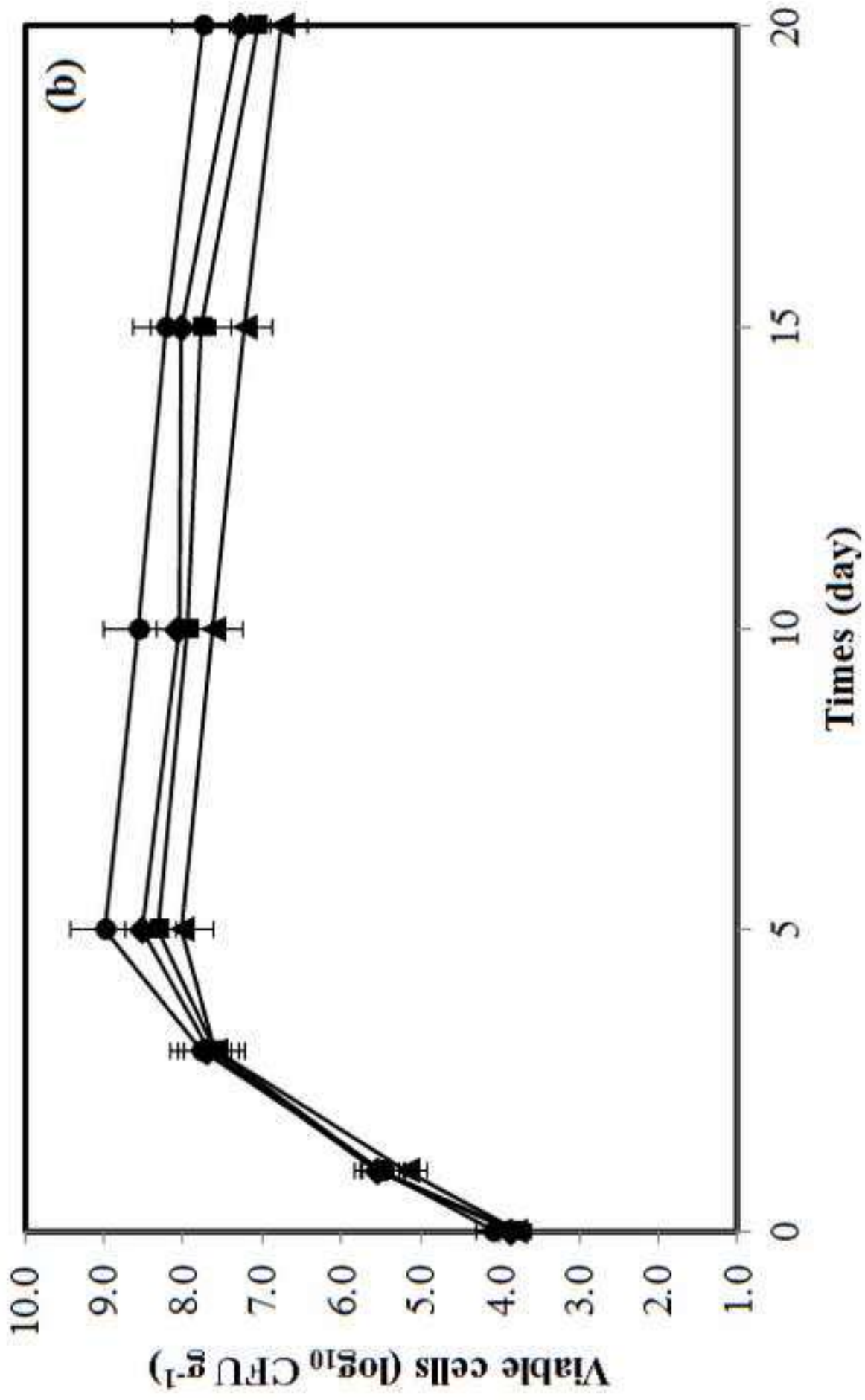


Figure 2b

[Click here to download high resolution image](#)

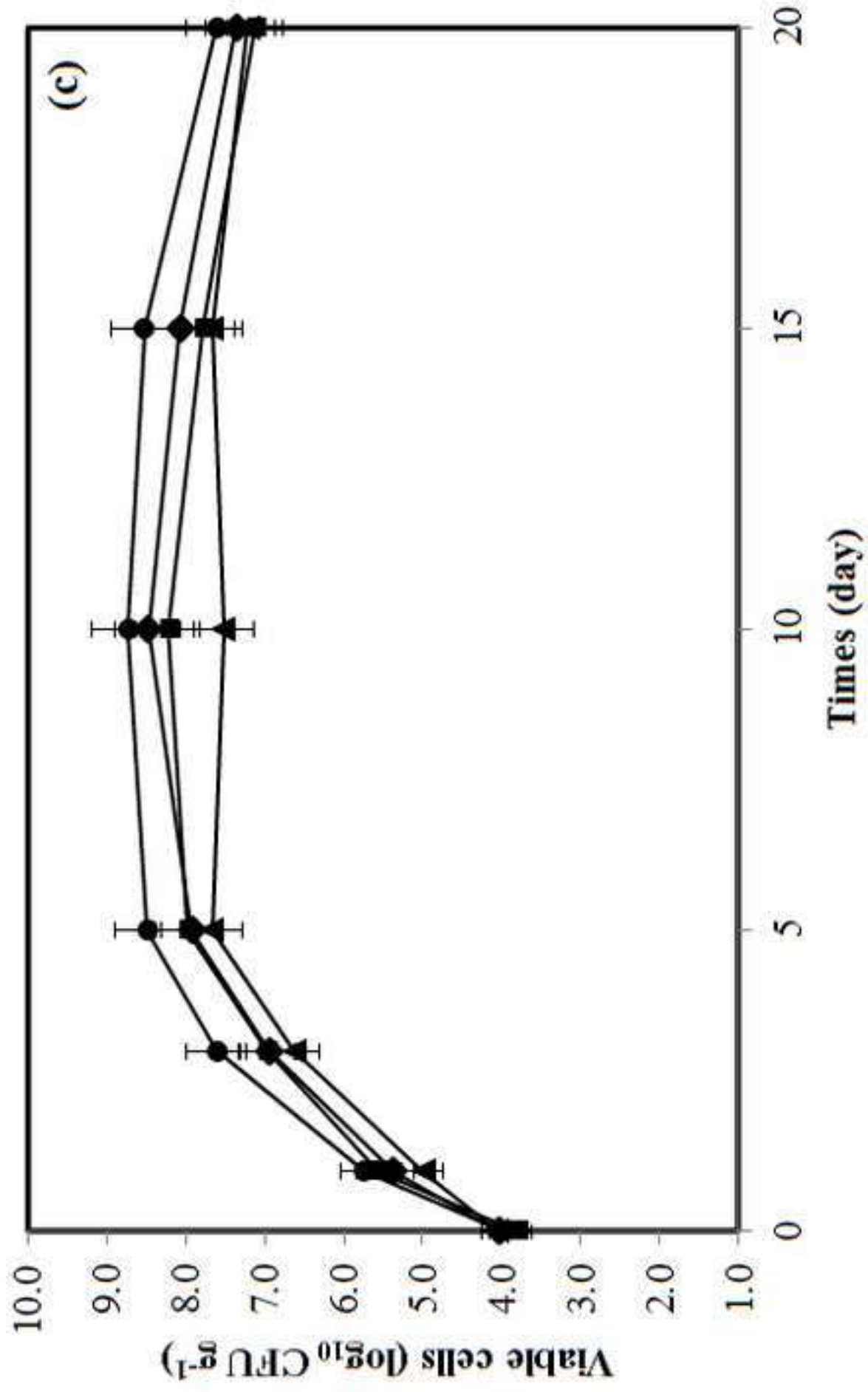


Figure 2c

[Click here to download high resolution image](#)

Figure 3

[Click here to download high resolution image](#)

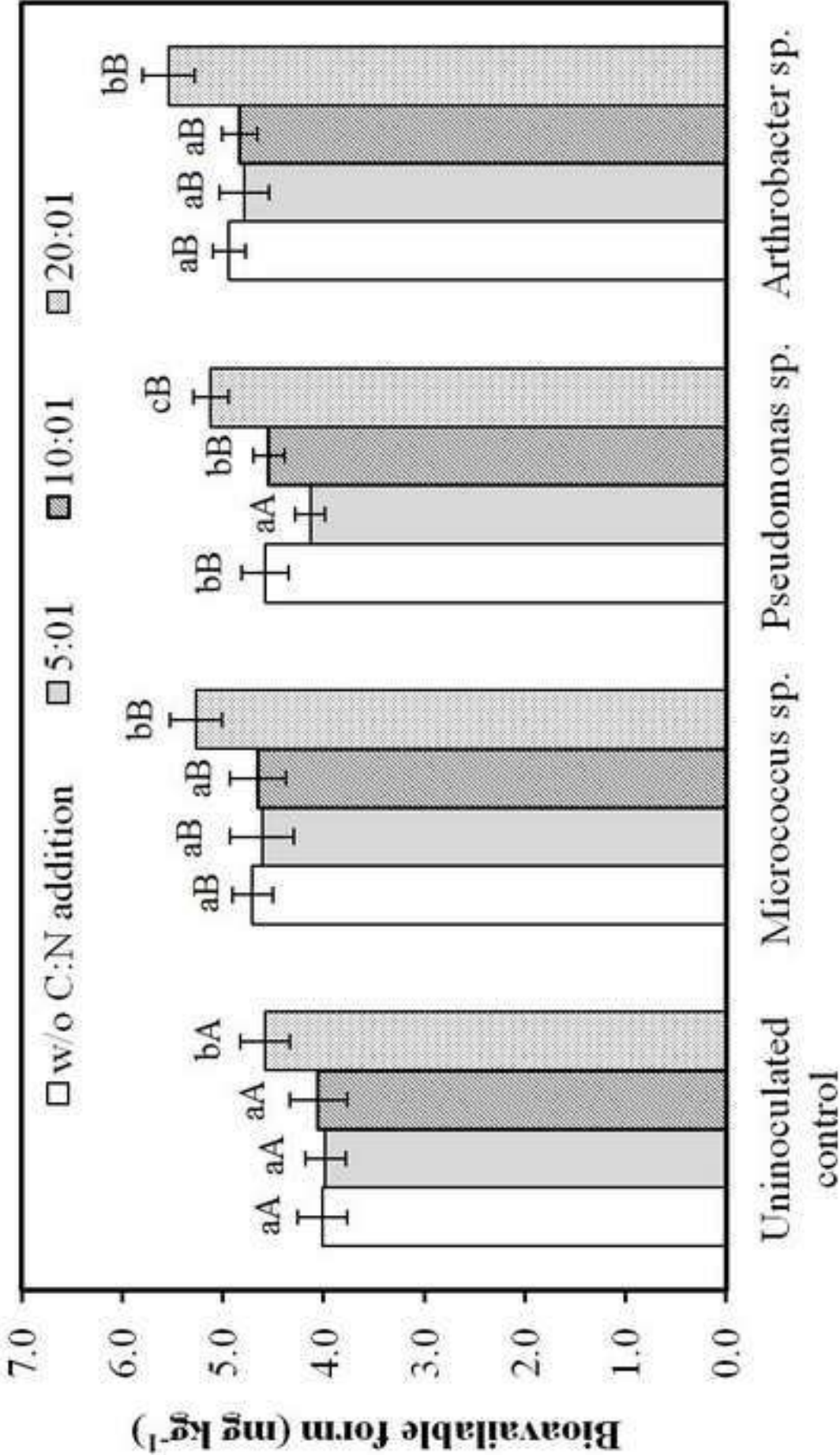


Figure 4

[Click here to download high resolution image](#)

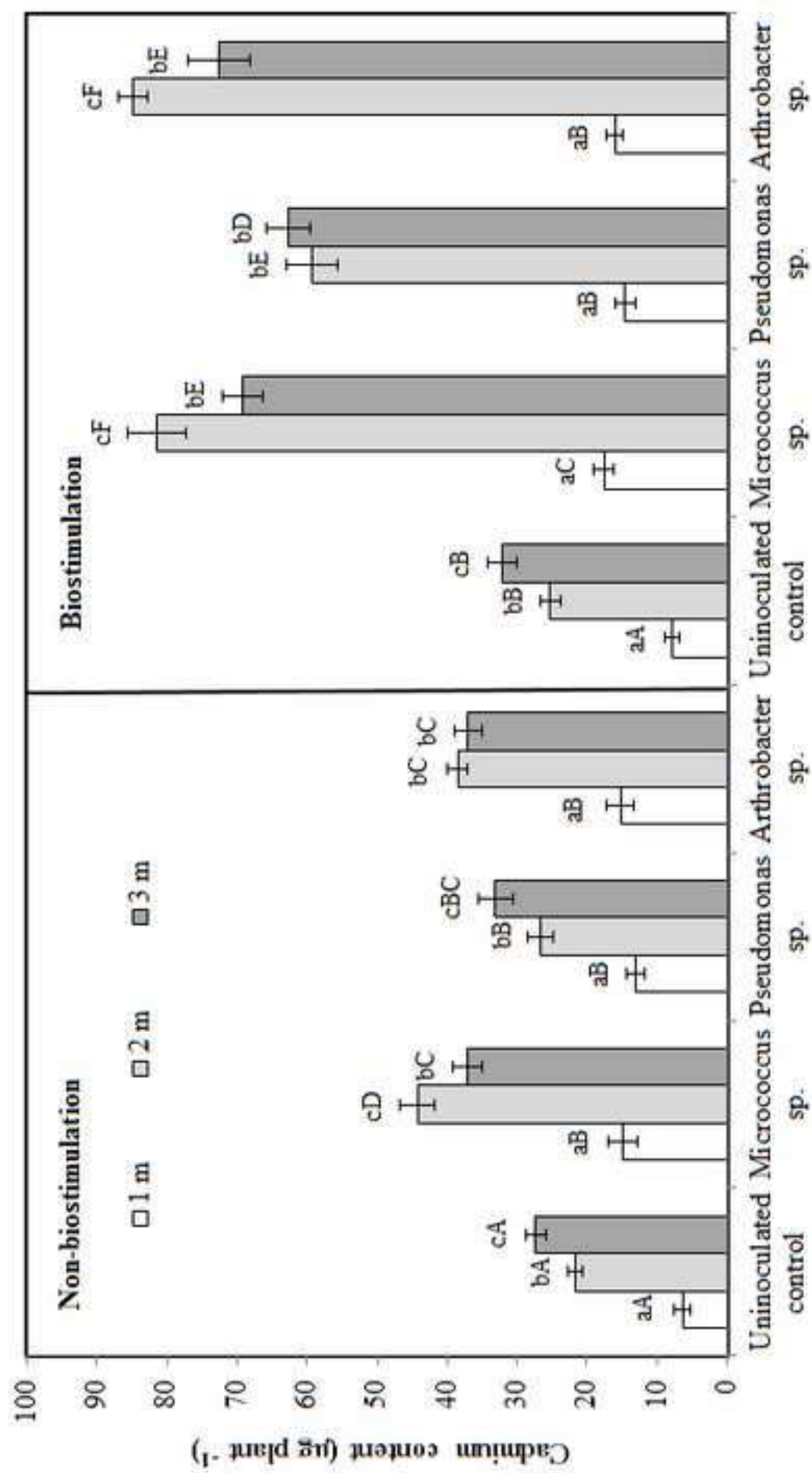


Figure Captions

Fig. 1 Root elongation of *G. max* L. with and without cadmium-resistant bacteria inoculation under toxic cadmium conditions. Error bars represent SE (n = 20), and a different lowercase letter above a bar graph of each cadmium concentration denotes a significant difference at $p < 0.05$ compared with the uninoculated control.

Fig. 2 The numbers of viable cells of (a) *Micrococcus* sp., (b) *Pseudomonas* sp. and (c) *Arthrobacter* sp. in cadmium-contaminated soil with and without nutrient biostimulation. Error bars represent SE (n = 3).

Fig. 3 Levels of bioavailable cadmium concentration in contaminated soil inoculated with cadmium-resistant bacteria with and without nutrient biostimulation. The error bars represent the SE (n = 3), and a different lowercase letter above a bar graph denotes a significant difference at $p < 0.05$ among the different C:N ratios. A different uppercase letter above a bar graph at the same C:N ratio indicates a significant difference at $p < 0.05$ of bacterial inoculation compared to the uninoculated control. An asterisk (*) denotes a non-significant difference at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

Fig. 4 Cadmium concentrations accumulated in a whole *G. max* L. plant after transplantation to cadmium-contaminated soil with and without nutrient biostimulation for 3 months. The error bars represent the SE (n = 3), and a different lowercase letter above a bar graph denotes a significant difference at $p < 0.05$ among the different harvesting periods. A different uppercase

23 letter above a bar graph in the same harvesting period indicates a significant difference at $p <$
24 0.05 of bacterial inoculation compared to the uninoculated control.

25