สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกและจำแนกแบคทีเรียที่สามารถทนโครเมทและรีดิวซ์โครเมท จากบ่อบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานฟอกหนัง

Isolation and Identification of Chromate Resistant and Chromate Reducing Bacteria from Tannery Water Treatment Plant

โดย

อภิรดี ปิลันธนภาคย์
ดร.ชัชวลี กะลัมพะเหติ
สุดารัตน์ บุญจันทร์

27 มี.ค. 2552
249310

เริ่มบริการ
27 เม.ย. 2552

BK 0030839

ได้รับทุนอุดหนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพา
ปีงบประมาณ 2538-2539

ชื่อโครงการ การแยกและจำแนกแบคทีเรียที่สามารถทนโครเมทและสามารถรีดิวซ์โครเมท จากบ่อบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานฟอกหนัง

Isolation and Identification of Chromate Resistant and Chromate Reducing Bacteria from Tannery Water Treatment Plant

คณะผู้วิจัย นางสาวอภิรดี ปิลันธนภาคย์

*ดร. ชัชวลี กะล้มพะเหติ

นางสาวสุดารัตน์ บุญจันทร์

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

*ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ได้รับทุนอุดหนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพา ปีงบประมาณ 2538 - 2539 จำนวนเงิน 214,400 บาท

บทคัดย่อ

จากการตรวจหาแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์โครเมท จากบ่อบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานฟอกหนัง จังหวัดสมุทรปราการ สามารถแยกแบคทีเรียที่รีดิวซ์โครเมทได้จากแอคติเวเตดสลัดจ์จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Act 11 ซึ่งการจำแนกทางชีวเคมีเบื้องต้นพบว่าเป็น *Pseudomonas maltophilia* มีระดับการทนโครเมท (MIC) เท่ากับ 1.5 มิลลิโมลาร์ จากการตรวจหาพลาสมิดโดยวิธี alkali - lysis พบว่ามีพลาสมิดขนาด 80 และ 50 กิโลเบสตามลำดับ *Pseudomonas maltophilia* Act 11 สามารถรีดิวซ์โครเมทได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิระหว่าง 30 - 40 องศาเซลเซียส และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่าง 7 - 9 ที่สภาวะดังกล่าว *Ps maltophilia* Act 11 สามารถรีดิวซ์โปตัสเซียมไดโครเมทความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้สมบูรณ์ในเวลา 6 - 8 ชั่วโมง ขึ้นกับอายุและปริมาณเชื้อตั้งต้น การลดลงของปริมาณโครเมียม (VI) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสอดคล้องกับการเพิ่มของปริมาณโครเมียม (III)ในเซลล์แบคทีเรีย

Abstract

One strain of chromate reducing bacteria Act 11 was isolated from activated sludge of tannery water treatment plant, Samutrprakarn province. This bacterial strain was identified as *Pseudomonas maltophilia* with the chromate MIC value of 1.5 millimolar. Alkali lysis extraction method showed 2 plasmids size of 80 and 50 kilobase. *Pseudomonas maltophilia* Act 11 can reduce chromate in aerobic condition, When the temperature is betaween 30 - 40°C and the pH range of culture media is 7 - 9. At this condition the bacterial strain can reduce 0.6 mM $K_2Cr_2O_7$ in culture media completely in 6 - 8 hours depend on the size and age of inoculum. Decreasing of chromium (VI) in culture media corresponding to the increasing of chromium (III) in bacterial cell.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
บทที่1 บทนำ	1
บทที่2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการ	6
การเก็บตัวอย่าง	6
อาหารเลี้ยงเชื้อ	6
แบคทีเรีย	6
การกำหนดชื่อแบคทีเรีย	6
วิธีทดลอง	7
บทที่4 ผลการทดลอง	10
การแยกแบคทีเรียทนโครเมทจากตัวอย่าง	10
การแยกแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์โครเมทจากตัวอย่าง	10
การหาค่า MIC ของแบคทีเรียทนโครเมทและรีดิวซ์โครเมท	13
การตรวจหาพลาสมิดดีเอ็นเอในแบคทีเรียทนโครเมท และรีดิวซ์โครเมท	14
การศึกษาโครเมทรีดักชันเบื้องต้น	16
การศึกษาสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการรีดิวซ์โครเมทและสะสมโครเมียม (III) ในเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี UV-visible Spectophotometry	18
บทที่5 สรุปและอภิปรายผล	29
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	39
ภาคผนวก ก	40
ภาคผนวก ข	42

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 การจัดกลุ่มแบคทีเรียจากการย้อมกรัม และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	10
2 ความสามารถในการรีดิวซ์โครเมียมของแบคทีเรียจากตัวอย่างบริเวณต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโปรตัสเซียมไดโครเมทต่างๆกัน	12
3 ปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมทสายพันธุ์ Inf1 และสายพันธุ์ Act 11	13
4 ระดับการทนโครเมทของแบคทีเรียทนโครเมท	15
5 ค่า MIC ขนาด และ จำนวนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตรวจพบในแบคทีเรียทนโครเมท จำนวน 10 สายพันธุ์ และแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมทจำนวน 2 สายพันธุ์	15

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

1 ความสามารถในการรีดิวซ์โครเมียมในสภาวะแอโรบของแบคทีเรียจากตัวอย่างบริเวณต่างๆ ที่เลี้ยงใน KSC medium ที่มี $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ 11

2 อะกาโลสเจลอิเลกโตรฟอริซีสของพลาสมิดที่แยกได้จาก *Pseudomonas maltophilia* ที่สามารถรีดิวซ์โครเมทได้ 16

3 ความสามารถในการรีดิวซ์โครเมทของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทิ้งจากการศึกษารีดักชันเบื้องต้น 17

4 ผลการ scan เพื่อหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบโครเมียม ในช่วงความยาวคลื่น 200 - 700 นาโนเมตร 19

5 กราฟมาตรฐานแสดงการดูดกลืนแสงของสารละลาย Cr(VI) ที่ความยาวคลื่น 351 นาโนเมตร 20

6 กราฟมาตรฐานแสดงการดูดกลืนแสงของสารละลาย Cr(III) ที่ความยาวคลื่น 527 นาโนเมตร 20

7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cr(VI) ในส่วนน้ำใสกับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน KSC medium ที่ผสมโปตัสเซียมไดโครเมทความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 22

8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cr(III) ในเซลล์ กับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน KSC medium ที่ผสมโปตัสเซียมไดโครเมทความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 23

9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cr(VI) ในส่วนน้ำใสกับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน KSC medium pH 5 - 9 ที่ผสมโปตัสเซียมไดโครเมท ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 25

10 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cr(III) ภายในเซลล์ กับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน KSC medium pH 5 - 9 ที่ผสมโปตัสเซียมไดโครเมท ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 26

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

11 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cr(VI) ในส่วนน้ำใสกับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน KSC medium pH8 ที่ผสมโปตัสเซียมไดโครเมท ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส 27

12 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cr(III) ในเซลล์ กับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน KSC medium pH 8 ที่ผสมโปตัสเซียมไดโครเมท ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส 28

บทที่ 1
บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่กำลังพัฒนา มีการพัฒนาทางด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ ขึ้นเป็นอย่างมาก ซึ่งผลกระทบที่ควรคำนึงถึงจากการพัฒนานี้ คือปัญหามลพิษจากโรงงานอุตสาหกรรมที่จะมีผลต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพอนามัยของประชาชน โครเมียมเป็นโลหะหนักชนิดหนึ่งที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมสี อุตสาหกรรมชุบโลหะ อุตสาหกรรมไม้แปรรูป รวมถึงอุตสาหกรรมการฟอกหนัง ถึงแม้ว่าโรงงานเหล่านี้จะมีการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานก่อนปล่อยสู่สภาพแวดล้อมภายนอกแล้วก็ตาม แต่ก็ยังพบว่ามีโครเมียมปะปนอยู่ในน้ำทิ้งจำนวนหนึ่ง ซึ่งเมื่อมีการระบายน้ำทิ้งเหล่านี้ออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติก็จะทำให้เกิดการปนเปื้อนของโครเมียมในสิ่งแวดล้อม ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ hexavalent [chromium (VI), Chromate] หรือ trivalent [Chromium (III)] โครเมียมที่อยู่ในรูป hexavalent จะมีความเป็นพิษมากกว่า trivalent (Petrilli and DeFlora, 1977) โดยจะมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด และยังเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย (Petrilli DeFlora, 1977; Venitt and Levy, 1974) ดังนั้นการหาวิธีที่จะลดความเป็นพิษของโครเมียมที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้งก่อนจะปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมจึงจำเป็นและมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

ปัจจุบันการลดความเป็นพิษของโครเมท สามารถทำได้โดยวิธีทางเคมีด้วยการใช้สารเคมีตกตะกอนโครเมทให้ได้เป็นโครเมียมไฮดรอกไซด์ซึ่งไม่ละลายน้ำ แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือต้องมีการปรับสภาพ pH ของน้ำให้มีความเหมาะสมตามชนิดของสารเคมีที่ใช้ และต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง การลดความเป็นพิษของโครเมทอีกวิธีหนึ่งสามารถทำได้ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากพิษของโลหะหนักรวมทั้งโครเมียม ทำให้สามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีโลหะหนักได้ โดยทั่วไปกลไกที่แบคทีเรียใช้ในการทนโลหะหนักได้แก่ การเปลี่ยนรูปโลหะหนักที่เป็นพิษให้อยู่ในรูปที่มีความเป็นพิษลดลง การสะสมโลหะหนักไว้ในเซลล์ส่วนที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ การดูดซับโลหะหนักไว้ที่ผิวเซลล์ การลดการนำโลหะหนักเข้าเซลล์หรือเร่งการส่งโลหะหนักออกจากเซลล์ (Gadd, 1989) ในกรณีของการทนโครเมท กลไกที่พบบ่อยได้แก่ การลดการนำโครเมทเข้าสู่เซลล์ และการรีดิวซ์โครเมทให้ไปอยู่ในรูป chromium (III) เป็นไปได้ว่ากลไกการรีดิวซ์โครเมทให้เป็น chromium (III) ซึ่งมีพิษลดลงเป็นกลไกที่มีประโยชน์ทั้งในด้านการลดความเป็นพิษของโครเมียมในสภาวะแวดล้อมและการนำเอาโครเมียมที่มีอยู่ออกจากน้ำทิ้งกลับมาใช้ใหม่ เนื่องจากโครเมียมในรูป Chromium (III) สามารถตกตะกอน

เป็นโครเมียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งไม่ละลายน้ำในสภาพ pH ที่เป็นกลาง (Cervantes and Silver, 1992; Silver and Walderhaug, 1992)

ในประเทศไทยมีอุตสาหกรรมหลายประเภทที่ใช้โครเมียมในกระบวนการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อุตสาหกรรมการฟอกหนัง โดยใช้โครเมียมในรูป Cr_2O_3 เป็นสารฟอกหนัง ทำให้คาดว่าน่าจะมีการคัดเลือกจุลินทรีย์ทนโครเมียมในธรรมชาติไว้มาก จุลินทรีย์เหล่านี้อาจใช้กลไกในการทนแบบรีดักชัน หรือลดการสะสมโครเมทดังที่มีผู้รายงานไว้ในสายพันธุ์ต่างประเทศ หรืออาจจะมีกลไกอื่นๆ นอกจากนี้ ซึ่งอาจมีประโยชน์ในการนำมาใช้งานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ งานวิจัยนี้ จึงมุ่งศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนโครเมท และรีดิวซ์โครเมทจากน้ำทิ้งและแหล่งปนเปื้อนโครเมียม เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้แบคทีเรียในการบำบัดน้ำทิ้งที่ปนเปื้อนโครเมียม

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. เพื่อแยกและจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามาถในการทนโครเมท และสามารถรีดิวซ์โครเมทจากบ่อบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานฟอกหนัง
2. เพื่อศึกษากลไกเบื้องต้นในการทนต่อโครเมทของแบคทีเรียที่แยกได้
3. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพและมีกลไกที่เป็นประโยชน์ไว้ทำการศึกษาต่อไป

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

แบคทีเรียและข้อมูลที่ได้จากการวิจัย จะใช้เป็นแนวทางในการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้วิธีทางชีวภาพ กำจัดโครเมทที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้ง

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

สารประกอบโครเมียมเป็นสารที่ใช้มากในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ มีหลายรูปแบบ รูป Cr(VI) หรือโครเมทเป็นรูปที่สามารถทำอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยพบว่าเป็นสารก่อมะเร็งในคนและสัตว์ เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียและรา (Ottow and Klopotek, 1969; Venitt and Levy, 1974) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแบคทีเรียหลายชนิดและยีสต์ *Candida* sp. สามารถทนโครเมทได้ โดยยีสต์นี้สามารถทนโครเมทที่ความเข้มข้นสูงถึง 10 มิลลิโมลาร์ (Baldi *et al*, 1990) แบคทีเรียที่มีรายงานว่าทนโครเมทได้แก่ *Pseudomonas* sp. ต่างๆ ได้แก่ *Pseudomonas fluorescens* (Bopp *et al*, 1983), *Pseudomonas ambigua* และ *Pseudomonas aerugionsa* (Summer and Jacoby, 1978; Horitsu *et al*, 1983) *Streptococcus lactis, Alcaligenes eutrophus, Aeromonas* sp. และ *Enterobacter cloacae* (Efstathiou and Mokay, 1977; Nies and Silver, 1989; Wang *et al*, 1989)

ความสามารถในการทนโลหะหนักเป็นคุณสมบัติหนึ่งที่เซลล์มีไว้เพื่อป้องกันอันตรายต่อเซลล์ ในการที่ต้องอยู่ในสภาวะที่มีโลหะหนัก โดยเซลล์จะใช้กลไกหลายชนิดช่วยในการทน ในกรณีของการทนโครเมทมีรายงานว่า เกิดจากกลไก 2 กลไกคือ ความสามารถในการลดการนำโครเมทเข้าเซลล์ และความสามารถในการรีดิวซ์โครเมทจาก Cr^{+6} ไปเป็น Cr^{+3} ซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่า (Mergeay, 1991) โดยขบวนการรีดักชันของโครเมท ซึ่งจัดว่าเป็นกลไกใหม่ในการทำลายพิษของโลหะหนักโดยแบคทีเรีย และกำลังเป็นที่สนใจในแง่ของการนำไปใช้แก้ปัญหามลพิษทางเทคโนโลยีชีวภาพ (Mergeay, 1991; Silver, 1992)

ความสามารถในการทนโลหะหนักของแบคทีเรียสามารถทราบได้จากการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะหนักที่ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยในปี คศ. 1989 Nieto และคณะ (Nieto *et al*, 1989) ได้ศึกษาแบบแผนของการทนต่อโลหะหนัก 10 ชนิด รวมทั้งโครเมียมของ moderately halophillic eubacteria โดยการหาค่า MIC ด้วยวิธี agar dilution แบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้แก่ *Deleya halophila* 37 สายพันธุ์, *Acinetobacter* sp. 24 สายพันธุ์, *Flavobacterium* sp. 28 สายพันธุ์ และ moderately halophillic eubacteria ที่เป็นแกรมบวกรูปกลมต่าง ๆ ได้แก่ *Marinococcus* sp. , *Sporosarcina* sp. , *Micrococcus* sp. และ *Staphylococcus* sp. พบว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีค่า MIC ต่อโลหะชนิดต่างๆ เหมือนกันหรือแตกต่างกันออกไป ขึ้นกับชนิดของโลหะหนักที่ใช้ และ

ชนิดสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการทนโลหะหนักยังขึ้นกับความเค็ม และความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย

ความสามารถในการทนโครเมียม และความสามารถในการรีดิวซ์โครเมียมเป็นกลไกที่เกิดเป็นอิสระต่อกัน ความสามารถในการทนโครเมียมจากการลดการนำโครเมียมเข้าเซลล์ควบคุมโดยจีนทั้งบนพลาสมิดและโครโมโซม ในขณะที่ไม่พบว่าจำเป็นจะต้องมี genetic determinant ที่จำเพาะต่อการรีดิวซ์โครเมทเป็น chromium (III) Bopp และคณะ (Bopp *et al*, 1983) ได้ศึกษาพลาสมิดที่ควบคุมการทนต่อโครเมียมใน *P. fluorescens* พบว่า *P. fluorescens* ซึ่งทนต่อโครเมียมที่แยกได้จากดินตะกอนที่ปนเปื้อน มีพลาสมิดที่ควบคุมการทน ถ้าทำให้พลาสมิดหายไปจะทำให้คุณสมบัติการทนโครเมียมเสียไป แต่ถ้าทำการถ่ายทอดพลาสมิดนี้ให้กับ *P. fluorescens* หรือ *E. coli* ที่ไม่ทนโครเมียมจะสามารถทำให้แบคทีเรียทั้งสองนี้เกิดการทนโครเมียมขึ้นได้ แบคทีเรียทนโครเมียมที่มีสาเหตุมาจากการมีพลาสมิด ยังมีรายงานในแบคทีเรียอีกหลายชนิด เช่น *A. eutrophus*, *P. ambigua* และ *Streptococcus lactis* (Diels and Mergeay, 1990; Mergeay, 1991) ส่วนการรีดิวซ์โครเมทที่ควบคุมโดยพลาสมิดมีรายงานใน *Ps. aeruginosa* โดย Cervantes และคณะ (Cerventes *et al*, 1990) ได้ทำการโคลนพลาสมิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* เข้าในเวกเตอร์ pSUP 104 พบว่า พลาสมิดลูกผสมใน *Pseudomonas aeruginosa* pA01 สามารถรีดิวซ์โครเมทได้ การรีดิวซ์โครเมทควบคุมโดยเอ็นไซม์โครเมทรีดักเตส ซึ่งสามารถทำงานได้นอกเซลล์แบคทีเรีย (Shen and Wang, 1993; Suzuki *et al*, 1992)

ประสิทธิภาพและความสามารถในการทนต่อโครเมท และรีดิวซ์โครเมทขึ้นกับปัจจัยหลายชนิด ทั้งปัจจัยทางกายภาพ และชีวภาพ ปัจจัยเหล่านี้ได้แก่ ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ ค่าpH ความเข้มข้นโครเมทในสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียบางชนิดสามารถรีดิวซ์โครเมทได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ในขณะที่แบคทีเรียบางชนิดรีดิวซ์โครเมทได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน นอกจากนี้โครเมทรีดักชัน ยังอาจเป็นผลมาจาก H_2S ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรีย (Smillie *et al*, 1981) มีรายงานว่า *E. cloacae* สามารถรีดิวซ์โครเมทในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น (Wang *et al*, 1989) ส่วนแบคทีเรียที่มีรายงานว่าสามารถรีดิวซ์โครเมทในสภาวะที่มีออกซิเจนคือ *Ps. fluorescens* (Bopp and Ehrlich, 1988) และ *Ps. putida* (Ishibashi *et al*, 1990) อัตราการรีดิวซ์จะเป็นสัดส่วนกับปริมาณเซลล์ ที่อุณหภูมิ และ pH ที่พอเหมาะ การเติมโปตัสเซียมไดโครเมทความเข้มข้น 1 - 2 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มอัตราการรีดิวซ์โครเมท ในขณะที่ถ้าความเข้มข้นโปตัสเซียมไดโครเมทสูงเกินไปจะยับยั้งการรีดิวซ์ นอกจากนี้ยังพบว่า acetate, ethanol, malate, succinate และ glycerol เป็นตัวให้อิเลกตรอนสำหรับการรีดิวซ์ได้ดี ในขณะที่สารบางชนิด เช่น molybdate,

vanadate, tellulate และ manganese dioxide จะยับยั้งการรีดิวซ์ของโครเมท (Komori *et al*, 1990) ในปี คศ. 1993 Lovley และคณะ (Lovley *et al*, 1993) ศึกษาอิออนต่างๆ ที่มีผลต่อการรีดิวซ์โครเมทของ *Agrobacterium radibacter* EPS - 916 พบว่าอัตราการรีดิวซ์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอิออนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย Fe^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} และ Mn^{2+} ในปริมาณที่เหมาะสมจะเพิ่มอัตราการรีดิวซ์โครเมทของเซลล์

ในระยะแรกแบคทีเรียที่เป็นที่สนใจในการพัฒนามาใช้ในการลดความเป็นพิษของโครเมทในน้ำทิ้งได้แก่ *E. cloacae* H01 ซึ่งพบว่าสามารถทนโครเมทได้ถึง 10 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งขณะนี้กำลังอยู่ในขั้นตอนระดับ pilot plant (Ohtake *et al* 1990, Ohtake and Silver, 1992) ต่อมา Lovley และ Phillips (Lovley and Phillips, 1994) ได้ศึกษาการใช้เซลล์แบคทีเรีย *Desulfovibrio vilgris* ในการลดความเป็นพิษของโครเมียม โดย *D. vilgris* สามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ไปเป็น Cr(III) ได้อย่างรวดเร็วโดยใช้ H_2 เป็นตัวให้อิเลคตรอน และพบว่าการใช้แบคทีเรียนี้ในการกำจัดพิษของโครเมททำได้ดีกว่า

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ และ วิธีดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดินและน้ำที่ปนเปื้อนโครเมทจากบริเวณทางเข้าสู่บ่อบำบัดน้ำทิ้ง และจากบ่อบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานฟอกหนัง จังหวัดสมุทรปราการ จำนวน 7 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างบริเวณทางเข้าสู่บ่อบำบัด 3 ตัวอย่าง บริเวณบ่อบำบัด 3 ตัวอย่าง และจากแอคติเวเตดสลัดจ์ 1 ตัวอย่าง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Luria agar ที่ผสม $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้นต่างๆกันสำหรับเลี้ยงและแยกแบคทีเรียทนโครเมท

2.2 Nutrient agar ที่ผสม $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้นต่างๆกันสำหรับหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC)

2.3 KSC medium ที่ผสม $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้นต่างๆกันสำหรับทดสอบการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ สำหรับทดสอบทางชีวเคมี

3. แบคทีเรีย

3.1 *Escherichia coli* K_{12} ที่ไวต่อโครเมทใช้เป็นแบคทีเรียควบคุมในการหาค่า MIC

3.2 แบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งทั่วไป เพื่อนำมาศึกษาค่า MIC เปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งปนเปื้อน

4. การกำหนดชื่อแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่แยกได้จากการทดลอง จะกำหนดชื่อโดยใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษ 2 ตัว ตามด้วยเครื่องหมาย - และตัวเลข 3 ตัว อักษรตัวแรกหมายถึง แหล่งที่พบโดย N หมายถึงแยกมาจากแหล่งทั่วไป W หมายถึงแยกได้จากตัวอย่างจากบ่อบำบัดน้ำทิ้ง อักษรตัวที่ 2 หมายถึงบริเวณที่แยกได้ โดย N หมายถึงบริเวณทั่วไป I หมายถึงบริเวณเข้าสู่ทางบำบัดน้ำทิ้ง และ S หมายถึงบริเวณบ่อบำบัดน้ำทิ้ง ตัวเลข 3 ตัว หมายถึงลำดับของแบคทีเรียที่แยกได้ในกรณีต่างๆข้างต้น ดังตัวอย่าง NN - 001 หมายถึงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 1 ที่แยกได้จากตัวอย่างแหล่งทั่วไป WI - 002 หมายถึงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 ที่แยกได้จากตัวอย่างบริเวณทางเข้าสู่บ่อบำบัดน้ำทิ้งและ WS - 003 หมายถึงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 3 ที่แยกได้จากตัวอย่างบ่อบำบัดน้ำทิ้ง

5. วิธีทดลอง

5 .1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียทนโครเมท

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม หรือตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตรมาทำการ enrich ใน KSC medium ที่มี $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้น 0.25, 0.5, และ 1.0 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำเชื้อจากหลอดที่มีความขุ่นมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $K_2Cr_2O_7$ 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญมาทำการย้อมแกรม ย้อมสปอร์ และจัดกลุ่ม แบคทีเรียที่สนใจ จะนำมาจำแนกชนิดต่อโดยวิธีการทางชีวเคมี

5.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียที่มีสามารถรีดิวซ์โครเมท

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม หรือตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ KSC medium 9 มิลลิลิตร ที่ผสม $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 1 - 3 สัปดาห์ นำเชื้อจากหลอดที่เกิดการรีดิวซ์โครเมท ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเหลืองเป็นสีขาว มาทำการ enrich ซ้ำใน KSC medium ที่มีความเข้มข้น $K_2Cr_2O_7$ เท่ากับในหลอดเดิมอีกครั้งหนึ่ง บ่มที่สภาวะเดิม นำเชื้อจากหลอดที่เกิดการรีดิวซ์มา streak บนอาหารแข็ง KSC ที่ผสม $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่เจริญมาทดสอบการรีดิวซ์โครเมียมที่ความเข้มข้น $K_2Cr_2O_7$ 0.25 มิลลิโมลาร์ อีกครั้งหนึ่ง นำเชื้อที่แยกได้จากหลอดที่ให้ผลบวกมาจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมี

5.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของโครเมทที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC)

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณปนเปื้อน และแหล่งทั่วไป มาเลี้ยงใน nutrient broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ถ่ายลงบนอาหารใหม่อีกครั้งหนึ่ง บ่มเป็นเวลา 2 - 3 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งจะได้เชื้อประมาณ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นจำนวนที่เหมาะสมต่อการหาค่า MIC (มาลิน จุลศิริ, 2532) นำแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 0.05 มิลลิลิตร มาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้นระหว่าง 0.1 - 2.5 มิลลิโมลาร์ โดยเริ่มหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $K_2Cr_2O_7$ น้อยไปหามาก โดยใช้ *E. coli* K_{12} เป็นแบคทีเรียควบคุม อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญหลังบ่ม 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

5.4 การตรวจหาพลาสมิด

ทำการตรวจหาพลาสมิดจากแบคทีเรียทนโครเมทและแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมทที่แยกได้ โดยวิธี alkali lysis (Birnboim and Doly, 1979) และวิธี boiling method (Kado and Liu, 1981) วิเคราะห์ plasmid profile และขนาดของพลาสมิดที่แยกได้

5.5 การวิเคราะห์โครเมทรีดักชันเบื้องต้น

ทำการศึกษาความสามารถในการรีดิวโครเมทเบื้องต้นของแบคทีเรียที่แยกได้โดยวิธี spectophotometry (Spectoquant, Merck Photometer SQ 118) โดยการทำปฏิกิริยากับ diphenyl carbazide ในสารละลายกรด ซึ่งจะให้สารละลายมีสี วัดได้ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Urone, 1955)

5.6 การวิเคราะห์โครเมทรีดักชันด้วยวิธี UV - Vissible spectrophotometry

5.6.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำแบคทีเรียที่รีดิวซ์โครเมทได้มาเลี้ยงเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำหัวเชื้อเริ่มต้น 20 มิลลิลิตร ใส่ใน KSC medium 130 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ 4 ขวด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 6 - 8 ชั่วโมง วัดความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.7 จากนั้นเติม $K_2Cr_2O_7$ ลงในขวดแต่ละขวด ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2, 0.4, 0.6 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ บ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำใสแต่ละขวดมาวิเคราะห์ปริมาณ Cr(VI) และ Cr (III) ที่ 0, 1, 2, 3, 4, 6, 15 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

5.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณ Cr(VI) และ Cr (III)

5.6.2.1 การหาค่าความยาวคลื่นสูงสุด (λ max) ของ Cr(VI)

ผสม $K_2Cr_2O_7$ กับ KSC medium ให้มีความเข้มข้นโครเมียมสุดท้ายต่างๆ กันซึ่งให้ค่าดูดกลืนแสง อยู่ระหว่าง 0 - 1 นำไป scan หาค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ด้วยเครื่อง UV - Visible spectophometer (spectronic 3000 ARRAY) ความยาวคลื่นที่ scan อยู่ระหว่าง 200 - 700 นาโนเมตร

5.6.2.2 การหาค่าความยาวคลื่นสูงสุด (λ max) ของ Cr(III)

ผสม $Cr(NO_3)_3$ กับ KSC medium ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆ กัน จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาให้เกิดเป็นสารประกอบสีม่วงโดยดูดสารละลาย $Cr(No_3)_3$ มิลลิลิตร ผสมกับ 50 mM EDTA 80 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้สารละลายเข้ากัน นำไปอุ่นใน waterbath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วนำไป scan หาความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดตามวิธีในข้อ 5.6.2.1

5.6.2.3 การวิเคราะห์ค่า Cr(VI) และ Cr(III) ในส่วนน้ำใส

นำสารละลายตัวอย่างไปทำการหาปริมาณ Cr(VI) และ Cr(III) ด้วยการ scan ด้วยเครื่อง UV - Visible spectrophotometer โดยการใช้ค่าความยาวคลื่นสูงสุดที่หาได้จากข้อ 5.6.2.1 และ 5.6.2.2 ตามลำดับ วิเคราะห์ความเข้มข้น Cr(VI) และ Cr(III) โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย $K_2Cr_2O_7$ และ $Cr(NO_3)_3$

5.7 การวิเคราะห์ปริมาณ Cr(III) ในเซลล์

นำเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาล้างด้วยสารละลาย 0.85 % NaCl จากนั้นนำเซลล์มาย่อยด้วยสารละลายกรด HCl เข้มข้น 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มใน waterbath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที จนเซลล์ถูกย่อยหมดได้สารละลายใส หากเซลล์ยังแตกไม่หมดให้เติม HCl ลงไปอีก จนกว่าจะได้สารละลายใส ทิ้งให้เย็น นำมาปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร แบ่งสารละลาย 3 มิลลิลิตรมาทำปฏิกิริยาให้เกิดสารประกอบสีม่วงตามวิธีในข้อ 5.5.2.2 วิเคราะห์ความเข้มข้น โดยการหาค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณค่าเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย $Cr(NO_3)_3$ ที่ความยาวคลื่นซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่หาได้จากข้อ 5.6.2.2

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียทนโครเมทจากตัวอย่าง

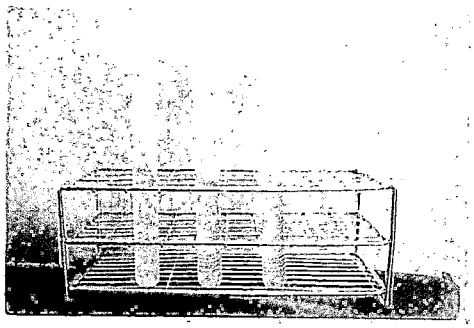
จากการแยกแบคทีเรียทนโครเมทจากตัวอย่างดินและน้ำทิ้งบริเวณทางเข้าบ่อบำบัด 3 ตัวอย่างบริเวณบ่อบำบัด 3 ตัวอย่าง และจากแอคติเวเตดสลัดจ์ 1 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียทนโครเมทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KSC agar ที่มี $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 100 - 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บน plate ต่าง ๆ ได้จำนวน 44 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียกรัมบวก 26 สายพันธุ์ และแบคทีเรียกรัมลบ 18 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1 แบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือแบคทีเรียกรัมลบรูปท่อนเรียงตัวเป็นสายสั้น ๆ และที่พบรองลงมาคือ แบคทีเรียกรัมบวกเรียงตัวเป็นคู่ 2 หรือ คู่ 4

ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มแบคทีเรียจากการย้อมกรัม และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

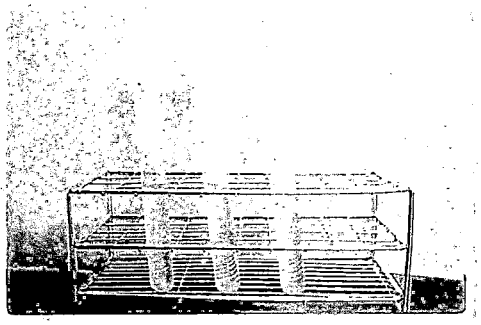
ประเภทแบคทีเรีย	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	จำนวนที่พบ
กรัมบวก	รูปท่อน สร้างสปอร์	4
	รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์	5
	รูปกลม อยู่เป็นกลุ่มหรือกระจัดกระจาย	3
	รูปกลม เรียงตัวเป็นสายสั้นๆ	2
	รูปกลม เรียงตัวเป็นคู่ 2 หรือคู่ 4	12
กรัมลบ	รูปท่อน เรียงตัวเป็นสายสั้นๆ	16
	รูปท่อนอยู่เป็นกลุ่มหรือกระจัดกระจาย	2

2. การแยกแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์โครเมทจากตัวอย่าง

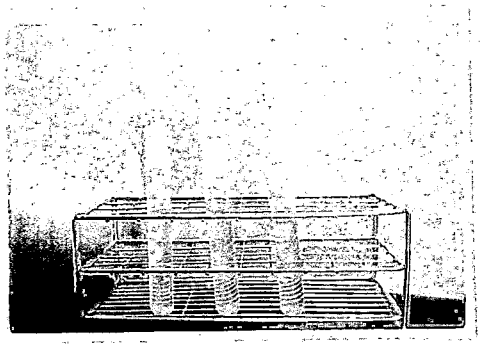
เพื่อทำการแยกแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์โครเมท โดยนำดินหรือน้ำตัวอย่างจากบริเวณที่กล่าวถึงข้างต้นมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ KSC medium ที่มี $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้นต่างๆกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะมีออกซิเจน และไร้ออกซิเจน พบว่าเชื้อจากหลอดที่เกิดรีดิวซ์ได้ดี คือหลอดตัวอย่างจากทางเข้าบ่อบำบัด1 และแอคติวเตดสลัดจ์ที่นำมา enrich ใน KSC medium ที่มีความเข้มข้น $K_2Cr_2O_7$ 0.25 มิลลิโมลาร์ โดยจะสังเกตเห็นการรีดิวซ์จากการที่อาหารเลี้ยงไว้เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาว ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 1



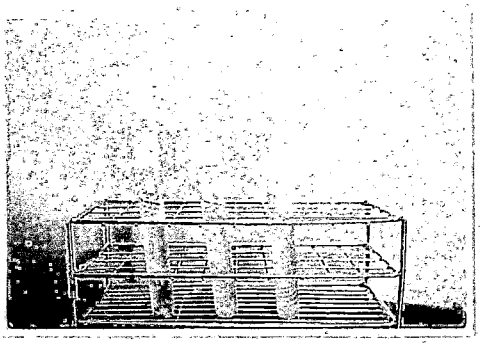
ก



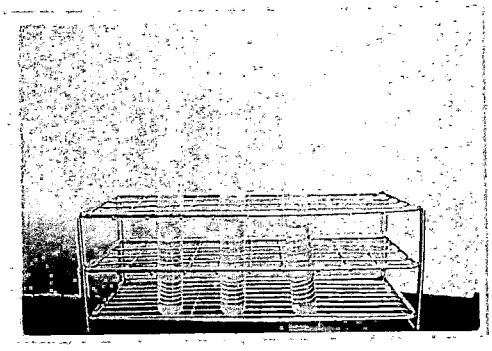
ข



ค



ง



จ

ภาพที่ 1 ความสามารถในการรีดิวซ์โครเมียมในสภาวะแอโรบของแบคทีเรียจากตัวอย่างบริเวณต่างๆ เลี้ยงใน KSC medium ที่มี $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ เรียงจากซ้ายไปขวา

ก. บริเวณทางเข้าสู่บ่อบำบัดน้ำทิ้งที่ 1

ข. บริเวณทางเข้าสู่บ่อบำบัดน้ำทิ้งที่ 2

ค. บริเวณบ่อบำบัดน้ำทิ้งที่ 2

ง. แอคติเวเตดสลัดจ์

จ. ชุดควบคุม ผลลบ

ตารางที่ 2 ความสามารถในการรีดิวซ์โครเมียมของแบคทีเรียจากตัวอย่างบริเวณต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโปตัสเซียมไดโครเมทปริมาณต่างกัน

ตัวอย่าง	ความสามารถในการรีดิวซ์โครเมียมของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยวเชื้อ KSC ที่มี $K_2Cr_2O_7$ ปริมาณต่างๆ (มิลลิโมลาร์)	
	0.25	0.5
บริเวณทางเข้าสู่บ่อบำบัด 1	3+	-
บริเวณบ่อบำบัด 1	2+	-
บริเวณทางเข้าสู่บ่อบำบัด 2	1+	-
แอคติเวเตดสลัดจ์	3+	-

3+ อาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาว อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นมาก

2+ อาหารเปลี่ยนสีเล็กน้อย

1+ การเปลี่ยนแปลงเห็นได้ไม่ชัดเจน

- ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลง

ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมท โดยนำเชื้อจากหลอดผลบวกแต่ละหลอดมา streak บนอาหารแข็ง KSC agar ที่มี $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง และนำโคโลนีเดี่ยวมาตรวจสอบการรีดิวซ์โครเมียมซ้ำอีกครั้งหนึ่ง สามารถแยกเชื้อรีดิวซ์โครเมทได้ 2 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์จากทางเข้าบ่อบำบัด 1 สายพันธุ์ คือ Inf : 01 และจากแอคติเวเตดสลัดจ์ 1 สายพันธุ์ คือ Act 11

จากการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้ คือ *Pseudomonas maltophilia* โดยที่ทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลทดสอบทางชีวเคมีเหมือนกันดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมท สายพันธุ์ Inf 1 01 และสายพันธุ์ Act 11

ปฏิกิริยาที่ทดสอบ	ผลการทดสอบ	
	สายพันธุ์ Inf 1-10	สายพันธุ์ Act-11
OF - glucose	nonoxidizer / nonfermenter	nonoxidizer / nonfermenter
catalase	+	+
oxidase	+	+
motility	+	+
indole	-	-
nitrate	+	+
nitrite	-	-
lysine decarboxylase	+	+
growth on MacConkey agar	+	+
gelatinase	+	+

3. <u>การหาค่า MIC ของแบคทีเรียทนโครเมทและรีดิวซ์โครเมท</u>

จากการหาค่า MIC ของแบคทีเรียทนโครเมทที่แยกได้จำนวน 44 สายพันธุ์ เทียบกับแบคทีเรีย *E. coli* K_{12} และแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติ NN - 001 พบว่า *E. coli* K_{12} และ NN - 001 มีค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์ ส่วนแบคทีเรียอื่นๆ มีค่า MIC แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่มีระดับ MIC ในระดับการทนปานกลาง คือ มีค่า MIC สูงเป็น 2 - 3 เท่าของแบคทีเรียควบคุม (MIC 1.0 - 1.5) มีแบคทีเรียเพียง 4 สายพันธุ์ ที่มี MIC ระดับสูงคือ 2.0 - 2.5 มิลลิโมลาร์ ระดับ MIC ของแบคทีเรียทั้ง 46 สายพันธุ์ แสดงในตารางที่4 ค่า MIC ของแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ ที่ตรวจพบภายหลังว่ามีพลาสมิด และแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมท แสดงในตารางที่ 5 พบว่าแบคทีเรียที่รีดิวซ์โครเมทได้ 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ Inf 01 และ Act 11 มีค่า MIC เท่ากับ 1.5 มิลลิโมลาร์

4. การตรวจหาพลาสมิดดีเอ็นเอในแบคทีเรียทนโครเมทและรีดิวซ์โครเมท

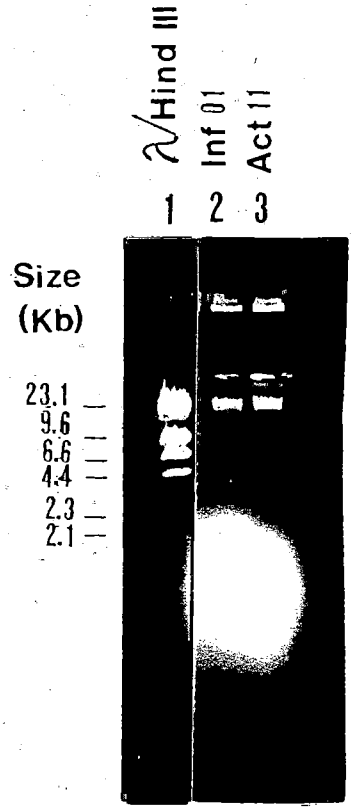
จากการนำแบคทีเรียทนโครเมททั้ง 44 สายพันธุ์ และแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมท 2 สายพันธุ์ มาทำการวิเคราะห์หาพลาสมิด โดยวิธี alkali - lysis พบพลาสมิดดีเอ็นเอในแบคทีเรียทนโครเมท จำนวน 10 สายพันธุ์ คือ WS - 003, WS - 004, WS - 009, WS - 014, WS - 033, WS - 034, WS - 035, WS - 039, WS - 045 และ WS - 047 โดยที่ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากแอคติเวเตดสลัดจ์ ขนาดและจำนวนพลาสมิดที่พบแสดงในตารางที่ 5 โดยพบว่า จำนวนแถบพลาสมิดดีเอ็นเอในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบแบบแผนของพลาสมิดที่ได้ของทั้ง 10 สายพันธุ์ พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน โดยบางพลาสมิดพบในแบคทีเรียมากกว่า 1 ชนิด ขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอที่พบมากที่สุดคือ 9.2 กิโลเบส โดยพบในแบคทีเรียจำนวน 7 สายพันธุ์ รองลงมาคือพลาสมิดขนาด 40 และ 33 กิโลเบส ซึ่งพบในแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ ส่วนพลาสมิดของแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมททั้งสองสายพันธุ์มีขนาดใหญ่ต่างจากแบคทีเรียทนโครเมท โดยพบว่ามีขนาด 50 และ 80 กิโลเบส แสดงในภาพที่ 2 อย่างไรก็ตามเมื่อใช้วิธีแยกพลาสมิดของ Kado และ Liu ไม่สามารถตรวจพบพลาสมิดดังกล่าว

ตารางที่ 4 ระดับการทนโครเมทของแบคทีเรียทนโครเมท

MIC (มิลลิโมลาร์)	จำนวนที่พบ
0.2 - 0.5	11
1.0 - 1.5	31
2.0 - 2.5	4

ตารางที่ 5 ค่า MIC ขนาดและจำนวนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตรวจพบในแบคทีเรียทนโครเมท จำนวน 10 สายพันธุ์ และแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมทจำนวน 2 สายพันธุ์

แบคทีเรีย	MIC	จำนวนพลาสมิดที่พบ	ขนาดพลาสมิด (กิโลเบส)
WS - 003	1.5	2	33, 9.2
WS - 004	1.0	1	8.6
WS - 009	1.0	8	15, 12, 8, 7.2, 6.5, 5.5, 3.9, 3.5
WS - 014	1.0	3	33, 12, 9.2
WS - 033	1.0	2	40, 9.0
WS - 034	1.0	2	33, 9.2
WS - 035	1.0	2	40, 9.2
WS - 039	2.0	2	40, 9.2
WS - 045	1.5	5	9.2, 7.2, 3.2, 2.6, 1.9
WS - 047	1.5	4	9.2, 3.2, 2.6, 1.9
Inf 01	1.5	2	80, 50
Act 11	1.5	2	80, 50



ภาพที่ 2 อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีสของพลาสมิดที่แยกได้จาก *Pseudomonas maltophilia* ที่สามารถรีดิวซ์โครเมท

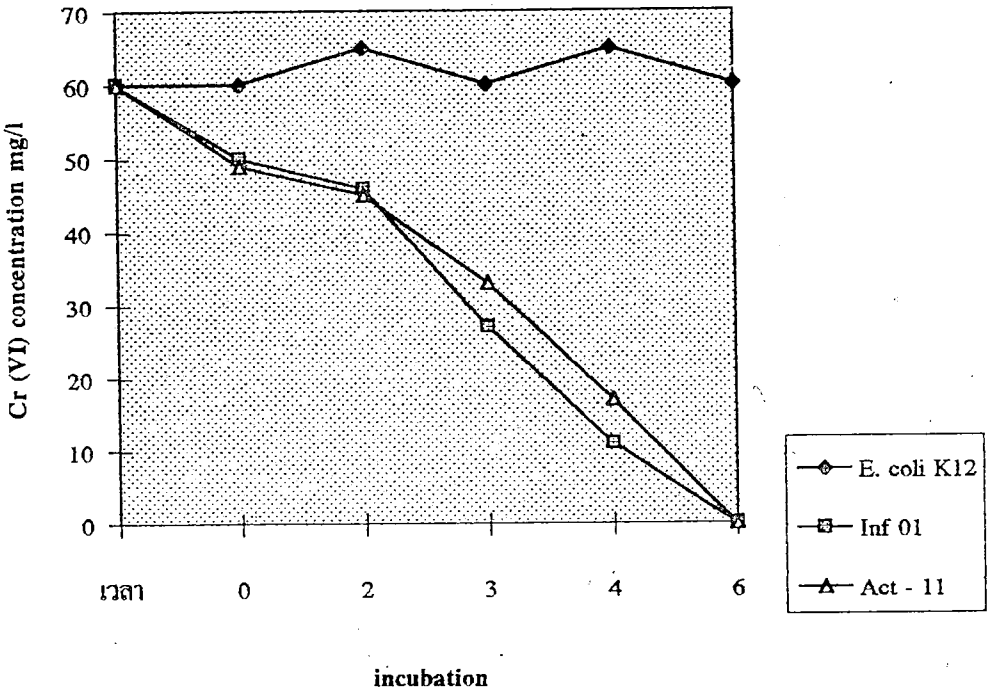
แถวที่1 λ/ *Hind* III

แถวที่2 พลาสมิดที่แยกได้จากสายพันธุ์ Inf 01

แถวที่3 พลาสมิดที่แยกได้จากสายพันธุ์ Act 11

5. <u>การศึกษาโครเมทรีดักชันเบื้องต้น</u>

จากการศึกษาโครเมทรีดักชั่นเบื้องต้น ด้วยการใช้ spectoquant ควบคู่กับ Commerical kit ของแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมท 2 สายพันธุ์ข้างต้น พบว่าเมื่อใช้แบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 1.5×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถรีดิวซ์โครเมทที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.2 mM (60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ได้หมดภายในเวลา 6 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 3 จากภาพจะเห็นว่าอัตราการรีดิวซ์ไม่แตกต่างกัน จึงได้เลือกแบคทีเรียเพียง 1 สายพันธุ์ เป็นตัวแทนในการศึกษาโครเมทรีดักชันในสภาวะต่างๆ ต่อไป

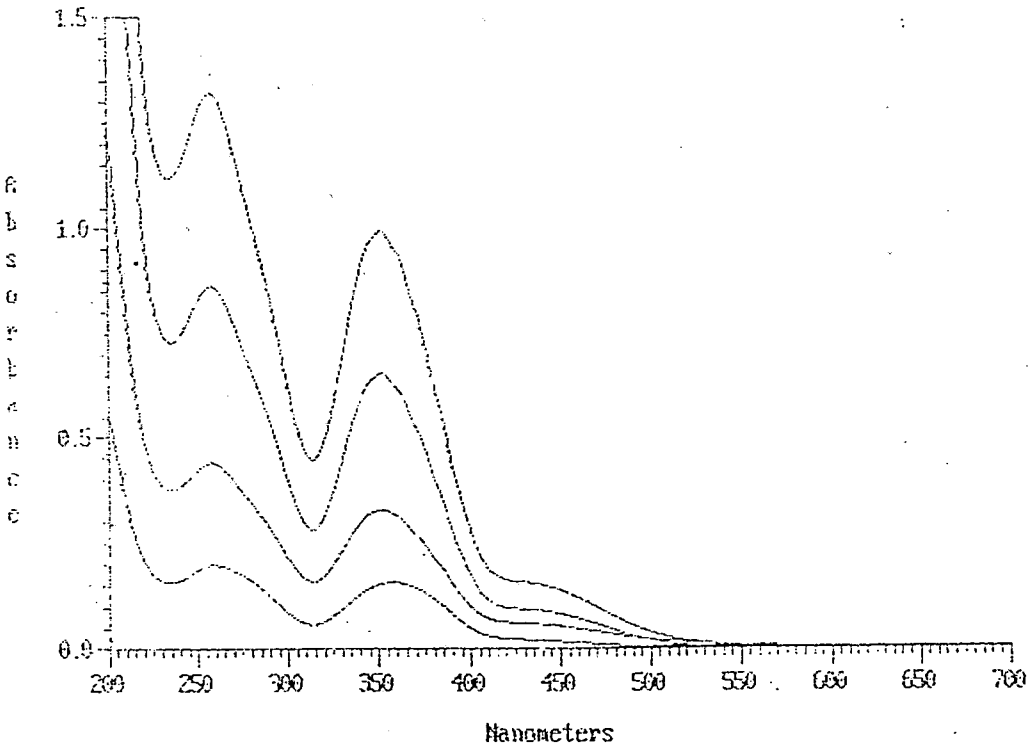


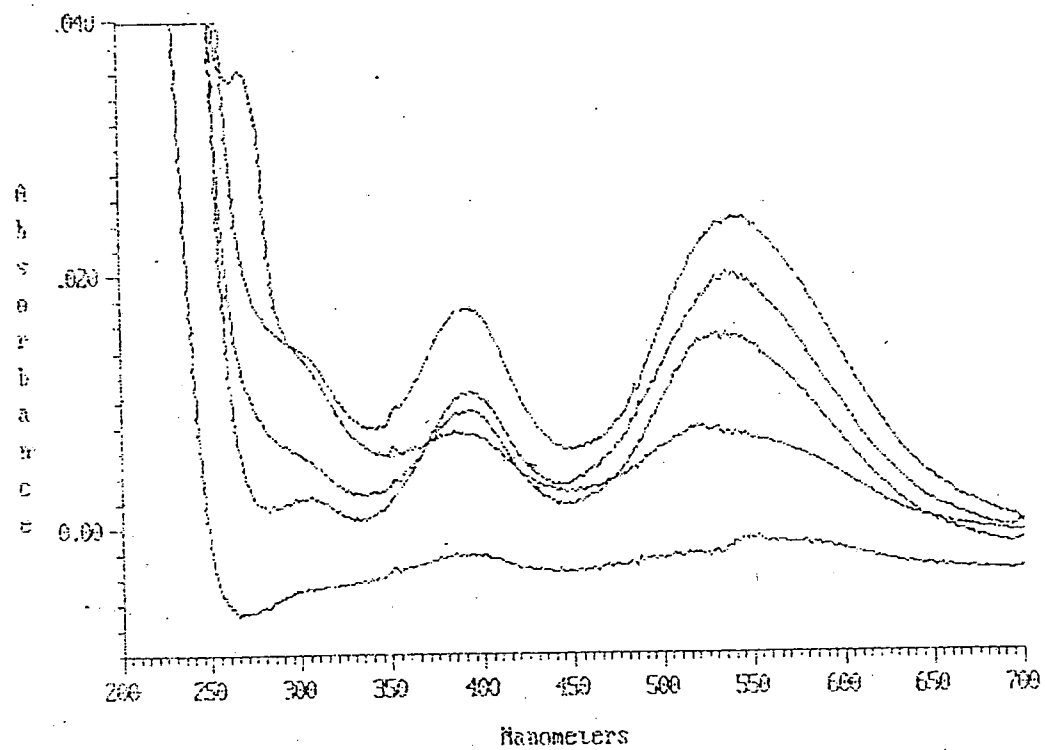
ภาพที่ 3 ความสามารถในการรีดิวซ์โครเมทของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทิ้ง จากการศึกษารีดักชันเบื้องต้น

6. การศึกษาสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการรีดิวซ์โครเมทและสะสม Cr(III) ในเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี UV - Visible spectophotometer

6.1 การหาค่า λ max และการเตรียมกราฟมาตรฐานของ Cr(III) และ Cr(VI)

จากการ scan หาค่า λ max ในช่วงความยาวคลื่น 200 - 700 นาโนเมตร สำหรับการวิเคราะห์ Cr(VI) และ Cr(III) โดยวิธี UV - Visible spectophotometry พบว่า ค่า λ ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ Cr(VI) และ Cr(III) คือ 351 นาโนเมตรและ 5.27 นาโนเมตรตามลำดับ ผลของการ scan แสดงในภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานของ Cr(IV) และ Cr(III) แสดงในภาพที่ 5 และ ภาพที่ 6

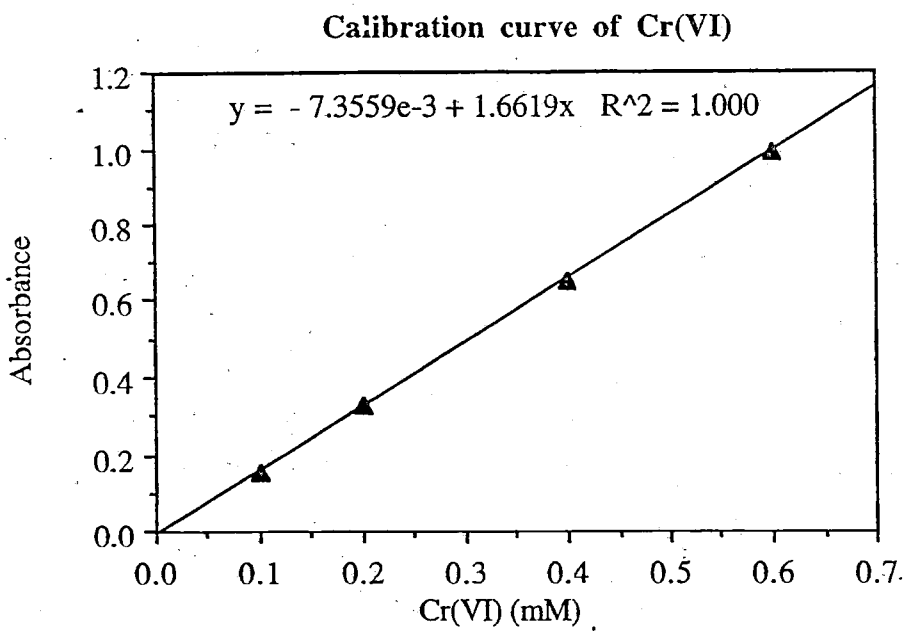




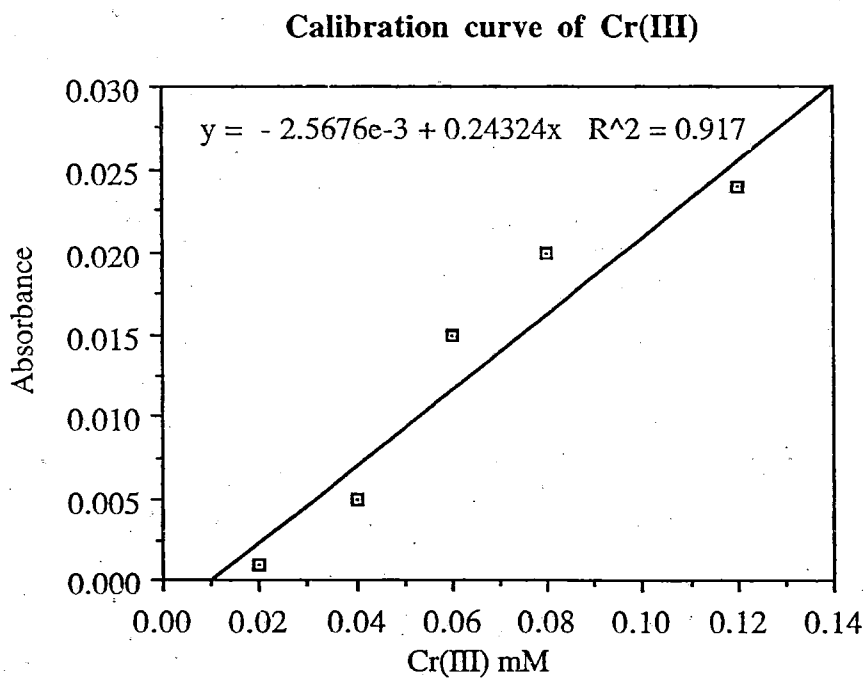
ภาพที่ 4 การ scan เพื่อหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบโครเมียม ในช่วงความยาวคลื่น 200 - 700 นาโนเมตร

ก. การวิเคราะห์ Cr(IV) เมื่อใช้สารละลาย $K_2Cr_2O_7$

ข. การวิเคราะห์ Cr(III) เมื่อใช้สารละลาย $Cr(NO_3)_3$



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานแสดงการดูดยกลืนแสงของสารละลาย Cr(VI) ที่ความยาวคลื่น 351 นาโนเมตร



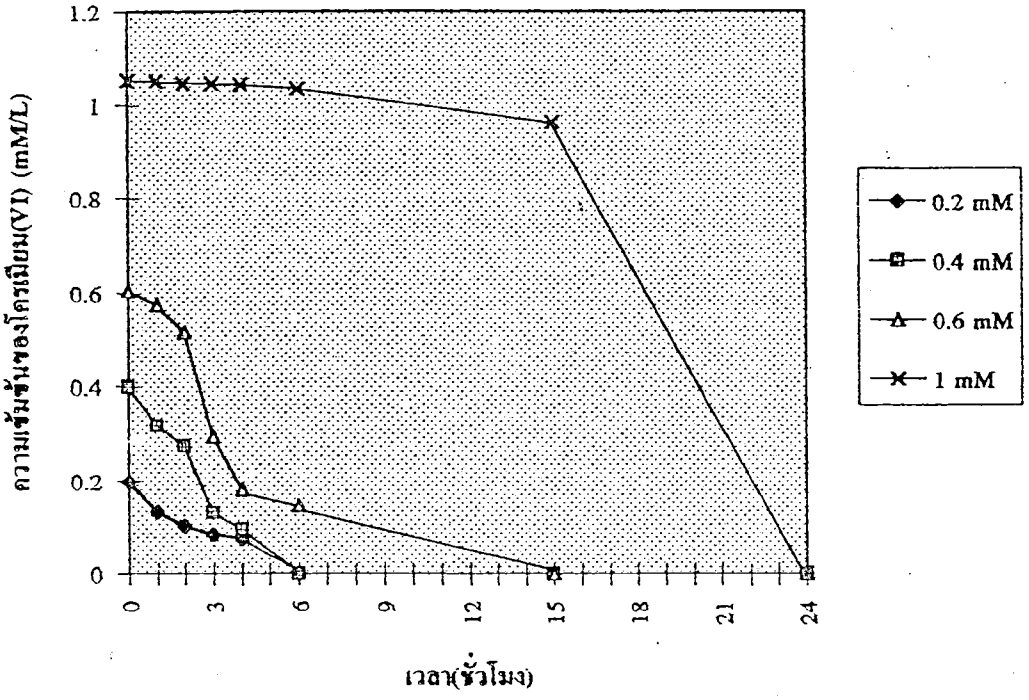
ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานแสดงการดูดกลืนแสงของสารละลาย Cr(III) ที่ความยาวคลื่น 527 นาโนเมตร

6.2 การศึกษาผลของปริมาณโครเมทเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการรีดิวซ์โครเมท

จากการทดลองการเกิดรีดักชันของแบคทีเรียทนโครเมทใน KSC medium ที่ผสม $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าปริมาณ Cr(VI) ในน้ำใสมีค่าลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไปเชื้อสามารถรีดิวซ์โครเมทได้ในทุกความเข้มข้นเริ่มต้น (0.2 - 1.0 มิลลิโมลาร์) โดยสามารถรีดิวซ์โครเมทความเข้มข้น 0.2 และ 0.4 มิลลิโมลาร์ ได้หมดในเวลา 6 ชั่วโมง และที่ 0.6 มิลลิโมลาร์ สามารถรีดิวซ์ได้หมดในเวลา 15 ชั่วโมง อัตราการรีดิวซ์โครเมทความเข้มข้น 0.4 -1.0 มิลลิโมลาร์ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อความเข้มข้นโครเมทสูงขึ้น เวลาที่ใช้ในการรีดิวซ์โครเมทจนสมบูรณ์เพิ่มขึ้น โดยจะมี log phase ยาวขึ้น พบว่าที่ความเข้มข้นของโปตัสเซียมไดโครเมท 1.0 มิลลิโมลาร์ การรีดิวซ์จะเกิดหลังจากเวลาผ่านไปนานถึง 15 ชั่วโมง ผลของการรีดิวซ์แสดงในภาพที่ 7

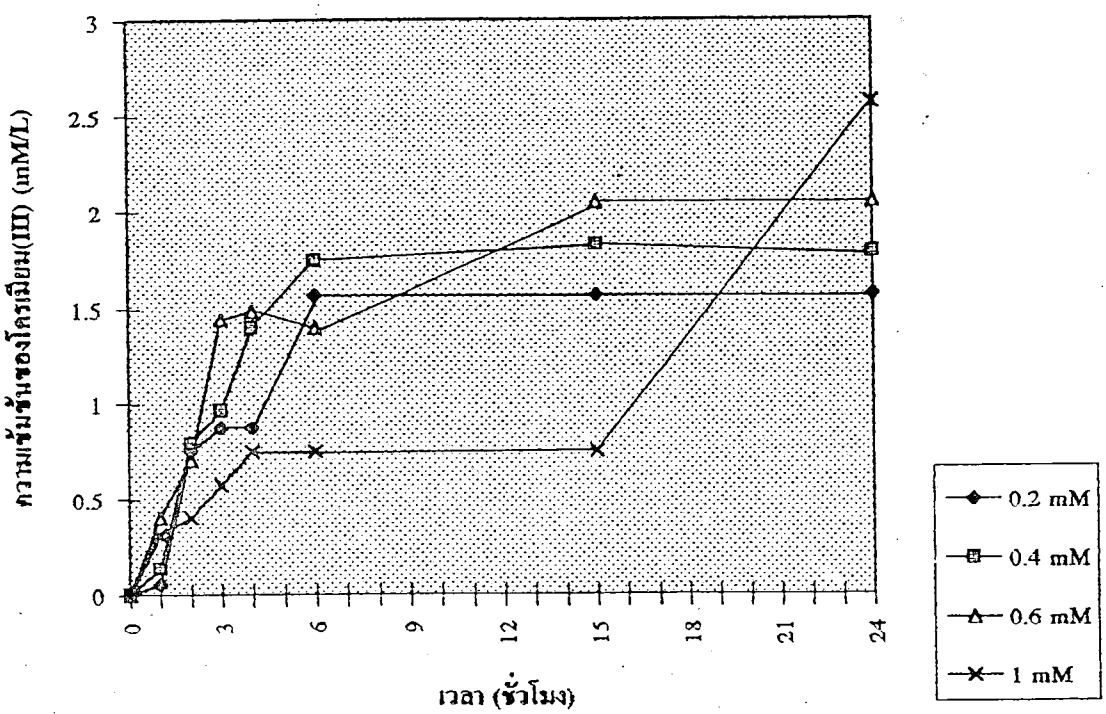
เนื่องจาก Cr(IV) เมื่อถูกรีดิวซ์จะเกิดเป็น Cr(III) จึงได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ Cr(III) ในน้ำใสควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ปริมาณ Cr(IV) และพบว่าปริมาณ Cr(III) ในส่วนน้ำในมีค่าน้อยมาก และปริมาณที่พบไม่เปลี่ยนแปลง ถึงแม้ว่าเวลาที่ใช้ในการรีดิวซ์โครเมทจะเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงไม่คำนึงถึง

เมื่อนำเซลล์ที่ได้จากการทดลองนี้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ Cr(III) พบว่าปริมาณ Cr(III) ในเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามเวลาที่ผ่านไป โดยอัตราการเพิ่มขึ้นของ Cr(III) ที่ความเข้มข้นโปรตัสเซียมไดโครเมท 0.2 - 0.6 มิลลิโมลาร์ ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าการเพิ่มปริมาณ Cr(III) เป็นไปไม่ต่อเนื่อง และจะพบได้มากเมื่อเวลาผ่านไปนานถึง 15 ชั่วโมง (ภาพที่8)



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cr(VI) ใน ส่วนน้ำใสกับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน KSC medium ที่ผสมโปรตัสเซียมไดโครเมทความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cr(III) ภายในเซลล์ กับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน KSC medium ที่ผสมโปตัสเซียมไดโครเมทความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

วิทย.ว
๐๒๕๔ ๕
ฉ. ๒

249310

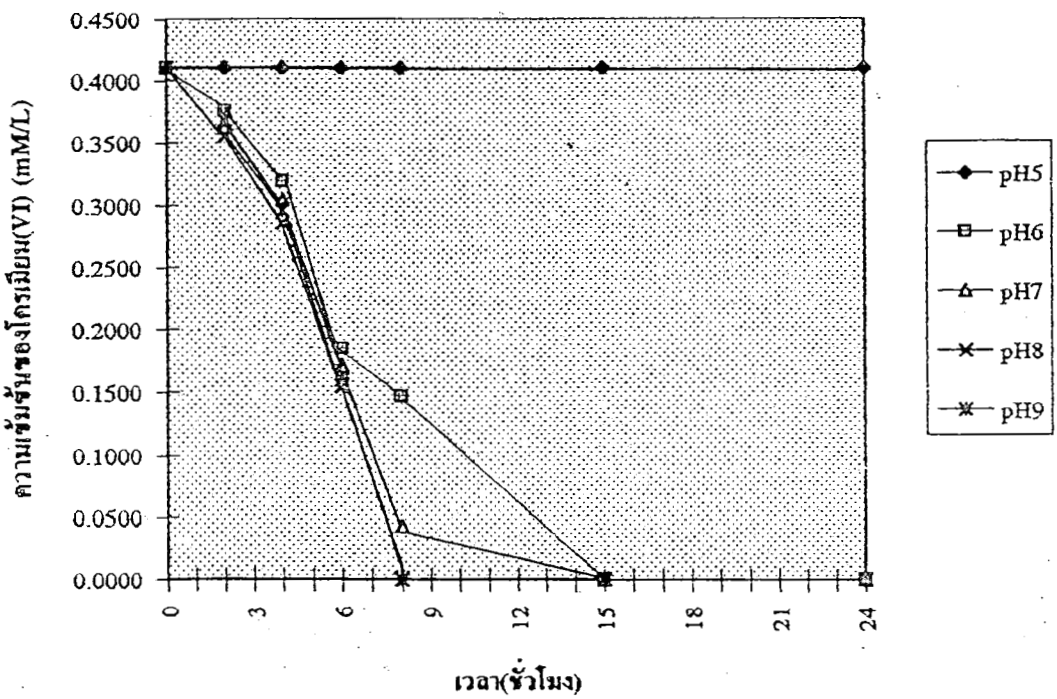
6.3 การศึกษาผลของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการรีดิวซ์โครเมท

จากการทดลองการเกิดรีดักชันของแบคทีเรียทนโครเมทในอาหาร KSC medium ที่ปรับให้มีค่า pH 5, 6, 7, 8 และ 9 และผสมโปตัสเซียมไดโครเมทให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 0.4 มิลลิโมลาร์ แล้วนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ โดยการวิเคราะห์ปริมาณ Cr(VI) ที่ลดลงในน้ำใส ควบคู่กับการวิเคราะห์ Cr(III) พบว่าที่ pH 6 - 8 ปริมาณ Cr(VI) ในส่วนน้ำใสมีค่าลดลงเรื่อยๆ เมื่อการวิเคราะห์ Cr(III) ในเซลล์ พบว่าที่ pH 6 - 8 ปริมาณ Cr(VI) ในส่วนน้ำใสมีค่าลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป ส่วนที่ pH 5 ปริมาณ Cr(VI) ไม่เปลี่ยนแปลง เชื้อสามารถรีดิวซ์โครเมทได้ดีที่สุดที่ pH 8 และ 9 โดยใช้เวลารีดิวซ์โครเมทจนสมบูรณ์ 8 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามอัตราการรีดิวซ์ที่ระดับ pH 7 - 9 ไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อนำตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ pH 5 - 9 จากการทดลองเดียวกันนี้มาวิเคราะห์ Cr(III) พบว่าที่ pH 6 - 9 ปริมาณ Cr(III) ในเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในขณะที่ pH 5 ไม่พบ Cr(III) ในเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของ Cr(VI) ในส่วนน้ำใสที่ pH 6 - 9 และการคงที่ของ Cr(VI) ที่ pH 5 ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 9 และภาพที่ 10

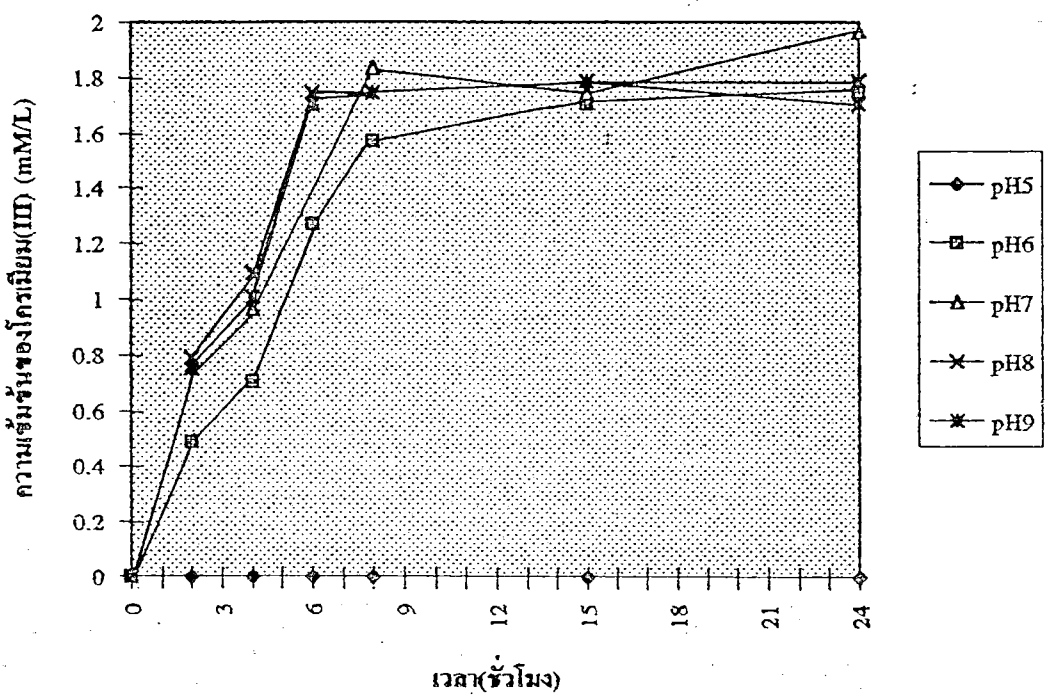
6.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแบคทีเรียต่อการรีดิวซ์โครเมท

จากการทดลองการเกิดรีดักชันของแบคทีเรียทนโครเมทในอาหาร KSC medium ที่มีโปรตัสเซียมไดโครเมทความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ ผสมอยู่ และ pH เท่ากับ 8 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณ Cr(VI) ในส่วนน้ำใสลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ไม่ว่าจะบ่มที่อุณหภูมิใด แต่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการรีดิวซ์จะต่ำสุด ปริมาณ Cr(VI) ในส่วนน้ำใสจะลดลงอย่างช้าๆ และหมดใน 24 ชั่วโมง ในขณะที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส การรีดิวซ์เกิดได้ดี อัตราการลดลงของ Cr(VI) ในเซลล์ไม่ต่างกันมากนักโดยจะรีดิวซ์ได้สมบูรณ์ในเวลา 8 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 11

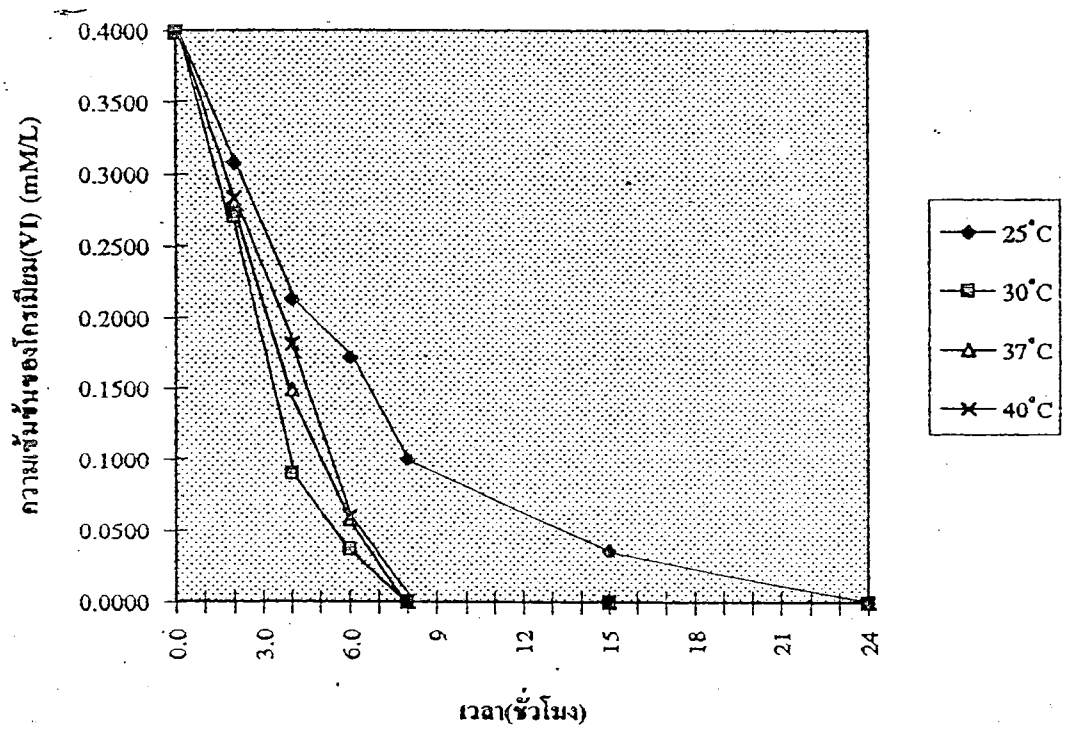
การลดลงของปริมาณ Cr(VI) สอดคล้องดับการเพิ่มขึ้นของ Cr(III) ในเซลล์โดยที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณ Cr(III) ในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ขณะที่เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 12



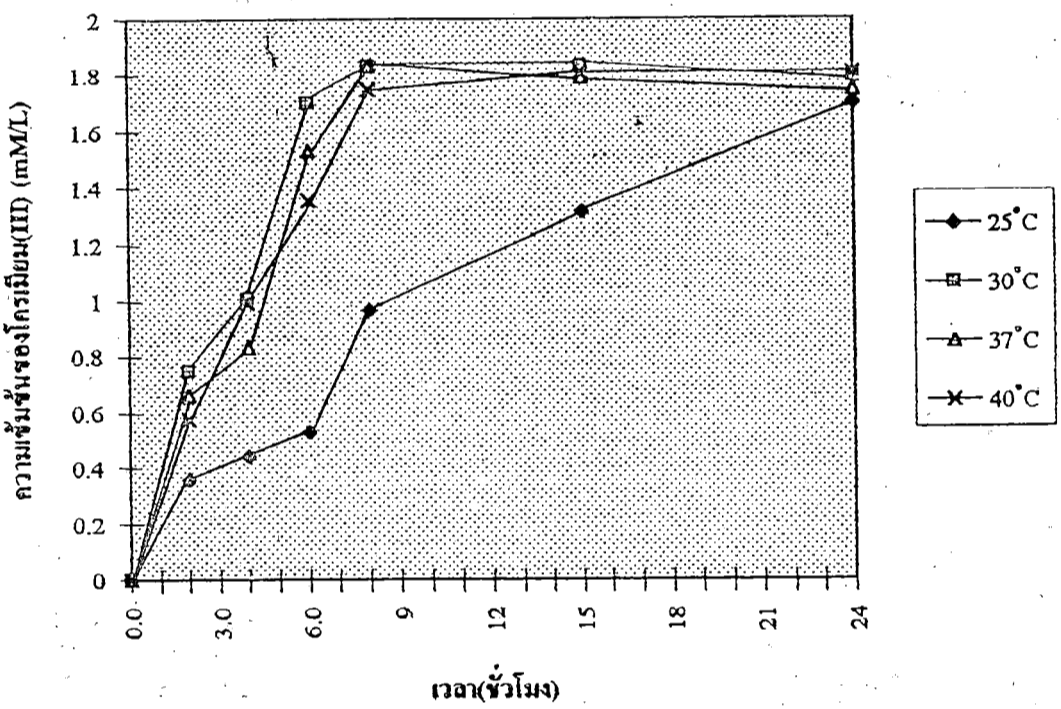
ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cr(VI) ในส่วนน้ำใส กับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน KSC medium pH 5 - 9 ที่ผสมโปตัสเซียมไดโครเมทความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cr(III) ภายในเซลล์กับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงใน KSC medium pH 5 - 9 ที่ผสมโปตัสเซียมไดโครเมทความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cr(VI) ในส่วนน้ำใส กับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน KSC medium pH8 ที่ผสมโปตัสเซียมไดโครเมทความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cr(III) ภายในเซลล์ กับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อใน KSC medium pH 8 ที่ผสมโปตัสเซียมไดโครเมทความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส

บทที่ 5
สรุป และอภิปรายผล

จากการตรวจหาแบคทีเรียจากน้ำเสียบริเวณบ่อบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานฟอกหนัง จังหวัดสมุทรปราการ สามารถแยกแบคทีเรียที่ทนโครเมียม และรีดิวซ์โครเมียมได้จำนวน 46 สายพันธุ์ โดยส่วนใหญ่มีระดับการทนโครเมียมปานกลาง คือมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 1.0 - 1.5 มิลลิโมลาร์ แบคทีเรียที่มีความสามารถในการรีดิวซ์โครเมียม 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Inf 01 ซึ่งแยกได้จากทางเข้าบ่อบำบัดน้ำทิ้ง และสายพันธุ์ Act 11 ที่แยกได้จากแอคติเวเตดสลัดจ์ มีค่า MIC เท่ากับ 1.5 มิลลิโมลาร์ และสามารถรีดิวซ์โครเมียม (VI) ไปเป็น (III) ในสภาวะที่มีออกซิเจน ผลจากการตรวจสอบลักษณะการเจริญ คุณสมบัติทางสรีรวิทยา ปฏิกิริยาทางชีวเคมีเบื้องต้น พบว่า ทั้งสายพันธุ์ Inf 01 และ Act 11 น่าจะเป็น *Pseudomonas maltophilia* และเป็นสายพันธุ์เดียวกัน เนื่องจากมีลักษณะและคุณสมบัติที่กล่าวมาข้างต้นเหมือนกัน นอกจากนี้ยังแสดงคุณสมบัติการรีดิวซ์โครเมียมด้วยอัตราเร็วใกล้เคียงกัน มีพลาสมิดจำนวนและขนาดเท่ากันคือ 80 และ 50 กิโลเบส จึงได้เลือกสายพันธุ์ Act 11 เป็นตัวแทนในการศึกษาคุณสมบัติการรีดิวซ์ในสภาวะทางกายภาพต่างๆ กัน *Ps. maltophilia* Act 11 สามารถรีดิวซ์โครเมียมไปเป็น Cr(III) ได้ดีในสภาวะมีออกซิเจน ที่อุณหภูมิระหว่าง 30 - 40 องศาเซลเซียส และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่าง 7 - 9 และพบว่ามีการเพิ่มของโครเมียม (III) ในเซลล์ ในอัตราเร็วที่สอดคล้องกับการลดลงของโครเมียม (VI) ในส่วนน้ำใส

จุลินทรีย์รีดิวซ์โครเมียมและทนโครเมียมสามารถพบได้ทั้งในยีสต์และแบคทีเรีย แต่ส่วนใหญ่พบได้ในแบคทีเรียกรัมลบ และ Pseudomonas แบคทีเรียกรัมลบที่มีรายงาน ได้แก่ *Pseudomonas fluorescens* (Bopp *et al*, 1983) *Pseudomonas ambigua*, *Pseudomonas putida* (Ishibashi *et al*, 1990) *Pseudomonas aeruginosa* (Suzuki *et al*, 1992) *Pseudomonas mendocina* (Dhakephalkar *et al*, 1996) *Aeromonas* sp.(Cervantes and Silver , 1992) *Alcaligenes eutrophus* , *Enterobacter cloacae* (Komori *et al*, 1990) *E. coli* (Shen and Wang, 1994) *Desulfovibrio vulgaris* (Lovley and Phillips, 1994) *Agrobacterium radiobacter* (Llovera *et al*, 1993) ส่วนยีสต์มีรายงานในสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกับ *Candida albican* (Baldi *et al*, 1990) จุลินทรีย์เหล่านี้มีระดับการทนโครเมทและความสามารถในการรีดิวซ์แตกต่างกัน บางชนิดทนโครเมทได้ระดับสูงถึง 30 มิลลิโมลาร์ (Dhakephalkar, *et al*) ในขณะที่บางชนิดทนได้ในระดับปานกลาง (1 - 2 มิลลิโมลาร์) บางชนิดต้องการออกซิเจนในการรีดิวซ์ ในขณะที่บางชนิดการรีดิวซ์จะเกิดได้เฉพาะในสภาวะไม่มี

ออกซิเจนเท่านั้น (Komori *et al*, 1990; Baldi *et al*, 1990) แบคทีเรียทนโครเมทที่แยกได้จากการทดลองทั้งหมด มีการทนโครเมทได้ในระดับต่ำถึงปานกลาง เมื่อเทียบกับที่มีผู้รายงานไว้ในยีสต์และ *P. mendocina* คือ MIC ไม่เกิน 2.5 มิลลิโมลาร์ และเกือบทั้งหมดไม่สามารถรีดิวซ์โครเมียมได้ไม่ว่าจะเป็นสภาวะมีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน เป็นจริงตามที่มีรายงานในแบคทีเรียอื่นๆ ว่ากลไกในการรีดิวซ์โครเมียม และการทนโครเมียม เป็นกลไกที่เป็นอิสระ ไม่ขึ้นแก่กัน (Mergeay, 1991) อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียรีดิวซ์โครเมียมที่แยกได้ สามารถทนโครเมียมได้ในระดับหนึ่งคือ 1.5 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่แยกมาจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนโครเมียม จึงจำเป็นต้องมีกลไกในการปรับตัวให้มีชีวิตอยู่ได้ บริเวณที่พบแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมียมได้มาก มี 2 แหล่ง คือ บริเวณทางเข้าสู่บ่อบำบัดน้ำทิ้งที่ 1 และจากแอคติเวเตดสลัดจ์ บริเวณทางเข้าสู่บ่อบำบัดน้ำทิ้งที่ 1 เป็นบริเวณแรกที่รับน้ำเสียจากโรงงานฟอกหนังในบริเวณนิคมอุตสาหกรรม และยังไม่มีการบำบัดใดๆ ซึ่งสภาวะนี้เป็น selective pressure ที่ดี ทำให้มีการคัดพันธุ์แบคทีเรียทนโครเมียมและรีดิวซ์ไว้ ลักษณะของน้ำทิ้งจะมีสีดำสนิท และมีก๊าซ H_2S เกิดขึ้น สังเกตได้จากกลิ่น สี และ ฟองก๊าซ ที่ผุดขึ้นตลอดเวลา เมื่อแยกแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมียมเบื้องต้น โดยวิธี enrichment สามารถพบแบคทีเรียที่รีดิวซ์โครเมทได้ทั้งในสภาวะแอโรบ และแอนแอโรบ สังเกตได้จากการที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมโครเมียม ($K_2Cr_2O_7$) เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาว เนื่องจากมีการรีดิวซ์ Cr(VI) ไปเป็น Cr(III) (Cevantas and Silver, 1992) อย่างไรก็ตาม พบว่าการรีดิวซ์โครเมียมในสภาวะมีออกซิเจนเกิดได้ดีกว่า ในการศึกษานี้จึงได้เลือกศึกษาแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์โครเมทในสภาวะมีออกซิเจนเป็นอันดับแรก เมื่อทำการแยกแบคทีเรียจากหลอดที่ทำการ enrich ตัวอย่างจากบ่อบำบัดน้ำทิ้งที่ 1 และแอคติเวเตดสลัดจ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ สามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวน 13 สายพันธุ์ (ไม่ได้แสดงผลในที่นี้) อย่างไรก็ตามเมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้กลับไปทำการทดสอบการรีดิวซ์ซ้ำ พบว่ามีเพียง 2 สายพันธุ์ข้างต้นเท่านั้นที่สามารถรีดิวซ์โครเมทได้

เนื่องจากมีการรายงานว่าการรีดิวซ์โครเมทสามารถถูกควบคุมโดยจีนบนพลาสมิดได้เช่นเดียวกับโครโมโซม (Cervantes *et al*, 1990) ในการทดลองนี้จึงได้ตรวจหาพลาสมิดของแบคทีเรียที่แยกได้ โดยใช้วิธีการสกัด 2 วิธี คือวิธี alkali - lysis และ Kado method พบว่าวิธี alkali - lysis สามารถตรวจพบพลาสมิด ขณะที่ วิธี Kado method ไม่พบ ทั้งนี้พบว่าการแยกโดยใช้วิธี Kado กับ Pseudomonas ให้สารละลายที่หนืดมากหลังขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้การปั่นแยกพลาสมิดออกจากโครโมโซมอาจทำให้มีการสูญเสียพลาสมิดไปกับโครโมโซมได้ ดังนั้นหากจะใช้วิธี Kado อาจต้องมีการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงในบางขั้นตอน ส่วนการตรวจหาพลาสมิด

ในแบคทีเรียทนโครเมียมโดยวิธี alkali - lysis พบพลาสมิดในแบคทีเรียทนโครเมทจำนวน 10 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 44 สายพันธุ์ โดยพบจำนวนและขนาดที่แตกต่างๆ กัน อย่างไรก็ตามมีบางพลาสมิดที่พบได้บ่อย ได้แก่ พลาสมิดขนาด 9.2 กิโลเบส และ 40 กิโลเบส โดยขนาด 40 กิโลเบส พบในแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ และขนาด 9.2 กิโลเบสพบในแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ แสดงว่าอาจจะเป็นพลาสมิดที่ควบคุมการทนโครเมท ซึ่งการที่จะทราบแน่ชัดจำเป็นต้องแยกพลาสมิดที่สงสัยออกมาศึกษาต่อโดยวิธีทางพันธุศาสตร์ เช่น การทรานส์ฟอร์ม เข้า *E. coli* ที่ไม่ทนโครเมท ที่น่าสังเกตคือ พลาสมิดที่แยกได้ทั้งหมด พบในสายพันธุ์ที่ได้จากแอคติเวเตดสลัดจ์ ทำให้คิดว่าน่าจะมีปัจจัยบางอย่างในแอคติเวเตดสลัดจ์ที่ช่วยให้พลาสมิดมีความเสถียรในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งอาจเป็น selective pressure ของโครเมียม หรือความสมบูรณ์ของสารอาหาร ในการตรวจหาพลาสมิดของแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์โครเมทโดยวิธี alkali - lysis พบพลาสมิดขนาด 80 และ 50 กิโลเบส อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ว่าแถบพลาสมิดที่เข้าใจว่าเป็นขนาด 80 เป็นเพียงโครงรูปหนึ่งของพลาสมิดขนาด 50 กิโลเบส เนื่องจากแถบที่ได้จางและไม่คมชัด

การศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์โครเมทในการทดลองนี้มีหลายขั้นตอน ในขั้นแรกเป็นการศึกษาเบื้องต้น ใช้วิธีวิเคราะห์โดยเครื่องมือที่ใช้ง่ายๆในภาคสนาม ควบคู่กับการใช้ commercial kit ซึ่งใช้หลักการของการเกิดสารเชิงซ้อนที่มีสีในสารละลายกรด (Urone, 1955) ดังนั้นค่าที่ได้จากวิธีนี้ อาจมีความคลาดเคลื่อนได้ อย่างไรก็ตามผลที่ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า *Ps. maltophilia* Act 11 และ Inf 01 สามารถรีดิวซ์โครเมทความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ได้หมดอย่างรวดเร็วภายใน 6 ชั่วโมง เมื่อใช้แบคทีเรียเริ่มต้น 1.5×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์มีผลอย่างมากต่ออัตราการรีดิวซ์ ที่ความเข้มข้นต่ำเกินไป อาจมีผลให้อัตราการรีดิวซ์ต่ำ หรือไม่เกิดขึ้นเลย เมื่อความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นสูงขึ้นจะทำให้อัตราเร็วการรีดิวซ์เพิ่มขึ้น ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร พบว่าการรีดิวซ์เกิดในทันทีที่เติมโครเมียมความเข้มข้น 0.4 - 0.6 มิลลิโมลาร์ ลงในอาหาร (ไม่ได้แสดงผลในที่นี้) ในการศึกษาการรีดิวซ์โครเมียมอย่างละเอียดได้เลือกใช้วิธี UV - Visible spectrophotometry ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ ในการทดลองนี้แทนวิธี diphenylcarbazide ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ที่นิยมใช้กัน (Shen and Wang, 1993; Wang and Mori, 1989; Urone, 1958) ทั้งนี้เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และให้ค่าที่ถูกต้อง เนื่องจากการรีดิวซ์จะเกิดโดยการเปลี่ยน Cr(VI) ไปเป็น Cr(III) ดังนั้นเมื่อเวลาผ่านไป หากมีการรีดิวซ์เกิดขึ้นน่าจะพบว่า Cr(VI) ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ในขณะที่ Cr(III) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นในลักษณะที่สอดคล้องกัน ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน โดยการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของค่า Cr(VI)

และ Cr(III) ทั้งในและนอกเซลล์พบว่า Cr(VI) ในส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเรื่อยๆ อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีการเพิ่มของ Cr(III) ในส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่กลับมีการเพิ่มของ Cr(III) ในส่วนของเซลล์แบคทีเรีย ในลักษณะที่สอดคล้องกับการเพิ่มปริมาณ Cr(VI) ในส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่ามีการนำ Cr(VI) เข้าเซลล์ และถูกเปลี่ยนแปลงเป็น Cr(III) สะสมในเซลล์ การสะสมโครเมียมในเซลล์เป็นกลไกที่พบได้ทั่วไปดังที่มีรายงานในแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมทหลายชนิด (Cervantes and Simon, 1992) Cervantes และ Simon (1992) ได้ศึกษากลไกการทนต่อโครเมท พบว่ามีการนำ Cr(VI) ผ่านเข้าเซลล์โดยขบวนการที่เป็น analog กับการนำซัลเฟตเข้าสู่เซลล์ ซึ่งในเซลล์จะมีเอนเซม์โครเมทรีดักเตสเร่งปฏิกิริยาการรีดิวซ์ Cr(VI) เป็น Cr(III) Suzuki และคณะ (1992) ได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์โครเมทรีดักเตส พบว่าระหว่างการรีดิวซ์ Cr(VI) ไปเป็น Cr(III) มีสารตัวกลางคือ Cr(V) เกิดขึ้นก่อน อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ไม่ได้ทำการศึกษาไว้

จากการศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการรีดิวซ์ พบว่า ปริมาณโครเมท pH อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการรีดิวซ์โครเมท จากการศึกษาความเข้มข้นของโครเมทที่มีผลต่ออัตราการรีดิวซ์โครเมียม พบว่าเชื้อสามารถรีดิวซ์โครเมทได้ทุกความเข้มข้น (0.2 - 1.0 มิลลิโมลาร์) ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.2 มิลลิโมลาร์) อัตราการรีดิวซ์ค่อนข้างต่ำ ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (0.4 - 0.6 มิลลิโมลาร์) อัตราการรีดิวซ์สูงขึ้นและไม่แตกต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ การรีดิวซ์จะเกิดหลังจาก 15 ชั่วโมง แต่เมื่อเกิดแล้วอัตราการรีดิวซ์ไม่ต่างจากที่ความเข้มข้นโครเมท 0.4 - 0.6 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นระยะแรกที่ยังไม่พบการรีดิวซ์ น่าจะเป็นระยะที่เซลล์ต้องปรับตัว หรือสร้างเอ็นไซม์โครเมทรีดักเตสให้เพียงพอต่อการเกิดรีดักชัน ระดับโครเมทที่มีผลยับยั้งการรีดิวซ์ของแบคทีเรียต่างชนิดกันไม่เท่ากัน *Enterobacter cloacae* H01 จะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 5 มิลลิโมลาร์ ช่วง pH ที่ *Ps. maltophilia* Act 11 สามารถรีดิวซ์โครเมียมได้คือ ที่ pH 6 - 9 pH ที่รีดิวซ์ได้ดีคือ pH เป็นกลาง ถึงค่อนข้างเป็นด่าง ระหว่าง 7 - 9 ที่ pH 8 และ 9 อัตราการรีดิวซ์สูงกว่าที่ pH 7 เล็กน้อย แต่ที่ pH เป็นกรด pH 5 ไม่พบว่ามีการรีดิวซ์เกิดขึ้น ช่วงอุณหภูมิที่ *Ps. maltophilia* Act 11 สามารถรีดิวซ์โครเมียมได้ อยู่ระหว่าง 30 - 40 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การรีดิวซ์จะเกิดดีที่สุด ส่วนที่อุณหภูมิต่ำ 25 องศาเซลเซียส การรีดิวซ์โครเมทไม่ดีนัก อัตราการรีดิวซ์ต่ำ โดยที่ความเข้มข้นโครเมท 0.4มิลลิโมลาร์ เชื้อต้องใช้เวลาถึง 24 ชั่วโมง ในการรีดิวซ์โครเมทอย่างสมบูรณ์ ส่วนที่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เชื้อใช้เวลา 8 ชั่วโมง ในการรีดิวซ์ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับที่ Komori และคณะ (1990) ได้รายงานไว้ว่าถ้าอุณหภูมิลดลงถึง 20 องศาเซลเซียส อัตราการรีดิวซ์ของ

Enterobacter cloacae H01 จะลดลงถึง 80 % จากระดับปกติในการรีดิวซ์ โดยทั่วๆไป แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความต้องการสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดการรีดิวซ์ต่างๆกัน แบคทีเรียที่มีการศึกษากันมากได้แก่ *Enterobacter cloacae* H01 (Wang *et al*, 1989; Komori *et al* 1990) Komori และคณะ (1990) รายงานว่า *Enterobacter cloacae* H01 จะรีดิวซ์ได้ดีที่อุณหภูมิ 30 - 37 องศาเซลเซียส pH 7 - 7.8 โดยพบว่าการเติมโปตัสเซียมไดโครเมทความเข้มข้น 1 - 2 มิลลิโมลาร์ จะทำให้อัตราการรีดิวซ์โครเมียมสูงขึ้น และจะหยุดเมื่อความเข้มข้นโครเมทสูงกว่า 5 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากการรีดิวซ์ต้องอาศัยเอ็นไซม์โครเมทรีดักเตส ที่ pH ต่ำๆ การรีดิวซ์ไม่เกิดเนื่องจากเอ็นไซม์ถูกทำลาย (Ishibachi, 1990; Holt *et al*, 1994)

ถึงแม้ว่ากลไกการสะสมโครเมทในเซลล์ จะเป็นกลไกหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในแบคทีเรียทนโครเมียม แต่ในกรณีแบคทีเรียรีดิวซ์โครเมท โดยปกติเมื่อมีการรีดิวซ์ Cr(VI) ไปเป็น Cr(III) แล้ว แบคทีเรียมักจะปล่อย Cr(III) ออกมานอกเซลล์ ซึ่งจะตกตะกอนในรูป Cr(OH) ซึ่งไม่ละลายน้ำ ทำให้สามารถกำจัดโครเมียมที่ปนเปื้อนออกจากน้ำได้ Shen และ Wang (1993) รายงานว่า *E. coli* ATCC 33456 จะปล่อย Cr(III) ออกมานอกเซลล์และมีบางส่วนเหลืออยู่ในเซลล์ บางส่วนจะเกาะตามผิวเซลล์ช่วยป้องกันความเป็นพิษของ Cr(VI) ให้กับเซลล์ มีรายงานว่า *Enterobacter cloacae* H01 ก็มีการปล่อย Cr(III) ออกนอกเซลล์เช่นเดียวกัน (Komori *et al*, 1989) ดังนั้นการที่ไม่พบ Cr(III) นอกเซลล์ในการทดลองนี้จึงเป็นไปได้ 2 กรณีคือ

1 มีการสะสมโครเมียม Cr(III) ในเซลล์โดยไม่ปล่อยออกมานอกเซลล์จริง ซึ่งถ้ากรณีนี้แบคทีเรียอาจมีกลไกการป้องกันความเป็นพิษของโครเมียม โดยวิธี compartmentation คือเก็บ Cr(III) ไว้ในส่วนที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ซึ่งจะต่างจากกลไกที่มีรายงานทั่วไปในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ซึ่งมักจะสะสม Cr(III) ไว้บางส่วน หรือปลดปล่อยออกนอกเซลล์

2 สภาวะที่ใช้ในการทดลองยังไม่เหมาะสม ทำให้การปลดปล่อยโครเมียมออกนอกเซลล์ทำได้ช้า จึงยังไม่สามารถตรวจสอบได้ใน 24 ชั่วโมงของการทดลอง หรือปริมาณโครเมทที่ใช้ต่ำเกินไป เซลล์จึงยังทนโครเมียมอยู่ได้ ไม่มีความจำเป็นต้องส่งออกมานอกเซลล์ ดังนั้นการขยายขนาดทดลองเป็นระดับ pilot plant อาจมีความจำเป็น

3 วิธีการวิเคราะห์ไม่เหมาะสม จึงไม่สามารถตรวจวิเคราะห์โครเมียม(III) ในเซลล์ อย่างไรก็ตามโอกาสเป็นกรณีนี้ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์โครเมียม(III) ในเซลล์แล้ว การวิเคราะห์โครเมียม (III) ในส่วนน้ำใสง่ายกว่า และขั้นตอนไม่ยุ่งยาก

นอกจากปัจจัยทางกายภาพที่กล่าวมาแล้ว มีรายงานว่าอัตราการรีดิวซ์ยังขึ้นกับชนิดและปริมาณของไอออนต่างๆ ในสารอาหารก็เป็นปัจจัยสำคัญในการเร่งหรือยับยั้งอัตราการรีดิวซ์ เช่น

Fe^{2+} ถ้ามีสูงเกินไปจะยับยั้งการรีดิวซ์ใน *Agrobacterium racibacter* EPS - 916 (Hovera *et al*, 1993) acetate, ethanol, malate, succinate, pyruvate และ glycerol จะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเลกตรอนที่ดี ทำให้อัตราการรีดิวซ์สูงขึ้น molydate, Vanadate, tellurate และ manganese oxide จะยับยั้งการรีดิวซ์โครเมท หรือแม้แต่โลหะที่มีพิษต่างๆ ก็มีผลยับยั้งการเกิดปฏิกิริยารีดักชันเช่นกัน (Komori *et al*, 1989) ในการทดลองนี้ทดสอบการเกิดปฏิกิริยารีดักชันใน KSC medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรายงานการศึกษาทั่วไป

ในการศึกษานี้ใช้เชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้นระดับหนึ่ง ซึ่งสะดวกในการติดตามปฏิกิริยารีดักชัน คือสามารถเกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ในสภาวะที่ใช้ทดลองใน 24 ชั่วโมง และมีเวลานานเพียงพอที่จะติดตามปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามดังที่กล่าวมาตอนต้นแล้วว่า ในระหว่างการทดลองพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้นสูงขึ้นจากปกติประมาณ 10 เท่า แบคทีเรียสามารถรีดิวซ์โครเมทความเข้มข้น 0.4 - 0.6 มิลลิโมลาร์ ได้หมดในทันทีที่เติมโครเมทให้กับแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *P. maltophilia* Act 11 น่าจะมีศักยภาพในการรีดิวซ์โครเมทสูงกว่าที่รายงานไว้ในการศึกษานี้ และเป็นไปได้ที่จะนำมาพัฒนาเมื่อใช้ในการลดความเป็นพิษของโครเมททางชีวภาพ ซึ่งจะทราบได้จากการศึกษาเพิ่มเติมในระดับ pilot plant ประกอบกับการควบคุมปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพให้เหมาะสม

เอกสารอ้างอิง

มาลิน จุลศิริ. 2532. *ยาต้านจุลชีพ : ความรู้พื้นฐานและประยุกต์*. กรุงเทพมหานคร, โรงพิมพ์อักษรบัณฑิต.

Baldi, F. A. M., Vaughan and G. J. Olson. 1990. Chromium(VI) resistant yeast isolate from a sewage treatment plant receving tannery wastes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 913 - 918.

Birnboim H. C. and J. Doly. 1979. A Rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acid res.* 7 : 1513 - 1523.

Bopp, L. H. and H. L. Ehrlich. 1988. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB 300. *Arch. Microbiol.* 150 : 426 - 431.

Bopp, L. H., A. M. Chakrabarty, and H. L. Ehrlich. 1983. Chromate resistance plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 155 : 1105 - 1109.

Cerventes, C., H. Ohtake, L. Chu, T. Misra, K. and S.Silver. 1990. Cloning nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM 505. *J. Bacteriol.* 172 : 287 - 291.

Cerventes, C., 1991. Bacterial interactions with chromate. *Antone van Leeuwenhock*. 59 : 229 - 233.

Cervantes, C., and S. Silver. 1992. Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid*. 27 : 65 - 71.

Dhakephalkar., P. K., J. V. Bhide and K. M. Paknikar. 1996. Plasmid mediated chromate resistance and reduction in *Pseudomonas mendocina* MCMB - 180. *Biotechnol. Lett.* 18 : 1119 - 1122.

Diels, L., and M. Mergeay. 1990. DNA probe mediated detection of resistant bacteria from soils highly polluted by heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 1483 - 1491.

Efstathiou, J. D. and L. L. Mckay. 1977. Inorganic salts resistance associated with a lactose fermenting plasmid in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 130 : 257 - 265.

Gadd., G. M and C. White. 1989. Heavy metal and radionuclide accumulation and toxicity in fungi and yeast *In* " Metal - Microbe interactions " P. K. Poole and G. M. Gadd Ed. IRL Press. Oxford.

Horitsu, H. S. Futo, K. Ozawa. and K. Kawai. 1983. Comparison of characteristies of hexavalent chromium by hexavalent chromium tolerant *Pseudomonas ambigua* G - 1. *Agric. Biol. Chem.* 51 : 2417 - 2420.

Ishabishi Y., C. Cervantes. and S. Silver. 1990. Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 2268 - 2270.

Kado, C. I. and S. T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. *J. Bacteriol.* 145 : 1365 - 1373.

Komori, K., P. Wang, K. toda and H. Ohtake. 1989. Factors affection chromate reduction in *Enterobacter cloacae* strain H01. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31 : 567 - 570.

Komori, K., A. Rivas, K. Toda and H. Ohtake. 1990. A method for removal of toxic chromium using dialysis - sac cultures of a chromate reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33 : 117 - 119.

Lovley, D. R. and E. J. P. Phillips. 1994. Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its C3 cyotchrome. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 726 - 728.

Lovley, D. R. 1993. Dissimilatory metal reduction, *Annu. rev. Microbiol.* 47 : 263 - 290.

Llovera, S., R. Bonet, I. Congte gado. 1993. Effect of culture medium ions on chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium radibacter*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39 : 424 - 426.

Mergeay, M. 1991. Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Trends. Biotechnol.* 9 : 17 - 24.

Nies, A., D. H. Nies and S. Silver. 1989. Cloning and expression of plasmid genes encoding resistance to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 71 : 5065 - 5070.

Nieto, I. I., Mc. Marquez. 1969. Survey of metal tolerance in moderately halophillic Eubacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 2385 - 2390.

Ohtake, H., E. Fujii and K. Toda. 1990. Reduction of toxic chromate in an industrial effluent by use of a chromate reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *Environ. Technol.* 11 : 663 - 668.

Ohtake, H. and S. Silver. 1992. Bacterial reduction of toxic hexavalent chromate *In* " Biodegradation and Bioremediation of toxic chemicals " (G. R. Chaudihry Ed.) Dioscorides Press. Portland.

Ottow, J. C. G. and A. Von. Klopotek. 1969. Enzymatic reduction of iron oxide by fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 38 : 478 - 485.

Petrilli, F. L. and S. DeFlora. 1977. Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium on *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ Microbiol.* 33 : 805 - 809.

Shen, H. and Y. T. Wang. 1993. Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 3771 - 3777.

Shen, H. and Y. T. Wang. 1994. Modeling hexavalent chromium reduction in *Escherichia coli* ATCC 33456. *Biotechnol. Bioeng.* 43 : 293 - 300.

Silver, S. 1992. Plasmid determined metal resistance mechanisms. Range and overview. *Plasmid.* 27 : 1 - 3.

Silver, S. and M. Waldehaug. 1992. Gene regulation.of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol Rev.* 56 : 195 - 228.

Smillie, R. H., K. Hunter and M, Loutit. 1981. Reduction of chromium(VI) by bacterially produced hydrogen sulphide in a marine environment. *Water Res.* 15 : 1351 - 1354.

Summer, A. O., and G. A. Jacoby. 1978. Plasmid determined resistance to boron and chromium compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemolter.* 13 : 637 - 640.

Suzuki, T., N. Miyata, H. Horitsu, K. Kawai., K. Takamizawa, Y. Taiand., M. Okazaki. 1992. NAD(P)H - dependent chromium(VI) reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1 : a Cr(VI) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). *J. Bacteriol.* 174 : 5344 - 5345.

Venitt, S. and L. S. Levy. 1974. Mutagenicity of chromates in bacteria and its relevance to chromate carcinogenesis. *Natue* (London). 250 : 493 - 495.

Wang. P., T. Mori., K. Komori., M. Sasatsu, K. Toda. and H. Ohtake. 1989. Isolation and chracterization of an *Enterobacter cloacae* strain H01 that reduces hexavalent chromium under anaerobic condition. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 1665 - 1669.

Urone, P. F., 1995. Stability of colorimetric reagent for chromium s-diphenlycarbazide in various solvents. *Anal. Chem.* 27 : 1354 - 1355.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. Luria Broth (LB)

มีสูตรดังนี้

Bacto trytone	10.0	กรัม
Bacto yeast extract	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Luria Agar (LA)

มีสูตรดังนี้

Bacto trytone	10.0	กรัม
Bacto yeast extract	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Bacto agar	15.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. KSC medium

มีสูตรดังนี้

NH_4Cl	0.03	กรัม
K_2HPO_4	0.03	กรัม
NaCl	0.01	กรัม
KH_2PO_4	0.05	กรัม
*$MgSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม

*$CaCO_3$	0.005	กรัม
*$FeCl_3$. $7H_2O$	0.005	กรัม
Soduirn acetate	2.0	กรัม
Casein hydrolysate	1.0	กรัม
น้ำปะปา	100.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

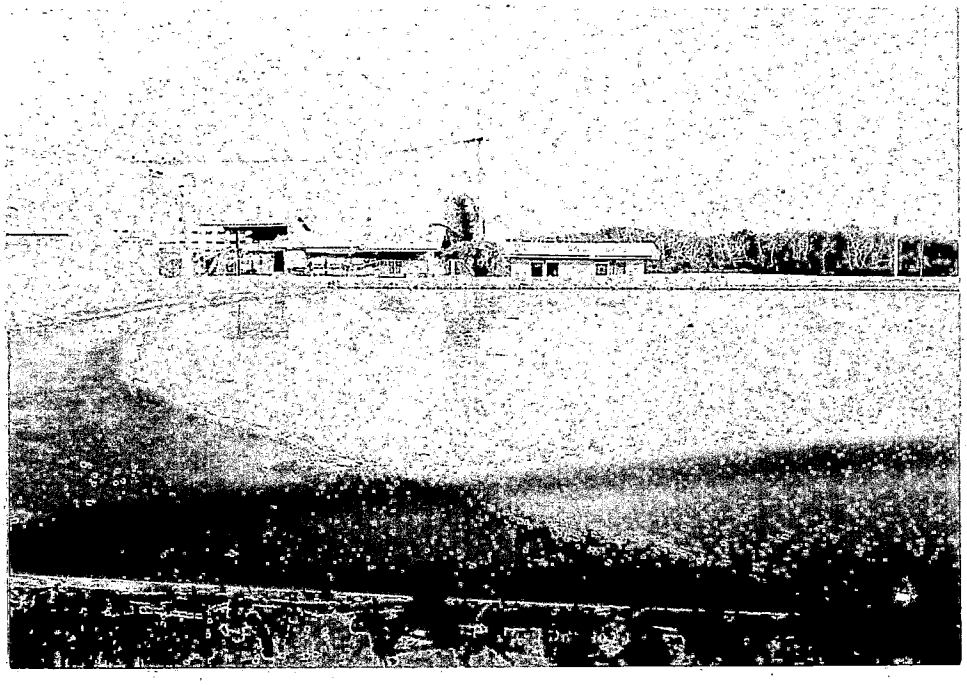
หมายเหตุ

* = เมื่อฆ่าเชื้อที่ความร้อนสูงมักจะรวมกับสารอื่นแล้วตกตะกอน จึงควรเตรียมเป็น stock solotion (คือ สารที่ต้องแยกฆ่าเชื้อก่อนแล้วจึงเติมลงในอาหารภายหลัง โดยคิดปริมาณสุดท้าย)

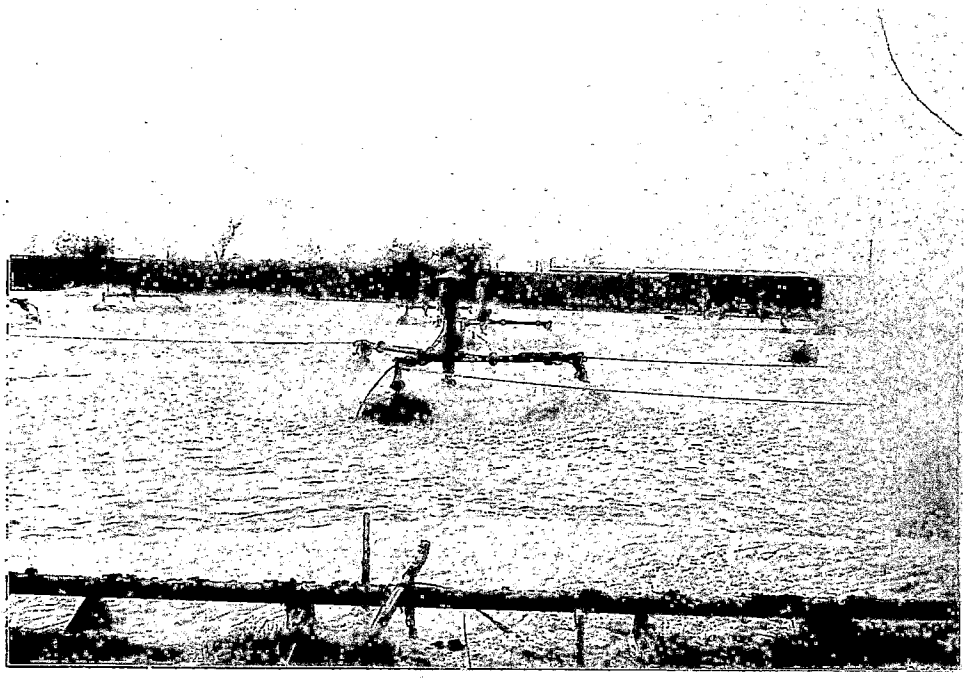
ภาคผนวก ช

สถานที่เก็บตัวอย่าง

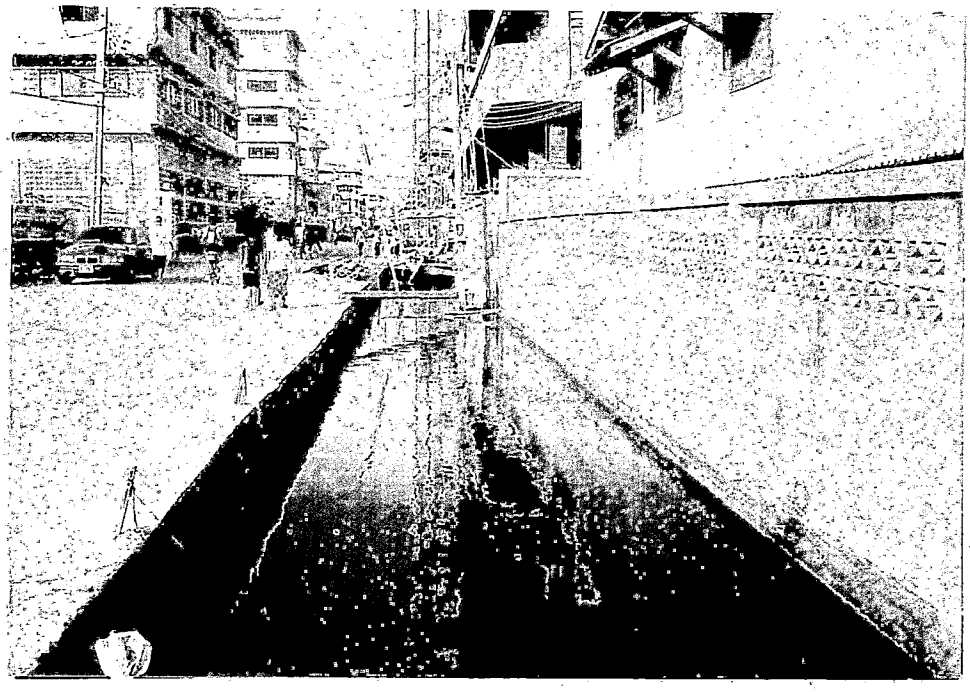
บริเวณทางเข้าสู่บ่อบำบัด 1



บริเวณทางเข้าสู่บ่อบำบัด 2



บริเวณบ่อบำบัด 2



บริเวณท่อระบายน้ำด้านนอก