



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตเอนไซม์ตรึงสำหรับประยุกต์ใช้ในการกำจัดโครเมียม  
จากน้ำทิ้งในกระบวนการฟอกหนัง

Construction of an immobilized enzyme for application in  
chromium removal from tannery wastewater

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 354347

สัญญาเลขที่ 72/2560

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตเอนไซม์ตรึงสำหรับประยุกต์ใช้ในการกำจัดโครเมียม  
จากน้ำทิ้งในกระบวนการฟอกหนัง

Construction of an immobilized enzyme for application in  
chromium removal from tannery wastewater

รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตเอนไซม์ตรึงสำหรับประยุกต์ใช้ในการกำจัดโครเมียมจากน้ำทิ้งในกระบวนการฟอกหนัง” สำเร็จลงด้วยดีเนื่องจากได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 72/2560 ผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2561

## บทคัดย่อ

การฟอกหนังเป็นอุตสาหกรรมที่พบได้ทั่วไปในทุกประเทศซึ่งทิ้งสารปนเปื้อนความเข้มข้นสูงที่ไม่สามารถสลายทางชีวภาพได้ออกมากับน้ำทิ้ง ที่จำเป็นต้องอาศัยเทคโนโลยีในการกำจัดที่มีประสิทธิภาพเพื่อรักษาสีและกลิ่นต่อไป หนึ่งในสารปนเปื้อนหลักที่พบในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกหนังนี้คือโครเมียม ซึ่งเฮกซะวาเลนต์โครเมียมหรือ Cr(VI) นั้นจัดเป็นรูปวาเลนต์ของโครเมียมที่มีอันตรายจัดเป็นสารก่อมะเร็งที่สามารถละลายน้ำได้ในทุกค่าพีเอช การรีดักชัน Cr(VI) ด้วยแบคทีเรียได้มีการยืนยันแล้วว่าเป็นวิธีการกำจัด Cr(VI) ที่มีประสิทธิภาพและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม แต่ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่จะใช้ในการกำจัดยังคงมีข้อจำกัดตามปัจจัยทางกายภาพ เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิ และหรือความเค็มของน้ำทิ้งที่จะใช้ในการบำบัด ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะค้นหาแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีศักยภาพสูงในการกำจัด Cr(VI) ทางชีวภาพ โดยทำการคัดเลือกจากแบคทีเรียที่พบมีในห้องปฏิบัติการ ผ่านการมีของขึ้นยีสที่กำหนดการสร้างเอนไซม์โครเมทรีดักเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่ใช้ในการรีดักชันโครเมียม ผลการทดลองพบแบคทีเรียจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Acinetobacter baylyi*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis* และ *Streptococcus sciuri* มียีสที่กำหนดการสร้างเอนไซม์โครเมทรีดักเทส ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ที่ค่าแอกติวิตีในช่วง 2-10 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าแบคทีเรียจำนวน 3 ชนิดในสกุล *Bacillus* คือ *B. megaterium*, *B. cereus* และ *B. subtilis* สามารถเจริญและทนต่อสภาวะที่มี Cr(VI) ความเข้มข้นสูง ( $\leq 50$  มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้โดยสามารถกำจัด Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์ในสภาวะที่มีเกลือสูงถึงร้อยละ 7.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยเหตุนี้จึงเลือกแบคทีเรียทั้งสามชนิดนี้มาทำการศึกษาต่อไป

การศึกษากำจัด Cr(VI) ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระบบแบบแบทพบว่า *B. megaterium* สามารถกำจัด Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 12 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะเหมาะสมคือ อุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 โดยใช้ความเร็วในการเขย่าเท่ากับ 250 รอบต่อนาที โดยพบว่าทริปโตนและฟรุคโตสเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. megaterium* นอกจากนี้ยังพบประสิทธิภาพในการรีดักชัน Cr(VI) ที่สูงมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อใช้กลีเซอรอล กลูโคส โซเดียมอะซิเตท และแลคโตสเป็นตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับการปนเปื้อนของโลหะหนักในระบบไม่พบการรบกวนประสิทธิภาพในการรีดักชันของ Cr(VI) โดยแบคทีเรีย ยกเว้นการมีของ  $Ag^+$  และ  $Hg^{2+}$

เซลล์อิสระของ *B. cereus* สามารถรีดักชัน Cr(VI) ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้สมบูรณ์ในสภาวะเหมาะสมคือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 7.0 ความเร็วในการกวน 50 รอบต่อนาที และหัวเขี่ยร้อยละ 25 โดยใช้ฟรุคโตสเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ในสภาวะที่ไม่มีไอออนของโลหะหนักที่ไม่ใช่  $Cu^{2+}$  และ  $Ba^{2+}$  ขณะที่ *B. subtilis* สามารถกำจัด Cr(VI) ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้ทริปโตนเป็นตัวให้อิเล็กตรอนและมี Cr(VI) ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อย่างสมบูรณ์ที่ค่าพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยการกวนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีและใช้หัวเขี่ยตั้งต้นร้อยละ 10 โดยพบว่าประสิทธิภาพในการรีดักชันจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีไอออนของ  $Zn^{2+}$  และ  $Cu^{2+}$  ปนเปื้อน ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของ *B. megaterium*, *B. cereus* และ *B.*



*subtilis* ที่จะนำมาใช้ในการกำจัด Cr(VI) ที่ปนเปื้อนมากับน้ำทิ้งจากระบวนการอุตสาหกรรมต่อไป  
ในอนาคต

**คำสำคัญ** การรื้อฟื้นทางชีวภาพ, เฮกซาวาเลนซ์โครเมียม, การกำจัด Cr(VI), *Bacillus* sp.

## Abstract

Leather tanning is a wide common industry all over the world. The high concentrations of pollutants with low biodegradability in tannery wastewater represent a serious and actual technological and environmental challenge. Chromium is one of the major contaminants in the effluents and demands special attention. Among the two stable valence states of chromium, the hexavalent chromium, Cr(VI) is remarkably hazardous because its properties of carcinogenic and water soluble in the full pH range. Reduction of Cr(VI) by bacteria has been found to be an efficient and environmental friendly strategy to solve chromate pollution. However, the performance of these bacteria suffers when pH, temperature, and/or salinity fluctuate. This study aims to explore a novel bacterium with potential to biological removal of Cr(VI).

Bacteria from laboratory stock were preliminary screened as candidate of Cr(VI) reducers based on the presence of a chromate reductase gene. Five bacteria including *Acinetobacter baylyi*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis* and *Streptococcus sciuri* contained the chromate reductase gene. Assay of chromate reductase activity revealed enzyme production in the range of 2-10 U/mL. However, three bacteria in the genus *Bacillus*, *B. megaterium*, *B. cereus* and *B. subtilis* exhibited relatively high tolerance to Cr(VI) ( $\leq 50$  mg/L) and whole reduction of Cr(VI) in the salty condition up to 7.5% (w/v). Hence, these bacteria were selected for further studies.

Study on the removal of 20 mg/L Cr(VI) in batch experiments by *B. megaterium* showed complete reduction of Cr (VI) within 12 hours under optimized conditions of temperature 30-45 °C, pH 7.0 and 250 rpm. Tryptone and fructose were found to be an effective electron donor for growth of *B. megaterium* and Cr (VI) reduction. High reduction of Cr (VI) ( $\geq 90\%$ ) was also obtained for glycerol, glucose, sodium acetate and lactose. Presence of metal ions except  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Hg}^{2+}$  did not affect reduction ability of *B. megaterium*.

Free-cells of *B. cereus* showed complete reduction of 25 mg/L Cr(VI) at the optimum condition of temperature 37 °C, pH 7.0, shaking velocity (50 rpm) and biomass dose (25% culture inoculums) in the absence of metal ions except  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  and use of fructose as electron donor. *B. subtilis* showed complete reduction of 20 mg/L Cr(VI) at pH 7.0 and 37 °C, 200 rpm of shaking velocity by using 10% of biomass dose. Tryptone was found to be the best electron donor for the Cr(VI)

reduction and the presence of  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  did not affect reduction ability of *B. subtilis*. Our finding evidently shows that *B. megaterium*, *B. cereus* and *B. subtilis* are a potential candidate to practically biotreat the industrial effluents containing Cr(VI) in the future.

**Keywords:** Bioreduction, Hexavalent chromium, Cr(VI) removal, *Bacillus* sp.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	6
สารบัญตาราง	9
สารบัญภาพ	10
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	12
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	13
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	14
2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
2.1.1 กระบวนการฟอกหนัง	15
2.1.2 เฮกซาวาเลนซ์โครเมียม	17
2.1.3 การกำจัดโครเมียม	19
2.1.4 การรีดักชันทางชีวภาพของเฮกซาวาเลนซ์โครเมียมโดยแบคทีเรีย	24
2.2 ขอบเขตของการดำเนินการวิจัย	25
3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถรีดักชัน Cr(VI)	26
3.2 การรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรีย	28
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณของ Cr(VI)	28
3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการรีดักชัน Cr(VI)	29
4 ผลการวิจัย	
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถรีดักชัน Cr(VI)	30
4.2 การรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรีย	35
4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>Bacillus megaterium</i>	38
4.3.1 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น	38
4.3.2 ผลของความเร็วในการเขย่า	38
4.3.3 ผลของอุณหภูมิ	38
4.3.4 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI)	40
4.3.5 การติดตามการรีดักชัน Cr(VI) ที่เวลาต่างกัน	40

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย	
4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>Bacillus megaterium</i>	
4.3.6 ผลของแหล่งคาร์บอน	40
4.3.7 ผลของไอออนโลหะ	42
4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>Bacillus cereus</i>	42
4.4.1 ผลของปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น	42
4.4.2 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น	42
4.4.3 ผลของอุณหภูมิ	44
4.4.4 ผลของความเร็วในการเขย่า	44
4.4.5 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI)	44
4.4.6 การติดตามการรีดิวซ์ Cr(VI) โดย <i>B. cereus</i> ในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่สภาวะเหมาะสม	46
4.4.7 ผลของแหล่งคาร์บอน	46
4.4.8 ผลของไอออนโลหะ	46
4.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>Bacillus subtilis</i>	47
4.5.1 ผลของปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น	47
4.5.2 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น	48
4.5.3 ผลของอุณหภูมิ	49
4.5.4 ผลของความเร็วในการเขย่า	49
4.5.5 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI)	49
4.5.6 การทดสอบประสิทธิภาพของ <i>B. subtilis</i> ในการรีดิวซ์ Cr(VI)	50
4.5.7 ผลของแหล่งคาร์บอน	51
4.5.8 ผลของไอออนโลหะ	51
5 อภิปรายผลการวิจัย	53
6 สรุปผลการวิจัย	57
บรรณานุกรม	58
ภาคผนวก	
1 กราฟมาตรฐานของ BSA เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Bradford	68
2 กราฟมาตรฐานของ Cr(VI) และ $K_2Cr_2O_7$ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี 1,5-diphenylcarbazine	69
3 ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก <i>Acinetobacter baylyi</i>	70

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก	
4 ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก <i>Bacillus megaterium</i>	71
5 ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก <i>Bacillus cereus</i>	72
6 ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก <i>Bacillus subtilis</i>	73
7 ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก <i>Streptococcus sciuri</i>	74
8 ผล BLAST ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ <i>Acinetobacter baylyi</i>	75
9 ผล BLAST ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ <i>Bacillus megaterium</i>	77
10 ผล BLAST ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ <i>Bacillus cereus</i>	79
11 ผล BLAST ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ <i>Bacillus subtilis</i>	81
12 ผล BLAST ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ <i>Streptococcus sciuri</i>	83
ประวัติและผลงานของผู้วิจัย	85

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 Cr(VI) ที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ	18
2 สารดูดซับทางชีวภาพที่ใช้ในการกำจัด Cr(VI)	20
3 การดูดซับ Cr(VI) โดยจุลินทรีย์	21
4 แบคทีเรียในห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย	27
5 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>B. megaterium</i>	41
6 ผลของไอออนโลหะต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>B. megaterium</i>	42
7 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>B. cereus</i>	47
8 ผลของไอออนโลหะต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>B. cereus</i>	47
9 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>B. subtilis</i>	51
10 ผลของไอออนโลหะต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>B. subtilis</i>	52

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 กลไกในการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน	25
2 ปฏิกริยาระหว่าง Cr(VI) กับ 1,5-diphenylcarbazine	28
3 การวิเคราะห์ห่อสารโครโมเจนของตัวอย่างจาก <i>Acinetobacter baylyi</i>	31
4 การวิเคราะห์ห่อสารโครโมเจนของตัวอย่างจาก <i>Bacillus megaterium</i>	31
5 การวิเคราะห์ห่อสารโครโมเจนของตัวอย่างจาก <i>Bacillus cereus</i>	32
6 การวิเคราะห์ห่อสารโครโมเจนของตัวอย่างจาก <i>Bacillus subtilis</i>	32
7 การวิเคราะห์ห่อสารโครโมเจนของตัวอย่างจาก <i>Streptococcus sciuri</i>	33
8 ลำดับดีเอ็นเอที่หาได้จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียทั้งห้าสายพันธุ์	34
9 การเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากยีนโครเมอริคที่เตรียมได้จากแบคทีเรียทั้งห้าสายพันธุ์	34
10 การเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียทั้งห้าสายพันธุ์	36
11 การรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียเมื่อใช้ความเข้มข้น Cr(VI) เริ่มต้นต่างกัน	37
12 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรีย	37
13 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>B. megaterium</i>	38
14 การเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>B. megaterium</i> ที่ความเร็วในการเขย่าต่างกัน	39
15 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>B. megaterium</i>	39
16 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI) ต่อการเจริญและความสามารถในการรีดักชันของ <i>B. megaterium</i>	40
17 การเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของ <i>B. megaterium</i> ที่เวลาต่างกัน	41
18 ผลของปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นต่อเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ <i>B. cereus</i>	43
19 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียสังเคราะห์ต่อการเจริญและการกำจัด Cr(VI) ของ <i>B. cereus</i>	43
20 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ <i>B. cereus</i>	44
21 ผลของความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ <i>B. cereus</i>	45
22 ผลของความเข้มข้น Cr(VI) ต่อการเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ <i>B. cereus</i>	45
23 การติดตามการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ <i>B. cereus</i>	46
24 ผลของปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ <i>B. subtilis</i>	48
25 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียสังเคราะห์ต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ <i>B. subtilis</i>	48



## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
26 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ <i>B. subtilis</i>	49
27 ผลของความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ <i>B. subtilis</i>	50
28 ผลของความเข้มข้นโครเมียมเริ่มต้นต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ <i>B. subtilis</i>	50
29 การติดตามการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ <i>B. subtilis</i>	51

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

<	=	น้อยกว่า
±	=	บวกหรือลบ
%	=	ร้อยละ
°C	=	องศาเซลเซียส
h	=	ชั่วโมง
kV	=	กิโลโวลต์
min	=	นาที
mg/L	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
OD	=	Optical density
Pa	=	ปาสคาล
pH	=	ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าพีเอช
ppm	=	ส่วนในล้านส่วน
R <sup>2</sup>	=	Regression coefficient
rpm	=	ความเร็วรอบต่อนาที

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การฟอกหนัง (Tanning) คือกระบวนการเตรียมพื้นผิวของหนังสัตว์ให้พร้อมก่อนที่จะนำมาผลิตเป็นเครื่องหนัง ซึ่งเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่เก่าแก่ที่สุดในโลกและรองรับความต้องการของประชากรในทุกภาคส่วน เมื่อจำนวนประชากรเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้การใช้นหนังฟอกนั้นมีความต้องการเพิ่มสูงขึ้นด้วย จึงนำไปสู่การขยายตัวของกิจการฟอกหนังจากกิจการระดับเล็กไปสู่อุตสาหกรรมระดับใหญ่ขึ้นสำหรับประเทศไทยที่จัดเป็น 1 ใน 4 ของประเทศที่มีการส่งออกหนังฟอกและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเครื่องหนังมากที่สุดในโลก (Ramanujam et al., 2009) ประกอบกับนโยบายของภาครัฐที่ส่งเสริมให้ประเทศไทยเป็นเมืองแฟชั่นเสื้อผ้าและเครื่องแต่งกาย ทำให้อุตสาหกรรมเครื่องหนังมีกำลังขยายตัวเพิ่มขึ้นด้วย จึงไม่สามารถหลีกเลี่ยงกับปัญหามลพิษที่จะตามมาได้ ในกระบวนการฟอกหนังเริ่มจากวัตถุดิบที่เป็นหนังเค็ม (หนังแช่เกลือ) ผ่านขบวนการต่างๆ จนได้เป็นหนังสำเร็จพร้อมส่งจำหน่ายได้นั้นจำเป็นต้องมีการใช้วัตถุดิบเคมีภัณฑ์ พลังงาน และน้ำเป็นจำนวนมาก ที่กลายเป็นของเสียที่ทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำเสีย อากาศเสีย และกากของเสียจากการผลิต โดยพบว่าปัญหาหลักของโรงงานฟอกหนังคือ น้ำเสียที่มีโลหะหนักจากการฟอกโครมปนเปื้อนและกลิ่นเหม็นที่ยังไม่สามารถแก้ไขได้อย่างเป็นการถาวร (Khan et al., 1999)

โครเมียม (Chromium) เป็นหนึ่งในสารปนเปื้อนหลักที่พบในน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนัง และยังคงต้องได้รับการกำจัดด้วยวิธีเฉพาะ โดยรูปเสถียรของโครเมียมที่พบการปนเปื้อนสูงที่สุดในน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนัง ได้แก่ ไทรวาเลนซ์โครเมียม (trivalent chromium) หรือ Cr(III) ที่สามารถละลายน้ำได้น้อย มีความเป็นพิษน้อยกว่า และเป็นที่ยอมรับว่า Cr(III) ในปริมาณต่ำ จะเป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญและเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ (Xu et al., 2013) และเฮกซะวาเลนซ์โครเมียม (hexavalent chromium) หรือ Cr(VI) ที่จัดเป็นสารอันตรายเนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และสารมิวทาเจน (mutagen) สำหรับสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ยังสามารถละลายน้ำได้ในทุกค่าพีเอชทำให้พบการตกค้างในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลายได้ (Megharaj et al., 2003; Mohanty et al., 2006) ซึ่งเคยมีรายงานของ USEPA พบการปนเปื้อนของ Cr(VI) ในน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังปริมาณสูงถึง 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร (Laxman & More, 2002) ซึ่งโรงงานฟอกหนังทุกแห่งจำเป็นต้องทำการกำจัดโครเมียมในน้ำทิ้งก่อนปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมต่อไป (Cronje et al., 2011)

การกำจัดโครเมียมในอดีต นิยมทำโดยการเติมสารเคมีให้เกิดการตกตะกอน (chemical precipitation) หรือการแยกโดยใช้เมมเบรน (membrane based separation) หรือ เรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange resin) แต่วิธีเหล่านี้ก็ยังไม่สามารถกำจัดโครเมียมได้อย่างสมบูรณ์รวมทั้งเกิดการผลิตกากตะกอนที่มีความเป็นพิษ และใช้ต้นทุนในการกำจัดที่สูงอีกด้วย เนื่องจากการ

เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (chemical reduction) ของ Cr(VI) เป็น Cr(III) นั้นต้องใช้สารเคมีในปริมาณสูง ส่วนการแยกโดยใช้เมมเบรนและกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนต้องใช้เครื่องมือที่มีต้นทุนสูงและ คนงานที่มีประสบการณ์ (Eckenfedler, 1989; Philip et al., 1998; Liu et al., 2010) ด้วยเหตุนี้ การพัฒนาวิธีการกำจัดโครเมียมที่มีประสิทธิภาพและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมจึงเป็นประเด็นที่ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น

การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนมากับน้ำทิ้งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจ ซึ่งมีรายงานยืนยันแล้วว่าจุลินทรีย์สามารถปรับตัวเพื่อการเจริญได้ในสภาวะที่มีโลหะหนัก และจะป้องกันตัวเองจากพิษของโลหะหนักผ่านการเปลี่ยนรูปละหะหนักนั้นให้เป็นสารที่มีพิษน้อยลง ด้วยปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ออกซิเดชัน (oxidation) หรือการตกตะกอน (precipitation) (Wang & Shen, 1995) ซึ่งเคยมีรายงานพบแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถรีดิวส์ Cr(VI) เป็น Cr(III) ที่มีความเป็นพิษน้อยลงได้ (Wang & Shen, 1995; Shen & Wang, 1995; Laxman & More, 2002) จากการทำงานของเอนไซม์โครเมตรีดักเตส (chromate reductase) ที่อยู่ในเซลล์สังโเล็กตรอนจาก NADH หรือ NADPH ให้โครเมท (Bopp & Elrich, 1988; Wang & Shen, 1997; Philip et al., 1998; Murugavelh & Mohanty, 2012) ซึ่งการใช้แบคทีเรียกำจัดโครเมียมมีข้อดีเหนือการใช้ สารเคมีกำจัดคือ สามารถกำจัดได้อย่างสมบูรณ์แม้ปริมาณของโครเมียมที่พบจะมีเพียงเล็กน้อย ซึ่ง การใช้สารเคมีกำจัดไม่สามารถทำได้ นอกจากนี้ การใช้สารเคมีกำจัดโครเมียมนั้นจำเป็นต้องมีการปรับค่าพีเอชของน้ำทิ้งให้มีความเป็นกรด (ค่าพีเอช 2 หรือ 3) ขณะที่การใช้แบคทีเรียกำจัดโครเมียม สามารถดำเนินการได้ในช่วงค่าพีเอชใกล้เคียงความเป็นกลาง ที่ไม่ทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของน้ำ ทิ้งที่มีความเป็นกรดลงสู่สิ่งแวดล้อมต่อไป (Shen & Wang, 1995; Murugavelh & Mohanty, 2012) จากข้อเท็จจริงข้างต้น ทำให้โครงการวิจัยนี้สนใจที่จะคัดแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการ กำจัดโครเมียมผ่านการทำงานของเอนไซม์โครเมตรีดักเตส เพื่อนำมาผลิตเป็นเอนไซม์ตรึงที่มี ศักยภาพสูงในการกำจัดโครเมียม เพื่อเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่สามารถถ่ายทอดให้ภาคอุตสาหกรรมพอก หนึ่งนำมาพัฒนาต่อยอดและใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่เกิดขึ้นต่อไป โดยในปีที่ 1 ของการดำเนินงานวิจัย จะมุ่งสนใจไปที่การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดโครเมียมจากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนโครเมียม การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะ ระบุชนิด และการหาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (ปีที่ 1 ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560)

คัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดโครเมียมจากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนโครเมียม ศึกษาคุณลักษณะเฉพาะ ระบุชนิด และหาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

## บทที่ 2

### การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

##### 2.1.1 กระบวนการฟอกหนัง

การฟอกหนัง (Tanning) คือกระบวนการเตรียมพื้นผิวของหนังสัตว์ให้พร้อมก่อนที่จะนำมาผลิตเป็นเครื่องหนัง ซึ่งเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่เก่าแก่ที่สุดในโลกและรองรับความต้องการของประชากรในทุกภาคส่วน เมื่อจำนวนประชากรเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้การใช้หนังฟอกนั้นมีความต้องการเพิ่มสูงขึ้นด้วย จึงนำไปสู่การขยายตัวของกิจการฟอกหนังจากกิจการระดับเล็กไปสู่อุตสาหกรรมระดับใหญ่ขึ้น สำหรับประเทศไทยที่จัดเป็น 1 ใน 4 ของประเทศที่มีการส่งออกหนังฟอกและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเครื่องหนังมากที่สุดในโลก (Ramanujam et al., 2009) ประกอบกับนโยบายของภาครัฐที่ส่งเสริมให้ประเทศไทยเป็นเมืองแฟชั่นเสื้อผ้าและเครื่องแต่งกาย ทำให้อุตสาหกรรมเครื่องหนังมีกำลังขยายตัวเพิ่มขึ้นด้วย จึงไม่สามารถหลีกเลี่ยงกับปัญหามลพิษที่จะตามมาได้ ในกระบวนการฟอกหนังเริ่มจากวัตถุดิบที่เป็นหนังเค็ม (หนังแช่เกลือ) ผ่านขบวนการต่างๆ จนได้เป็นหนังสำเร็จพ่นสีที่พร้อมส่งจำหน่ายได้นั้นจำเป็นต้องมีการใช้วัตถุดิบเคมีภัณฑ์ พลังงาน และน้ำเป็นจำนวนมาก ที่กลายเป็นของเสียที่ทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำเสีย อากาศเสีย และกากของเสียจากการผลิต โดยพบว่าปัญหาหลักของโรงงานฟอกหนังคือ น้ำเสียที่มีโลหะหนักจากการฟอกโครมปนเปื้อนและกลิ่นเหม็นที่ยังไม่สามารถแก้ไขได้อย่างเป็นการถาวร (Khan et al., 1999)

กระบวนการฟอกหนังสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนหลัก คือ

(1) การเตรียมหนังก่อนฟอก (beam house process) ที่จะต้องมีการกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการ เช่น ขนสัตว์ เศษหนัง และคราบไขมันออกจากหนังดิบก่อน เพื่อเตรียมหนังดิบให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะฟอก ในขั้นตอนนี้จะมีการแช่น้ำปูน กัดขนออกด้วยซัลไฟด์หรือเอนไซม์โปรติเอส (proteolytic enzymes) ขูดพังผืด แล่หนัง ล้างน้ำปูน และบ่มหนังในน้ำยาที่มีสารต้านการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา ที่นิยมใช้ได้แก่ ไดไทโอคาร์บาเมต (dithiocarbamate) หรือ 2-(ไทโอไฮยาโนเมทิลไทโอ) เบนโซไทอะโซล (2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole) เป็นระยะเวลา 6 ชม. ถึง 12 วัน ทำให้ในขั้นตอนนี้มีการปล่อยน้ำทิ้งที่มีฤทธิ์เป็นด่างอย่างแรงที่มีสิ่งเจือปนที่เป็นสารจำพวกโปรตีนและไขมัน ขนสัตว์ ตลอดจนสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน เช่น ปูนขาว สารลดแรงตึงผิว (surfactant) แอมโมเนียม (ammonium) อัลคาไลน์ (alkaline) ซัลไฟด์ (sulfide) และยาฆ่าเชื้อ เป็นต้น ออกมากับน้ำทิ้ง

(2) การฟอก (tanning process) คือการเปลี่ยนสภาพหนังสัตว์ดิบซึ่งเน่าเปื่อยได้ไปเป็นหนังสำเร็จที่มีความคงตัวกว่า ไม่เน่าเปื่อย และมีความทนทานต่อสภาพอากาศและน้ำร้อน ซึ่งในขั้นตอนนี้มีการใช้สารเคมีบางชนิด ได้แก่ ฝาด (vegetable tanning) โครเมียม (chrome tanning) ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส และสารเคมีอื่นๆ เข้าไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนคอลลาเจน

(collagen) ในหนัง (Rao et al., 2002; Sundar et al., 2011) ซึ่งเคยมีรายงานว่ามีการเติมสารเคมีลงไปในช่วงขั้นตอนนี้ประมาณ 300 กิโลกรัมต่อหนังดิบ 1 ตันเลยทีเดียว (Verheijen et al., 1996) โดยกระบวนการฟอกหนังด้วยโครเมียมหรือที่เรียกว่าการฟอกโครมนั้น เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากกว่าการฟอกฝาดที่ใช้แทนนิน (tannin) หรือสารสังเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเป็นตัวฟอก เนื่องจากใช้เวลาสั้น สารเคมีราคาถูก และหนังที่ผ่านการฟอกโดยวิธีนี้ยังทนต่อความร้อนและความชื้นได้ดีกว่า ซึ่งเคยมีรายงานพบว่าร้อยละ 90 ของอุตสาหกรรมฟอกหนังใช้วิธีการฟอกโครมในช่วงขั้นตอนนี้ (Ramanujam et al., 2009) แต่ไม่ว่าการฟอกหนังจะดำเนินการโดยวิธีใด ก็มีความจำเป็นที่จะต้องทำการดองกรดเสียก่อนเพื่อปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมกับปฏิกิริยาการฟอกหนัง และสารเคมีทั่วไปที่นิยมใช้ในขั้นตอนนี้คือ เกลือแกง กรดกำมะถัน และกรดฟอร์มิก (formic acid) ที่มีค่าพีเอชประมาณ 3.5-4.0 ประกอบกับในระหว่างการฟอกอาจมีการเติมสารเคมีพิเศษ เช่น สารซักฟอกหรือสารช่วยตรึงโครเมียม ลงไปในช่วงการดองกรด เพื่อให้หนังจับโครเมียมได้ดีขึ้นและเพื่อลดปริมาณโครเมียมในน้ำทิ้งที่เกิดจากกระบวนการฟอกหนัง แต่ทั้งนี้ปริมาณของโลหะหนักโครเมียมที่ยังเหลือตกค้างในน้ำทิ้งที่มีความเป็นกรดก็ยังคงอยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูงอยู่ เมื่อผ่านขั้นตอนนี้หนังจะถูกรีดน้ำทำให้แห้ง เจียรผิวด้วยเครื่องตัดแต่งและคัดเลือกเพื่อเก็บไว้รอจำหน่ายหรือแปรรูปต่อไป

(3) การฟอกซ้ำ ย้อมสี ให้น้ำมัน และการตกแต่งหนัง (finishing process) เป็นขั้นตอนที่มักกระทำกับหนังที่ได้มาจากการฟอกโครม โดยทำขึ้นเพื่อปรับปรุงคุณภาพหนังให้เหมาะสมกับความต้องการของตลาด ในการนี้สารเคมีที่ใช้อาจเป็นโครเมียม, แทนนิน หรือซินแทน (ซึ่งเป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้น) ก็ได้ (Durai and Rajasimman, 2011) จะเห็นได้ว่าการฟอกหนังเป็นกระบวนการแปรรูปหนังสัตว์ที่อาศัยน้ำและสารเคมีจำนวนมาก ที่อาจส่งผลให้เกิดการตกค้างของคราบโปรตีนไขมัน เกลือ สารแขวนลอย สารเคมี หรือโลหะหนัก โดยเฉพาะโครเมียมและซัลไฟด์มากับน้ำทิ้งของโรงงานปริมาณสูง (Nandy et al., 1999; Uberoi, 2003) สำหรับประเทศไทยเคยมีรายงานพบการตกค้างของสารแขวนลอยและโลหะหนักโครเมียมเฉลี่ยปริมาณ 8,725 และ 13 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ในน้ำทิ้งรวมจากอุตสาหกรรมฟอกหนัง (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2549)

การบำบัดทางชีวภาพ เชื่อว่าเป็นวิธีการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ดีที่สุดแต่มีข้อจำกัดในเรื่องของความเสถียรและศักยภาพของแบคทีเรียที่ใช้ในระบบบำบัด (Jawahar et al., 1998; Kadam, 1990; Rajamani et al., 1995) สำหรับน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังนั้น เคยมีรายงานวิจัยถึงการใช้ ระบบบำบัด MSBR (membrane sequencing batch reactor) บำบัดน้ำทิ้งที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมหนังก่อนฟอกของโรงงานฟอกหนัง โดยเดินระบบต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 150 วันและไม่มีการกำจัดกากตะกอนออกระหว่างเดินระบบ พบประสิทธิภาพของระบบในการกำจัดแอมโมเนียมเกือบสมบูรณ์ ขณะที่สามารถลดค่า COD (chemical oxygen demand) ได้ร้อยละ 90 และมีประสิทธิภาพในการกำจัดไนโตรเจนรวม (total nitrogen; TN) ในช่วงร้อยละ 60-90 (Goltara et al., 2003) หรือรายงานวิจัยของ Haydar และคณะ ในปี ค.ศ. 2007 ที่ใช้ระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบแอกติเวตเตดสลัดจ์ (activated sludge process) ซึ่งประกอบด้วยแท่งเติมอากาศและถังตกตะกอน ที่มีดำเนินการของระบบบำบัดอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 267 วัน บำบัดน้ำทิ้งสังเคราะห์ของกระบวนการฟอกหนัง พบว่าสามารถลดค่า BOD (biochemical oxygen demand) และ COD ของน้ำทิ้งได้ถึงร้อยละ 90 และ 80 ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการเดินระบบ เป็นต้น

จากปริมาณเกลือสูง (ร้อยละ 1-10 น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่พบในน้ำทิ้งจากโรงงานฟอกหนัง ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการบำบัดทางชีวภาพน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังด้วยวิธีปกติ (Dhaneshwar, 1990) จึงทำให้แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือสูง (salt tolerant bacteria) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดฯ ได้ ซึ่งเคยมีรายงานถึงการใช้แบคทีเรียทนเกลือทำงานร่วมกับแบคทีเรียธรรมชาติในระบบบำบัดแบบแอกติเวทเตดสลัดจ์ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังได้ (Hinteregger and Streichsbier, 1997; Kargi and Uygur, 1997; Kubo et al., 2001; Lefebvre et al., 2005; Moon et al., 2003; Santos et al., 2001; Sivaprakasam et al., 2008) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำทิ้งที่มาจากกระบวนการฟอกหนังนั้น ยังมีคราบโปรตีน ไขมัน สารเคมี และโลหะหนัก โดยเฉพาะโครเมียมในปริมาณสูงที่ส่งผลต่อการเจริญและศักยภาพในการบำบัดของแบคทีเรียหรือเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียเหล่านี้ขึ้นมาอีกด้วย จึงทำให้นักวิจัยส่วนใหญ่สนใจที่จะหาแบคทีเรียหรือเอนไซม์ที่มีความเสถียรในสภาวะดังกล่าวมาทดลองใช้ในระบบบำบัดน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนัง ดังตัวอย่างเช่น รายงานวิจัยของ Pillai และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 ที่คัดแยก *Bacillus subtilis* P13 ที่สามารถขับเอนไซม์เซรีนโปรติเอส (serine protease) มาใช้กักขังในขั้นตอนการเตรียมหนังก่อนฟอก รวมทั้งใช้ในการบำบัดขนสัตว์ที่ปนเปื้อนมากับน้ำทิ้งที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมหนังก่อนฟอก หรือ รายงานวิจัยของ Sivaprakasam และคณะ ในปีเดียวกันที่ทดลองใช้เอนไซม์โปรติเอสทนเกลือที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* BC1 ความเข้มข้นร้อยละ 2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) กำจัดโปรตีนที่ปนเปื้อนมากับน้ำทิ้งของกระบวนการฟอกหนังได้ถึงร้อยละ 75 เมื่อทำการบำบัดเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับการกำจัดโครเมียมออกจากน้ำทิ้งของกระบวนการฟอกหนังนั้น ได้เคยมีรายงานถึงการใช้ *Bacillus subtilis* ที่คัดแยกได้จากดินและน้ำทิ้งในบริเวณใกล้แหล่งอุตสาหกรรมฟอกหนัง กำจัดโครเมียมที่อยู่ในระบบบำบัดได้ถึงร้อยละ 92-98 (Adeel et al., 2012) และการใช้ตัวดูดซับ (adsorbent) เช่น แอกติเวทเตดคาร์บอน (activated carbon) หรือวัสดุธรรมชาติที่ได้ทางการเกษตร เช่น เศษหญ้าและขี้เลื่อย ดูดซับโครเมียมที่ตกค้างในน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนัง เป็นต้น (Hamadia et al., 2001; Kadirvelu et al., 2001; Netzer et al., 1974; Ranganathan, 2000; Rao et al., 2002; Valdimir and Danish, 2002; Youssef et al., 2004)

### 2.1.2 เฮกซาวาเลนซ์โครเมียม

โครเมียม (Chromium) เป็นโลหะหนักที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในกระบวนการอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น การผลิตแผ่นวงจรไฟฟ้า การทำสารถ้อยอมสีไม้ สีย้อมผ้า และที่นิยมใช้มากที่สุดคืออุตสาหกรรมฟอกหนัง ที่มีการปล่อยโครเมียมปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมในปริมาณสูงผ่านมากับน้ำทิ้งที่เกิดจากอุตสาหกรรม

เฮกซาวาเลนซ์โครเมียม (Hexavalent chromium; Cr(VI)) เป็นสารประกอบเคมีที่มีโครเมียมในสถานะออกซิเดชัน (oxidation state) เท่ากับ +6 บางครั้งรู้จักในชื่อของโครเมียมไตรออกไซด์ (chromium trioxide) หรือโครเมต (chromate) หรือเกลือไดโครเมต (dichromate salts) ซึ่งไอออนทั้งของโครเมต (สีเหลือง) และไดโครเมต (สีส้ม) จัดเป็นสารออกซิไดส์ที่มีความรุนแรงในสภาวะที่มีค่าพีเอชเป็นกรด (Holleman et al., 1945) โดย Cr(VI) เป็นสารที่นิยมนำมาใช้ใน

อุตสาหกรรมที่หลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น การผลิตสี หมึก ยาฆ่าเชื้อรา ยาทาพื้นผิวไม้ และในกระบวนการฟอกหนัง (NIOSH, 1975; NIOSH, 1988) โดยโพแทสเซียมไดโครเมท ( $K_2Cr_2O_7$ ) เป็นรูปของโครเมียมที่นิยมใช้ที่สุดในการผลิตหนังโดยใช้เป็นสารฟอกหนัง (tanning agent) ขณะที่โครเมียมนิยมนำมาใช้เป็นสารที่ช่วยในการย้อมติดสีในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ตารางที่ 1 แสดงการใช้ Cr(VI) ในอุตสาหกรรมต่างๆ

ตารางที่ 1 Cr(VI) ที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ

รูปแบบของ Cr(VI) ที่ใช้	สูตรโครงสร้าง	การประยุกต์ใช้	เอกสารอ้างอิง
Ammonium dichromate	$(NH_4)_2Cr_2O_7$	การทำพลุ ภาพถ่าย และสีย้อมสำหรับเครื่องแก้วและเครื่องหนัง	Bryson, 1996
Barium chromate	$BaCrO_4$	เม็ดสีในสีทาพื้นผิว	Eastaugh et al., 2007
Calcium chromate	$CaCrO_4$	เม็ดสีในสีทาพื้นผิว สารยับยั้งการกัดกร่อน ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตโครเมียม ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน และในการขับเคลื่อนเตอรี	Pohanish, 2008
Chromium trioxide	$CrO_3$	สีเขียวในสีทาพื้นผิว	Walker and Tarn, 1990
Lead chromate	$PbCrO_4$	สีทาถนน	Cornelis et al., 2005
Potassium chromate	$K_2CrO_4$	เครื่องพิมพ์ กระบวนการผลิตภาพถ่าย และการผลิตโครม-เม็ดสี	Pohanish, 2008
Potassium dichromate	$K_2Cr_2O_7$	การฟอกหนัง สีทาพื้นผิว สิ่งพิมพ์ ภาพถ่าย เม็ดสีในสีทาเคลือบผิวไม้	US EPA, 2000
Sodium chromate	$Na_2Cr_2O_7$	อุตสาหกรรมปิโตรเคมี อุตสาหกรรมสิ่งทอ สีเคลือบเนื้อไม้	Anger et al., 2005 Thompson, 1991
Strontium chromate	$SrCrO_4$	เม็ดสีต้านการกัดกร่อน	Fouassier and Rabek, 1993
Zinc chromate	$ZnCrO_4$	สารเคลือบสี	Tencer, 2006



### 2.1.3 การกำจัดโครเมียม

โครเมียมเป็นสารเคมีอันตรายที่พบได้ในน้ำที่มาจากกระบวนการฟอกหนังซึ่งมักพบหลักอยู่ในรูปของไตรวาเลนซ์โครเมียมหรือ Cr(III) และเฮกซะวาเลนซ์โครเมียมหรือ Cr(VI) ซึ่งมีรายงานพบว่า Cr(VI) นั้นมีความเป็นพิษมากกว่า Cr(III) ประมาณ 100 เท่า เมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกายโดยตรงผ่านการบริโภค และพบรายงานจำนวนมากถึงความเป็นพิษอันตรายร้ายแรงต่อมนุษย์ (Katz and Salem, 1992) ด้วยเหตุนี้การกำจัดโครเมียมอย่างสมบูรณ์จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ และในปัจจุบันพบวิธีการกำจัดโครเมียมที่นิยมใช้อยู่สองวิธีคือ การกำจัดด้วยปฏิกิริยาทางเคมี ที่ใช้สารเคมีเปลี่ยนสถานะออกซิเดชันของ Cr(VI) หรือทำให้ตกตะกอน และการกำจัดทางชีวภาพที่ใช้จุลินทรีย์และสารดูดซับทางชีวภาพในการกำจัด (Lofrano et al., 2013)

การกำจัดด้วยปฏิกิริยาทางเคมีเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดักชัน Cr(VI) ด้วยสารรีดิวซ์ ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ก่อนการกำจัดทางชีวภาพ ยกตัวอย่างเช่น การใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ ( $H_2S$ ) ทำปฏิกิริยากับ Cr(VI) เปลี่ยนเป็นโครเมียม (III) ไฮดรอกไซด์ ( $Cr(OH)_3$ ) และซัลเฟอร์ (S) ซึ่ง  $Cr(OH)_3$  ที่ได้จะอยู่ในรูปออกซิเดชัน Cr(III) ที่ละลายน้ำได้ลดลงและตกตะกอนลงมา (Kim et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีการใช้สารรีดิวซ์เช่น โซเดียมไดไทโอไนต์ ( $Na_2S_2O_4$ ) (Fruchter et al., 2000) โซเดียมเมทาไบซัลไฟต์ ( $NaHSO_3$ ) แคลเซียมเมทาไบซัลไฟต์ ( $CaHSO_3$ ) และแคลเซียมโพลีซัลไฟต์ ( $CaS_5$ ) ในบางปฏิกิริยา (Jacobs et al., 2001) จากจำนวนสารรีดิวซ์ทั้งหมดได้มีรายงานพบว่าการใช้  $Na_2S_2O_4$  เป็นวิธีในการรีดิวซ์โครเมทที่ต่ำสุด โดยสามารถรีดิวซ์โครเมทได้ที่ระดับปริมาณ 900 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เหลือในระดับที่ตรวจสอบไม่พบ ( $< 8$  มิลลิกรัมต่อลิตร) อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีในการกำจัดโครเมียมก็ยังคงเป็นวิธีที่มีต้นทุนในการใช้งานที่ค่อนข้างสูงและในระบบกำจัดต้องมีระบบการกรองหรือการทำให้ตกตะกอนที่มีประสิทธิภาพร่วมด้วย นอกจากนี้การกำจัดโครเมียมด้วยสารเคมียังคงเป็นวิธีที่ไม่คุ้มในเชิงต้นทุนสำหรับการกำจัดโครเมียมที่มีปริมาณต่ำที่พบในน้ำเสียอีกด้วย

การกำจัดทางชีวภาพ แบ่งได้เป็น 2 วิธีหลักๆ คือ

1) การใช้สารดูดซับทางชีวภาพ เคยมีรายงานการใช้สารดูดซับทางชีวภาพที่เป็นของเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมหรืออุตสาหกรรมในการกำจัด Cr(VI) ดังสรุปในตารางที่ 2 ดังนี้ ในปี ค.ศ. 2002 Dakiky และคณะทดลองนำขนสัตว์ กากทะเลลายปาล์ม ชี้เลื่อย ใบสน เปลือกอัลมอนต์ ใบกระบองเพชร และถ่าน มาประยุกต์ใช้เป็นสารดูดซับ Cr(VI) จากน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม ผลการทดลองพบว่าขนสัตว์และชี้เลื่อยสามารถดูดซับ Cr(VI) ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารอื่น โดยสภาวะที่เหมาะสมในการดูดซับคือใช้ Cr(VI) 100 ppm และสารดูดซับจำนวน 8 กรัมต่อลิตร พบว่าขนสัตว์สามารถดูดซับ Cr(VI) ได้ 69.3% ขณะที่ชี้เลื่อยดูดซับได้ 53.5% (Dakiky et al., 2002) และในปีเดียวกันนี้ Garg และคณะได้ทดลองใช้ชานอ้อยกำจัด Cr(VI) โดยพบว่าชานอ้อยที่ผ่านการจุ่มกรดซัคซินิก (succinic acid) สามารถดูดซับ Cr(VI) ในรูปของสารละลายเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 92% ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2 ต่อมาในปี ค.ศ. 2003 Yu และคณะได้ทดลองใช้ชี้เลื่อยของต้นมาเบิ้ล กำจัด Cr(VI) ในรูปของสารละลายและพบว่าสามารถกำจัด Cr(VI) ได้ 70% เมื่อใช้ชี้เลื่อย 10 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มปริมาณชี้เลื่อยก็พบว่าประสิทธิภาพในการดูดซับเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและสามารถดูดซับได้สูงสุดเมื่อทำการดูดซับที่ค่าพีเอชในช่วง 2-5 (Yu et al., 2003) ต่อมาในปี ค.ศ. 2006 Malkoc และคณะได้ทดลองใช้กากชาจากโรงงานชาในตุรกีดูดซับ Cr(VI) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

พบว่าสามารถดูดซับได้สูงถึง 99% ในสภาวะที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 2 และใช้กากชาปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร เมื่อสร้างแบบจำลอง Langmuir isotherm พบว่ากากชาสามารถดูดซับ Cr(VI) ได้สูงที่สุด 54.65 มิลลิกรัมต่อกรัมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Malkoc et al., 2006) นอกจากนี้ยังพบรายงานวิจัยใช้เปลือกมะขามในการดูดซับ Cr(VI) ผลการวิจัยพบว่าการใช้เปลือกมะขาม 10 กรัมต่อลิตร สามารถกำจัด Cr(VI) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 99 % เมื่อเวลาผ่านไป 15 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มความร้อนจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการดูดซับเพิ่มขึ้น โดยเปลือกมะขามสามารถดูดซับ Cr(VI) ได้ดีที่อุณหภูมิ 81 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Verma et al., 2006)

ตารางที่ 2 สารดูดซับทางชีวภาพที่ใช้ในการกำจัด Cr(VI)

สารดูดซับทางชีวภาพ	ประสิทธิภาพในการดูดซับ	เอกสารอ้างอิง
เปลือกอัลมอนต์	23.5% เมื่อใช้ Cr(VI) 100 ppm และสารดูดซับ 8 กรัมต่อลิตร	Dakiky et al., 2002
ใบกระบอกเพชร	19.8% เมื่อใช้ Cr(VI) 100 ppm และสารดูดซับ 8 กรัมต่อลิตร	Dakiky et al., 2002
ถ่าน	23.6% เมื่อใช้ Cr(VI) 100 ppm และสารดูดซับ 8 กรัมต่อลิตร	Dakiky et al., 2002
ขี้เถ้า	70.0% เมื่อใช้ Cr(VI) 10 มิลลิกรัมต่อลิตรและสารดูดซับ 10 กรัมต่อลิตร	Yu et al., 2003
กากทะเลสาปาล์ม	47.1% เมื่อใช้ Cr(VI) 100 ppm และสารดูดซับ 8 กรัมต่อลิตร	Dakiky et al., 2002
ใบสน	42.9% เมื่อใช้ Cr(VI) 100 ppm และสารดูดซับ 8 กรัมต่อลิตร	Dakiky et al., 2002
ชานอ้อน	92.0% เมื่อใช้ Cr(VI) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารดูดซับ 10 กรัมต่อลิตร	Garg et al., 2009
เปลือกมะขาม	99.0% เมื่อใช้ Cr(VI) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารดูดซับ 1 กรัมต่อลิตร	Verma et al., 2006
กากชา	99.0% เมื่อใช้ Cr(VI) 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารดูดซับ 10 กรัมต่อลิตร	Malkoc et al., 2007

2) การกำจัดโดยจุลินทรีย์ที่ใช้เชื้อรา แบคทีเรีย และสาหร่ายขนาดเล็ก ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์ที่เคยมีรายงานใช้ในการกำจัดโครเมียม เช่น การใช้เชื้อรา *Padina* sp. และ *Sargassum* sp. กำจัด Cr(VI) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ อย่างสมบูรณ์ในเวลา 1450 นาที และ 500 นาที ตามลำดับ หรือการใช้สาหร่ายทะเลสีน้ำตาลสองชนิดกำจัด Cr(VI) ได้ 90% ในเวลา 360 นาที เป็นต้น (Sheng et al., 2005) อีกหนึ่งตัวอย่างของการใช้จุลินทรีย์ดูดซับโครเมียมในสภาวะที่มีเกลือคือ การใช้ *Rhizopus arrhizus* ที่พบว่าสามารถกำจัด Cr(VI) ความเข้มข้นสูงถึง 78.0 มิลลิกรัม

ตารางที่ 3 การดูดซับ Cr(VI) โดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	ประสิทธิภาพในการดูดซับ	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus niger</i>	117.33 มิลลิกรัมต่อกรัม	Khambhaty et al., 2009
<i>A. sydoni</i>	87.95%	Kumar et al., 2008
<i>Mucor hiemalis</i>	53.5 มิลลิกรัมต่อกรัม	Tewari et al., 2005
<i>Padina</i> sp.	54.60 มิลลิกรัมต่อกรัม	Sheng et al., 2005
<i>Penicillium janthinellum</i>	86.61%	Kumar et al., 2008
<i>Rhizopus arrhizus</i>	78.0 มิลลิกรัมต่อกรัม	Aksu & Balibek., 2007
<i>Sargassum</i> sp.	31.72 มิลลิกรัมต่อกรัม	Sheng et al., 2005
<i>Chlorella miniata</i>	100%	Han et al., 2007
<i>Dunaliella</i> sp.		Dönmez & Aksu, 2002
<i>Dunaliella</i> 1	58.3 มิลลิกรัมต่อกรัม	
<i>Dunaliella</i> 2	45.5 มิลลิกรัมต่อกรัม	
<i>Pachymeniopsis</i> sp.	225 มิลลิกรัมต่อกรัม	Lee et al., 2000
<i>Spirogyra</i> sp.	14.7 × 10 <sup>3</sup> มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม	Gupta et al., 2001
<i>Achromobacter</i> sp.	8 มิลลิโมลาร์	Zhu et al., 2008
<i>Bacillus pumilus</i>	24%	Rehman & Faisal, 2015
<i>B. salmalaya</i>	20.35 มิลลิกรัมต่อกรัม	Dadrasnia et al., 2015
<i>B. sphaericus</i>	300 ไมโครโมลาร์	Pal et al., 2005
<i>B. subtilis</i>	0.2 มิลลิโมลาร์	Zheng et al., 2015
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	18%	Rehman & Faisal, 2015
<i>Exiguobacterium</i>	19%	Rehman & Faisal, 2015
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1 มิลลิโมลาร์	He et al., 2011
<i>Microbacterium</i> sp.	100 ไมโครโมลาร์	Pattanapitpaisal et al., 2001
<i>Pantoea agglomerans</i>	100 ไมโครโมลาร์	Francis et al., 2002
<i>Pseudomonas putida</i>	40 ไมโครโมลาร์	Ishibashi et al., 1990
<i>Shewanella alga</i>	10 มิลลิกรัมต่อลิตร	Guha et al., 2001

ต่อลิตรได้ในสถานะที่ปราศจากเกลือ และยังคงกำจัดโครเมียมได้สูงถึง 64.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ในสถานะที่มีเกลือปนเปื้อน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (Aksu and Balibek., 2007) นอกจากนี้ยังเคยมีรายงานถึงการกำจัด Cr(VI) โดยเชื้อราในระบบปิด ซึ่งพบว่าในสถานะที่มี Cr(VI) ปนเปื้อนความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น *Aspergillus niger* สามารถกำจัด Cr(VI) ได้ 91.03% ขณะที่ *A. sydoni* และ *Penicillium janthinellum* กำจัดได้ 87.95% และ 86.61% ตามลำดับ (Kumar et al., 2008) และยังพบการกำจัด Cr(VI) ของ *A. niger* ที่ไม่มีชีวิตที่สามารถกำจัดได้สูงสุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 1.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยกำจัดโครเมียมความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 117.33 มิลลิกรัมต่อกรัมของเชื้อ (Khambhaty et al., 2009)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้สาหร่ายทั้งในรูปของเซลล์ที่มีและไม่มีชีวิตกำจัด Cr(VI) ซึ่งพบการเข้าจับของ Cr(VI) กับผิวเซลล์อย่างรวดเร็ว เคยมีรายงานการกำจัด Cr(VI) ของ *Spirogyra* sp. ในระบบปิด พบว่าสามารถกำจัด Cr(VI) ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ภายใน 120 นาที ด้วยประสิทธิภาพในการกำจัดเท่ากับ  $14.7 \times 10^3$  มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโครเมียม (Gupta et al., 2001) หลังจากนั้นได้มีการทดลองใช้ *Chlorella iniata* กำจัด Cr(VI) ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ในประสิทธิภาพของการกำจัดเท่ากับ 65% ภายในเวลา 2 ชั่วโมง และพบว่าที่ความเข้มข้นนี้เชื้อสามารถกำจัดได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 150 ชั่วโมง เมื่ออยู่ในสถานะที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 2.0 และใช้มวลชีวภาพของเชื้อเท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตร (Han et al., 2007) ต่อมาในปี ค.ศ. 2002 Dönmez และ Aksu ได้รายงานการใช้ *Dunaliella* sp. ที่แยกได้จากทะเลสาบน้ำเค็มในตุรกี ในการกำจัด Cr(VI) ซึ่งพบว่ามีเชื้อสองสายพันธุ์คือ *Dunaliella* sp.1 และ *Dunaliella* sp.2 ที่สามารถกำจัด Cr(VI) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2.0 ในสถานะที่มีเกลือปนเปื้อน โดยพบว่า *Dunaliella* sp.1 และ *Dunaliella* sp.2 สามารถกำจัด Cr(VI) ได้ 58.3 และ 45.5 มิลลิกรัมต่อกรัม ในสถานะที่มีเกลือปนเปื้อน 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ภายในเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งพบปริมาณของ Cr(VI) ลดลงเหลือ 20.7 และ 12.2 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

นอกจากเชื้อราและสาหร่ายแล้ว แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์ทางเลือกที่นิยมใช้ในการกำจัด Cr(VI) เนื่องจากข้อได้เปรียบที่เหนือกว่าในเรื่องของอัตราการเจริญที่เร็วและง่ายต่อการประยุกต์ใช้ แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่จะใช้ในการกำจัดโครเมียมนั้นจำเป็นต้องผลิตเอนไซม์โครเมทรีดักเทส (chromate reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการกำจัด Cr(VI) ซึ่งเคยมีรายงานถึงการผลิตเอนไซม์โครเมทรีดักเทสของ *Pseudomonas putida* หลายสายพันธุ์ ได้แก่ *P. putida* PRS2000 และ *P. fluorescens* LB303 รวมทั้ง *Escherichia coli* AC80 ที่มียีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์โครเมทรีดักเทส โดยพบว่า *P. putida* PRS2000 สามารถกำจัด Cr(VI) ได้อย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ เมื่อศึกษาค่าทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ในแบคทีเรียชนิดนี้พบว่าเอนไซม์ต้องการ NADH หรือ NADPH ในการเร่งปฏิกิริยา โดยให้ค่าคงที่ Michaelis-Menten ( $K_m$ ) เท่ากับ 40 ไมโครโมลาร์ของโครเมียม และให้ค่าความเร็วสูงสุด ( $V_{max}$ ) เท่ากับ 6 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และพบว่า  $Hg^{2+}$  และ  $Ag^+$  สามารถยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ (Ishibashi et al., 1990) นอกจากนี้ยังมีการแยกแบคทีเรียที่ทน Cr(VI) จากน้ำทิ้งของโรงงานฟอกหนังในปากีสถานพบ *Microbacterium* sp. จำนวน 13 ไอโซเลท ที่สามารถกำจัด Cr(VI) ได้และพบว่าไอโซเลท No. MP 30 สามารถกำจัดโซเดียมไดโครเมทความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ได้สูงที่สุด 99% เมื่อทำในสถานะ

ที่ไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง *Microbacterium* sp. MP 30 สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มี Cr(VI) ความเข้มข้น 100-500 มิลลิโมลาร์ โดยกำจัด Cr(VI) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ปริมาณมวลชีวภาพเท่ากับ  $2.4 \times 10^9$  เซลล์ต่อ มิลลิลิตร (Pattanapitpaisal et al., 2001) นอกจากนี้ยังพบรายงานการกำจัด Cr(VI) โดยเซลล์พัก ของ *Achromobacter* sp.Ch1 ที่สามารถดูดซับ Cr(VI) ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ได้อย่างสมบูรณ์ ภายในเวลา 150 นาที (Zhu et al., 2008) หรือรายงานวิจัยที่ใช้ *Lysinibacillus fusiformis* ZC1 ที่ คัดแยกได้จากโรงงานผลิตอิเล็กทรอนิกส์โทรเพลทใน Guangdong ประเทศจีนที่สามารถกำจัด Cr(VI) ได้อย่าง สมบูรณ์ภายในเวลา 12 ชั่วโมง (He et al., 2011) และยังพบการใช้ *Bacillus subtilis* BYCr-1 ที่คัด แยกได้จากดินในเมือง Baiyin ประเทศจีนที่สามารถกำจัด Cr(VI) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ได้ อย่างสมบูรณ์ในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อทำการส่องกราดเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่อง กราด (Transmission electron microscopy; TEM) พบการตกตะกอนของ Cr(VI) อยู่ทั้งภายใน และภายนอกเซลล์ และพบว่าเอนไซม์ NADPH nitroreductase (NfsA) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการ กำจัด Cr(VI) ของแบคทีเรียชนิดนี้ (Zheng et al., 2015)

สำหรับแบคทีเรียทางทะเลเคยมีรายงานของ Yer และคณะในปี ค.ศ. 2004 ที่คัดแยก *Enterobacter cloacae* จากตะกอนทะเลในชายฝั่งทะเลทางตะวันตกของอินเดีย พบว่าแบคทีเรีย สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีโลหะหนักปนเปื้อนและสามารถผลิตเอกโซโพลีแซคคาไรด์ (exopolysaccharide) ได้ในสภาวะที่มี Cr(VI) ปนเปื้อนที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ppm แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะใช้แบคทีเรียชนิดนี้ในการกำจัดโครเมียมทางชีวภาพต่อไป ต่อมา Cheung และ Gu (2005) ได้ทำการคัดแยก *Bacillus megaterium* TKW3 จากตะกอนทะเลที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักใน Tokwawan ฮ่องกง พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถกำจัด Cr(VI) ในรูป ของ  $\text{CrO}_4^{2-}$  ที่ละลายน้ำได้เป็น Cr(III) ที่ไม่ละลายน้ำและมีความเป็นพิษลดลง ภายใต้สภาวะที่ต้องใช้อ ออกซิเจน โดยสามารถกำจัด Cr(VI) ความเข้มข้น 0.20 มิลลิโมลาร์ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 360 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถทนต่อโลหะหนักอื่นๆ ได้แก่  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  ความเข้มข้น 0.34 มิลลิโมลาร์  $\text{AsO}_4^{3-}$  ความเข้มข้น 0.32 มิลลิโมลาร์  $\text{SeO}_3^{2-}$  ความเข้มข้น 0.58 มิลลิโมลาร์ และ  $\text{SeO}_4^{2-}$  ความเข้มข้น 0.53 มิลลิโมลาร์ ต่อมาในปี ค.ศ. 2006 ได้มีรายงานถึง *Shewanella* sp. PV-4 ที่แยกจากตะกอนทะเลลึกในฮาวาย ซึ่งสามารถกำจัดโลหะหนักหลายชนิด ได้แก่ Fe(III), Co(III) Cr(VI) Mn(IV) และ U(VI)

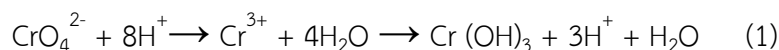
ต่อมาได้มีการศึกษา *Bacillus* sp. MTCC 5514 ที่คัดแยกจากทะเลใน Tamil Nadu กำจัด Cr(VI) ทั้งในระบบปิดและระบบแบบต่อเนื่อง พบว่า แบคทีเรียสามารถกำจัด Cr(VI) ที่ความเข้มข้น สูงถึง 2000 มิลลิกรัมต่อลิตรได้โดยใช้ระบบปิดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วในการ เขย่า 200 รอบต่อนาที โดยสามารถกำจัด Cr(VI) ได้สมบูรณ์ภายในเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับการ ใช้ ระบบแบบต่อเนื่องในการบำบัด พบว่าเมื่อใช้ Cr(VI) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการบำบัด โดยเติมทุก 12 ชั่วโมง พบว่า สามารถบำบัด Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 22 วัน (Gnanamani et al., 2010) หลังจากนั้น ในปีค.ศ. 2012 ได้มีการคัดแยกแบคทีเรียชอบเกลื้อ *Halomonas* sp. TA-04 จากตะกอนทะเลในประเทศอิตาลี เมื่อใช้เซลล์อิสระของแบคทีเรียชนิดนี้ทำ ปฏิกริยากับ  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$  ที่ความเข้มข้น 0.2-3 มิลลิโมลาร์พบว่า แบคทีเรียสามารถกำจัด Cr(VI) ความ

เข้มข้น 0.2-1 มิลลิโมลาร์ ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 50 ชั่วโมง ขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นความสามารถในการกำจัด Cr(VI) ก็ไม่เพิ่มขึ้น และเมื่อทำการตรึงเซลล์แบคทีเรียใส่ในคอลัมน์แก้วขนาด 100 มิลลิลิตร พบว่า แบคทีเรียสามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ได้เหลือเป็นความเข้มข้น 0.0248 มิลลิโมลาร์ คือสามารถกำจัด Cr(VI) ได้ 94.5% (Focardi et al., 2012)

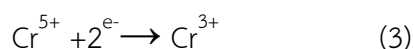
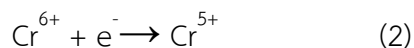
หลังจากนั้นได้มีงานวิจัยคัดแยก *Streptomyces* sp. จำนวน 20 สายพันธุ์จาก Tokyo Bay ประเทศญี่ปุ่น พบว่าเชื้อทั้ง 20 สายพันธุ์สามารถทนต่อ Cr(VI) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ และได้เลือก *S. thermocarboxydus* มาทำการศึกษาความสามารถในการกำจัด Cr(VI) พบว่าสามารถทนต่อ Cr(VI) ได้ความเข้มข้นสูงถึง 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตรได้อย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 1 อาทิตย์ (Terahara et al., 2015) ต่อมาในปี ค.ศ. 2016 Ran และคณะได้ศึกษาการกำจัด Cr(VI) ของ *Sporosarcina saromensis* M52 isolated ที่คัดแยกจากตะกอนทะเลใน Xiamen ประเทศจีน พบว่าเชื้อสามารถทนต่อ Cr(VI) ความเข้มข้นสูงถึง 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถกำจัด Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

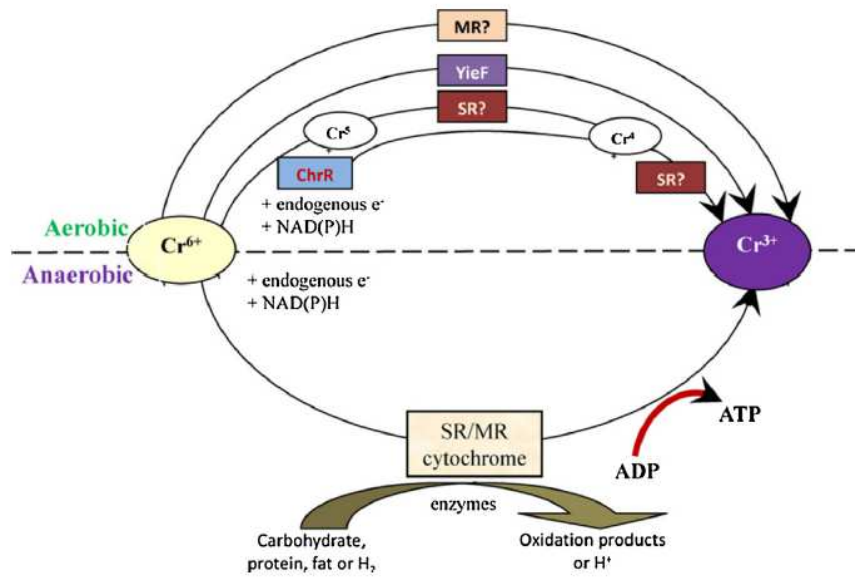
#### 2.1.4 การรีดักชันทางชีวภาพของเฮกซาวาเลนซ์โครเมียมโดยแบคทีเรีย

การรีดักชันทางชีวภาพของ Cr(VI) โดยแบคทีเรียเกิดขึ้นโดยการเปลี่ยน Cr(VI) เป็น Cr(III) ซึ่งเป็นรูปที่มีความเป็นพิษน้อยกว่า ผ่านกระบวนการรีดักชันแบบโดยตรงและโดยทางอ้อม ในการรีดักชันแบบโดยตรงจะใช้แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์และดูดซับโครเมียม (chromium-reducing bacteria) ขณะที่การรีดักชันแบบทางอ้อมจะใช้แบคทีเรียกลุ่มที่สามารถรีดิวซ์ไอออนและซัลเฟอร์ (Iron and sulfur-reducing bacteria) แทน (Malaviya & Singh, 2016) โดยปกติแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์โครเมียมจะมีระบบเอนไซม์ทั้งที่อยู่ในรูปของเอนไซม์ที่ละลายอยู่ภายในเซลล์และเอนไซม์ที่จับอยู่กับเมมเบรนในการรีดักชัน ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobic condition) การรีดักชันของ Cr(VI) โดยแบคทีเรียจะใช้ไซโทโครม (Cytochrome) ที่อยู่ในระบบขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport system) ในการทำงาน (Miransari, 2011) โดยในปฏิกิริยารีดักชันจะใช้สารชีวโมเลกุลที่อยู่ในเซลล์ เช่น NADH คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ลิพิด ไฮโดรเจน และตัวผลิอิเล็กตรอนต่างๆ ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนสำหรับกระบวนการรีดักชันของ Cr(VI) สมการที่ (1) สรุปกลไกในการรีดักชันภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน



ขณะที่ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic condition) Cr(VI) จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเพื่อเกิดเป็นสารที่ให้ออกซิเจน (Reactive oxygen species) ค้างอยู่ในเซลล์ จึงทำให้ Cr(VI) สามารถรีดิวซ์เป็น Cr(V) ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็น Cr(III) ต่อไป กลไกนี้จะใช้การทำงานของเอนไซม์โครเมทรีดักเทส (Pradhan et al., 2017) ดังแสดงในสมการที่ (2) และ (3) ซึ่งสามารถสรุปกลไกในการรีดักชัน Cr(VI) ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนได้ดังแสดงในภาพที่ 1





ภาพที่ 1 กลไกในการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ที่เสนอโดย Dhal et al. (2013)

## 2.2 ขอบเขตของการดำเนินการวิจัยในปีที่ 1 (ปีงบประมาณ 2560)

คัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดโครเมียมจากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนโครเมียม ศึกษาคุณลักษณะเฉพาะ ระบุชนิด และหาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถรีดักชัน Cr(VI)

การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถรีดักชัน Cr(VI) จากแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 4) จะดำเนินการเบื้องต้นโดยการทดสอบการมีของขึ้นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์โครเมทรีดักเทส (Patra et al., 2010) ซึ่งแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการที่นำมาทดสอบจะแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase-producing bacteria) และแบคทีเรียที่สามารถสลายสารอะคริลาไมด์ (acrylamide-degrading bacteria) โดยเริ่มทดสอบการมีของขึ้นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์โครเมทรีดักเทสจากการเตรียมโครโมโซมอลดีเอ็นเอ (chromosomal DNA) ของแบคทีเรียที่นำมาศึกษา และนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณขึ้นยีนโครเมทรีดักเทสด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 สาย คือ ChroR-F (5' TCACGCCGGAATATAACTAC 3') และ ChroR-R (5' CGTACCCTGATCAATCACTT 3') ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนโครเมทรีดักเทสในแบคทีเรีย (Patra et al., 2010) โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 250 นาโนกรัม เอนไซม์แท็กดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) จำนวน 1.25 หน่วย (เติมภายหลัง) บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1× สารผสมดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dNTPs mixture) ความเข้มข้น 6 ไมโครโมลาร์  $MgCl_2$  ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ และไพรเมอร์แต่ละสายความเข้มข้น 10 พิโคโมล ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในสภาวะดังนี้ ขั้นเริ่มต้นการแยกสายดีเอ็นเอ (pre-denaturation step) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามมาด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 35 รอบ โดยในแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation step) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นการจับของไพรเมอร์ (annealing step) ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และขั้นการต่อสายดีเอ็นเอ (extension step) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามมาด้วยขั้นการต่อสายดีเอ็นเอสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เมื่อได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่มีขนาดตามต้องการ คือขนาดประมาณ 300 คู่เบส จะนำมาทำบริสุทธิ์ด้วยชุด GF-1 Gel DNA recovery kit (Vivantis, Malaysia) และเชื่อมต่อเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pTG19-T (Vivantis, Malaysia) ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต ซึ่งในปฏิกิริยาของการเชื่อม (ligation mixture) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จะประกอบด้วย pTG19-T 62.5 นาโนกรัม ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 1.2 ไมโครกรัม บัฟเฟอร์ของการเชื่อม (ligation buffer) ความเข้มข้น 1× และเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส (*T4* DNA ligase) จำนวน 20 หน่วย ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อทำปฏิกิริยาการเชื่อมเสร็จจะทำการทรานส์ฟอร์ม (transformation) เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  โดยวิธีการกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock method) (Sambrook et al., 1989) คัดเลือก



ตารางที่ 4 แบคทีเรียในห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย

แบคทีเรีย	คุณสมบัติ	แหล่งที่มา	เอกสารอ้างอิง
1. <i>Acinetobacter baylyi</i>	แบคทีเรียทนเบนซินที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส	ตะกอนทะเลบริเวณสะพานปลา อ่างศิลา จังหวัดชลบุรี	Uttatree et al., 2010
2. <i>Bacillus megaterium</i>	แบคทีเรียผลิตเอนไซม์โปรติเอส	ตะกอนทะเลที่เกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี	Uttatree et al., 2017
3. <i>B. subtilis</i>	แบคทีเรียผลิตเอนไซม์โปรติเอส	ตะกอนทะเลที่เกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี	Uttatree & Charoenpanich, 2016
4. <i>B. cereus</i>	แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์	ตะกอนทะเลที่เกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี	Charoenpanich et al., 2014
5. <i>B. aerophilus</i>	แบคทีเรียผลิตเอนไซม์เอสเทอเรส	ดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง	Charoenpanich et al., 2018
6. <i>Enterobacter aerogenes</i>	แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์	น้ำทิ้งชุมชน จังหวัดชลบุรี	Buranasilp & Charoenpanich, 2011
7. <i>Kluyvera georgiana</i>	แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์	น้ำทิ้งชุมชน จังหวัดชลบุรี	Thanyacharoen et al., 2012
8. <i>Streptococcus sciuri</i>	ยังไม่ระบุคุณลักษณะเฉพาะ	ตะกอนทะเลในช่วงน้ำมั้นรั้ว อ่าวพร้าว จังหวัดระยอง	Charoenpanich et al., 2014
9. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	แบคทีเรียผลิตเอนไซม์โปรติเอส	ตะกอนทะเลที่เกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี	Uttatree and Charoenpanich, 2018

โคลีนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989) ที่มีแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-gal ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคาดว่าจะเป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (recombinant plasmid) มาสกัดด้วยชุด GF-1 Plasmid DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) ยืนยันการมีของชิ้นยีนด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ซึ่งพบในบริเวณโคลน (multiple cloning site) ของ pTG19-T จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีนโครเมทริดักเทสมาหาลำดับดีเอ็นเอ (Sanger et al., 1977) โดยใช้ไพรเมอร์ M13 forward (5'GCTCAGATTGAACGCTGGCG 3') และ M13 reverse (5' ACATTTCAACACGAGCTG 3') ซึ่งพบในบริเวณโคลนของ pTG-19T (1<sup>st</sup> Base Laboratories, Malaysia) จากนั้นตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลด้วยการทำ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ต่อไป

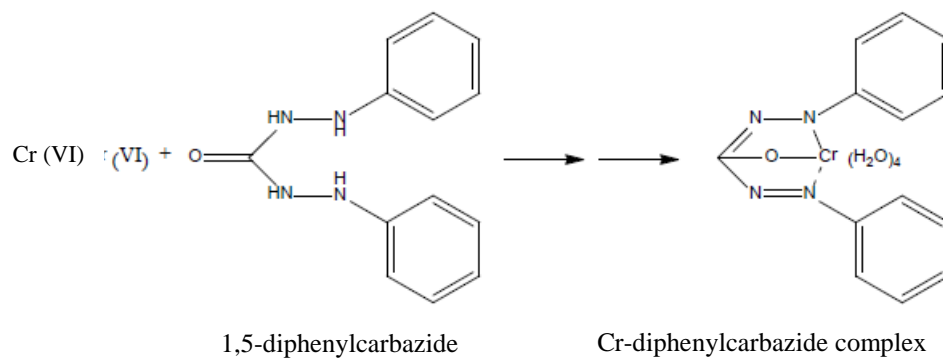
เมื่อได้แบคทีเรียที่ตรวจพบชิ้นยีนโครเมทริดักเทสแล้วจะนำมาตรวจสอบการผลิตเอนไซม์โครเมทริดักเทสอีกครั้ง โดยทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้อีกครั้งด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ นำตะกอนเซลล์ที่ละลายมาวางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และทำลายเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication) เป็นเวลา 10 นาที (เวลาเปิด/ปิด ทุก 5 วินาที) ปั่นแยกเศษเซลล์ออกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin หรือ BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 1) นำส่วนใสที่คาดว่ามีการละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 2 มิลลิกรัม มาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์โครเมทริดักเทส (Sau et al., 2010) ในปฏิกิริยาของการติดตามแอกติวิตีเอนไซม์ปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย  $K_2Cr_2O_7$  ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ค่าพีเอช 7.0) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ NADH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ และสารละลายเอนไซม์ ทำการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid หรือ TCA) ความเข้มข้นร้อยละ 20 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา และจึงเติมสารละลายไดฟีนิลคาร์บาไซด์ (diphenylcarbazide) ที่ละลายในอะซิโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณ 2.0 มิลลิลิตร ลงในปฏิกิริยาเพื่อทำให้เกิดสีชมพู และติดตามปริมาณของ Cr(VI) โดยวิธีไดฟีนิลคาร์บาไซด์ (1, 5- diphenylcarbazide method) ซึ่งจะอธิบายต่อไป (American Public Health Association, 1989) ในการทดสอบนี้จะใช้ปฏิกิริยาที่ไม่มีการเติมเอนไซม์เป็นชุดควบคุม หนึ่งในหน่วยของเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการรีดิวซ์โครเมทความเข้มข้น 1 โมลาร์ ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

### 3.2 การรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรีย

การติดตามการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียจะทำได้เวลาต่างๆ โดยการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 และใส่ Cr(VI) เริ่มต้นที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ตั้งแต่ 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร (เว้นระยะห่างเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) เลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และติดตามการรีดักชันของ Cr(VI) โดยวิธีไดฟีนิลคาร์บาไซด์ที่จะกล่าวในหัวข้อถัดไป นอกจากนี้ยังติดตามการรีดักชันของ Cr(VI) ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ ร้อยละ 1-7.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทุกการทดลองจะทำซ้ำสามครั้งและรายงานเป็นค่าเฉลี่ยพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สุดท้ายจะเลือกแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ที่ความเข้มข้นสูงและในสภาวะที่มีเกลือ เป็นแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ Cr(VI) เพื่อนำมาศึกษาต่อไป

### 3.3 การวิเคราะห์ปริมาณของ Cr(VI)

ในการหาความเข้มข้นของ Cr(VI) จะใช้วิธีไดฟีนิลคาร์บาไซด์ (Diphenylcarbazide method) (American Public Health Association, 1989) ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Cr(VI) ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.5 และ 50 mg/L โดยอาศัยหลักการที่ว่า Cr(VI) ในรูปของ  $K_2Cr_2O_7$  จะทำปฏิกิริยากับ 1,5-diphenylcarbazide ในสภาวะที่เป็นกรดที่อุณหภูมิห้อง เกิดเป็นสารเชิงซ้อนสีแดงม่วงที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ดังแสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาระหว่าง Cr(VI) กับ 1,5-diphenylcarbazide (Tayonea, 2015)

การคำนวณหาปริมาณของ Cr(VI) ที่ถูกรีดิวซ์ จะปริมาณจากการเทียบกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจาก  $K_2Cr_2O_7$  ความเข้มข้นในช่วง 0-2 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังที่แสดงในภาคผนวกที่ 2 ซึ่งมีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9998 ในการทดลองจะเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาต่างกันไปบนเหยือกที่ความเร็ว  $10,000 \times g$  เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียออก และนำส่วนใสที่ได้มาหาปริมาณ Cr(VI) โดยปฏิกิริยาที่วัดประกอบด้วยส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ (cell-free supernatant) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ปรับค่าพีเอชด้วย  $H_2SO_4$  ให้ได้ค่าพีเอชเท่ากับ  $2 \pm 0.5$  และสารละลาย diphenylcarbazide ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที โดยใช้อาหารเหลว LB หรือน้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์เติม Cr(VI) เป็นชุดควบคุม จากนั้นคำนวณการรีดิวซ์ Cr(VI) ในหน่วยร้อยละจากสูตรในสมการที่ (4)

$$\text{การรีดักชัน Cr(VI) (\%)} = \frac{C_i - C_e}{C_i} \times 100 \quad (4)$$

เมื่อ  $C_i$  คือความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร และ  $C_e$  คือความเข้มข้นของ Cr(VI) ภายหลังจากการรีดักชัน ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร แต่ผลการวัดจะทำซ้ำสามครั้งและรายงานเป็นค่าเฉลี่ยพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการรีดักชัน Cr(VI)

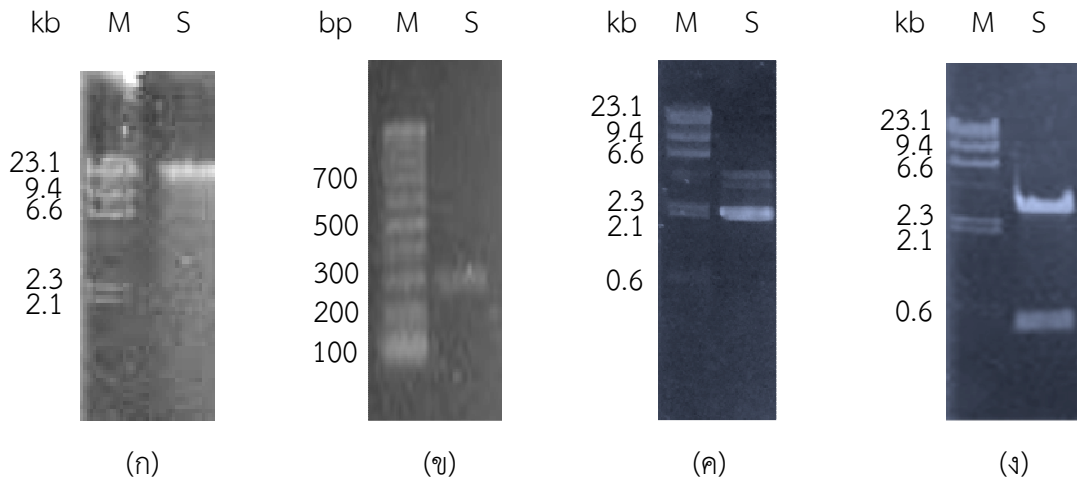
สภาวะทางกายภาพที่ส่งผลต่อการเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียที่ทำการศึกษาคือ ค่าพีเอช (2-12), อุณหภูมิ (15-50 องศาเซลเซียส เว้นระยะห่างที่ละ 5 องศาเซลเซียส), การเขย่าเพื่อให้อากาศ (50-300 รอบต่อนาที เว้นระยะห่างที่ละ 50 รอบต่อนาที), ความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI) (10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เว้นระยะห่างที่ละ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร), แหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) (ทริปโตน, กลูโคส, ซูโครส, ฟรุคโตส, แลคโตส, โซเดียมอะซิเตท, โซเดียมซิเตรท และกลีเซอรอล) และไอออนของโลหะ ( $Ag^+$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Hg^+$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$  และ  $Zn^{2+}$ ) ตลอดจนการทดลองจะดำเนินการเหมือนกันคือเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB ที่มี Cr(VI) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างกัน ติดตามการเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ตามวิธีที่ได้อธิบายมาก่อนหน้า ทุกการทดลองจะทำซ้ำสามครั้งและรายงานเป็นค่าเฉลี่ยพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

## บทที่ 4

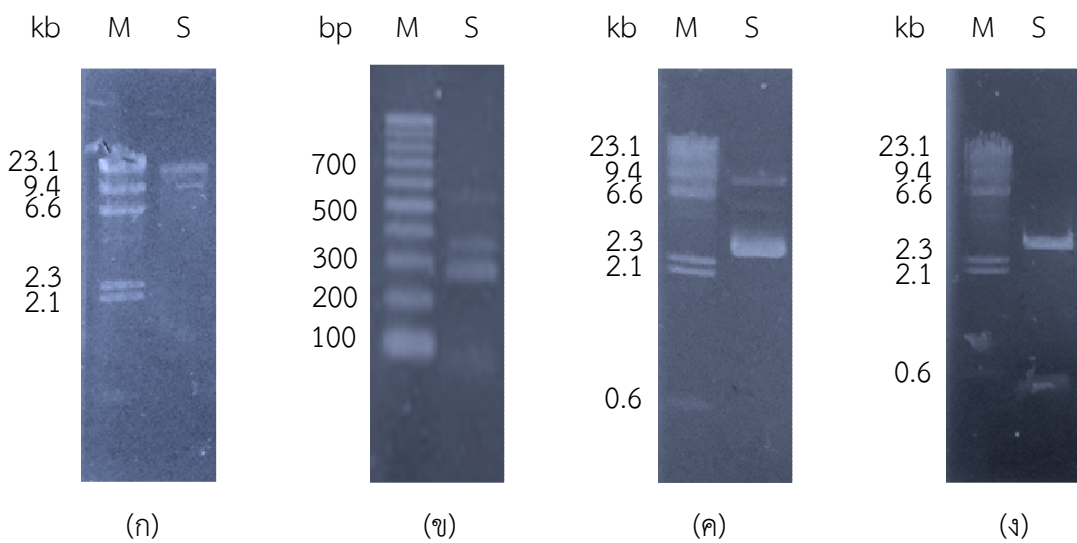
### ผลการวิจัย

#### 4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถรีดักชัน Cr(VI)

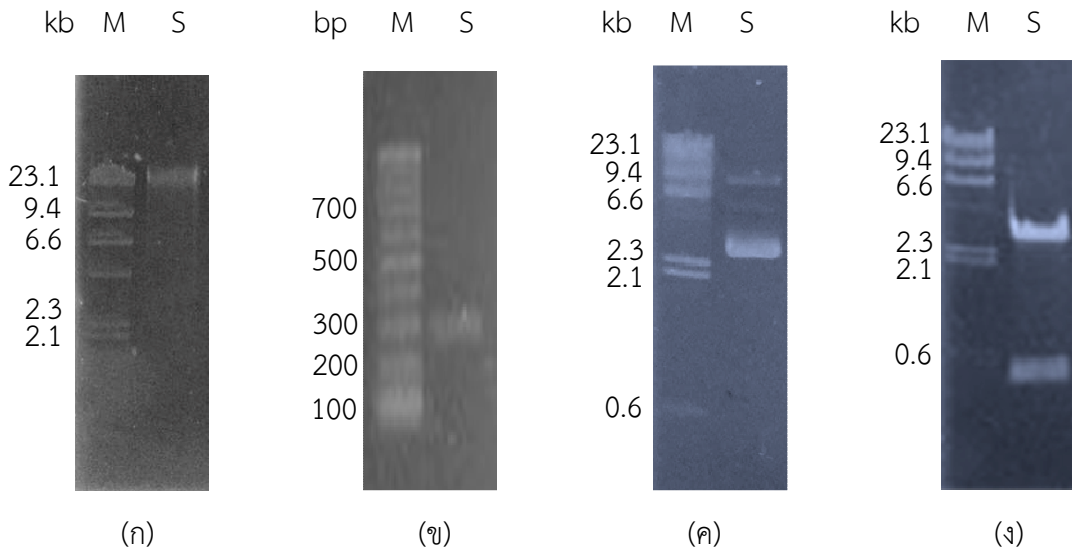
การคัดแยกแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการที่สามารถรีดักชัน Cr(VI) จากการมีของซึ้นยีนโครเมทรีดักเทส ซึ่ง เป็นยีนที่ใช้ในการรีดักชัน Cr(V) (Thatoi et al., 2014) เมื่อสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียและนำมา เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณของซึ้นยีนโครเมทรีดักเทสพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ขนาดประมาณ 300 คู่เบส (ภาพที่ 3-7) ซึ่งเมื่อทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ และเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pTG19-T ก่อนที่จะทรานส์ฟอร์มเข้า *E. coil* DH5 $\alpha$  และคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มี แอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-gal ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการหาลำดับ ดีเอ็นเอ (ภาพที่ 8) พบว่าจากแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการจำนวน 9 สายพันธุ์ มีแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่ ตรวจพบซึ้นยีนที่กำหนดการสร้างโครเมทรีดักเทส ได้แก่ *Acinetobacter baylyi* (Uttatree et al., 2010), *Bacillus megaterium* (Uttatree et al., 2017), *B. cereus* (Charoenpanich et al., 2014), *B. subtilis* (Uttatree & Charoenpanich, 2016), *Streptococcus sciuri* (Charoenpanich et al., 2014) และ *Staphylococcus saprophyticus* (Uttatree & Charoenpanich, 2018) ผลการหาลำดับดีเอ็นเอและการ เทียบความเหมือนของลำดับดีเอ็นเอกับฐานข้อมูล BLAST แสดงในภาคผนวกที่ 3-12 เมื่อทำการเทียบลำดับ กรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับดีเอ็นเอที่ได้ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ พบความเหมือนอย่างสมบูรณ์กับ ลำดับกรดอะมิโนของยีนโครเมทรีดักเทสในแบคทีเรีย (ภาพที่ 9) แสดงถึงความอนุรักษ์สูงของยีนในกลุ่ม แบคทีเรียที่ได้ จากนั้นเมื่อยืนยันการมีของซึ้นยีนจากการติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์โครเมทรีดักเทสใน แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่า *A. baylyi* สามารถผลิตเอนไซม์โครเมทรีดักเทสได้สูงที่สุดที่ค่า แอคติวิตีเท่ากับ  $9.58 \pm 0.46$  หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามมาด้วยการผลิตเอนไซม์ของ *B. megaterium* ( $7.90 \pm 0.33$  หน่วยต่อมิลลิลิตร), *B. cereus* ( $5.54 \pm 0.21$  หน่วยต่อมิลลิลิตร), *S. sciuri* ( $5.66 \pm 0.81$  หน่วยต่อ มิลลิลิตร) และ *B. subtilis* ( $2.55 \pm 0.31$  หน่วยต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ขณะที่ไม่สามารถวัดแอคติวิตีของ เอนไซม์โครเมทรีดักเทสได้ในแบคทีเรียอีก 4 สายพันธุ์ คือ *Enterobacter aerogenes* (Buranasilp, & Charoenpanich, 2011) *Kluyvera georgiana* (Thanyacharoen et al., 2012) *B. aerophilus* (Charoenpanich et al., 2018) และ *Staphylococcus saprophyticus* (Uttatree & Charoenpanich, 2018) ที่ไม่ตรวจพบการมีของซึ้นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์โครเมทรีดักเทส ด้วยเหตุนี้จึงเลือก *A. baylyi*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis* และ *S. sciuri* มาทำการศึกษาการรีดักชัน Cr(VI) ต่อไป



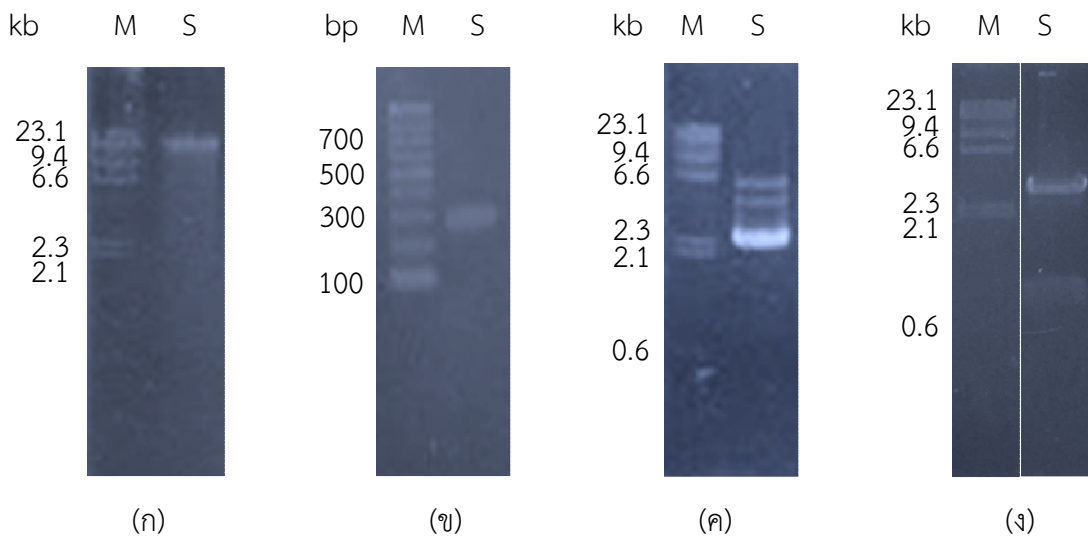
ภาพที่ 3 การวิเคราะห์อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของตัวอย่างจาก *Acinetobacter baylyi* (ก) โครโมโซมอลดีเอ็นเอ (ข) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (ค) ริกอมบิแนนท์พลาสมิด และ (ง) ริกอมบิแนนท์พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI สัญลักษณ M และ S คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ /*Hind*III หรือ 100 bp DNA ladder และตัวอย่างที่ได้จาก *A. baylyi* ตามลำดับ



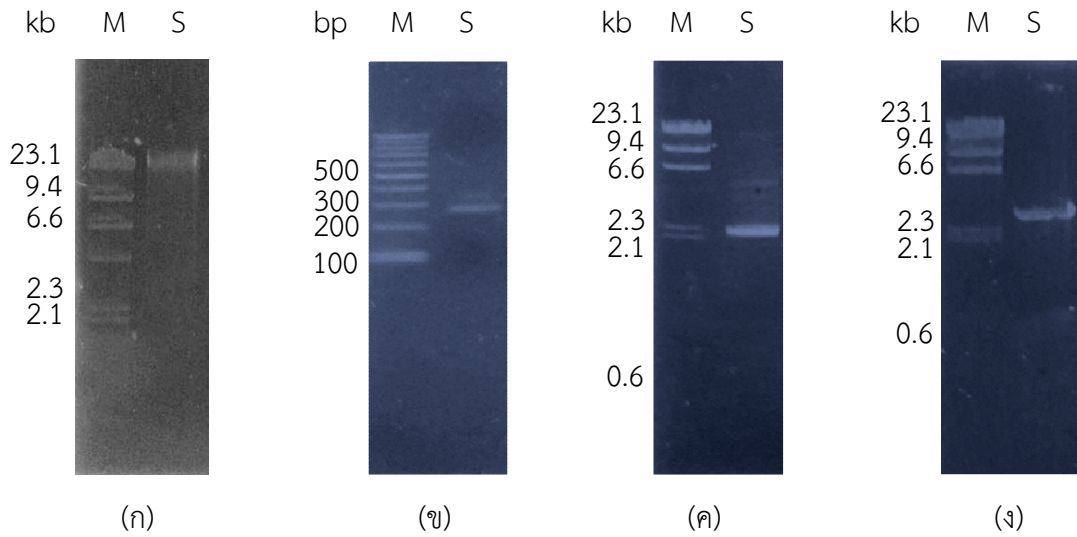
ภาพที่ 4 การวิเคราะห์อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของตัวอย่างจาก *Bacillus megaterium* (ก) โครโมโซมอลดีเอ็นเอ (ข) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (ค) ริกอมบิแนนท์พลาสมิด และ (ง) ริกอมบิแนนท์พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI สัญลักษณ M และ S คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ /*Hind*III หรือ 100 bp DNA ladder และตัวอย่างที่ได้จาก *B. megaterium* ตามลำดับ



ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ห่อสารไวรัสเจลอิลีกโทริฟริซิสของตัวอย่างจาก *Bacillus cereus* (ก) โครโมโซมอลดีเอ็นเอ (ข) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (ค) รีคอมบิแนนท์พลาสมิด และ (ง) รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI สัญลักษณ M และ S คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ /*Hind*III หรือ 100 bp DNA ladder และตัวอย่างที่ได้จาก *B. cereus* ตามลำดับ



ภาพที่ 6 การวิเคราะห์ห่อสารไวรัสเจลอิลีกโทริฟริซิสของตัวอย่างจาก *Bacillus subtilis* (ก) โครโมโซมอลดีเอ็นเอ (ข) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (ค) รีคอมบิแนนท์พลาสมิด และ (ง) รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI สัญลักษณ M และ S คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ /*Hind*III หรือ 100 bp DNA ladder และตัวอย่างที่ได้จาก *B. subtilis* ตามลำดับ



ภาพที่ 7 การวิเคราะห์ห่อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของตัวอย่างจาก *Streptococcus sciuri* (ก) โครโมโซมอลดีเอ็นเอ (ข) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (ค) รีคอมบิแนนท์พลาสมิด และ (ง) รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI สัญลักษณ์ M และ S คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ /*Hind*III หรือ 100 bp DNA ladder และตัวอย่างที่ได้จาก *S. sciuri* ตามลำดับ



(ก)

1 CGTACCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCACGCCGCC 60  
 61 CATAAATTCCGGCTTGTTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCAGAATCTGGCGCAGGTG 120  
 121 ATACTGACAGCGCGCGCCGCAATCACGCCCATGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT 180  
 181 ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCCACC 240  
 241 CGGTACCGAGTAGTTATATTCCGGCGTG

(ข)

1 CGTACCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCACGCCGCC 60  
 61 CATAAATTCCGGCTTGTTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCAGAATCTGGCGCAGGTG 120  
 121 ATACTGACAGCGCGCGCCGCAATCACGCCCATGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT 180  
 181 ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCCACC 240  
 241 CGGTACCGAGTAGTTATATTCCGGCGTG

(ค)

1 CGTACCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCACGCCGCC 60  
 61 CATAAATTCCGGCTTGTTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCAGAATCTGGCGCAGGTG 120  
 121 ATACTGACAGCGCGCGCCGCAATCACGCCCATGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT 180  
 181 ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCCACC 240  
 241 CGGTACCGAGTAGTTATATTCCGGCGTG

(ง)

1 CGTACCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCACGCCGCC 60  
 61 CATAAATTCCGGCTTGTTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCAGAATCTGGCGCAGGTG 120  
 121 ATACTGACAGCGCGCGCCGCAATCACGCCCATGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT 180  
 181 ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCCACC 240  
 241 CGGTACCGAGTAGTTATATTCCGGCGTGA

(จ)

1 CGTACCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCACGCCGCC 60  
 61 CATAAATTCCGGCTTGTTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCAGAATCTGGCGCAGGTG 120  
 121 ATACTGACAGCGCGCGCCGCAATCACGCCCATGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT 180  
 181 ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCCACC 240  
 241 CGGTACCGAGTAGTTATATTCCGGCGTG

ภาพที่ 8 ลำดับดีเอ็นเอที่หาได้จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ (ก) *Acinetobacter baylyi* (ข) *Bacillus megaterium* (ค) *B. cereus* (ง) *B. subtilis* และ (จ) *Streptococcus sciuri*

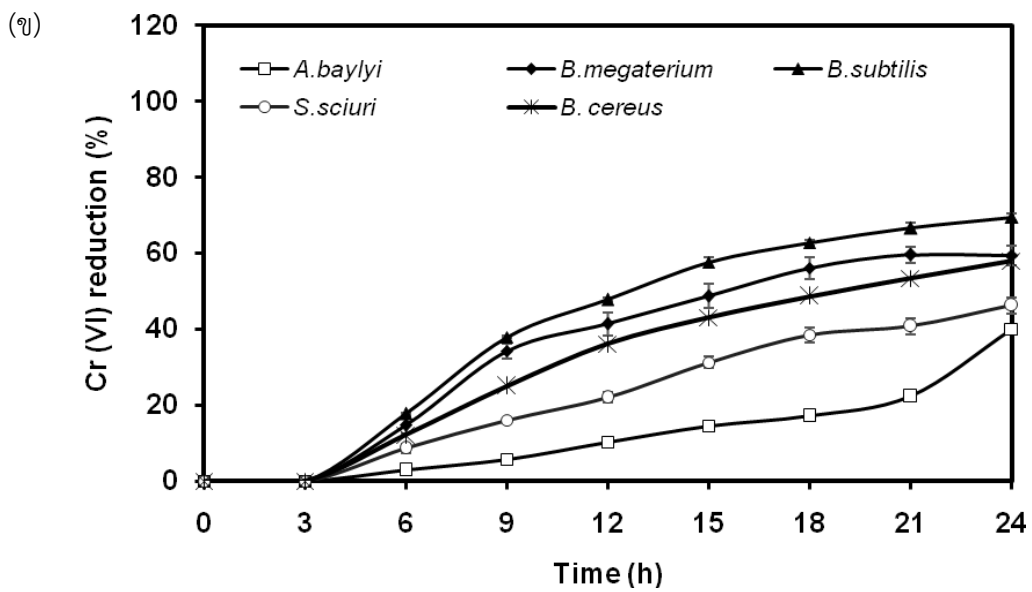
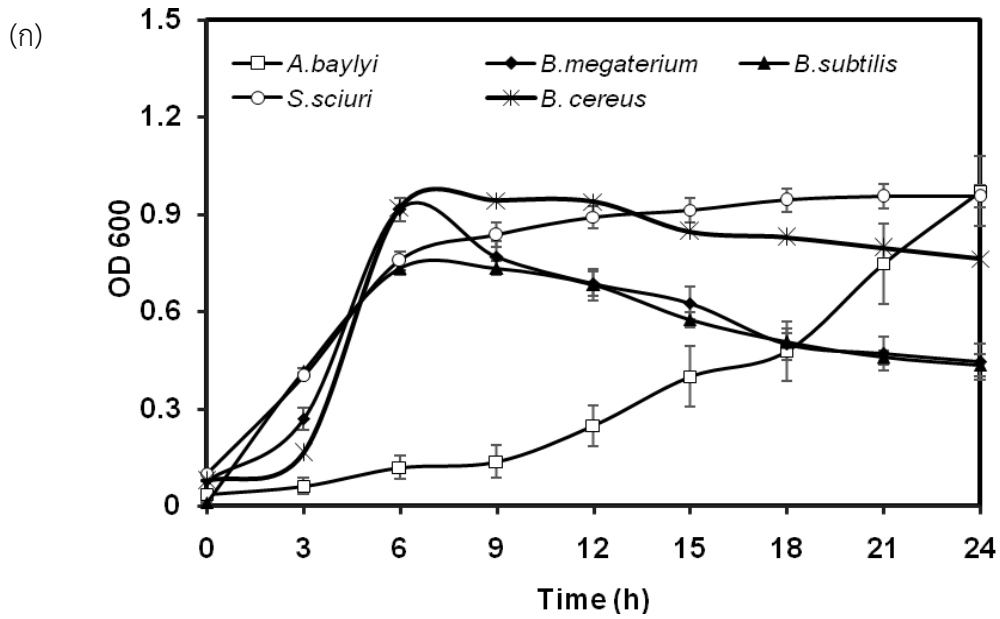
<i>A. baylyi</i>	TPEYNYSVPGGLKNAIDWLSRLPDQPLAGKPVLIQTSSMGVICGARCQYHLRQILVFLDA
<i>B. megaterium</i>	TPEYNYSVPGGLKNAIDWLSRLPDQPLAGKPVLIQTSSMGVICGARCQYHLRQILVFLDA
<i>S. sciuri</i>	TPEYNYSVPGGLKNAIDWLSRLPDQPLAGKPVLIQTSSMGVICGARCQYHLRQILVFLDA
<i>B. cereus</i>	TPEYNYSVPGGLKNAIDWLSRLPDQPLAGKPVLIQTSSMGVICGARCQYHLRQILVFLDA
<i>B. subtilis</i>	TPEYNYSVPGGLKNAIDWLSRLPDQPLAGKPVLIQTSSMGVICGARCQYHLRQILVFLDA
	*****
<i>A. baylyi</i>	MVMNKPEFMGGVIQNKVDPQTGEVIDQGT
<i>B. megaterium</i>	MVMNKPEFMGGVIQNKVDPQTGEVIDQGT
<i>S. sciuri</i>	MVMNKPEFMGGVIQNKVDPQTGEVIDQGT
<i>B. cereus</i>	MVMNKPEFMGGVIQNKVDPQTGEVIDQGT
<i>B. subtilis</i>	MVMNKPEFMGGVIQNKVDPQTGEVIDQGT
	*****

ภาพที่ 9 การเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากยีนโครเมทรีดักเทสที่เตรียมได้จาก *Acinetobacter baylyi*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis* และ *Streptococcus sciuri*

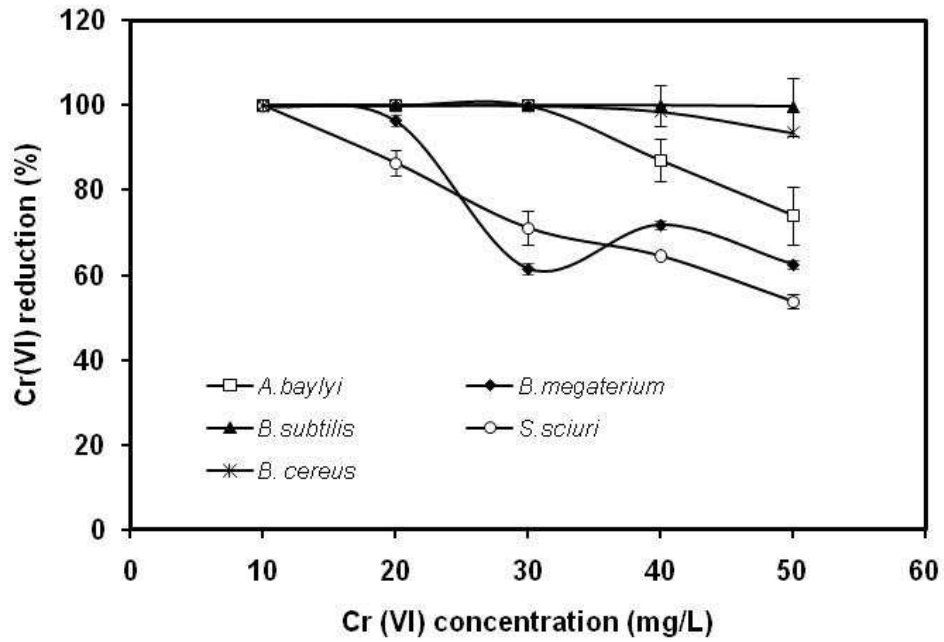
## 4.2 การรีดักซ์ Cr(VI) ของแบคทีเรีย

เมื่อนำแบคทีเรียที่ตรวจพบขึ้นยืนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์โครเมตรีดักเทสทั้ง 5 สายพันธุ์ มาติดตามการเจริญและความสามารถในการรีดักซ์ Cr(VI) ที่ช่วงเวลาต่างๆ พบว่า *B. megaterium*, *B. cereus* และ *B. subtilis* ให้ลักษณะของการเจริญที่คล้ายกันโดยสามารถเข้าสู่ช่วงการเจริญคงที่ (stationary growth phase) หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นอัตราการเจริญจะลดลงอย่างช้าๆ ขณะที่การเจริญของ *S. sciuri* จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและเข้าสู่ระยะคงที่หลังจากเลี้ยงไป 12 ชั่วโมง และอัตราการเจริญจะคงที่ไปนานถึง 24 ชั่วโมง ส่วนอัตราการเจริญของ *A. baylyi* จะต่ำกว่าของแบคทีเรียชนิดอื่น (ภาพที่ 10) โดยพบว่าทุกแบคทีเรียเริ่มรีดักซ์ Cr(VI) ได้เมื่อเซลล์เจริญเข้าสู่ช่วงระยะปลายเอ็กโปเนนเชียล (late-exponential growth phase) คือหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และความสามารถในการรีดักซ์จะเพิ่มขึ้นตามการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งความสามารถในการรีดักซ์ Cr(VI) ของ *B. megaterium*, *B. cereus* และ *B. subtilis* จะสูงกว่าของแบคทีเรียอีกสองสายพันธุ์เท่าตัว

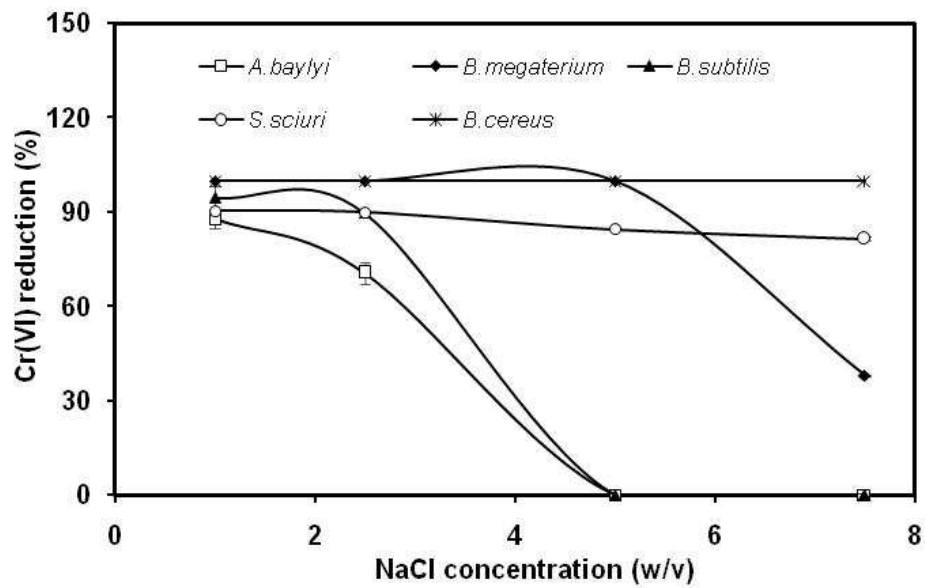
*B. cereus* และ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถทนต่อโครเมียมและรีดักซ์ Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นสูงถึง 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 11) ขณะที่ *A. baylyi* และ *B. megaterium* จะรีดิวซ์ Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น Cr(VI) เริ่มต้น เท่ากับ 30 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งในทางตรงกันข้ามความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *S. sciuri* จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI) และเมื่อศึกษาความสามารถในการกำจัด Cr(VI) ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ในสภาวะที่มีเกลือ โดยใช้ความเข้มข้น Cr(VI) เริ่มต้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตรในการศึกษา พบว่า ความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis*, *A. baylyi* และ *S. sciuri* จะลดลงในสภาวะที่มีเกลือปนเปื้อน ขณะที่ *B. megaterium* และ *B. cereus* สามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นเกลือ NaCl สูงถึงร้อยละ 5 และร้อยละ 7.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 12 ผลการทดลองที่ได้ทำให้เลือก *B. subtilis*, *B. megaterium* และ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการรีดักซ์ Cr(VI) มาใช้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการรีดักซ์ต่อไป



ภาพที่ 10 (ก) การเจริญและ (ข) การรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ตรวจพบขึ้นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์โครเมตรีดักเทส เมื่อเลี้ยงเจริญในอาหารเหลว LB ค่าพีเอช 7.0 ที่มี Cr(VI) ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที แสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำสามครั้งพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 11 การรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียเมื่อใช้ความเข้มข้น Cr(VI) เริ่มต้นต่างกัน รายงานผลการทดลองจากค่าเฉลี่ยในการทดลองซ้ำสามครั้งพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

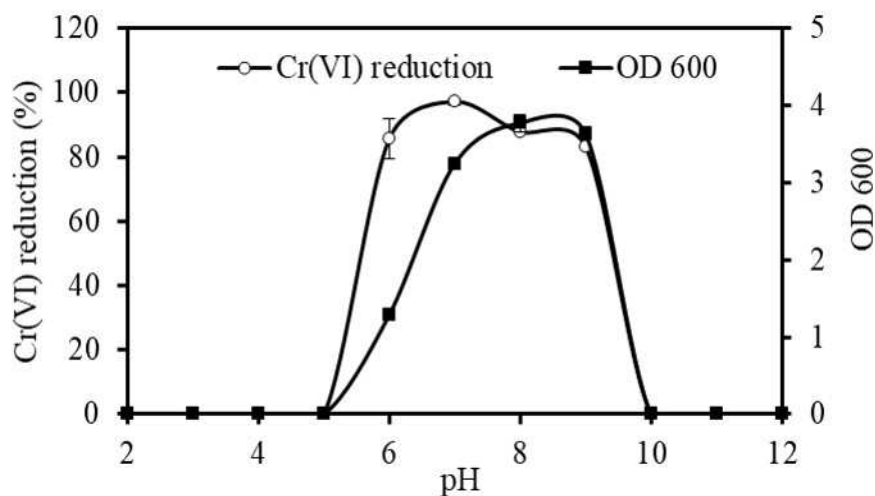


ภาพที่ 12 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB ค่าพีเอช 7.0 ที่มี Cr(VI) ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที รายงานผลการทดลองจากค่าเฉลี่ยในการทดลองซ้ำสามครั้งพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการรีดักชัน Cr(VI) ของ *Bacillus megaterium*

#### 4.3.1 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น

เมื่อศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. megaterium* ในอาหารเหลว LB ที่มี Cr(VI) เริ่มต้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า *B. megaterium* สามารถเจริญได้ดีในช่วงค่าพีเอช 6.0-9.0 ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกันกับการรีดักชัน Cr(VI) reduction โดยที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 *B. megaterium* สามารถรีดักชัน Cr(VI) ได้สูงที่สุดเท่ากับร้อยละ  $97.21 \pm 0.97$  (ภาพที่ 13) ด้วยเหตุนี้จึงเลือกค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 เป็นค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. megaterium* และนำมาทดสอบในพารามิเตอร์ถัดไป



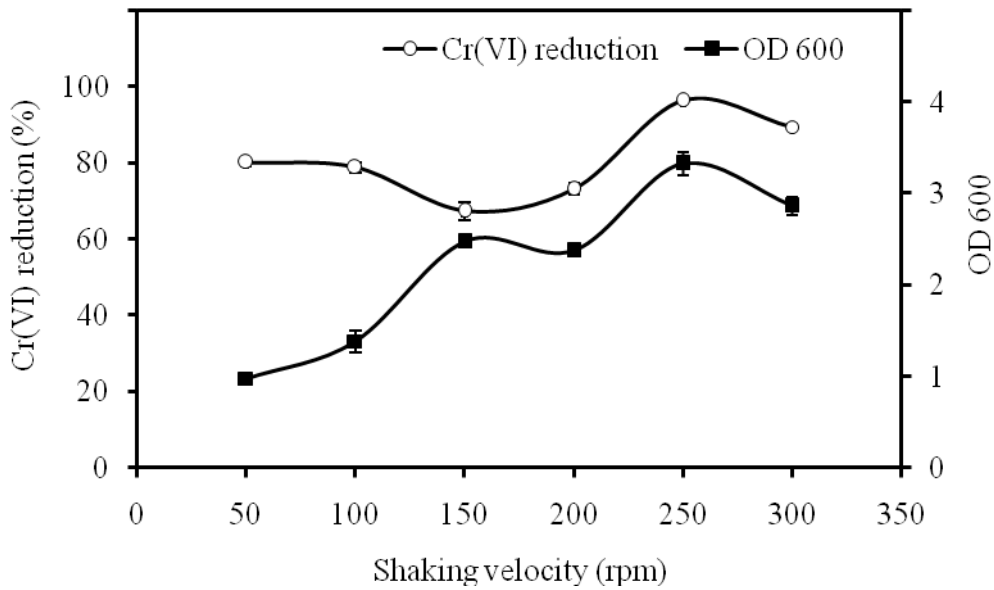
ภาพที่ 13 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. megaterium* เมื่อทำการทดลองในอาหารเหลว LB ที่มี Cr(VI) ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลการทดลองจากค่าเฉลี่ยของการดำเนินการทดลองซ้ำสามครั้งพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.3.2 ผลของความเร็วในการเขย่า

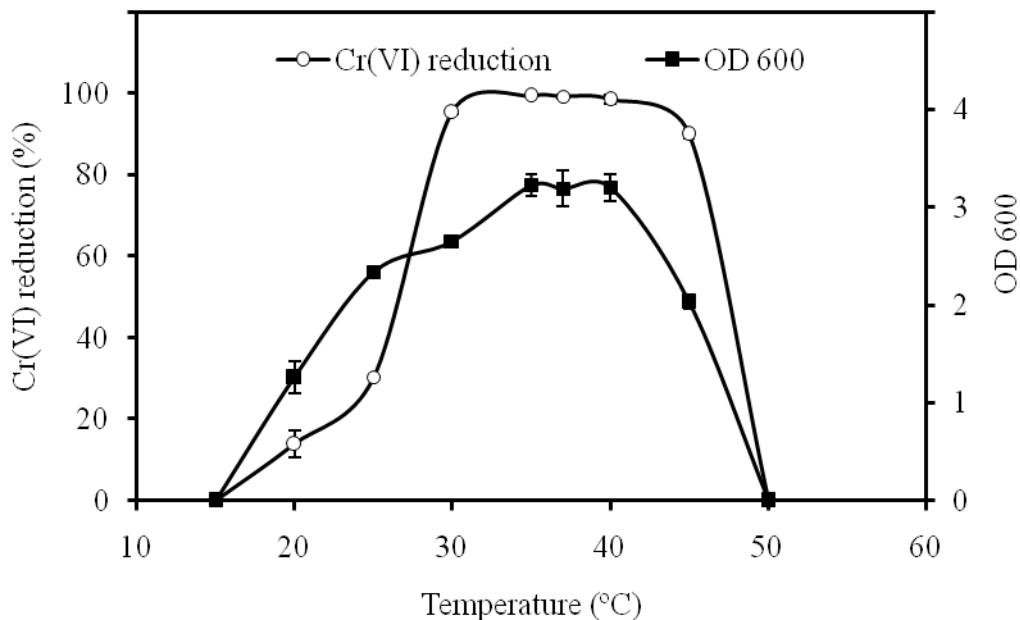
การให้อากาศด้วยการเขย่าเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดักชัน Cr(VI) เมื่อทำการทดลองในสภาวะที่มีการเขย่าให้อากาศที่ความเร็วในการเขย่าต่างกันจาก 50 ถึง 300 รอบต่อนาที พบว่า *B. megaterium* สามารถเจริญและรีดิวซ์ Cr(VI) ได้สูงที่สุด ที่ความเร็วในการเขย่าเท่ากับ 250 รอบต่อนาที (ภาพที่ 14) ขณะที่ความเร็วในการเขย่าอื่นให้ประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ที่ร้อยละ 70-90 สำหรับการเจริญจะลดลงตามความเร็วในการเขย่าที่เพิ่มขึ้น จึงเลือกความเร็วในการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาทีมาใช้ในการทดสอบพารามิเตอร์ถัดไป

#### 4.3.3 ผลของอุณหภูมิ

*B. megaterium* สามารถเจริญและรีดักชัน Cr(VI) ที่อุณหภูมิ 20-45 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 15) โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการรีดักชันคือที่อุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส ที่สามารถรีดักชัน Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์



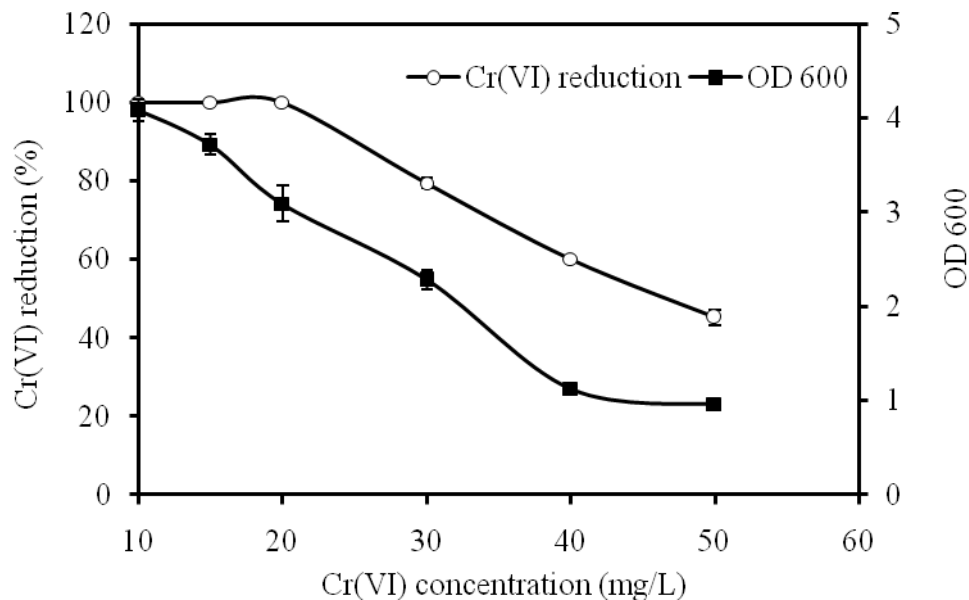
ภาพที่ 14 การเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. megaterium* ที่ความเร็วในการเขย่าต่างกัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB (ค่าพีเอช 7.0) ที่มี Cr(VI) ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยของการทำการทดลองซ้ำสามครั้งพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. megaterium* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB (ค่าพีเอช 7.0) ที่มี Cr(VI) ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยของการทำการทดลองซ้ำสามครั้งพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.3.4 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI)

ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI) ต่อความสามารถในการรีดักชันของ *B. megaterium* พบการรีดักชันอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นต่ำคือ 10-20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 16) แต่ที่ความเข้มข้นของ Cr(VI) ที่สูงขึ้นก็ยังมีประสิทธิภาพในการรีดักชันสูงกว่าครึ่ง ขณะที่การเจริญจะลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 16 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI) ต่อการเจริญและความสามารถในการรีดักชันของ *B. megaterium* เมื่อทำการทดลองในอาหารเหลว LB (ค่าพีเอช 7.0) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองสามซ้ำพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

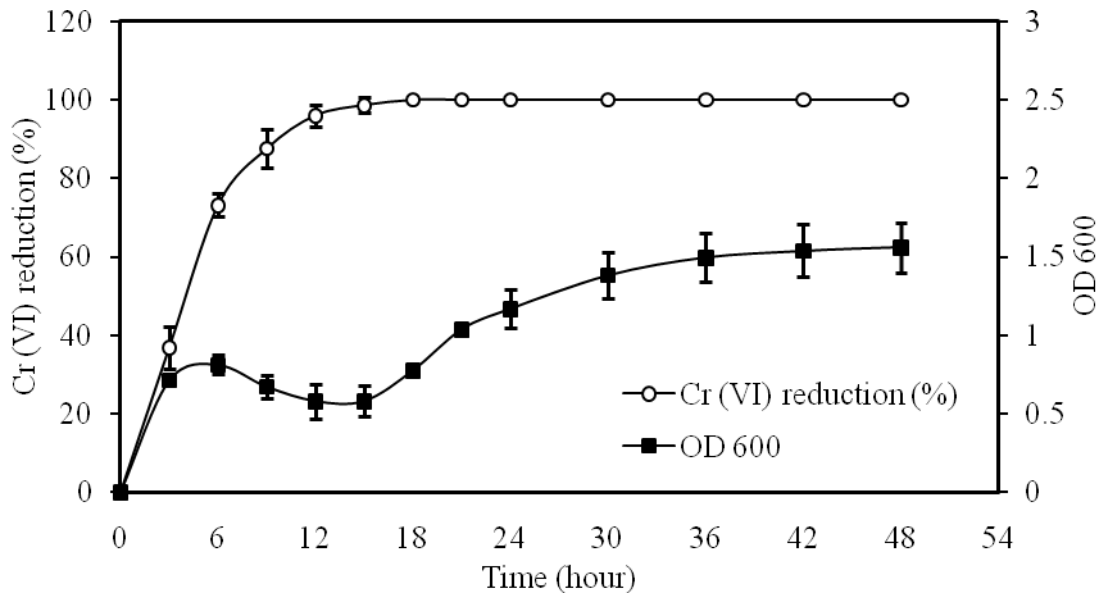
#### 4.3.5 การติดตามการรีดักชัน Cr(VI) ที่เวลาต่างกัน

เมื่อติดตามการเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. megaterium* ที่เวลาต่างกัน ในอาหารเหลว LB ที่มี Cr(VI) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที พบว่าความสามารถในการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นตามการเจริญและสามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์ภายหลังจากเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง ในช่วงการเจริญเข้าสู่สภาวะคงที่ และเกิดอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 17

#### 4.3.6 ผลของแหล่งคาร์บอน

เนื่องจากประสิทธิภาพในการรีดักชัน Cr(VI) โดยจุลินทรีย์มักได้รับอิทธิพลจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นตัวให้อิเล็กตรอน จึงทำการศึกษาในอาหารเหลว LB ในสภาวะเหมาะสมคือ ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ความเร็วในการเขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI) เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากทริปโตเนนเป็นแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ผลการทดลองพบว่า การใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนทริปโตเนน ทำให้เกิดการรีดักชัน Cr(VI) อย่างสมบูรณ์ ตามมาด้วยการใช้โซเดียมอะซิเตท กลีเซอรอล แลคโตส กลูโคส และซูโครส ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 ขณะที่การใช้โซเดียมซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนจะยับยั้งความสามารถในการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรีย แต่เมื่อทดสอบเติมแหล่งคาร์บอนมากกว่าสองชนิดในอาหารเลี้ยงพบว่า *B. megaterium* สามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์

เมื่อใช้ทริปโตนเป็นแหล่งคาร์บอนพื้นฐาน ขณะที่การเติมแหล่งคาร์บอนคู่อื่นให้ประสิทธิภาพในการรีดักชัน > 85% นอกจากนี้การผสมโซเดียมอะซิเตทกับกลูโคสยังให้ประสิทธิภาพในการรีดักชันที่สูงเกือบสมบูรณ์ ดังนั้นในการเลือกแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการทดลองในปริมาณมาก เพื่อเป็นการลดต้นทุนจะใช้การผสมของ โซเดียมอะซิเตทกับกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. megaterium* ต่อไป



ภาพที่ 17 การเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. megaterium* ที่เวลาต่างกันเมื่อติดตามในอาหารเหลว LB (ค่าพีเอช 7.0) ที่มี Cr(VI) ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่า ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ตารางที่ 5 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. megaterium*

แหล่งคาร์บอน	ร้อยละการรีดักชัน Cr(VI) $\pm$ SD
ทริปโตน	100
กลีเซอรอล	93.01 $\pm$ 1.29
กลูโคส	89.20 $\pm$ 0.99
ฟรุคโตส	100
โซเดียมอะซิเตท	94.26 $\pm$ 2.33
โซเดียมซิเตรท	17.99 $\pm$ 1.66
แล็คโตส	92.87 $\pm$ 1.18
ซูโครส	82.81 $\pm$ 1.87
ทริปโตนและโซเดียมอะซิเตท	100
ทริปโตนและกลูโคส	100
ทริปโตนและซูโครส	100
โซเดียมอะซิเตทและกลูโคส	97.27 $\pm$ 0.64
โซเดียมอะซิเตทและซูโครส	92.99 $\pm$ 1.45
กลูโคสและซูโครส	86.35 $\pm$ 0.54



### 4.3.7 ผลของไอออนโลหะ

การมีอยู่ของไอออนโลหะอื่นอาจรบกวนความสามารถในการรีดักชัน Cr(VI) ของจุลินทรีย์ แต่จากผลการทดลองที่รายงานในตารางที่ 6 พบว่า *B. megaterium* สามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์ในสภาวะที่มีไอออนของโลหะทุกชนิดยกเว้น  $Ag^+$  และ  $Hg^{2+}$  ที่ยับยั้งการรีดักชันอย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 6 ผลของไอออนโลหะต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. megaterium*

ไอออนโลหะ	ร้อยละการรีดักชัน Cr(VI)
ชุดควบคุม (ไม่เติมไอออน)	100
$Ag^+$	0
$Ba^{2+}$	100
$Co^{2+}$	100
$Cu^{2+}$	100
$Ni^{2+}$	100
$Hg^{2+}$	0
$Fe^{3+}$	100
$Zn^{2+}$	100
$Mg^{2+}$	100
$Al^{3+}$	100

## 4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการรีดักชัน Cr(VI) ของ *Bacillus cereus*

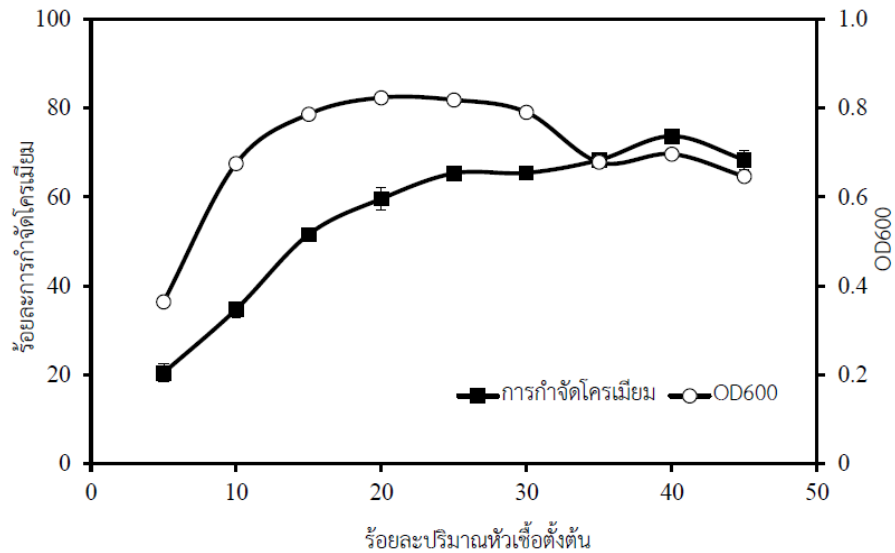
### 4.4.1 ผลของปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น

ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. cereus* ในการรีดักชัน Cr(VI) ในน้ำเสียสังเคราะห์จะเริ่มพิจารณาที่พารามิเตอร์แรกคือ ปริมาณของหัวเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในระบบ ผลการทดลองพบว่าการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus* จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่ใช้ โดยมีร้อยละของการรีดิวซ์ Cr(VI) ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับร้อยละ 5 ถึง 20 จากนั้นความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) จะเริ่มคงที่ ที่การใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นระหว่างร้อยละ 25 และร้อยละ 45 โดยมีค่าการรีดิวซ์ Cr(VI) ในช่วงร้อยละ 65 ถึงร้อยละ 73 ดังแสดงในภาพที่ 18 ซึ่งพบว่าค่าร้อยละการรีดักชัน Cr(VI) สูงสุดจะมีค่าเท่ากับร้อยละ 73.65 เมื่อใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่ปริมาณร้อยละ 40 แต่เมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญที่ลดต่ำลงเมื่อเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อตั้งต้นนั้น จึงเลือกปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่ร้อยละ 25 ไปใช้ทดสอบในพารามิเตอร์ต่อไป

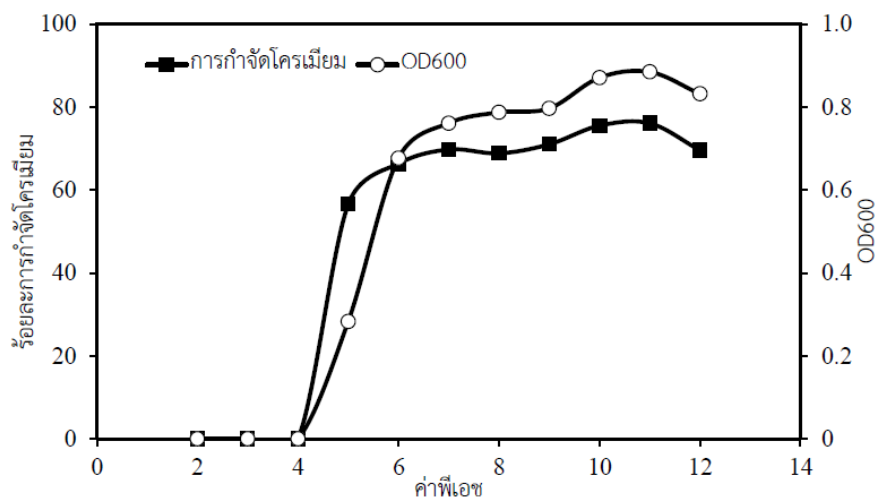
### 4.4.2 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น

เมื่อได้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมแล้วต่อมาได้ทำการศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียสังเคราะห์ โดยพบว่า *B. cereus* ไม่สามารถเจริญได้ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าพีเอชน้อยกว่า 5.0 แต่สามารถเจริญและรีดิวซ์ Cr(VI) ได้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชจาก 5.0 เป็น 6.0 โดยมีค่าร้อยละการรีดักชัน Cr(VI) เท่ากับ 56.57 และ 66.35 ตามลำดับ จากนั้นอัตราการเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus* จะมีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจากประมาณร้อยละ 70 เป็นร้อยละ 75 เมื่อเพิ่มค่าพีเอชจาก 7.0

เป็น 11.0 และอัตราการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) จะมีค่าลดลงเหลือประมาณร้อยละ 70 อีกครั้งเมื่อเพิ่มค่าพีเอชเป็น 12 ดังแสดงในภาพที่ 19 ด้วยเหตุนี้จึงเลือกค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 มาใช้ในการทดสอบต่อไป



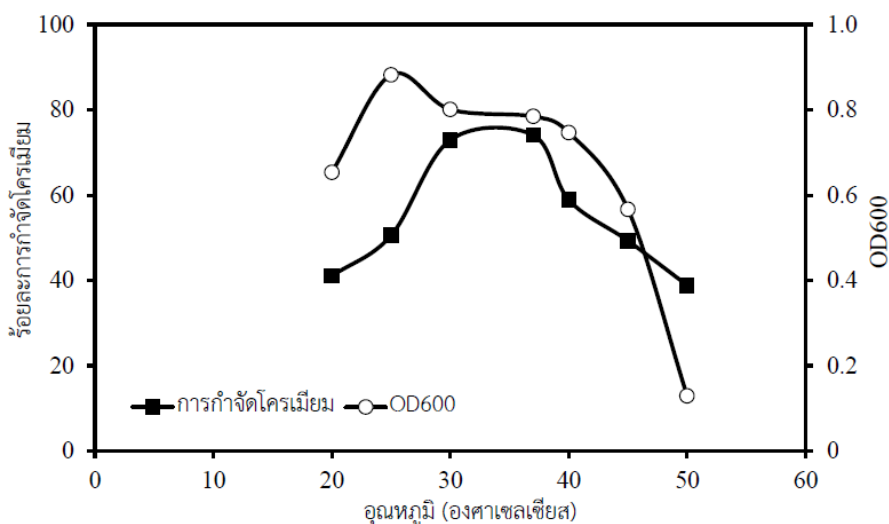
ภาพที่ 18 ผลของปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นต่อเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus* เมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 มีความเข้มข้น Cr(VI) เริ่มต้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ครั้ง พร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 19 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียสังเคราะห์ต่อการเจริญและการกำจัด Cr(VI) ของ *B. cereus* เมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้น Cr(VI) เริ่มต้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นร้อยละ 25 ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ครั้งพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.4.3 ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรียซึ่งอาจส่งผลต่อการกำจัด Cr(VI) ของแบคทีเรียได้ ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาอุณหภูมิที่ต่างกันตั้งแต่ 20 ถึง 50 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า *B. cereus* สามารถเจริญและรีดิวซ์ Cr(VI) ได้ดีตามการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจนถึงอุณหภูมิมากกว่า 37 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) ลดลง โดยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *B. cereus* สามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ได้ดีที่สุดเท่ากับร้อยละ 74.08 ดังแสดงในภาพที่ 20 ด้วยเหตุนี้จึงเลือกอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสมาใช้ในการทดลองถัดไป



ภาพที่ 20 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus* เมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 มีความเข้มข้น Cr(VI) เริ่มต้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นร้อยละ 25 ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

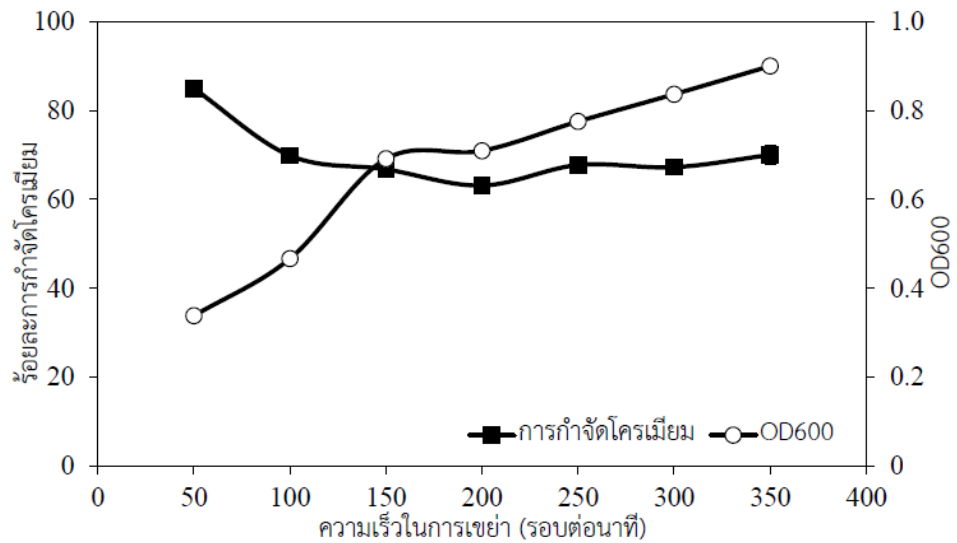
#### 4.4.4 ผลของความเร็วในการเขย่า

การศึกษาผลของความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus* พบว่า *B. cereus* สามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ได้สูงที่สุดโดยมีค่าร้อยละการรีดิวซ์เท่ากับ 84.99 ที่ความเร็วในการเขย่า 50 รอบต่อนาที ดังแสดงในภาพที่ 21 จากนั้นความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) จะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของความเร็วในการเขย่า โดยมีค่าร้อยละการรีดิวซ์ Cr(VI) ประมาณร้อยละ 70 ซึ่งตรงข้ามกันกับการเจริญของแบคทีเรียที่มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ด้วยเหตุนี้จึงเลือกความเร็วในการเขย่าที่ 50 รอบต่อนาที มาใช้ในการศึกษาถัดไป

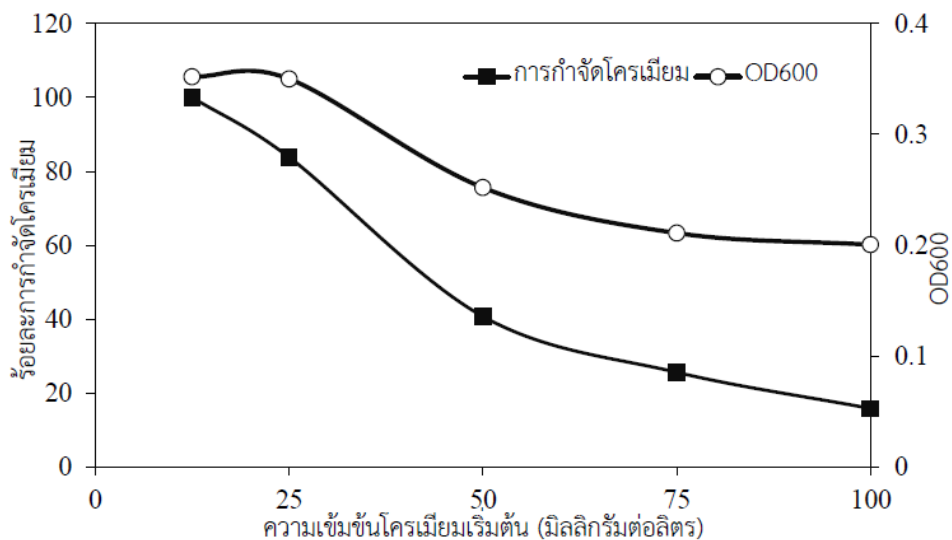
#### 4.4.5 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI)

เมื่อทดสอบผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI) ที่แตกต่างกันคือ 12.5, 25, 50, 75, และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus* พบว่าความสามารถในการเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) จะมีค่าลดลงตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้น Cr(VI) เริ่มต้น (ภาพที่ 22) แม้ที่ความเข้มข้น Cr(VI) เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น *B. cereus* จะสามารถเจริญได้ดีและรีดิวซ์ Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์ก็ตาม แต่เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการรีดิวซ์ที่ความเข้มข้น Cr(VI) 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ยังมีค่าสูงเท่ากับ

ร้อยละ 83.82 โดยไม่ส่งผลต่อการเจริญ ทำให้เลือกความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 25 มิลลิกรัมต่อลิตรมาใช้ในการทดสอบต่อไป



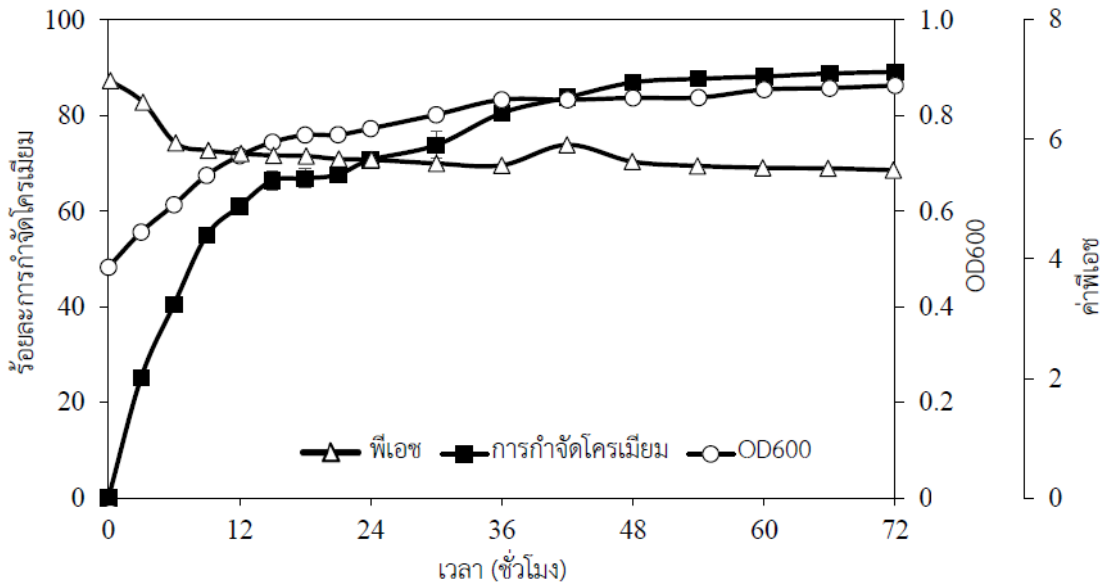
ภาพที่ 21 ผลของความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus* เมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 มีความเข้มข้น Cr(VI) เริ่มต้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นร้อยละ 25 ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 22 ผลของความเข้มข้น Cr(VI) ต่อการเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus* เมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นร้อยละ 25 ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.4.6 การติดตามการรีดิวซ์ Cr(VI) โดย *B. cereus* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่สภาวะเหมาะสม

เมื่อได้สภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus* แล้วต่อมาได้ติดตามการรีดิวซ์ที่เวลาต่างกัน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 23 โดยพบว่าการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) จะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของเวลา และเมื่อการเจริญของแบคทีเรียเข้าสู่ระยะคงที่คือ ที่ชั่วโมงที่ 48 ค่าร้อยละการรีดักชัน Cr(VI) จะเริ่มคงที่ โดยมีค่าร้อยละการรีดักชัน Cr(VI) ในช่วง 86.89 ถึง 89.11 ขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงในระหว่างการเจริญนี้



ภาพที่ 23 การติดตามการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus* เมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และมีค่าความเข้มข้นของ Cr(VI) เริ่มต้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นร้อยละ 25 ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.4.7 ผลของแหล่งคาร์บอน

การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus* ในน้ำเสียสังเคราะห์ในสภาวะเหมาะสมพบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจะใช้เป็นตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับการรีดักชัน Cr(VI) โดย *B. cereus* เรียงตามลำดับคือ ฟรุคโตส โซเดียมซิเตรท และทริปโตน ดังแสดงในตารางที่ 7 ขณะที่การใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นยับยั้งความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus*

#### 4.4.8 ผลของไอออนโลหะ

เมื่อศึกษาผลของไอออนโลหะต่อการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus* ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 โดยพบว่า ความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. cereus* ถูกยับยั้งได้โดยไอออนของโลหะทุกชนิด ยกเว้นไอออนของ  $\text{Cu}^{2+}$  และ  $\text{Ba}^{2+}$  ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI)

ตารางที่ 7 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. cereus*

แหล่งคาร์บอน	ร้อยละการรีดักชัน Cr(VI) $\pm$ SD
ทริปโตน	72 $\pm$ 0.64
กลีเซอรอล	49 $\pm$ 4.20
กลูโคส	49 $\pm$ 2.14
ฟรุคโตส	89 $\pm$ 3.41
โซเดียมอะซิเตท	46 $\pm$ 3.65
โซเดียมซิเตรท	81 $\pm$ 2.33
แลคโตส	27 $\pm$ 1.81
ซูโครส	41 $\pm$ 0.87

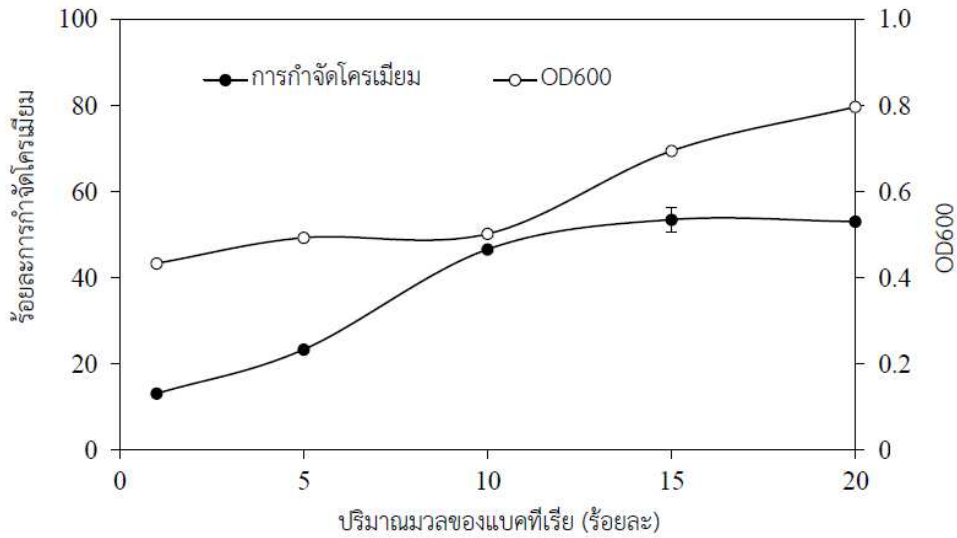
ตารางที่ 8 ผลของไอออนโลหะต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. cereus*

ไอออนโลหะ	ร้อยละการรีดักชัน Cr(VI) $\pm$ SD
ชุดควบคุม (ไม่เติมไอออน)	100
Ag <sup>+</sup>	14 $\pm$ 2.64
Ba <sup>2+</sup>	112 $\pm$ 1.47
Co <sup>2+</sup>	77 $\pm$ 2.02
Cu <sup>2+</sup>	142 $\pm$ 0.70
Ni <sup>2+</sup>	51 $\pm$ 1.54
Hg <sup>2+</sup>	17 $\pm$ 2.69
Fe <sup>3+</sup>	74 $\pm$ 3.23
Zn <sup>2+</sup>	30 $\pm$ 3.98
Mg <sup>2+</sup>	81 $\pm$ 1.01
Al <sup>3+</sup>	80 $\pm$ 1.80

#### 4.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการรีดักชัน Cr(VI) ของ *Bacillus subtilis*

##### 4.5.1 ผลของปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น

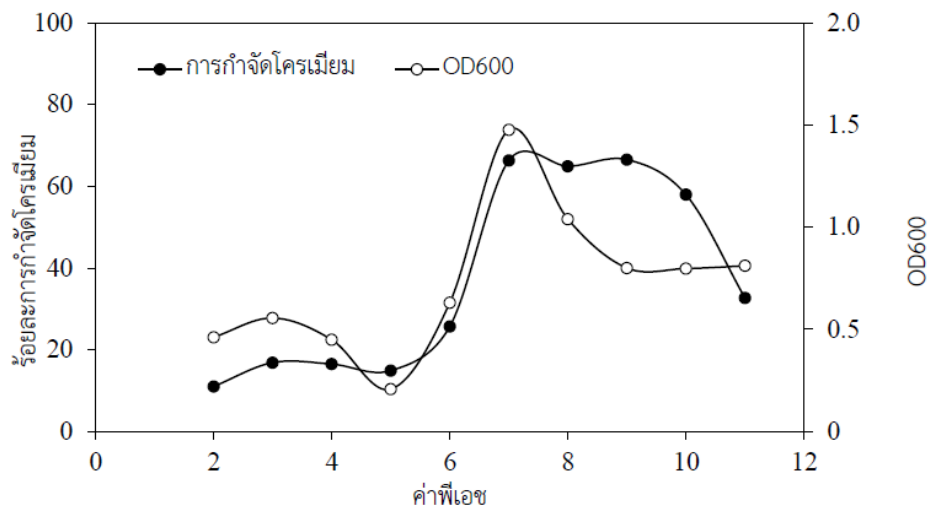
เมื่อทำการทดลองในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของ Cr(VI) เริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อของแบคทีเรียที่ต่างกัน พบว่าการเจริญและความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของแบคทีเรียมีความสัมพันธ์ตรงกันกับปริมาณหัวเชื้อที่เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียจะสามารถเจริญและรีดิวซ์ Cr(VI) ได้ดีขึ้นดังแสดงในภาพที่ 24 แต่เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของแบคทีเรียเมื่อใช้หัวเชื้อแตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 10 ร้อยละ 15 ถึงร้อยละ 20 พบว่า เชื้อสามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ได้เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 47 เป็นร้อยละ 54 และร้อยละ 53 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่ร้อยละ 10 มาใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 24 ผลของปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis* เมื่อวิเคราะห์ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มี Cr(VI) เริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ พร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.5.2 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น

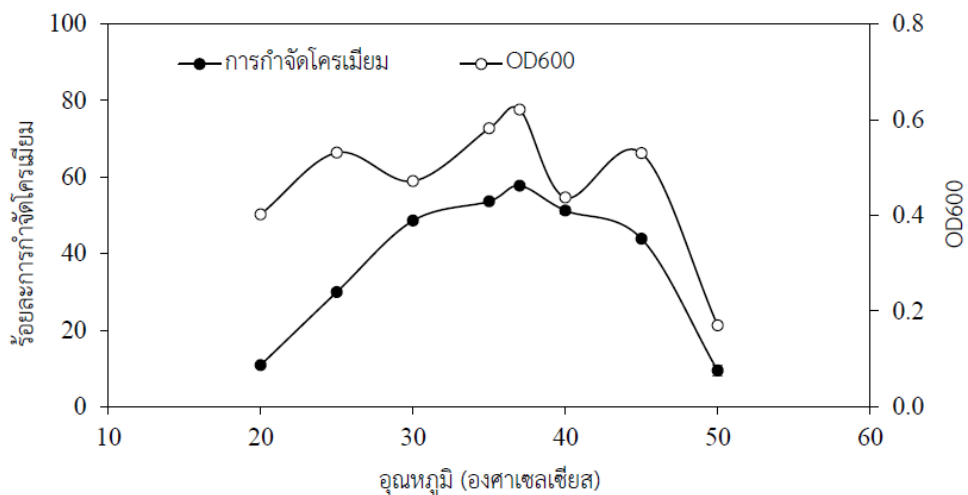
การศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis* ดำเนินการทดลองในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในช่วงพีเอชที่มีค่าเป็นกลางถึงด่าง และเจริญได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอช 7.0 โดยพบประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ไม่แตกต่างกันมากคือ อยู่ที่ร้อยละ 66.28 ถึงร้อยละ 64.91 ในช่วงค่าพีเอช 7.0-8.0 ดังแสดงในภาพที่ 25 ด้วยเหตุนี้จึงเลือกค่าพีเอช 7.0 มาใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 25 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียสังเคราะห์ต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis* เมื่อวิเคราะห์ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มี Cr(VI) เริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ พร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 4.5.3 ผลของอุณหภูมิ

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis* พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิจาก 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส ส่งผลให้แบคทีเรียรีดิวซ์ Cr(VI) ได้สูงขึ้นโดยสามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ได้สูงที่สุดที่ร้อยละ 58 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) จะมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 26 ด้วยเหตุนี้จึงเลือกอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสมาใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 26 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis* เมื่อวิเคราะห์ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มี Cr(VI) เริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 7.0 ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ พร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

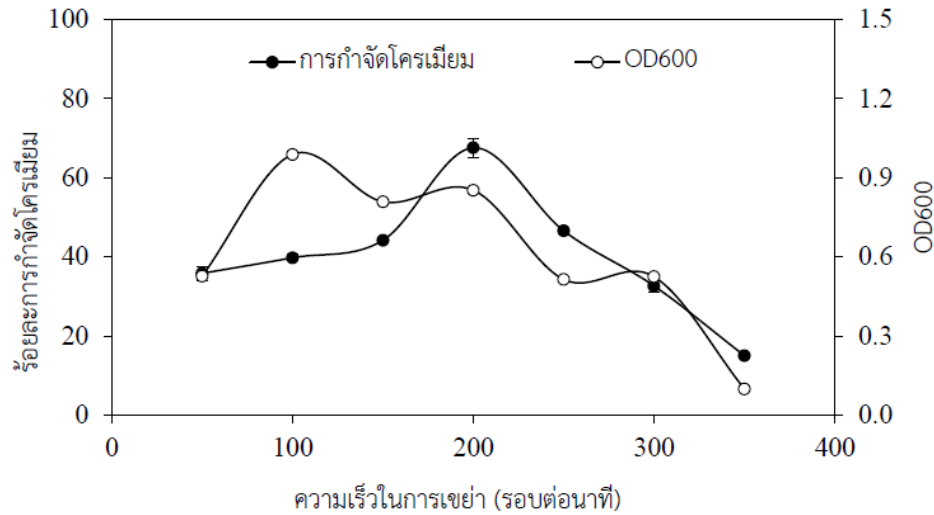
### 4.5.4 ผลของความเร็วในการเขย่า

ปัจจัยต่อมาที่ทำการศึกษาคือ ความเร็วในการเขย่าที่ส่งผลต่อการเจริญ และประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) จากภาพที่ 27 พบว่า *B. subtilis* สามารถเจริญได้ดีที่ค่าความเร็วในการเขย่า 100 รอบต่อนาที แต่จะรีดิวซ์ Cr(VI) ได้สูงที่สุดที่ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยสามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ได้เท่ากับร้อยละ 68 จากนั้นประสิทธิภาพในการรีดิวซ์จะลดลงพร้อมกับความสามารถในการเจริญ เมื่อเพิ่มความเร็วในการเขย่า ด้วยเหตุนี้จึงเลือกความเร็วในการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที มาใช้ในการศึกษาต่อไป

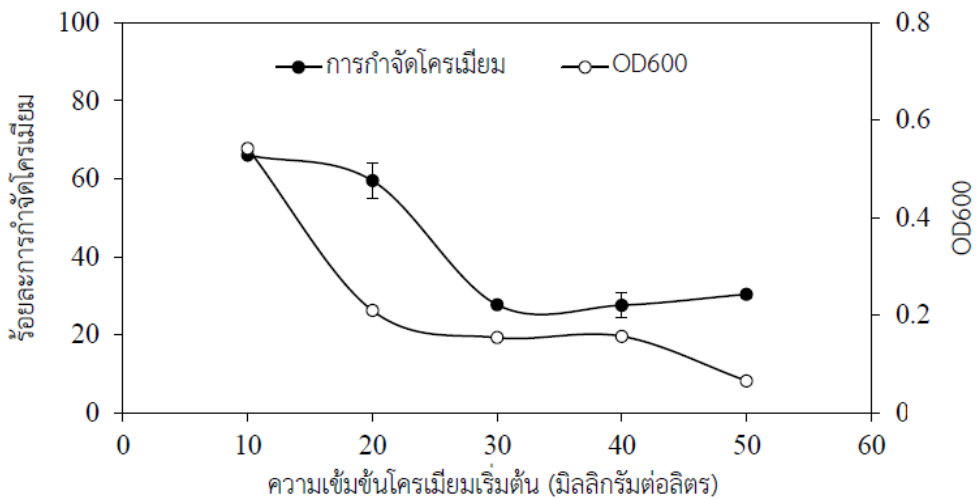
### 4.5.5 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI)

การศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI) ที่ใช้ต่อความสามารถในการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis* แสดงในภาพที่ 28 พบว่า *B. subtilis* สามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ได้ดีที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ค่าร้อยละการรีดิวซ์ที่แตกต่างกันมากกล่าวคือ สามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ร้อยละ 66.02 และร้อยละ 59.47 ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Cr(VI) มากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าส่งผลต่อการเจริญและความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) ด้วยเหตุนี้จึงเลือกความเข้มข้นโครเมียมเริ่มต้นที่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มาใช้ในการศึกษาต่อไป





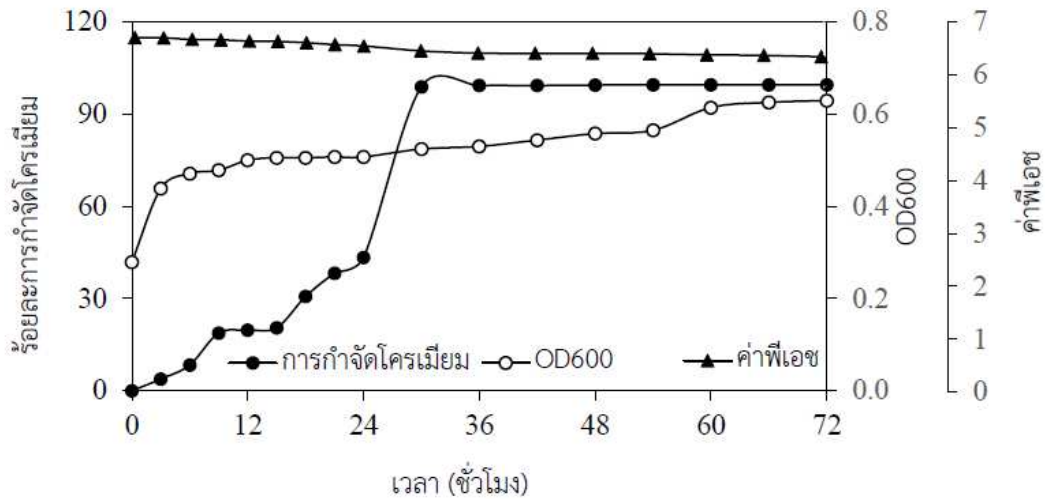
ภาพที่ 27 ผลของความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis* เมื่อวิเคราะห์ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มี Cr(VI) เริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ พร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 28 ผลของความเข้มข้นโครเมียมเริ่มต้นต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis* เมื่อวิเคราะห์ในน้ำเสียสังเคราะห์ (ค่าพีเอช 7.0) ที่มี Cr(VI) แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ พร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.5.6 การทดสอบประสิทธิภาพของ *B. subtilis* ในการรีดิวซ์ Cr(VI)

การศึกษาการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis* ที่เวลาต่างกัน พบว่าแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามการเจริญของเชื้อและการเพิ่มขึ้นของเวลาที่ใช้ และจะรีดิวซ์ Cr(VI) ได้หมดอย่างสมบูรณ์ เมื่อการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะปลายเอ็กโปเนนเชียล โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชมากนัก ดังแสดงในภาพที่ 29



ภาพที่ 29 การติดตามการเจริญและประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis* เมื่อวิเคราะห์ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มี Cr(VI) เริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ พร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.5.7 ผลของแหล่งคาร์บอน

การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis* ในสภาวะเหมาะสมพบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจะใช้เป็นตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับการรีดักชัน Cr(VI) โดย *B. subtilis* คือ ทริปโตน ดังแสดงในตารางที่ 9 ขณะที่การใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นยับยั้งความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis*

ตารางที่ 9 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. subtilis*

แหล่งคาร์บอน	ร้อยละการรีดักชัน Cr(VI) ± SD
ทริปโตน	100 ± 0.02
กลีเซอรอล	35 ± 0.85
กลูโคส	42 ± 2.89
ฟรุคโตส	72 ± 1.69
โซเดียมอะซิเตท	53 ± 5.40
โซเดียมซิเตรท	81 ± 1.82
แลคโตส	43 ± 2.03
ซูโครส	39 ± 0.75

#### 4.5.8 ผลของไอออนโลหะ

เมื่อศึกษาผลของไอออนโลหะต่อการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis* ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 10 โดยพบว่า การมีอยู่ของไอออนโลหะทุกชนิดยกเว้น  $Zn^{2+}$  จะยับยั้งความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis* และการเติม  $Cu^{2+}$  ช่วยเสริมประสิทธิภาพในการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. subtilis* ได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 24

ตารางที่ 10 ผลของไอออนโลหะต่อการรีดักชัน Cr(VI) ของ *B. subtilis*

ไอออนโลหะ	ร้อยละการรีดักชัน Cr(VI) $\pm$ SD
ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมไอออน)	100
Ag <sup>+</sup>	17 $\pm$ 2.74
Ba <sup>2+</sup>	60 $\pm$ 6.10
Co <sup>2+</sup>	69 $\pm$ 7.96
Cu <sup>2+</sup>	124 $\pm$ 1.77
Ni <sup>2+</sup>	44 $\pm$ 3.81
Hg <sup>2+</sup>	7 $\pm$ 1.65
Fe <sup>3+</sup>	80 $\pm$ 3.81
Zn <sup>2+</sup>	101 $\pm$ 0.74
Mg <sup>2+</sup>	15 $\pm$ 2.08
Al <sup>3+</sup>	92 $\pm$ 0.72

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการวิจัย

จากการนำสารก่อมะเร็ง Cr(VI) มาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมหลายชนิด โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการฟอกหนังในกระบวนการฟอกโครม (UNEP, 1994) นำไปสู่การปนเปื้อนของ Cr(VI) ในสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในห่วงโซ่อาหาร (Kotaš & Stasicka, 2000; Rieuwerts, 2015; Shanker et al., 2005) ซึ่งเคยมีรายงานถึงศักยภาพของแบคทีเรียในสกุล *Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Streptococcus* ที่สามารถรีดักชัน Cr(VI) เป็น Cr(III) ที่มีความเป็นพิษลดลงได้ (Gopalan & Veeramani, 1994; Ilias et al., 2011; Liu et al., 2015; Mala et al., 2015) ซึ่งกลไกในการรีดักชัน Cr(VI) โดยแบคทีเรียนี้เป็นกระบวนการที่ขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย (species dependent) และมีความหลากหลายสูง (Thatoi et al., 2014) ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถทนและเจริญในสถานะที่มี Cr(VI) ความเข้มข้นสูงได้ มักจะมีศักยภาพในการกำจัด Cr(VI) ผ่านการทำงานของเอนไซม์โครเมทรีดักเทส (Thatoi et al., 2014) ด้วยเหตุนี้ โครงการวิจัยนี้จึงเริ่มคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ Cr(VI) จากการมีอยู่ของชั้นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์โครเมทรีดักเทส และพบว่าแบคทีเรียห้าในเก้าสายพันธุ์ที่มีในห้องปฏิบัติการได้แก่ *Acinetobacter baylyi* (Uttatree et al., 2010), *Bacillus megaterium* (Uttatree et al., 2017), *B. cereus* (Charoenpanich et al., 2014), *B. subtilis* (Uttatree & Charoenpanich, 2016) และ *Streptococcus sciuri* (Charoenpanich et al., 2014) มียีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์โครเมทรีดักเทสและสามารถผลิตเอนไซม์โครเมทรีดักเทสที่ใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ (Sau et al., 2010) โดยสามารถติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ ด้วยเหตุนี้จึงเลือกแบคทีเรียทั้งห้าสายพันธุ์มาทดสอบการรีดักชัน Cr(VI) ต่อไป

เมื่อติดตามการเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียทั้งห้าสายพันธุ์เปรียบเทียบกับพบว่า *B. megaterium*, *B. cereus* และ *B. subtilis* ซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกันมีรูปแบบการเจริญที่คล้ายคลึงกัน ขณะที่อัตราการเจริญของ *A. baylyi* และ *S. sciuri* จะต่ำกว่าเท่าตัว ซึ่งแบคทีเรียทุกชนิดจะเริ่มการรีดักชัน Cr(VI) ในช่วงปลายของระยะเอ็กโปเนนเชียล และประสิทธิภาพในการรีดักชันจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเจริญเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียใช้พลังงานในการเจริญมาจากการรีดักชัน Cr(VI) และความเข้มข้นของ Cr(VI) ที่ลดลงน่าจะเกิดจากการเปลี่ยนรูป Cr(VI) เป็น Cr(III) ของแบคทีเรียภายหลังเกิดการรีดักชัน (Whitacre, 2012; Yao et al., 2008) เมื่อติดตามการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียทั้งห้าสายพันธุ์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cr(VI) ต่างกันพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Cr(VI) นั้น ความสามารถในการรีดักชัน Cr(VI) จะลดลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของ Cr(VI) ในระดับสูงที่ส่งผลต่อแบคทีเรีนั่นเอง และเมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการเจริญและรีดิวซ์ Cr(VI) ที่ความเข้มข้นต่างกันพบว่า *B. cereus* และ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญและรีดิวซ์ Cr(VI) ที่ความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าแบคทีเรียอีกสามสายพันธุ์ ขณะที่ *A. baylyi* และ *B. megaterium* จะทนและรีดิวซ์ Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์ถึงความเข้มข้นเท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่ความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *S. sciuri* จะลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงไม่พิจารณาที่จะเลือก *S. sciuri* เป็นแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ Cr(VI) เพื่อทำการทดลองต่อไป

จากข้อเท็จจริงที่ว่า การปนเปื้อนของเกลือเป็นปัจจัยหลักที่ต้องคำนึงถึงในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของแบคทีเรีย จึงได้เลือกความสามารถในการเจริญและรีดิวซ์ Cr(VI) ของแบคทีเรียในสถานะที่มีเกลือ NaCl

ปนเปื้อนเป็นเกณฑ์ในการพิจารณาเลือกแบคทีเรียรีดิวซ์ Cr(VI) ชั้นแรก เมื่อทำการติดตามการเจริญและการรีดักชัน Cr(VI) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแบคทีเรียทั้งห้าสายพันธุ์ในสภาวะที่มีการปนเปื้อน NaCl ความเข้มข้นต่างกัน พบว่า อัตราการเจริญและความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของ *B. subtilis*, *A. baylyi* และ *S. sciuri* จะลดลงขณะที่ *B. megaterium* และ *B. cereus* ยังคงสามารถรีดิวซ์ Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์ที่ทุกความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่ปนเปื้อน ผลการทดลองที่ได้ระบุว่า *B. megaterium* และ *B. cereus* น่าจะเป็นแบคทีเรียที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการกำจัด Cr(VI) ภายใต้สภาวะที่มีเกลือได้

เนื่องจากประสิทธิภาพในการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียสามารถควบคุมได้โดยปัจจัยทางกายภาพภายนอกจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของแบคทีเรียที่เลือกนำมาทดสอบ การทดสอบผลของปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่ใช้ต่อประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Cr(VI) พบว่า การเจริญและความสามารถในการกำจัด Cr(VI) ของแบคทีเรียมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ แต่เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นจำนวนมากเกินไป จะไม่ส่งผลให้การเจริญและประสิทธิภาพในการกำจัด Cr(VI) ของเชื้อเพิ่มขึ้นแตกต่างกันมากนัก ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการจำกัดของแหล่งพลังงานสำหรับแบคทีเรีย เมื่อใช้เชื้อที่มีปริมาณมวลชีวภาพสูงเกินไปนั่นเอง เนื่องจากค่าพีเอชเป็นปัจจัยทางกายภาพที่ส่งผลต่อการแตกตัวและเปลี่ยนรูปไอออนิกของบริเวณแอคทีฟของเอนไซม์ ซึ่งเคยมีรายงานว่าค่าพีเอชในช่วง 6.5-9.0 เป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมในการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรีย (Kathiravan et al., 2010) เนื่องจากในช่วงค่าพีเอชนี้ โครเมียมจะอยู่ในรูปของโครเมต (chromate หรือ  $\text{CrO}_4^{2-}$ ) ที่พร้อมจะเกิดการรีดักชัน (McLean & Beveridge, 2001) ขณะที่หากค่าพีเอชเข้าสู่ความเป็นด่างจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนรูปของโครเมียมเป็น  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  ที่เป็นพิษต่อการเจริญของแบคทีเรียได้ (McLean & Beveridge, 2001) ซึ่งผลการทดลองที่ได้จาก *B. megaterium*, *B. cereus* และ *B. subtilis* ให้ผลที่สอดคล้องกันคือ มีการรีดิวซ์ Cr(VI) ได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 และยังให้ผลคล้ายคลึงกับที่เคยพบรายงานใน *B. amyloliquefaciens* และ *B. coagulans* (Das et al., 2014; Philip et al., 1998)

เมื่อทดสอบความสามารถในการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์เมื่อทำการเขย่าเพื่อเติมอากาศที่ความเร็วในการเขย่าต่างกันพบว่า *B. megaterium* และ *B. subtilis* สามารถเจริญและรีดิวซ์ Cr(VI) reduction ได้ดีที่สุดที่ความเร็วในการเขย่าเท่ากับ 250 และ 200 รอบต่อนาที ตามลำดับ ขณะที่ *B. cereus* สามารถกำจัด Cr(VI) ได้ดีแม้จะใช้ความเร็วในการเขย่าที่ต่ำคือ 50 รอบต่อนาที และความสามารถในการกำจัด Cr(VI) จะมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเร็วในการเขย่า ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบที่สูงเกินไปอาจส่งผลให้เกิดฟองขึ้นในปฏิกิริยาที่มาจากความเครียดของแรงเขย่า (Mechanical stress) และ/หรือความเครียดจากปริมาณออกซิเจน (Oxidative stress) ซึ่งยับยั้งการส่งถ่ายอิเล็กตรอนระหว่างกระบวนการรีดักชันของโครเมียมได้ (Liu et al., 2004) ขณะที่การใช้ความเร็วในการเขย่าที่ต่ำเกินไปจะเป็นการจำกัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการส่งถ่ายอิเล็กตรอนระหว่างการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียได้

*B. megaterium*, *B. cereus* และ *B. subtilis* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20 ถึง 45 องศาเซลเซียส โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัด Cr(VI) สูงในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30 และ 45 องศาเซลเซียส ขณะที่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงมากกว่า 45 องศาเซลเซียส พบอัตราการเจริญและประสิทธิภาพในการกำจัดที่ลดลง ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการกำจัด Cr(VI) ของ *B. amyloliquefaciens* (Das et al., 2014) และ *Bacillus* sp. (Dhal et al., 2010) ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการกำจัด Cr(VI) อยู่ที่ 35 องศาเซลเซียส การใช้อุณหภูมิสูงจะลดอัตราการเจริญของแบคทีเรียและประสิทธิภาพในการรีดักชัน Cr(VI) เนื่องจากส่งผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ที่มีชีวิตและระบบเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลานาน นอกจากนี้ที่

อุณหภูมิสูงกว่าค่าที่เหมาะสมอาจส่งผลให้โครงสร้างธรรมชาติ (Native conformation) ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการรีดักชันโครเมียมเปลี่ยนไป หรือไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนหรือยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการรีดักชัน Cr(VI) ก็เป็นไปได้ ขณะที่อุณหภูมิต่ำจะไปจำกัดความสามารถในการส่งถ่ายของไหลข้ามเมมเบรนของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งอาจรบกวนระบบขนส่งสารทำให้ไม่สามารถเข้ามาภายในเซลล์ได้ (Narayani & Shetty, 2013)

สำหรับการเจริญและประสิทธิภาพในการกำจัด Cr(VI) ของแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ ที่มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของโครเมียมเริ่มต้นนั้น ให้ผลการทดลองตามที่คาดไว้ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากความเป็นพิษของโครเมียมที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อการเจริญและจำกัดความสามารถในการกำจัด Cr(VI) ของแบคทีเรีย ซึ่งเคยมีรายงานระบุว่า Cr(VI) ที่ระดับความเข้มข้น 10-12 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งผลให้เกิดการตัดแปลงสารพันธุกรรมและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระบบเมแทบอลิซึมหรือปฏิกิริยาที่ควบคุมลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียได้ (Me & Frankenberger, 1994) แม้แบคทีเรียจะสามารถกำจัด Cr(VI) ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของโครเมียมต่ำๆ แต่เมื่อเทียบประสิทธิภาพในการกำจัด Cr(VI) ที่ความเข้มข้น 20-25 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ให้ร้อยละการกำจัดสูงกว่าร้อยละ 80 แล้ว ความเข้มข้นโครเมียมในช่วงนี้ก็ยังคงมีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อไปมากกว่า เนื่องจากเป็นความเข้มข้นในระดับที่กำหนดและถูกจำกัดว่าเป็นช่วงความเข้มข้นที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมหากมีการปลดปล่อยออกมา

เมื่อติดตามการกำจัด Cr(VI) ของแบคทีเรียทั้งสามที่เวลาต่างกันพบว่า แบคทีเรียสามารถกำจัด Cr(VI) ได้ดีเมื่อการเจริญของเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary growth phase) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับทฤษฎีคลอรัมเซนซิง (Quorum sensing theory) ที่กล่าวว่า เมื่ออัตราการเจริญของแบคทีเรียมีค่าคงที่ (เข้าสู่ระยะคงที่) การแสดงออกของระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึม (Metabolize) สารแปลกปลอมจะเกิดได้อย่างสมบูรณ์ (Swift et al., 1996) สำหรับผลของแหล่งคาร์บอนที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในการรีดิวซ์ Cr(VI) ของแบคทีเรียทั้งสามชนิดนั้น พบว่าทริปโตเนนเป็นแหล่งคาร์บอนหลักที่เหมาะสมจะใช้เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในการเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสามชนิด ซึ่งตรงกับข้อเท็จจริงที่ว่าแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นมีความหลากหลายขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย และ *Bacillus* sp. ส่วนใหญ่ต้องการทริปโตเนนหรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ (Kathiravan et al., 2010) เมื่อทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ Cr(VI) ในสถานะที่มีไอออนโลหะปนเปื้อน ซึ่งมักเป็นสถานะปกติของน้ำทิ้งที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมพบว่า การมีอยู่ของ  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  และ  $\text{Ba}^{2+}$  ไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการรีดักชัน Cr(VI) ของแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ ในทางตรงกันข้ามกับช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการรีดักชัน Cr(VI) อีกด้วย ซึ่งให้ผลตรงกันข้ามกับผลการวิจัยที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ว่า  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  และ  $\text{Fe}^{3+}$  จะไปรบกวนการรีดิวซ์ Cr(VI) ของแบคทีเรียได้ (Ishibashi et al., 1990; Opperman et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยระบุว่าไอออนของโลหะบางชนิด ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (co-factor) ของเอนไซม์โครเมตรีดักเทสในแบคทีเรีย ยกตัวอย่างเช่น  $\text{Mg}^{2+}$  สำหรับเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของ *Thermus scotoductus* SA-01 (Opperman et al., 2008) เป็นต้น ผลการทดลองที่ได้จาก *B. megaterium* ที่พบว่า  $\text{Ag}^+$  และ  $\text{Hg}^{2+}$  สามารถยับยั้งการรีดักชัน Cr(VI) อย่างสมบูรณ์นั้นสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่พบใน *Pseudomonas putida* PRS2000 (Ishibashi et al., 1990) ที่ระบุว่า  $\text{Ag}^+$  และ  $\text{Hg}^{2+}$  ยับยั้งการรีดักชันของ Cr(VI) อย่างสมบูรณ์เนื่องจากไปออกซิไดส์หมู่ซัลไฮไดรล (sulfhydryl group) ที่อยู่ในบริเวณแอคทีฟของเอนไซม์นั่นเอง (Rath et al., 2014) และเมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการกำจัด Cr(VI) ของแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิของประเทศเขตร้อน และในช่วงค่าพีเอชเป็นกลางถึงด่าง เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของโครเมียมที่ 20-25 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้น

ที่สูงกว่าค่ามาตรฐานโครเมียมที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมแล้ว ก็แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของ  
แบบที่เรียทั้งสามชนิดนี้ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำทิ้งจริงที่มีการปนเปื้อนของ Cr(VI) ต่อไป

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ค้นพบแบคทีเรียสามสายพันธุ์ในสกุล *Bacillus* ได้แก่ *B. megaterium*, *B. cereus* และ *B. subtilis* ที่แสดงศักยภาพในการรีดักชัน Cr(VI) ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 20-30 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อย่างสมบูรณ์ ในสภาวะที่มีเกลือ ค่าพีเอชเป็นกลาง และอุณหภูมิห้อง (30-45 องศาเซลเซียส) โดยไม่ต้องการตัวรับอิเล็กตรอนเพิ่มเติมในปฏิกิริยารีดักชัน และไม่ถูกรบกวนประสิทธิภาพในการกำจัดอย่างรุนแรงจากการปนเปื้อนของโลหะหนัก ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ในการกำจัด Cr(VI) ที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้ง และยังเป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการรวบรวมความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถรีดักชันโครเมียมอีกด้วย



## บรรณานุกรม

- กรมโรงงานอุตสาหกรรม. (2549). คู่มือมาตรฐานการตรวจสอบโรงงานฟอกหนัง. สำนักโรงงานอุตสาหกรรม  
รายสาขา 2. กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 75 หน้า.
- Adeel, S. S., Wajid, A., Hussain, S., Malik, F., Sami, Z., Ul-Haq, I., Hameed, A., Channa, R. A.  
(2012). Recovery of chromium from the tannery wastewater by use of *Bacillus subtilis*  
in Gujranwala, Pakistan. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 2 (2): 36-  
45.
- Aksu, Z., Balibek, E. (2007). Chromium (VI) biosorption by dried *Rhizopus arrhizus*: Effect of  
salt (NaCl) concentration on equilibrium and kinetic parameters. Journal of Hazardous  
Materials. 145 (1): 210-220.
- American Public Health Association. (1989). Water Environment Federation Standard methods  
for the examination of water and wastewater.
- Anger, G., Halstenberg, J., Hochgeschwender, K., Scherhag, C., Korallus, U., Knopf, H., Ohlinger,  
M. (2005). Chromium compounds. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry.  
252.
- Bopp, L. H., Elrich, H. L. (1988). Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas*  
*fluorescens* strain LB 300. Archives Microbiology. 150: 426-431.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram  
quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical  
Biochemistry. 72 (1-2): 248-254.
- Bryson, P.D. (1996). Comprehensive reviews in toxicology: for emergency clinicians. CRC press.  
318.
- Buranasilp, K., Charoenpanich, J. (2011). Biodegradation of acrylamide by *Enterobacter*  
*aerogenes* isolated from wastewater in Thailand. Journal of Environmental Sciences.  
23 (3): 396-403.
- Charoenpanich, J., Soongrung, T., Chinnasri, S., Suebchuea, N., Suppoontong, M., Thiemsawait,  
S. (2018). A novel broad-temperature active and solvent stable esterase from a newly  
isolated *Bacillus aerophilus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 13: 116-122.
- Cheung, K. H., Gu, J. D. (2005). Chromate reduction by *Bacillus megaterium* TKW3 isolated  
from marine sediments. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21 (3): 213-  
219.
- Cornelis, R., Caruso, J. A., Crews, H., Heumann, K. G. (2005). Handbook of elemental  
speciation II: species in the environment, food, medicine and occupational health.  
John Wiley & Sons. 254.
- Cronje, K. J., Chetty, K., Carsky, M., Sahu, J. N., Meikap, B. C. (2011). Optimization of chromium  
(VI) sorption potential using developed activated carbon from sugarcane bagasse with  
chemical activation by zinc chloride. Desalination. 275: 276-284.

- Dadrasnia, A., Chuan Wei, K. S., Shahsavari, N., Azirun, M. S., Ismail, S. (2015). Biosorption potential of *Bacillus salmalaya* strain 139SI for removal of Cr (VI) from aqueous solution. *International Journal of Environmental Research and Public health*. 12 (12): 15321-15338.
- Dakiky, M., Khamis, M., Manassra, A., Mer'eb, M. (2002). Selective adsorption of chromium (VI) in industrial wastewater using low-cost abundantly available adsorbents. *Advances in Environmental Research*. 6 (4): 533-540.
- Das, S., Mishra, J., Das, S. K., Pandey, S., Rao, D. S., Chakraborty, A., Sudarshan, M., Das, N., Thatoi, H. (2014). Investigation on mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. *Chemosphere*. 96: 112-121.
- Dhal, B., Thatoi, H. N., Das, N. N., Pandey, B. D. (2010). Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus* sp. isolated from chromite mine soils and characterization of reduced product. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 85: 1471-1479.
- Dhal, B., Thatoi, H. N., Das, N. N., Pandey, B. D. (2013). Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review. *Journal of Hazardous Materials*. 250: 272-291.
- Dhaneshwar, R. S. (1990). Tannery wastewater treatment and disposal-state of art. *Indian Journal of Environmental Protection*. 10: 131-141.
- Dönmez, G., Aksu, Z. (2002). Removal of chromium (VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. *Process Biochemistry*. 38 (5): 751-762.
- Durai, G., Rajasimman, M. (2011). Biological treatment of tannery wastewater-A review. *Journal of Environmental Science and Technology*. 4 (1): 1-17.
- Eastaugh, N., Walsh, V., Chaplin, T., Siddall, R. (2007). *Pigment compendium: a dictionary of historical pigments*. Routledge. 38-39.
- Eckenfedler Jr., W. W. (1989). *Industrial Water Pollution Control*. McGraw Hill Book Company. New York.
- Focardi, S., Pepi, M., Landi, G., Gasperini, S., Ruta, M., Di Biasio, P., Focardi, S.E. (2012). Hexavalent chromium reduction by whole cells and cell free extract of the moderate halophilic bacterial strain *Halomonas* sp. TA-04. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 66 (1): 63-70.
- Fouassier, J. P., Rabek, J. F. (Eds.). (1993). *Radiation curing in polymer science and technology: Practical aspects and applications (Vol. 4)*. Springer Science & Business Media.
- Francis, C. A., Obratsova, A. Y., Tebo, B. M. (2002). Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (2): 543-548.
- Fruchter, J. S., Cole, C. R., Williams, M. D., Vermeul, V. R., Amonette, J. E., Szecsody, J. E., Humphrey, M. D. (2000). Creation of a subsurface permeable treatment zone for

- aqueous chromate contamination using in situ redox manipulation. *Groundwater Monitoring and Remediation*. 20 (2): 66-77.
- Garg, U. K., Kaur, M. P., Sud, D., Garg, V. K. (2009). Removal of hexavalent chromium from aqueous solution by adsorption on treated sugarcane bagasse using response surface methodological approach. *Desalination*. 249 (2): 475-479.
- Gnanamani, A., Kavitha, V., Radhakrishnan, N., Rajakumar, G. S., Sekaran, G., Mandal, A. B. (2010). Microbial products (biosurfactant and extracellular chromate reductase) of marine microorganism are the potential agents reduce the oxidative stress induced by toxic heavy metals. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 79 (2): 334-339.
- Goltara, A., Martinez, J., Mendez, R. (2003). Carbon and nitrogen removal from tannery wastewater with a membrane bioreactor. *Water Science and Technology*. 48 (1): 207-214.
- Gopalan, R., Veeramani, H. (1994). Studies on microbial chromate reduction by *Pseudomonas* sp. in aerobic continuous suspended growth cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 43 (6): 471-476.
- Guha, H., Jayachandran, K., Maurrasse, F. (2001). Kinetics of chromium (VI) reduction by a type strain *Shewanella* alga under different growth conditions. *Environmental Pollution*. 115 (2): 209-218.
- Gupta, V. K., Shrivastava, A. K., Jain, N. (2001). Biosorption of chromium (VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species. *Water Research*. 35 (17): 4079-4085.
- Hamadia, N. K., Chena, X. D., Farid, M. M., Lub, M. G. Q. (2001). Adsorption kinetics for the removal of chromium (VI) from aqueous solution by adsorbents derived from used tyres and sawdust. *Chemical Engineering Journal*. 84: 95-105.
- Han, X., Wong, Y. S., Wong, M. H., Tam, N. F. Y. (2007). Biosorption and bioreduction of Cr (VI) by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. *Journal of Hazardous Materials*. 146 (1): 65-72.
- Haydar, S., Aziz, J. A., Ahmad, M. S. (2007). Biological treatment of tannery wastewater using activated sludge process. *Pakistan Journal of Engineering and Applied Science*. 1: 61-66.
- He, M., Li, X., Liu, H., Miller, S. J., Wang, G., Rensing, C. (2011). Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1. *Journal of Hazardous Materials*. 185 (2): 682-688.
- Hinteregger, C., Streichsbier, F. (1997). *Halomonas* sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic wastewater. *Biotechnology Letters*. 19: 1099-1102.
- Ilias, M., Rafiqullah, I. M., Debnath, B. C., Mannan, K. S. B., Hoq, M. M. (2011). Isolation and characterization of chromium (VI)-reducing bacteria from tannery effluents. *Indian Journal of Microbiology*. 51 (1): 76-81.

- Ishibashi, Y., Cervantes, C., Silver, S. (1990). Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. Applied and Environmental Microbiology. 56 (7): 2268-2270.
- Jacobs, J., Hardison, R. L., Rose, J. V. (2001). In situ remediation of heavy metals using sulfur-based treatment technologies. Hydrovisions. 10 (2): 1-4.
- Jawahar, A. J., Chinnadurai, M., Ponselvan, J. K. S., Annadurai, G. (1998). Pollution from tanneries and options for treatment of effluent. Industrial Journal of Environmental Protection. 18: 672.
- Kadam, R. V. (1990). Treatment of tannery wastes. Industrial Journal of Environmental Protection. 10: 212.
- Kadirvelu, K., Thamaraiselvi, K., Namasivayam, C. (2001). Removal of heavy metals from industrial wastewaters by adsorption onto activated carbon prepared from an agricultural solid waste. Bioresources Technology. 76: 63-65.
- Kargi, F., Uygur, A. (1997). Biological treatment of saline wastewater in a rotating biodisc contactor by using halophilic organisms. Bioprocess and Biosystems Engineering. 17: 81-85.
- Kathiravan, M. N., Karthick, R., Muthu, N., Muthukumar, K., Velan, M. (2010). Sonoassisted microbial reduction of chromium. Applied Biochemistry and Biotechnology. 160 (7): 2000-2013.
- Katz, S. A., Salem, H. (1994). The biological and environmental chemistry of chromium. VCH Publishers
- Khambhaty, Y., Mody, K., Basha, S., & Jha, B. (2009). Kinetics, equilibrium and thermodynamic studies on biosorption of hexavalent chromium by dead fungal biomass of marine *Aspergillus niger*. Chemical Engineering Journal. 145 (3): 489-495.
- Khan, S. R., Kawaja, M. A., Khan, A. M., Ghani, H., Kazmi, S. (1999). Environmental impacts and mitigation costs associated with cloth and leather exports from Pakistan. A Report on Trade and Sustainable Development Submitted by Sustainable Development Policy Institute and IUCNP to IISD Canada for the IISD/IUCN/IDRC Project on Building Capacity for Trade and Sustainable Development in Developing Countries, Islamabad.
- Kim, C., Zhou, Q., Deng, B., Thornton, E. C., Xu, H. (2001). Chromium (VI) reduction by hydrogen sulfide in aqueous media: stoichiometry and kinetics. Environmental Science and Technology. 35(11): 2219-2225.
- Kotaš, J., Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. Environmental Pollution. 107 (3): 263-283.
- Kubo, M., Hiroe, J., Murakami, M., Fukami, H., Tachiki, T. (2001). Treatment of hypersaline-containing wastewater with salt-tolerant microorganisms. Journal of Bioscience and Bioengineering. 91 (2): 222-224.

- Kumar, R., Bishnoi, N. R., Bishnoi, K. (2008). Biosorption of chromium (VI) from aqueous solution and electroplating wastewater using fungal biomass. *Chemical Engineering Journal*. 135 (3): 202-208.
- Laxman, R. S., More, S. (2002). Reduction of hexavalent chromium by *Streptomyces griseus*. *Mineral Engineering*. 15: 831-837.
- Lee, D. C., Park, C. J., Yang, J. E., Jeong, Y. H., Rhee, H. I. (2000). Screening of hexavalent chromium biosorbent from marine algae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54 (3): 445-448.
- Lefebvre, O., Vasudevan, N., Torrijos, M., Thanasekaran, K., Moletta, R. (2005). Halophilic biological treatment of tannery soaks liquor in a sequencing batch reactor. *Water Research*. 39: 1471-1480.
- Liu, X., Wu, G., Zhang, Y., Wu, D., Li, X., Liu, P. (2015). Chromate reductase YieF from *Escherichia coli* enhances hexavalent chromium resistance of human HepG2 cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 16 (6): 11892-11902.
- Liu, Y. G., Xu, W. H., Zeng, C. M., Tang, C. F., Li, C. F. (2004). Experimental study on reduction by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Environmental Science*. 16: 795-801.
- Liu, G., Yang, H., Wang, J., Jin, R., Zhou, J., Lv, H. (2010). Enhanced chromate reduction by resting *Escherichia coli* cells in the presence of quinine redox mediators. *Bioresource Technology*. 101: 8127-8131.
- Lofrano, G., Meriç, S., Zengin, G. E., Orhon, D. (2013). Chemical and biological treatment technologies for leather tannery chemicals and wastewaters: a review. *Science of the Total Environment*. 461: 265-281.
- Mala, J. G. S., Sujatha, D., Rose, C. (2015). Inducible chromate reductase exhibiting extracellular activity in *Bacillus methylotrophicus* for chromium bioremediation. *Microbiological Research*. 170: 235-241.
- Malaviya, P., Singh, A. (2016). Bioremediation of chromium solutions and chromium containing wastewaters. *Critical Reviews in Microbiology*. 42 (4): 607-633.
- Malkoc, E., Nuhoglu, Y. (2007). Potential of tea factory waste for chromium (VI) removal from aqueous solutions: thermodynamic and kinetic studies. *Separation and Purification Technology*. 54 (3): 291-298.
- McLean, J. S., Beveridge, T. J. (2001). Chromate reduction by a *Pseudomonas* isolated from a site contaminated with chromate copper arsenate. *Applied Environmental Microbiology*. 67: 1076-1084.
- Meghataj, M., Avudaibayagaru, S., Naidu, R. (2003). Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. *Current Microbiology*. 47: 51-54.
- Miransari, M. (2011). Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnology Advances*. 29 (6): 645.

- Mohanty, K., Jha, M., Meikap, B. C., Biwas, M. N. (2006). Biosorption of Cr (VI) from aqueous solutions by *Eichhornia crassipes*. Chemical Engineering Journal. 117: 71-77.
- Moon, B. H., Seo, G. T., Lee, T. S., Kim, S. S., Yoon, C. H. (2003). Effects of salt concentration on floc characteristics and pollutants removal efficiencies in treatment of seafood wastewater by SBR. Water Science and Technology. 47 (1): 65-70.
- Murugavelh, S., Mohanty, K. (2012). Bioreduction of hexavalent chromium by live and active *Phanerochaete chrysosporium*: kinetics and modeling. Clean Soil Air Water. 40: 746-751.
- Nandy, T., Kaul, S. N., Shastry, S., Manivel, W., Deshpande, C. V. (1999). Waste-water management in cluster of tanneries in Tamilnadu through implementation of common treatment plants. Journal of Science Industrial and Research. 58: 475-516.
- Narayani, M., Shetty, K. V. (2013). Chromium-resistant bacteria and their environmental condition for hexavalent chromium removal: a review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 43 (9): 955-1009.
- Netzer, A., Wilkinson, P., Beszedits, S. (1974). Removal of trace metals from wastewater by treatment with lime and discarded automotive tires. Water Research. 8: 813-817.
- Opperman, D. J., Piater, L. A., van Heerden, E. (2008). A novel chromate reductase from *Thermus scotoductus* SA-01 related to old yellow enzyme. Journal of Bacteriology. 190 (8): 3076-3082.
- Pal, A., Dutta, S., Paul, A.K. (2005). Reduction of hexavalent chromium by cell-free extract of *Bacillus sphaericus* AND 303 isolated from serpentine soil. Current microbiology. 51 (5): 327-330.
- Patra, R. C., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R. (2010). Molecular characterization of chromium (VI) reducing potential in Gram positive bacteria isolated from contaminated sites. Soil Biology and Biochemistry. 42 (10): 1857-1863.
- Pattanapitpaisal, P., Brown, N., Macaskie, L. (2001). Chromate reduction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI)-contaminated site. Applied Microbiology and Biotechnology. 57 (1): 257-261.
- Philip, L., Iyengar, L., Venkobachar, C. (1998). Cr (VI) reduction by *Bacillus coagulans* isolated from contaminated soils. Journal of Environmental Engineering. 124: 1165-1170.
- Pillai, P., Mandge, S., Archana, G. (2011). Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13. Process Biochemistry. 46: 1110-1117.
- Pohanish, R. P. (2008). Sittig's handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens. William Andrew.
- Rajamani, S., Ramasami, T., Langerwerf, J. S. A., Schappman, J. E. (1995). Environmental management in tanneries-feasible chromium recovery and reuse system. Proceedings

- of the 3<sup>rd</sup> International Conference on Appropriate Waste Management Technologies for Developing Countries, (AWMTDC'95), Nagpur, India, pp: 965-969.
- Ramanujam, R. A., Ganesh, R., Kandasamy, J. (2009). Wastewater treatment technology for tanning industry. In Vigneswaran, S. ed. Water and Wastewater Treatment Technologies. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS) Publishers, Ontario, Canada.
- Ran, Z. H. A. O., Bi, W. A. N. G., CAI, Q. T., LI, X. X., Min, L. I. U., Dong, H. U., Chun, F. A. N. (2016). Bioremediation of hexavalent chromium pollution by *Sporosarcina saromensis* M52 isolated from offshore sediments in Xiamen, China. Biomedical and Environmental Sciences. 29 (2): 127-136.
- Ranganathan, K. (2000). Chromium removal by activated carbons prepared from *Casurina equisetifolia* leaves. Bioresources Technology. 73: 99-103.
- Rao, J. R., Thanikavelan, P., Sreeram, K. J., Nair, B. U. (2002). Green route for the utilization of chrome shavings (chromium-containing solid waste) in tanning industry. Environmental Science and Technology. 36: 1372-1376.
- Rath, B. P., Das, S., Mohapatra, P. K. D., Thatoi, H. (2014). Optimization of extracellular chromate reductase production by *Bacillus amyloliquefaciens* (CSB 9) isolated from chromite mine environment. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 3 (3): 35-41.
- Rehman, F., Faisal, M. (2015). Toxic hexavalent chromium reduction by *Bacillus pumilis*, *Cellulosimicrobium cellulans* and *Exiguobacterium*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 33 (3): 585-589.
- Rieuwerts, J. (2015). The Elements of Environmental Pollution. Routledge.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 74 (12): 5463-5467.
- Santos, C. A., Vieira, A. M., Fernandes, H. L., Empis, J. A., Novais, J. M. (2001). Optimisation of the biological treatment of hypersaline wastewater from *Dunaliella salina* carotenogenesis. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 76: 1147-1153.
- Sau, G. B., Chatterjee, S., Mukherjee, S. K. (2010). Chromate reduction by cell-free extract of *Bacillus firmus* KUCr1. Polish Journal of Microbiology. 59 (3): 185-190.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. Environment International. 31 (5): 739-753.
- Shen, H. and Wang, Y. T. (1995). Hexavalent chromium removal in two stage bioreactor system. Journal of Environmental Engineering. 121: 798-804.
- Sheng, P. X., Tan, L. H., Chen, J. P., Ting, Y. P. (2005). Biosorption performance of two brown marine algae for removal of chromium and cadmium. Journal of Dispersion Science and Technology. 25 (5): 679-686.

- Sivaprakasarn, S., Mahadevan, S., Sekar, S., Rajakumar, S. (2008). Biological treatment of tannery wastewater by using salt-tolerant bacterial strains. *Microbial Cell Factories*. 7: 15.
- Sundar, J. V., Raghavrao, J., Muralidharan, C., Mandal, A. B. (2011). Recovery and utilization of chromium-tanned proteinous wastes of leather making: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 41: 2048-75.
- Swift, S., Throup, J. P., Williams, P., Salmond, G. P., Stewart, G.S. (1996). Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends in Biochemical Sciences*. 21: 214-219.
- Tencer, M. (2006). Electrical conductivity of chromate conversion coating on electrodeposited zinc. *Applied Surface Science*. 252 (23): 8229-8234.
- Terahara, T., Xu, X., Kobayashi, T., Imada, C. (2015). Isolation and characterization of Cr (VI)-reducing *Actinomycetes* from estuarine sediments. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 175 (7): 3297-3309.
- Tewari, N., Vasudevan, P., Guha, B. K. (2005). Study on biosorption of Cr (VI) by *Mucorhiemalis*. *Biochemical Engineering Journal*. 23 (2): 185-192.
- Thanyacharoen, U., Tani, A., Charoenpanich, J. (2012). Isolation and characterization of *Kluyvera georgiana* strain with the potential for acrylamide biodegradation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 47 (11): 1491-1499.
- Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P., Das, N. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review. *Journal of Environmental Management*. 146: 383-399.
- Thompson-Eagle, E. T., Frankenberger, W. T. (1991). Selenium biomethylation in an alkaline, saline environment. *Water Research*. 25 (2): 231-240.
- Uberoi, N. K. (2003). *Environmental Management*. Excel Books Publisher, New Delhi. pp: 269.
- UNEP, I. PAC (1994) *Tanneries and the Environment—A Technical Guide* (No. 4). Technical Report (2nd Print) Series.
- Uttatree, S., Charoenpanich, J. (2016). Isolation and characterization of a broad pH-and temperature-active, solvent and surfactant stable protease from a new strain of *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 8: 32-38.
- Uttatree, S., Charoenpanich, J. (2018). Purification and characterization of a harsh conditions-resistant protease from a new strain of *Staphylococcus saprophyticus*. *Agriculture and Natural Resources*. 52 (1): 16-23.
- Uttatree, S., Kobtrakool, K., Ketsuk, A., Kaengam, W., Thakolprajak, P., Charoenpanich, J. (2017). A novel metal-tolerant, solvent and surfactant stable protease from a new strain of *Bacillus megaterium*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 12: 228-235.

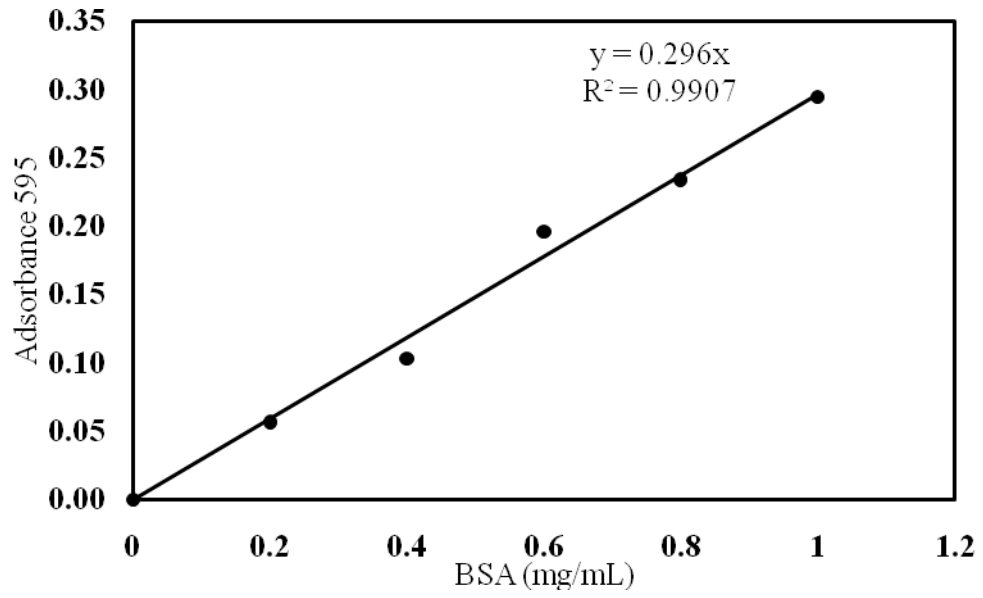


- Uttatree, S., Winayanuwattikun, P., Charoenpanich, J. (2010). Isolation and characterization of a novel thermophilic-organic solvent stable lipase from *Acinetobacter baylyi*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 162 (5): 1362-1376.
- Valdimir, S., Danish, J. M. (2002). Characterization and metal sorptive properties of oxidized active carbon. *Journal of Colloid and Interface Science*. 250: 213-220.
- Verheijen, L. A. H. M., Weirsema, D., Hwshoffpol, L. W., Dewit, J. (1996). Live stock and the environment: finding a balance management of waste from animal product processing. International Agriculture Centre, Wageningen, The Netherlands.
- Verma, A., Chakraborty, S., Basu, J. K. (2006). Adsorption study of hexavalent chromium using tamarind hull-based adsorbents. *Separation and Purification Technology*. 50 (3): 336-341
- Walker, P., Tarn, W. H. (Eds.). (1990). *CRC handbook of metal etchants*. CRC press, 293.
- Wang, Y. T., Shen, H. (1995). Bacterial reduction of hexavalent chromium. *Journal of Industrial Microbiology*. 159-163.
- Wang, Y. T., Shen, H. (1997). Modeling Cr (VI) reduction by pure bacterial cultures. *Water Research*. 31: 727-732.
- Whitacre, D. M. (Ed.). (2012). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*.
- Xu, F., Ma, T., Shi, L., Zhang, J. (2013). Bioreduction of Cr (VI) by *Bacillus* sp. QH-1 isolated from soil under chromium-containing slag heap in high altitude area. *Annual Reviews in Microbiology*. 1-8.
- Yao, H., Guo, L., Jiang, B. H., Luo, J., Shi, X. (2008). Oxidative stress and chromium (VI) carcinogenesis. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 27 (2): 77-88.
- Youssef, A. M., El-Nabarawy, T. H., Samra, S. E. (2004). Sorption properties of chemically-activated carbons 1. Sorption of cadmium (II) ions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 235: 153-163.
- Yu, L. J., Shukla, S. S., Dorris, K. L., Shukla, A., Margrave, J. L. (2003). Adsorption of chromium from aqueous solutions by maple sawdust. *Journal of Hazardous Materials*. 100 (1): 53-63.
- Zheng, Z., Li, Y., Zhang, X., Liu, P., Ren, J., Wu, G., Li, X. (2015). A *Bacillus subtilis* strain can reduce hexavalent chromium to trivalent and an *nfrA* gene is involved. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 97: 90-96.
- Zhu, W., Chai, L., Ma, Z., Wang, Y., Xiao, H., Zhao, K. (2008). Anaerobic reduction of hexavalent chromium by bacterial cells of *Achromobacter* sp. strain Ch1. *Microbiological Research*. 163 (6): 616-623.

ภาคผนวก

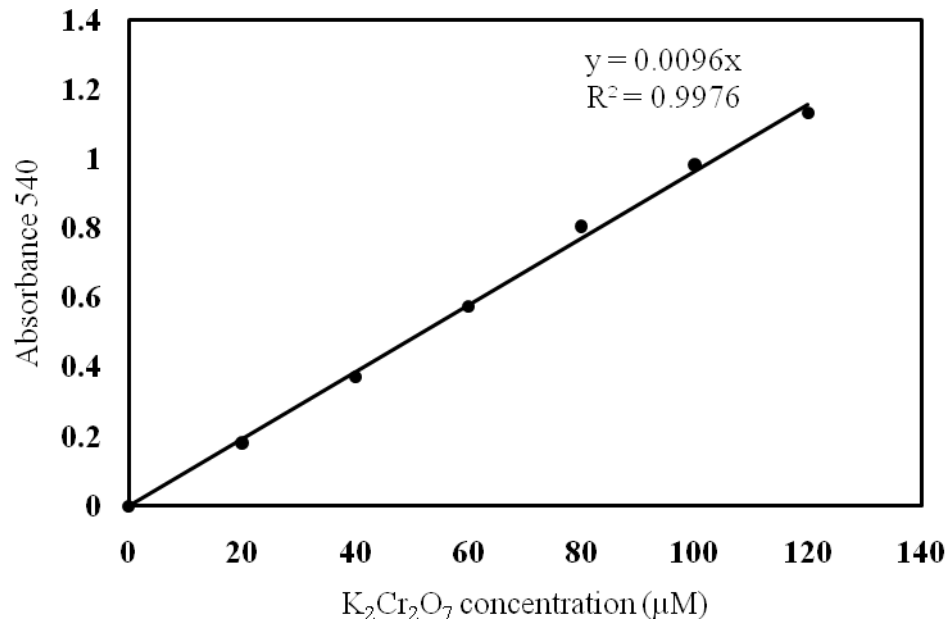
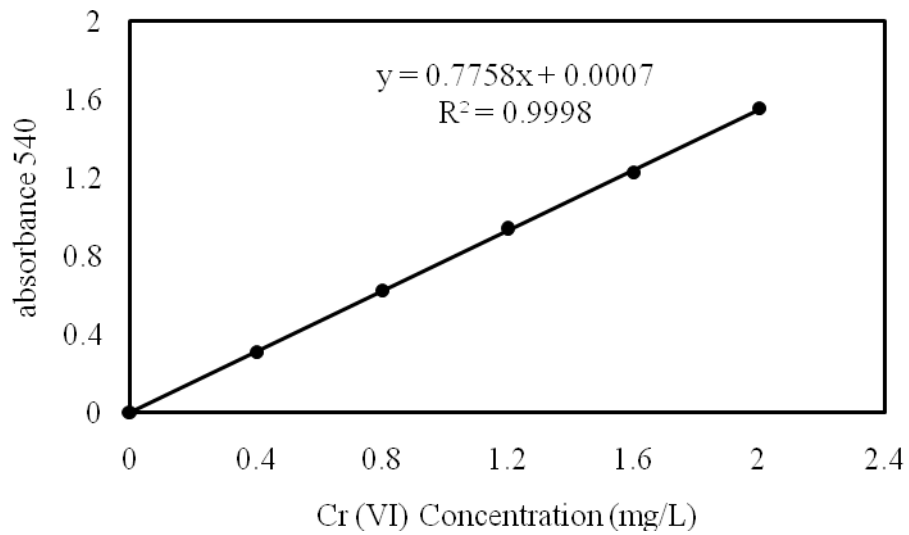
# ภาคผนวกที่ 1

กราฟมาตรฐานของ BSA เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Bradford



## ภาคผนวกที่ 2

กราฟมาตรฐานของ Cr(VI) และ  $K_2Cr_2O_7$  เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี  
1,5-diphenylcarbazide



# ภาคผนวกที่ 3

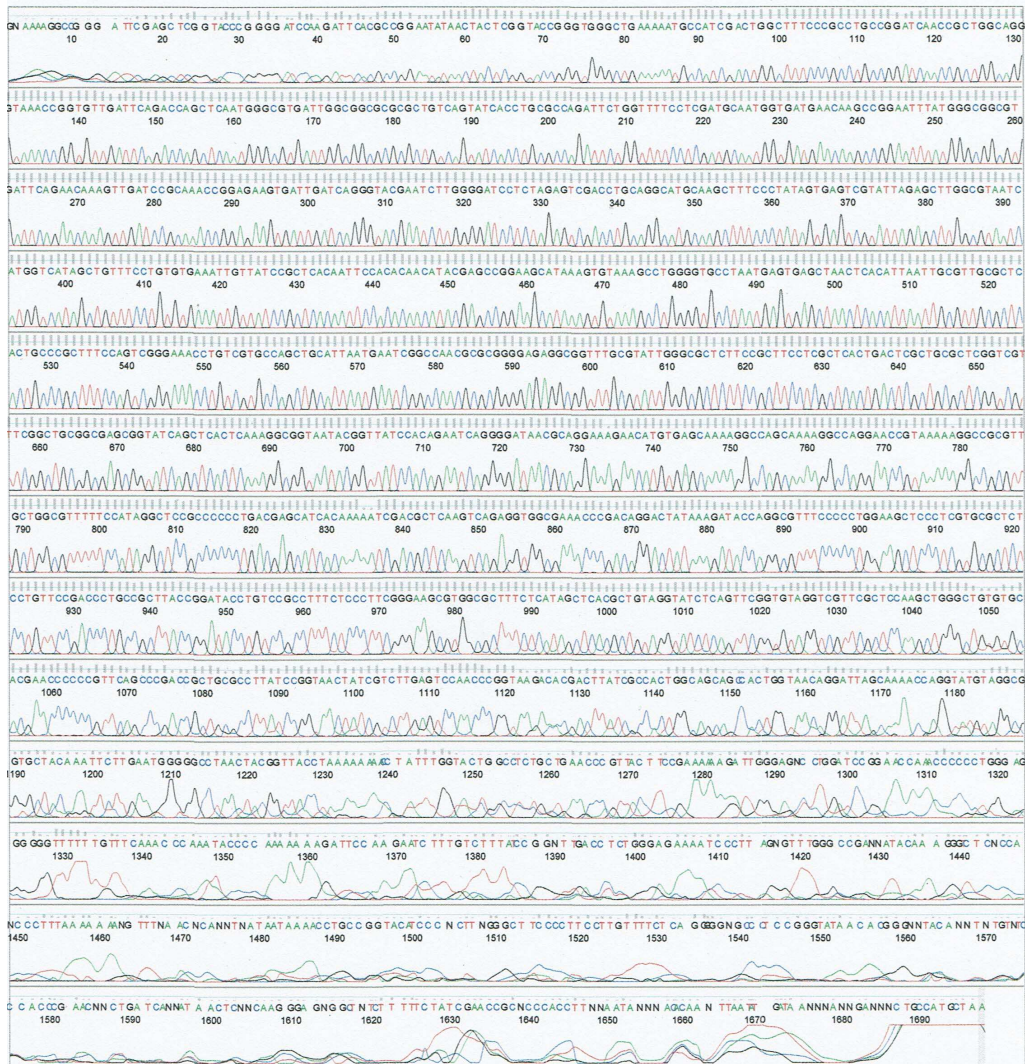
## ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก *Acinetobacter baylyi*

File: 1st\_BASE\_2121674\_Aby3\_M13F\_pUC\_\_40\_.ab1



Sample Name: 2121674\_Aby3\_M13F\_pUC\_\_40\_  
Mobility: KB\_3730\_POP7\_BDTv3.mob  
Spacing: 13.7007  
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 977, C = 967, G = 993, T = 841  
Lane/Cap#: 38  
Matrix: n/a  
Direction: Native





# ภาคผนวกที่ 4

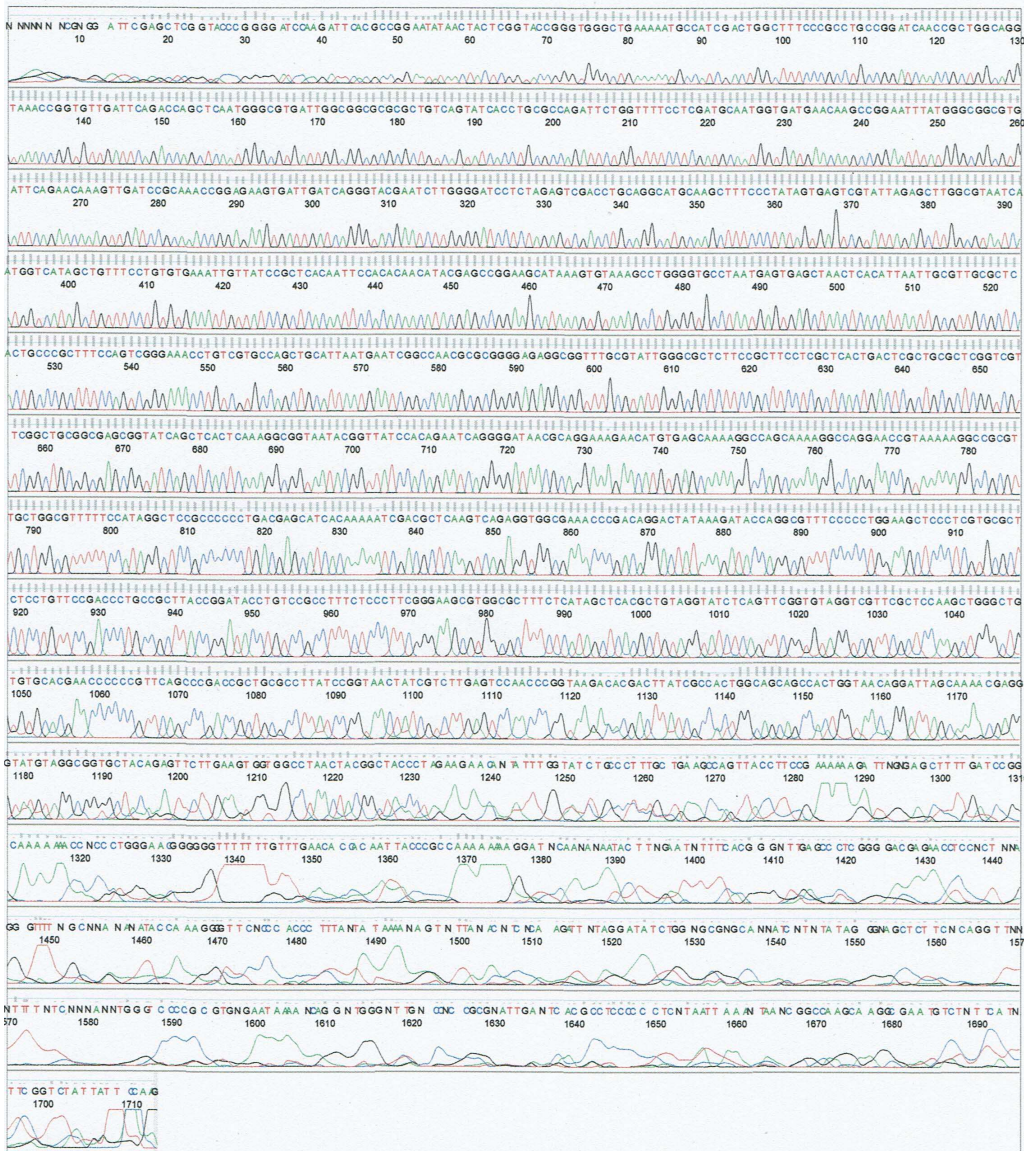
## ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก *Bacillus megaterium*

File: 1st\_BASE\_2109941\_Mega3\_M13F\_pUC\_\_40\_.ab1



Sample Name: 2109941\_Mega3\_M13F\_pUC\_\_40\_  
Mobility: KB\_3730\_POP7\_BDTv3.mob  
Spacing: 14.0337  
Comment: n/a

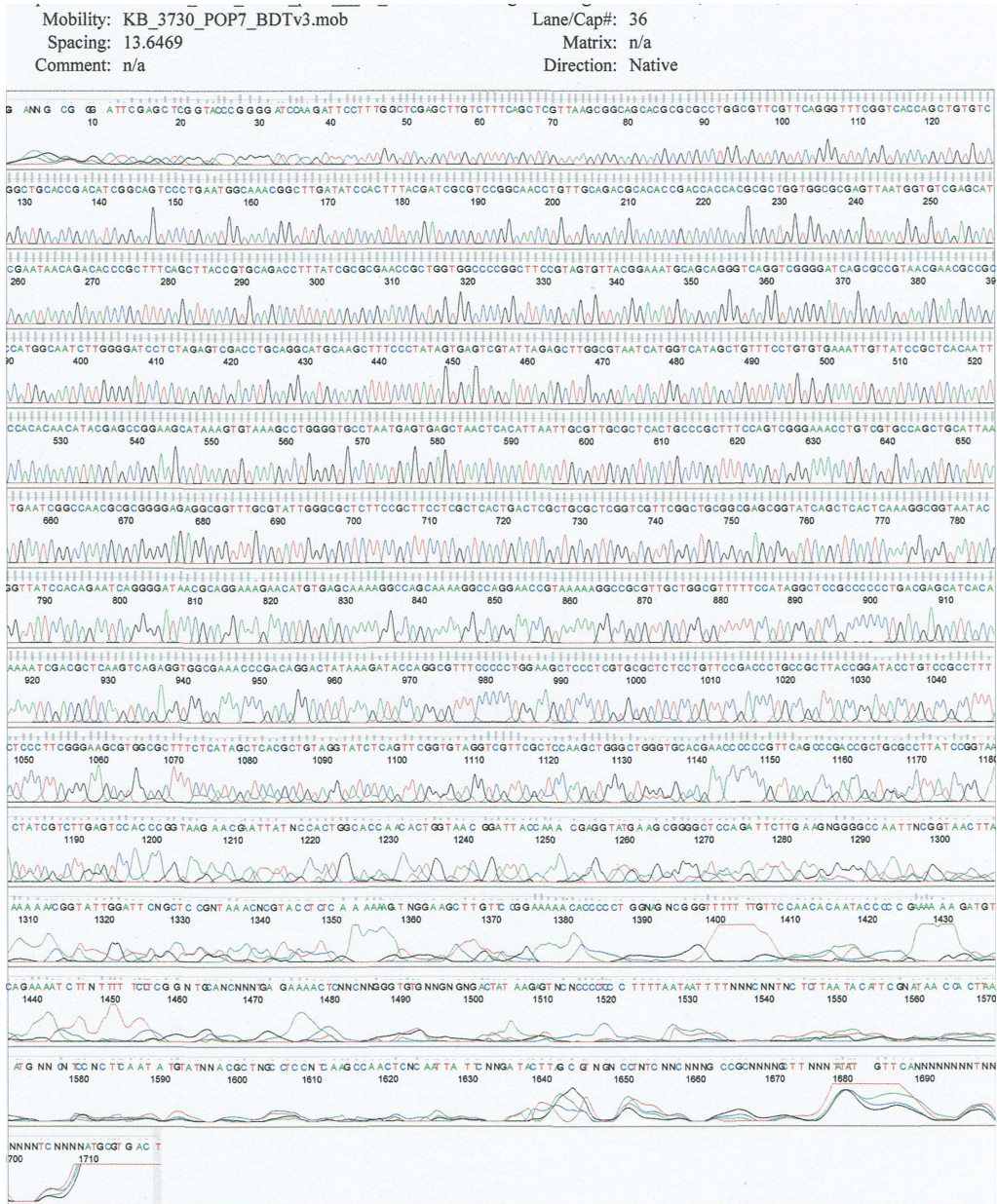
Signal Strengths: A = 714, C = 754, G = 672, T = 646  
Lane/Cap#: 20  
Matrix: n/a  
Direction: Native





# ภาคผนวกที่ 5

## ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก *Bacillus cereus*





# ภาคผนวกที่ 6

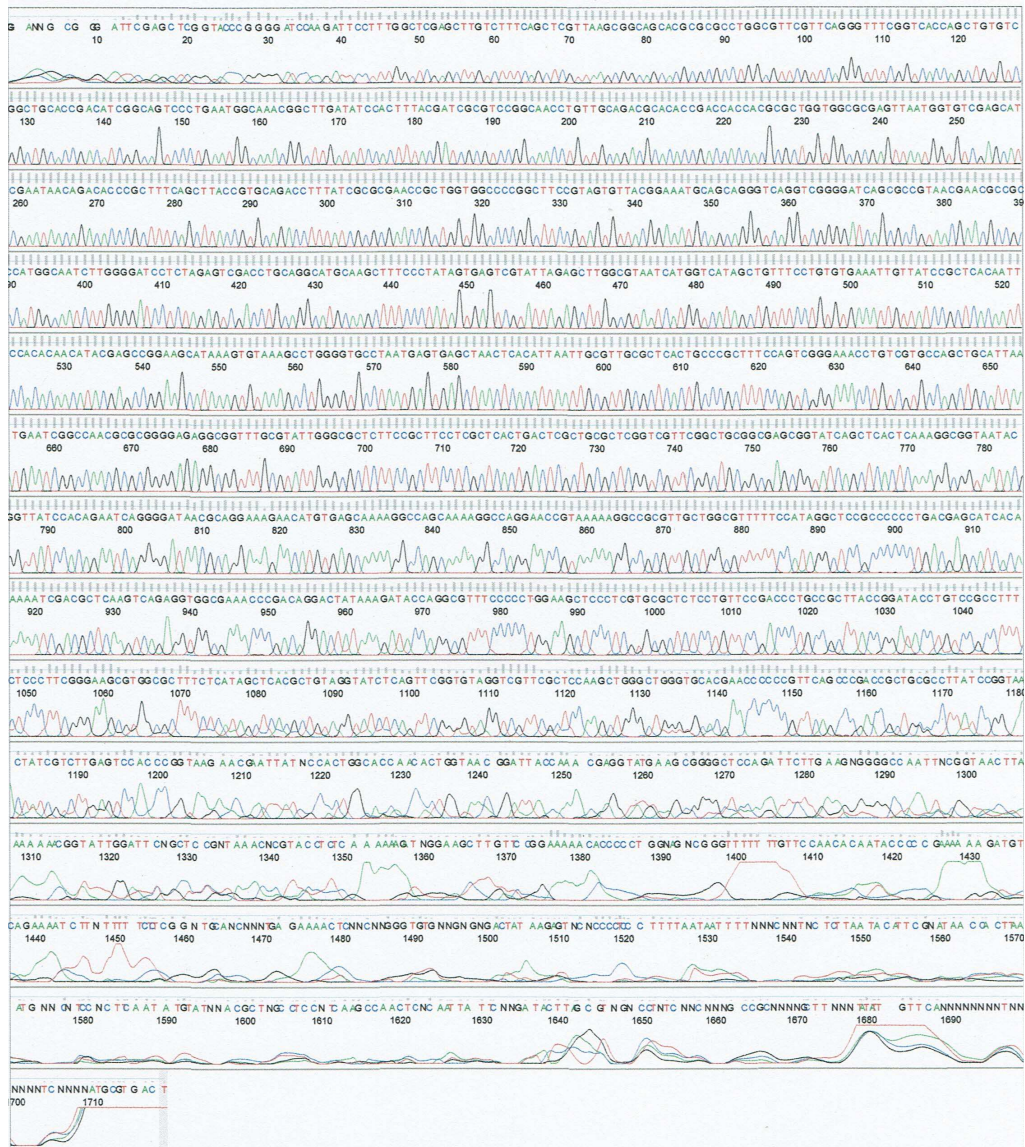
## ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก *Bacillus subtilis*

File: 1st\_BASE\_2121675\_Sub1\_M13F\_pUC\_\_40\_.ab1

Geospiza  
www.geospiza.com

Sample Name: 2121675\_Sub1\_M13F\_pUC\_\_40\_  
Mobility: KB\_3730\_POP7\_BDTv3.mob  
Spacing: 13.6469  
Comment: n/a

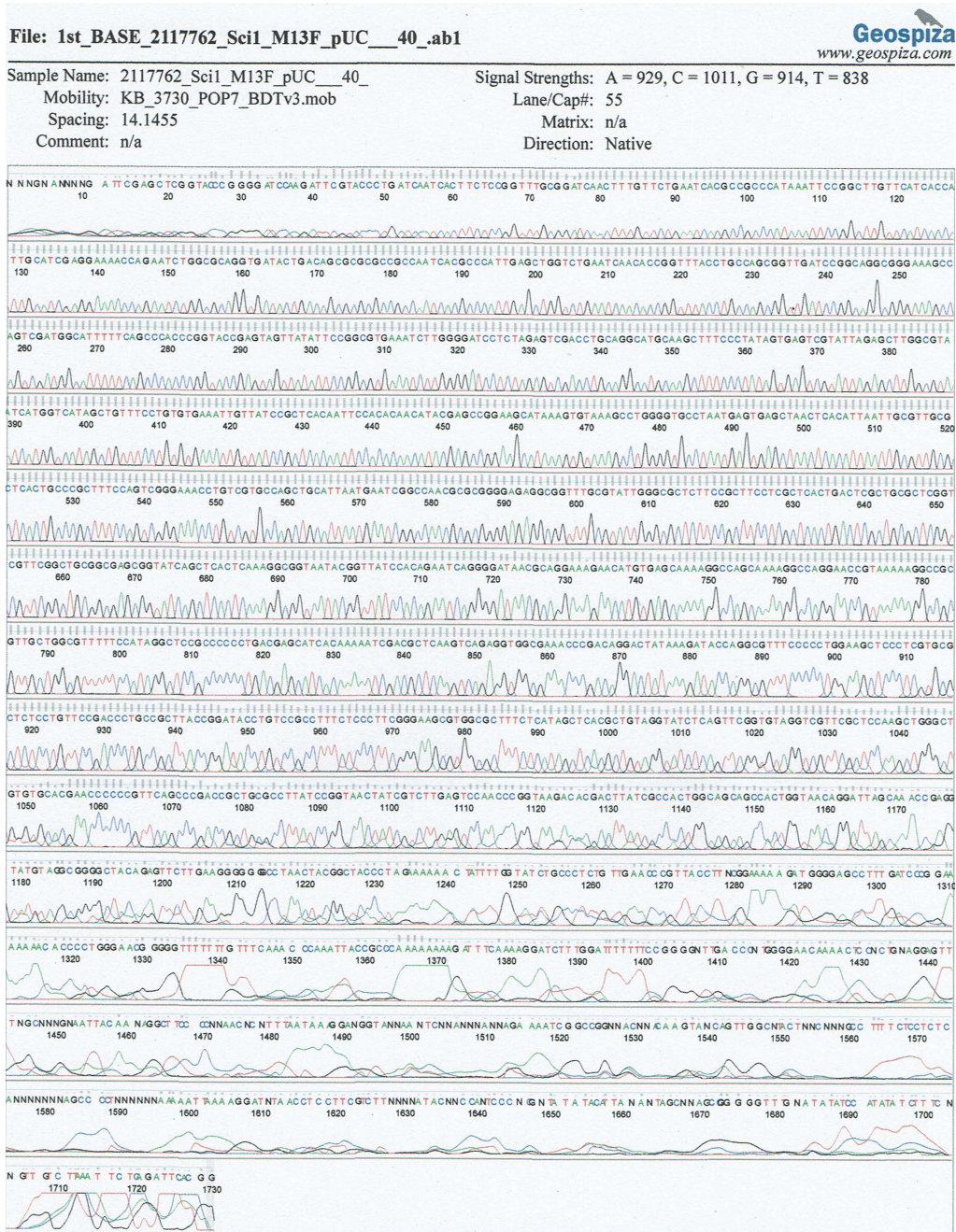
Signal Strengths: A = 1278, C = 1517, G = 1365, T = 1111  
Lane/Cap#: 36  
Matrix: n/a  
Direction: Native





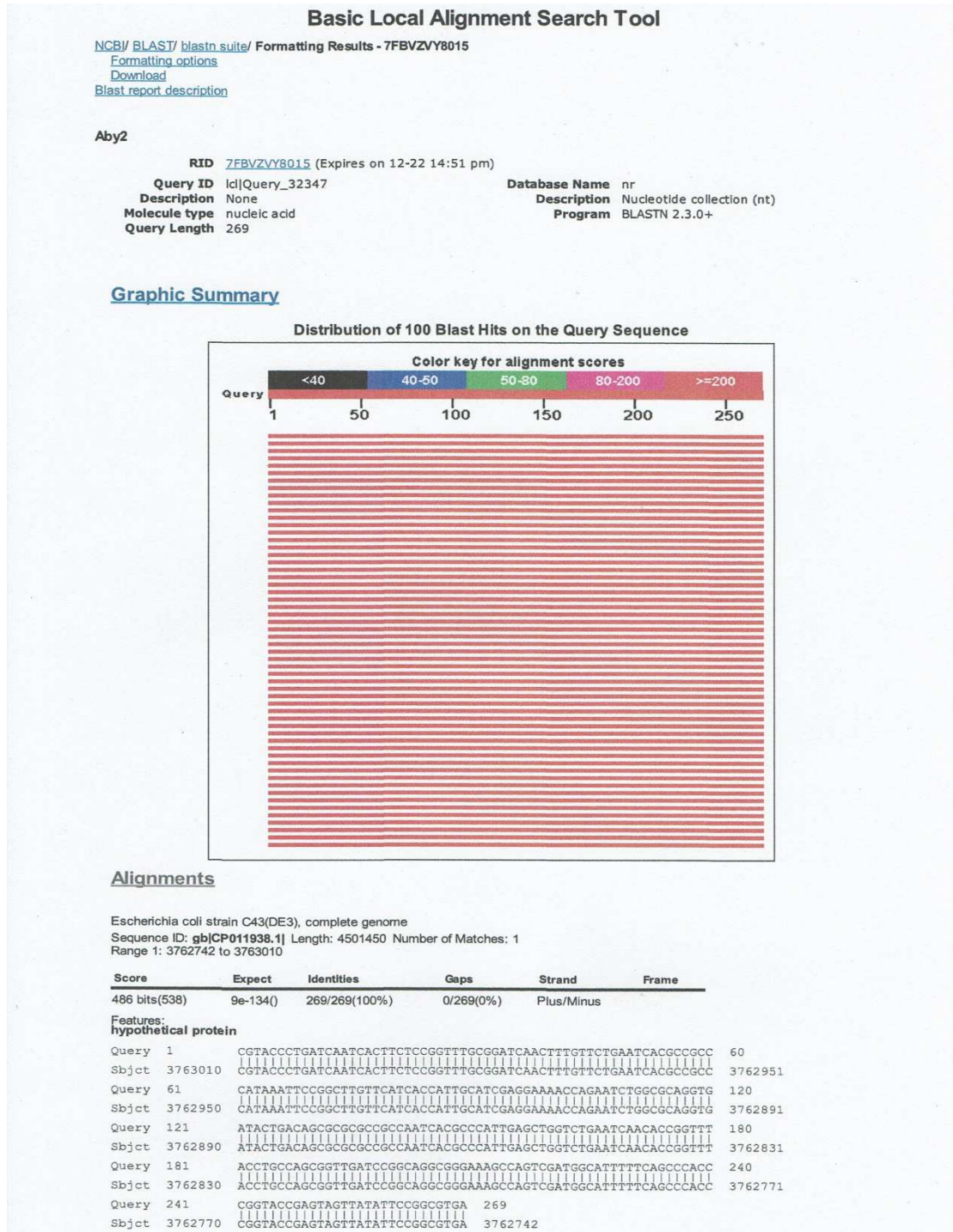
# ภาคผนวกที่ 7

## ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก *Streptococcus sciuri*



## ภาคผนวกที่ 8

ผล BLAST ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ *Acinetobacter baylyi*





Escherichia coli strain C41(DE3), complete genome  
 Sequence ID: **gb|CP010585.1** Length: 4557511 Number of Matches: 1  
 Range 1: 3783683 to 3783951

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	

Features:  
**hypothetical protein**

Query	1	CGTACCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGGCGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	60
Sbjct	3783951	CGTACCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGGCGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	3783892
Query	61	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACAGAACTGGCGCAGGTG	120
Sbjct	3783891	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACAGAACTGGCGCAGGTG	3783832
Query	121	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCAGGCCATTGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT	180
Sbjct	3783831	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCAGGCCATTGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT	3783772
Query	181	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTTTCAGCCACC	240
Sbjct	3783771	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTTTCAGCCACC	3783712
Query	241	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	269
Sbjct	3783711	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	3783683

Escherichia coli 1303, complete genome  
 Sequence ID: **gb|CP009166.1** Length: 4948797 Number of Matches: 1  
 Range 1: 4175501 to 4175769

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	

Features:  
**chromate reductase, class I, flavoprotein**

Query	1	CGTACCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGGCGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	60
Sbjct	4175769	CGTACCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGGCGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	4175710
Query	61	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACAGAACTGGCGCAGGTG	120
Sbjct	4175709	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACAGAACTGGCGCAGGTG	4175650
Query	121	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCAGGCCATTGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT	180
Sbjct	4175649	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCAGGCCATTGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT	4175590
Query	181	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTTTCAGCCACC	240
Sbjct	4175589	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTTTCAGCCACC	4175530
Query	241	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	269
Sbjct	4175529	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	4175501

Escherichia coli BL21(DE3), complete genome  
 Sequence ID: **emb|AM946981.2** Length: 4558947 Number of Matches: 1  
 Range 1: 3783677 to 3783945

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	

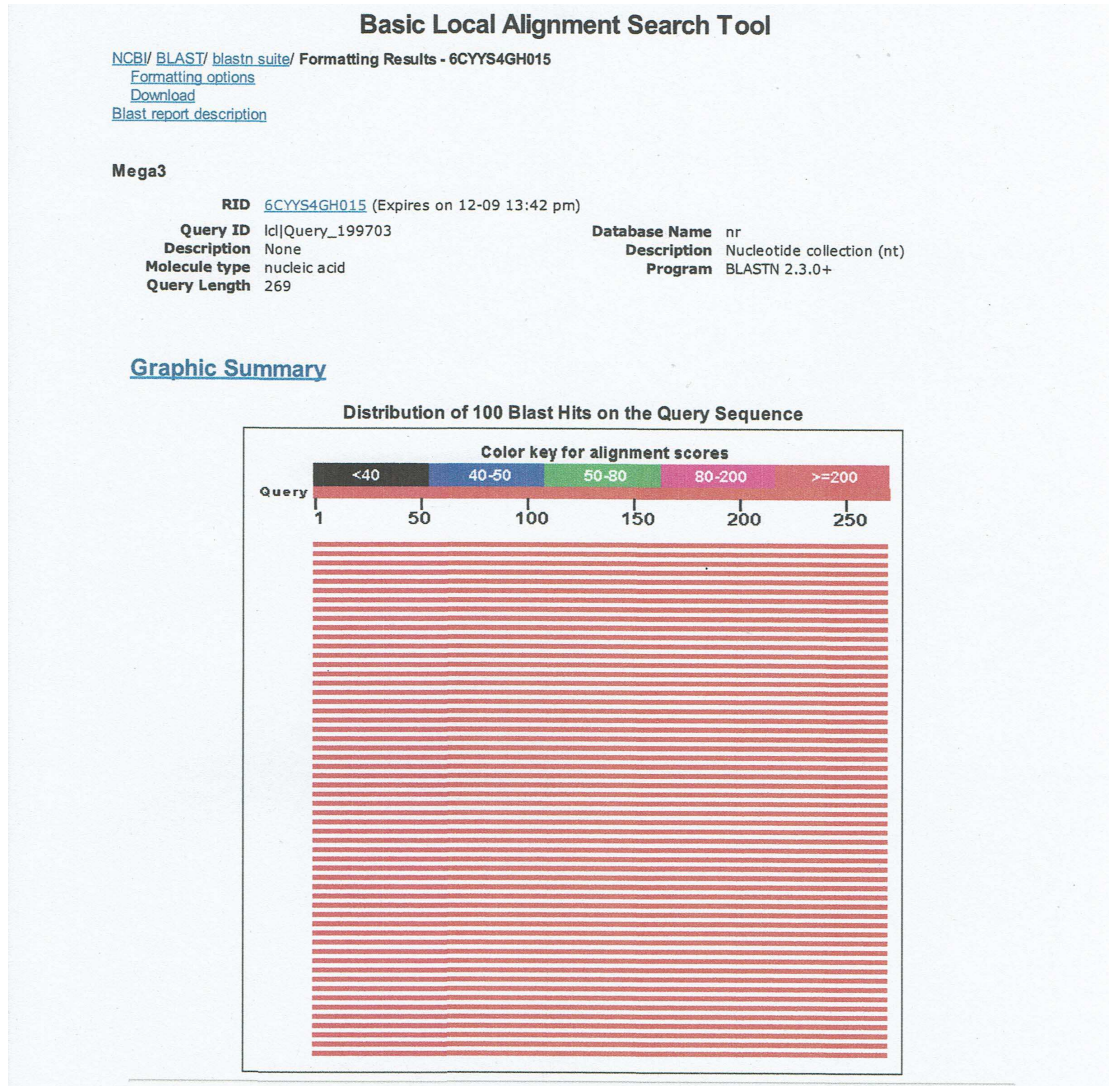
Features:  
**chromate reductase monomer, subunit of chromate reductase**

Query	1	CGTACCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGGCGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	60
Sbjct	3783945	CGTACCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGGCGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	3783886
Query	61	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACAGAACTGGCGCAGGTG	120
Sbjct	3783885	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACAGAACTGGCGCAGGTG	3783826
Query	121	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCAGGCCATTGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT	180
Sbjct	3783825	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCAGGCCATTGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT	3783766
Query	181	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTTTCAGCCACC	240
Sbjct	3783765	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTTTCAGCCACC	3783706
Query	241	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	269
Sbjct	3783705	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	3783677



# ภาคผนวกที่ 9

ผล BLAST ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ *Bacillus megaterium*



## Alignments

Escherichia coli strain C43(DE3), complete genome  
Sequence ID: [gb|CP011938.1](#) Length: 4501450 Number of Matches: 1  
Range 1: 3762743 to 3763010

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
484 bits(536)	3e-133()	268/268(100%)	0/268(0%)	Plus/Plus	
<b>Features:</b>					
<b>hypothetical protein</b>					
Query 1	CACGCCGGAATATAACTACTCGGTACCGGGTGGGCTGAAAAATGCCATCGACTGGCTTTC	60			
Sbjct 3762743	CACGCCGGAATATAACTACTCGGTACCGGGTGGGCTGAAAAATGCCATCGACTGGCTTTC	3762802			
Query 61	CCGCCTGCCGGATCAACCGCTGGCAGGTAACCGGTGTTGATTTCAGACCAGCTCAATGGG	120			
Sbjct 3762803	CCGCCTGCCGGATCAACCGCTGGCAGGTAACCGGTGTTGATTTCAGACCAGCTCAATGGG	3762862			
Query 121	CCTGATTGGCGGC CGCGCTGTTCAGTATCACCTGCGCCAGATTCTGGTTTTCTCGATGC	180			
Sbjct 3762863	CCTGATTGGCGGC CGCGCTGTTCAGTATCACCTGCGCCAGATTCTGGTTTTCTCGATGC	3762922			
Query 181	AATGGTGATGAACAAGCCGGAATTTATGGCCGGCGTGATTCAGAACAAAGTTGATCCGCA	240			
Sbjct 3762923	AATGGTGATGAACAAGCCGGAATTTATGGCCGGCGTGATTCAGAACAAAGTTGATCCGCA	3762982			
Query 241	AACCGGAGAAGTGATTGATCAGGGTACG	268			
Sbjct 3762983	AACCGGAGAAGTGATTGATCAGGGTACG	3763010			



Escherichia coli strain C41(DE3), complete genome  
 Sequence ID: **gb|CP010585.1** Length: 4557511 Number of Matches: 1  
 Range 1: 3783684 to 3783951

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
484 bits(536)	3e-133()	268/268(100%)	0/268(0%)	Plus/Plus	

Features:  
**hypothetical protein**

Query	1	CACGCCGGAATATAA	CTACTCGGTACCGGGTGGGCTGAAAAATGCCATCGACTGGCTTTC	60
Sbjct	3783684	CACGCCGGAATATAA	CTACTCGGTACCGGGTGGGCTGAAAAATGCCATCGACTGGCTTTC	3783743
Query	61	CCGCCTGCCGGATCA	ACCGCTGGCAGGTAACCGGTGTTGATTTCAGACCAGCTCAATGGG	120
Sbjct	3783744	CCGCCTGCCGGATCA	ACCGCTGGCAGGTAACCGGTGTTGATTTCAGACCAGCTCAATGGG	3783803
Query	121	CGTGATTGGCGGCG	CGCTGTCAAGTATCACCTGCGCCAGATTCTGGTTTTCTCGATGC	180
Sbjct	3783804	CGTGATTGGCGGCG	CGCTGTCAAGTATCACCTGCGCCAGATTCTGGTTTTCTCGATGC	3783863
Query	181	AATGGTGATGAACA	AGCCGGAATTTATGGCGGCGTGATTCAGAACAAAGTTGATCCGCA	240
Sbjct	3783864	AATGGTGATGAACA	AGCCGGAATTTATGGCGGCGTGATTCAGAACAAAGTTGATCCGCA	3783923
Query	241	AACCGGAGAAGTGA	TGATCAGGGTACG	268
Sbjct	3783924	AACCGGAGAAGTGA	TGATCAGGGTACG	3783951

Escherichia coli 1303, complete genome  
 Sequence ID: **gb|CP009166.1** Length: 4948797 Number of Matches: 1  
 Range 1: 4175502 to 4175769

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
484 bits(536)	3e-133()	268/268(100%)	0/268(0%)	Plus/Plus	

Features:  
**chromate reductase, class I, flavoprotein**

Query	1	CACGCCGGAATATAA	CTACTCGGTACCGGGTGGGCTGAAAAATGCCATCGACTGGCTTTC	60
Sbjct	4175502	CACGCCGGAATATAA	CTACTCGGTACCGGGTGGGCTGAAAAATGCCATCGACTGGCTTTC	4175561
Query	61	CCGCCTGCCGGATCA	ACCGCTGGCAGGTAACCGGTGTTGATTTCAGACCAGCTCAATGGG	120
Sbjct	4175562	CCGCCTGCCGGATCA	ACCGCTGGCAGGTAACCGGTGTTGATTTCAGACCAGCTCAATGGG	4175621
Query	121	CGTGATTGGCGGCG	CGCTGTCAAGTATCACCTGCGCCAGATTCTGGTTTTCTCGATGC	180
Sbjct	4175622	CGTGATTGGCGGCG	CGCTGTCAAGTATCACCTGCGCCAGATTCTGGTTTTCTCGATGC	4175681
Query	181	AATGGTGATGAACA	AGCCGGAATTTATGGCGGCGTGATTCAGAACAAAGTTGATCCGCA	240
Sbjct	4175682	AATGGTGATGAACA	AGCCGGAATTTATGGCGGCGTGATTCAGAACAAAGTTGATCCGCA	4175741
Query	241	AACCGGAGAAGTGA	TGATCAGGGTACG	268
Sbjct	4175742	AACCGGAGAAGTGA	TGATCAGGGTACG	4175769

Escherichia coli BL21(DE3), complete genome  
 Sequence ID: **emb|AM946981.2** Length: 4558947 Number of Matches: 1  
 Range 1: 3783678 to 3783945

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
484 bits(536)	3e-133()	268/268(100%)	0/268(0%)	Plus/Plus	

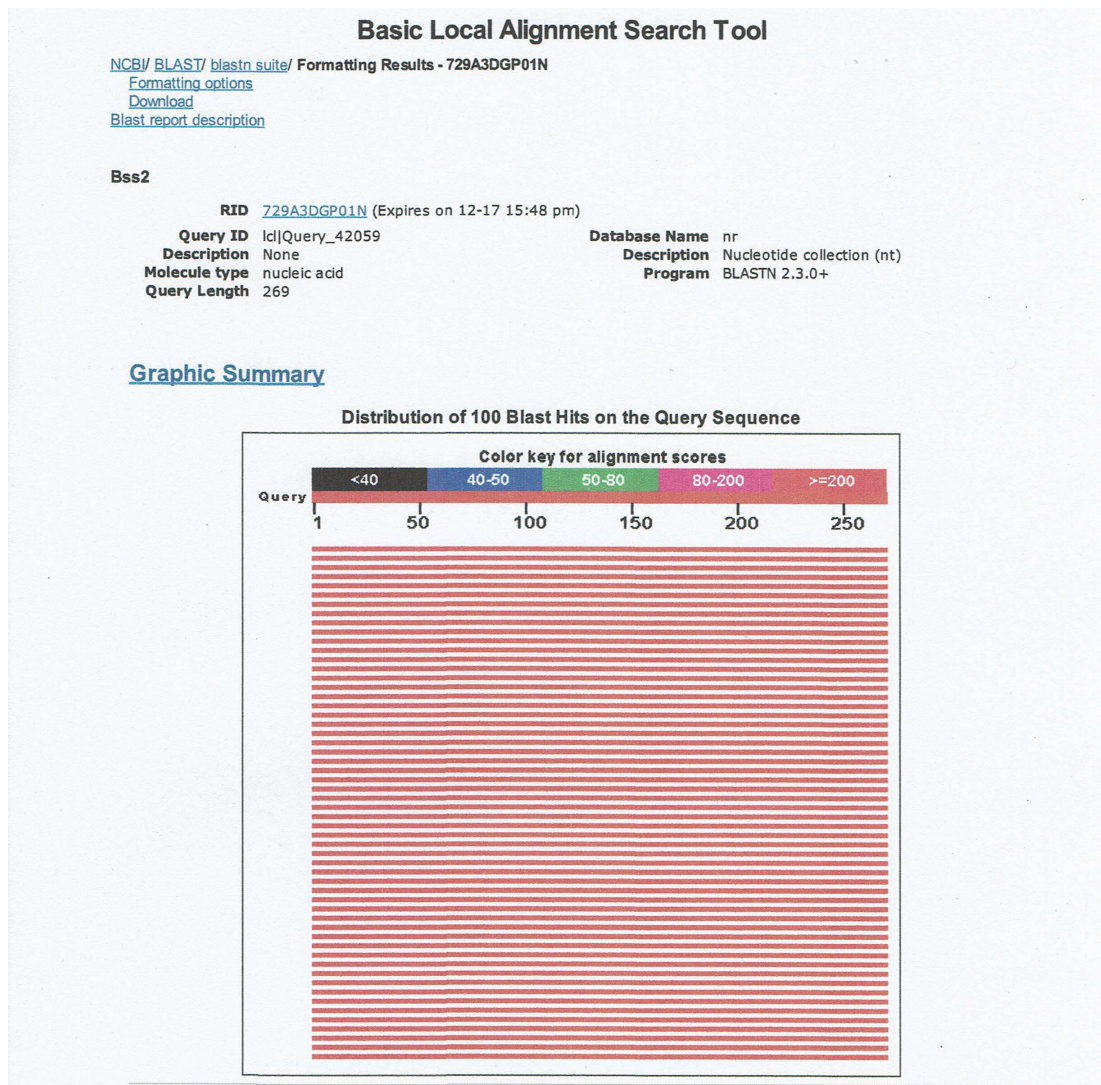
Features:  
**chromate reductase monomer, subunit of chromate reductase**

Query	1	CACGCCGGAATATAA	CTACTCGGTACCGGGTGGGCTGAAAAATGCCATCGACTGGCTTTC	60
Sbjct	3783678	CACGCCGGAATATAA	CTACTCGGTACCGGGTGGGCTGAAAAATGCCATCGACTGGCTTTC	3783737
Query	61	CCGCCTGCCGGATCA	ACCGCTGGCAGGTAACCGGTGTTGATTTCAGACCAGCTCAATGGG	120
Sbjct	3783738	CCGCCTGCCGGATCA	ACCGCTGGCAGGTAACCGGTGTTGATTTCAGACCAGCTCAATGGG	3783797
Query	121	CGTGATTGGCGGCG	CGCTGTCAAGTATCACCTGCGCCAGATTCTGGTTTTCTCGATGC	180
Sbjct	3783798	CGTGATTGGCGGCG	CGCTGTCAAGTATCACCTGCGCCAGATTCTGGTTTTCTCGATGC	3783857
Query	181	AATGGTGATGAACA	AGCCGGAATTTATGGCGGCGTGATTCAGAACAAAGTTGATCCGCA	240
Sbjct	3783858	AATGGTGATGAACA	AGCCGGAATTTATGGCGGCGTGATTCAGAACAAAGTTGATCCGCA	3783917
Query	241	AACCGGAGAAGTGA	TGATCAGGGTACG	268
Sbjct	3783918	AACCGGAGAAGTGA	TGATCAGGGTACG	3783945



## ภาคผนวกที่ 10

ผล BLAST ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ *Bacillus cereus*



### Alignments

Escherichia coli strain C43(DE3), complete genome  
 Sequence ID: [gb|CP011938.1](#) Length: 4501450 Number of Matches: 1  
 Range 1: 3762742 to 3763010

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	

Features:  
 hypothetical protein

Query	1	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	60
Sbjct	3763010	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	3762951
Query	61	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACAGAAATCTGGCCGAGGTG	120
Sbjct	3762950	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACAGAAATCTGGCCGAGGTG	3762891
Query	121	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCAATTGAGCTGGTCTGAATCAACCCGGTTT	180
Sbjct	3762890	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCAATTGAGCTGGTCTGAATCAACCCGGTTT	3762831
Query	181	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCCACC	240
Sbjct	3762830	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCCACC	3762771
Query	241	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	269
Sbjct	3762770	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	3762742



Escherichia coli strain C41(DE3), complete genome  
 Sequence ID: [gb|CP010585.1](#) Length: 4557511 Number of Matches: 1  
 Range 1: 3783683 to 3783951

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	
<b>Features:</b>					
<b>hypothetical protein</b>					
Query 1		CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC			60
Sbjct 3783951		CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC			3783892
Query 61		CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATC			120
Sbjct 3783891		CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATC			3783832
Query 121		ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCAT			180
Sbjct 3783831		ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCAT			3783772
Query 181		ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAA			240
Sbjct 3783771		ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAA			3783712
Query 241		CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	269		
Sbjct 3783711		CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA		3783683	

Escherichia coli 1303, complete genome  
 Sequence ID: [gb|CP009166.1](#) Length: 4948797 Number of Matches: 1  
 Range 1: 4175501 to 4175769

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	
<b>Features:</b>					
<b>chromate reductase, class I, flavoprotein</b>					
Query 1		CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC			60
Sbjct 4175769		CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC			4175710
Query 61		CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATC			120
Sbjct 4175709		CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATC			4175650
Query 121		ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCAT			180
Sbjct 4175649		ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCAT			4175590
Query 181		ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAA			240
Sbjct 4175589		ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAA			4175530
Query 241		CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	269		
Sbjct 4175529		CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA		4175501	

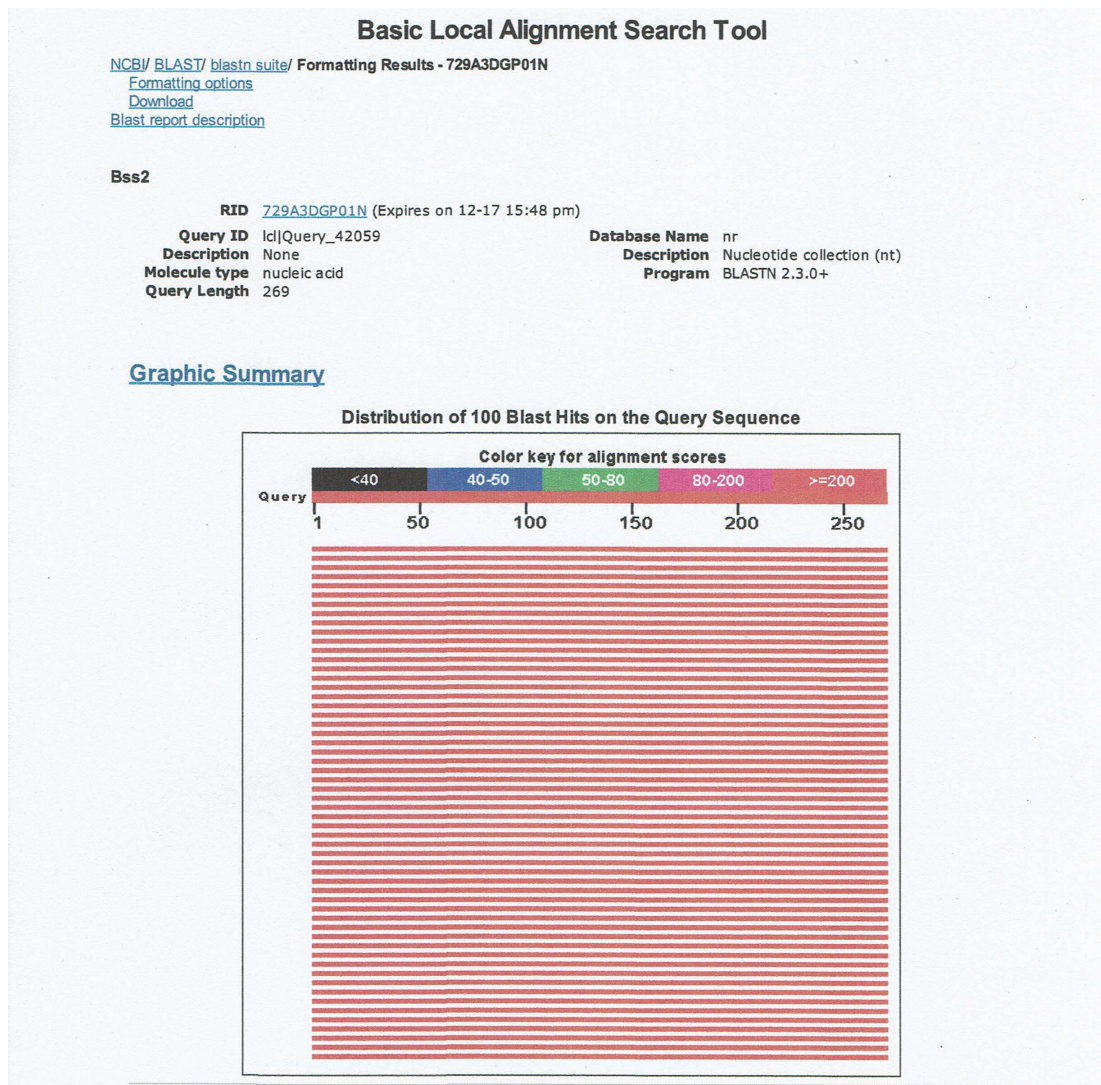
Escherichia coli BL21(DE3), complete genome  
 Sequence ID: [emb|AM946981.2](#) Length: 4558947 Number of Matches: 1  
 Range 1: 3783677 to 3783945

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	
<b>Features:</b>					
<b>chromate reductase monomer, subunit of chromate reductase</b>					
Query 1		CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC			60
Sbjct 3783945		CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC			3783886
Query 61		CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATC			120
Sbjct 3783885		CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATC			3783826
Query 121		ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCAT			180
Sbjct 3783825		ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCAT			3783766
Query 181		ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAA			240
Sbjct 3783765		ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAA			3783706
Query 241		CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	269		
Sbjct 3783705		CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA		3783677	



# ภาคผนวกที่ 11

ผล BLAST ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ *Bacillus subtilis*



**Alignments**

Escherichia coli strain C43(DE3), complete genome  
 Sequence ID: [gb|CP011938.1](#) Length: 4501450 Number of Matches: 1  
 Range 1: 3762742 to 3763010

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	

Features:  
**hypothetical protein**

Query	1	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	60
Sbjct	3763010	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	3762951
Query	61	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACAGAAATCTGGCCGAGGTG	120
Sbjct	3762950	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACAGAAATCTGGCCGAGGTG	3762891
Query	121	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCAATTGAGCTGGTCTGAATCAACCCGGTTT	180
Sbjct	3762890	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCAATTGAGCTGGTCTGAATCAACCCGGTTT	3762831
Query	181	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCACC	240
Sbjct	3762830	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCACC	3762771
Query	241	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	269
Sbjct	3762770	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	3762742



Escherichia coli strain C41(DE3), complete genome  
 Sequence ID: [gb|CP010585.1](#) Length: 4557511 Number of Matches: 1  
 Range 1: 3783683 to 3783951

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	

Features:  
 hypothetical protein

Query	1	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	60
Sbjct	3783951	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	3783892
Query	61	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCGAATCTGGCGCAGGTG	120
Sbjct	3783891	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCGAATCTGGCGCAGGTG	3783832
Query	121	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCATTTGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT	180
Sbjct	3783831	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCATTTGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT	3783772
Query	181	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTTTCAGCCACC	240
Sbjct	3783771	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTTTCAGCCACC	3783712
Query	241	CGGTACCGAGTAGTTATATTCCGGCGTGA	269
Sbjct	3783711	CGGTACCGAGTAGTTATATTCCGGCGTGA	3783683

Escherichia coli 1303, complete genome  
 Sequence ID: [gb|CP009166.1](#) Length: 4948797 Number of Matches: 1  
 Range 1: 4175501 to 4175769

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	

Features:  
 chromate reductase, class I, flavoprotein

Query	1	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	60
Sbjct	4175769	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	4175710
Query	61	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCGAATCTGGCGCAGGTG	120
Sbjct	4175709	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCGAATCTGGCGCAGGTG	4175650
Query	121	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCATTTGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT	180
Sbjct	4175649	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCATTTGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT	4175590
Query	181	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTTTCAGCCACC	240
Sbjct	4175589	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTTTCAGCCACC	4175530
Query	241	CGGTACCGAGTAGTTATATTCCGGCGTGA	269
Sbjct	4175529	CGGTACCGAGTAGTTATATTCCGGCGTGA	4175501

Escherichia coli BL21(DE3), complete genome  
 Sequence ID: [emb|AM946981.2](#) Length: 4558947 Number of Matches: 1  
 Range 1: 3783677 to 3783945

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	

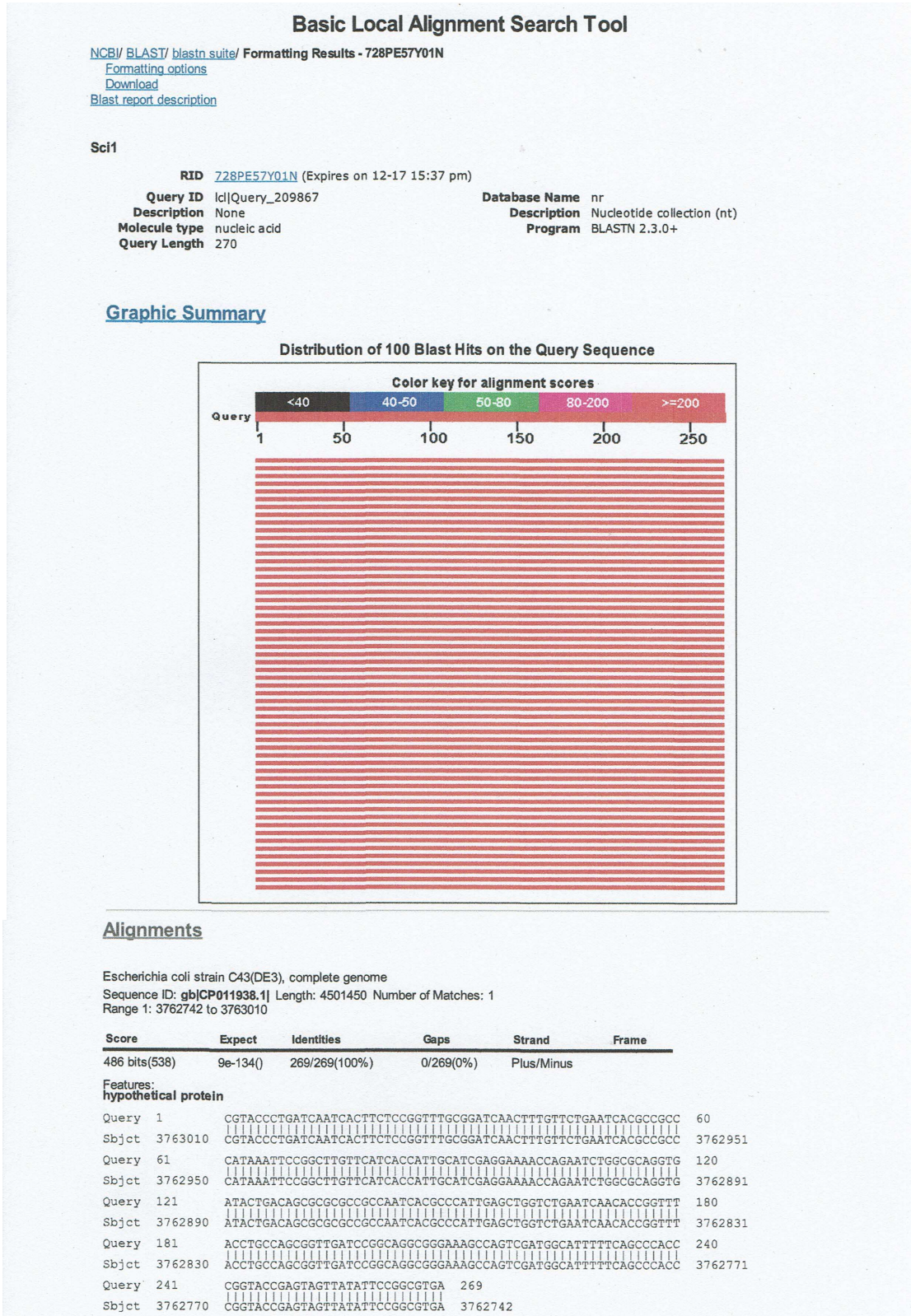
Features:  
 chromate reductase monomer, subunit of chromate reductase

Query	1	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	60
Sbjct	3783945	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGC GGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC	3783886
Query	61	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCGAATCTGGCGCAGGTG	120
Sbjct	3783885	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCGAATCTGGCGCAGGTG	3783826
Query	121	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCATTTGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT	180
Sbjct	3783825	ATACTGACAGCGCGCCGCCAATCACGCCCATTTGAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT	3783766
Query	181	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTTTCAGCCACC	240
Sbjct	3783765	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAGCCAGTCGATGGCATTTTTCAGCCACC	3783706
Query	241	CGGTACCGAGTAGTTATATTCCGGCGTGA	269
Sbjct	3783705	CGGTACCGAGTAGTTATATTCCGGCGTGA	3783677



## ภาคผนวกที่ 12

ผล BLAST ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ *Streptococcus sciuri*



Escherichia coli strain C41(DE3), complete genome  
 Sequence ID: **gb|CP010585.1** | Length: 4557511 | Number of Matches: 1  
 Range 1: 3783683 to 3783951

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	
<b>Features:</b>					
<b>hypothetical protein</b>					
Query	1	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGGCGGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC			60
Sbjct	3783951	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGGCGGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC			3783892
Query	61	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCGAATCTGGCGCAGGTG			120
Sbjct	3783891	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCGAATCTGGCGCAGGTG			3783832
Query	121	ATACTGACAGCGCGCGCCCAATCAGCCCATTTAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT			180
Sbjct	3783831	ATACTGACAGCGCGCGCCCAATCAGCCCATTTAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT			3783772
Query	181	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCACC			240
Sbjct	3783771	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCACC			3783712
Query	241	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	269		
Sbjct	3783711	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	3783683		

Escherichia coli 1303, complete genome  
 Sequence ID: **gb|CP009166.1** | Length: 4948797 | Number of Matches: 1  
 Range 1: 4175501 to 4175769

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	
<b>Features:</b>					
<b>chromate reductase, class I, flavoprotein</b>					
Query	1	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGGCGGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC			60
Sbjct	4175769	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGGCGGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC			4175710
Query	61	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCGAATCTGGCGCAGGTG			120
Sbjct	4175709	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCGAATCTGGCGCAGGTG			4175650
Query	121	ATACTGACAGCGCGCGCCCAATCAGCCCATTTAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT			180
Sbjct	4175649	ATACTGACAGCGCGCGCCCAATCAGCCCATTTAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT			4175590
Query	181	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCACC			240
Sbjct	4175589	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCACC			4175530
Query	241	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	269		
Sbjct	4175529	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	4175501		

Escherichia coli BL21(DE3), complete genome  
 Sequence ID: **emb|AM946981.2** | Length: 4558947 | Number of Matches: 1  
 Range 1: 3783677 to 3783945

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
486 bits(538)	9e-134()	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus	
<b>Features:</b>					
<b>chromate reductase monomer, subunit of chromate reductase</b>					
Query	1	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGGCGGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC			60
Sbjct	3783945	CGTACCCCTGATCAATCACTTCTCCGGTTTGGCGGATCAACTTTGTTCTGAATCAGCCGCC			3783886
Query	61	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCGAATCTGGCGCAGGTG			120
Sbjct	3783885	CATAAATCCGGCTTGTTCATCACCATTGCATCGAGGAAAACCGAATCTGGCGCAGGTG			3783826
Query	121	ATACTGACAGCGCGCGCCCAATCAGCCCATTTAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT			180
Sbjct	3783825	ATACTGACAGCGCGCGCCCAATCAGCCCATTTAGCTGGTCTGAATCAACACCGGTTT			3783766
Query	181	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCACC			240
Sbjct	3783765	ACCTGCCAGCGGTTGATCCGGCAGGCGGAAAAGCCAGTCGATGGCATTTCAGCCACC	3783706		
Query	241	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	269		
Sbjct	3783705	CGGTACCGAGTAGTTATATCCGGCGTGA	3783677		