Ubon Rajathanee University

รายงานการวิจัย

เรื่อง การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง

Reduction of chromate by thermotolerant bacterium

ผู้วิจัย

ผศ. ดร. ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2547

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง

Reduction of chromate by thermotolerant bacterium

Abstract

Seventeen isolates of thermotolerant chromate-reducing bacteria were isolated from soil- and water samples from Khumphun silk weaver factory, Ubon Ratchathani and soil samples from Phanthalung. All isolates were cultured in acetate minimal medium (AMM) supplemented with 100 µM CrO_4^{2-} at 40° C for 72 hour in aerobic and anaerobic conditions. The bacteria reduce Cr (VI) aerobically and anaerobically but anaerobic Cr(VI) reduction showed a higher rate except isolate NTR 11 and 12. The culture of isolate NTR 6(2), NTR 9, NTR 8, NTR 6(1) have a high rate of anaerobic Cr(VI) reduction and using isolate NTR9 for further study. Chromate reduction by isolate NTR9 was observed at pH 6-9 and at temperature of 30-55°C and the optimal condition took placed at pH 7 and 40 °C. Higher chromate reduction were obtained with higher initial cell concentration. Isolate NTR9 was identified by 16S rRNA sequencing analysis as a *Bacillus fusiformis*.

Key words : chromate, chromate-reducing thermotolerant bacteria

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทคัดย่อ

การคัดแยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวส์โครเมต โดยทำการเก็บตัวอย่างดินและน้ำจากโรงงานทอผ้าไหมคำปุน จังหวัดอุบลราชธานีและตัวอย่างดินพรุ จังหวัดพัทลุง สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งสิ้น 17 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพการรีดิวส์โครเมต โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ acetate minimal medium (AMM) ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมโครเมตเท่ากับ 100 μM อุณหภูมิ 40 ^{o}C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถรีดิวส์โครเมตได้ทั้งสองสภาวะ แต่ประสิทธิภาพการรีดิวส์โครเมตภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนสูงกว่าสภาวะมีออกซิเจน ยกเว้นไอโซเลท NTR 11 และ NTR 12 แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวส์โครเมตได้ดีภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนคือ ไอโซเลท NTR 6(2), NTR 9, NTR 8, NTR 6(1) และใช้ไอโซเลท NTR9 ในการศึกษาสภาวะเหมาะสมพบว่าไอโซเลท NTR 9 รีดิวส์โครเมตในช่วง pH 6-9 และช่วงอุณหภูมิ 30-55 ^{o}C โดยรีดิวส์ได้ดีที่สุดที่ pH 7 และอุณหภูมิ 40 ^{o}C การรีดิวส์โครเมตของไอโซเลท NTR9 ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น เมื่อนำไปจำแนกชนิดโดยวิธี 16S rRNA sequencing analysis พบว่าไอโซเลท NTR9 เป็นแบคทีเรีย *Bacillus fusiformis*

คำสำคัญ : โครเมียม, โครเมต, แบคทีเรียรีดิวส์โครเมต

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2547 ผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวนัฐธิรา บุญรับและนางสาวทิพย์มณฑา ฤกษ์ใหญ่ ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูล ขอขอบคุณโรงงานทอผ้าไหมคำปุน จังหวัดอุบลราชธานี ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่สำหรับทำงานวิจัยในครั้งนี้

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ชนิดของตัวอย่างและปริมาณโครเมตที่เหลือ 14
ตารางที่ 2 ชนิดของตัวอย่างและลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้ 14
ตารางที่ 3 การเจริญของแบคทีเรีย isolate NTR9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อAMM ที่ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างระดับต่าง ๆ 19
ตารางที่ 4 การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย isolate NTR9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ที่ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างระดับต่าง ๆ 19
ตารางที่ 5 การเจริญของแบคทีเรีย isolate NTR9 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 22
ตารางที่ 6 การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย isolate NTR9 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 24
ตารางที่ 7 การเจริญของแบคทีเรีย isolate NTR9 ที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น ระดับต่าง ๆ 25
ตารางที่ 8 การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย isolate NTR9 ที่ความหนาแน่นเซลล์ เริ่มต้นระดับต่าง ๆ 25

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 การเจริญของแบคทีเรียเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร AMM ภายใต้สภาวะมีออกซิเจน 15
ภาพที่ 2 การเจริญของแบคทีเรียเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร AMM ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน 17
ภาพที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน 18
ภาพที่ 4 การเจริญของแบคทีเรีย isolate NTR9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ที่ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างระดับต่าง ๆ..... 20
ภาพที่ 5 การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย isolate NTR9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ที่ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างระดับต่าง ๆ..... 21
ภาพที่ 6 การเจริญของแบคทีเรีย isolate NTR9 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 23
ภาพที่ 7 การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย isolate NTR9 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ..... 24
ภาพที่ 8 การเจริญของแบคทีเรีย isolate NTR9 ที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น ระดับต่าง ๆ..... 26
ภาพที่ 9 การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย isolate NTR9 ที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น ระดับต่าง ๆ..... 27
ภาพที่ 10 PCR amplification ของ 16S rDNA product ด้วย pA และ pH' primers..... 29
ภาพที่ 11 RFLP patterns ของ 16S rDNA product เมื่อตัดด้วย *Sau*3AI และ *Hae*III 30
ภาพที่ 12 ลำดับเบสของ 16S rDNA gene ของ positive control 31
ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบการเข้าคู่ของลำดับเบสของ positive control isolate และลำดับเบสของ subject sequence; *Escherichia coli* 32
ภาพที่ 14 ลำดับเบสของ 16S rDNA gene ของแบคทีเรีย isolate NTR9 33
ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบการเข้าคู่ของลำดับเบสของแบคทีเรีย isolate NTR9 และลำดับเบสของ subject sequence; *Bacillus forsiformis* 34

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทนำ

ปัญหาการปนเปื้อนของสารโลหะหนักในแหล่งน้ำ จัดเป็นปัญหาสำคัญที่ประเทศไทยกำลังประสบอยู่ สาเหตุสำคัญเกิดจากการระบายน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ โดยมิได้ผ่านกรรมวิธีการบำบัดอย่างถูกวิธี ปัญหานี้จึงเป็นปัญหาที่นับวันจะทวีความรุนแรงขึ้น เนื่องจากประชากรของประเทศไทยส่วนใหญ่ประกอบอาชีพทางด้านเกษตรกรรม จึงมีการนำน้ำจากแหล่งธรรมชาติมาใช้เพื่อการเพาะปลูก การประมง และการปศุสัตว์ รวมทั้งใช้ในการบริโภค หากโรงงานอุตสาหกรรมปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติโดยไม่มีการบำบัด จะส่งผลกระทบกับสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิดเป็นวัฏจักร สารโลหะหนักที่ปนเปื้อนในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมได้แก่ ปรอท, ตะกั่ว, โครเมียม, และสังกะสี เป็นต้น โดยเฉพาะโครเมียม (chromium, Cr) เป็นหนึ่งในสารโลหะหนักที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมการผลิตเหล็กกล้า อุตสาหกรรมการผลิตอัลลอยด์ อุตสาหกรรมการฟอกหนัง อุตสาหกรรมสิ่งทอและการผลิตเยื่อกระดาษ นอกจากนี้โครเมียมยังเป็นส่วนผสมที่สำคัญในน้ำหล่อเย็น สารดับเพลิง และสารป้องกันการเน่าสลายของเนื้อไม้ (Patterson, 1985)

โครเมียมที่พบโดยทั่วไปจะอยู่ในรูปไดวาเลนซ์และไตรวาเลนซ์โครเมียม [Cr(II) and Cr(III)] ซึ่งมีความคงตัวสูงและมีความเป็นพิษต่ำ ในขณะที่เฮกซาวาเลนซ์โครเมียม [chromate, Cr(VI), CrO_4^{2-}] มีความคงตัวต่ำ ความสามารถในการละลายและความเป็นพิษสูง เฮกซาวาเลนซ์โครเมียมหรือโครเมตสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ยูคาริโอตและโปรคาริโอตได้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Cervantes and Silver, 1992) โดยทำให้เกิดการผ่าเหล่าแบบ frameshift mutation และ base substitutions และที่ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Petrilli and De Flora, 1977) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าสารประกอบเฮกซาวาเลนซ์โครเมียม ทำให้เกิดการอักเสบในช่องจมูก แผลผุพองที่ผิวหนัง รวมทั้งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคมะเร็งปอดและระบบทางเดินหายใจของมนุษย์อีกด้วย (Langard, 1982; Beliles, 1979; Pederson, 1982; Gibb *et al.*,2000) ดังนั้นการปล่อยของเสียหรือน้ำเสียที่ปนเปื้อนสารประกอบโครเมียมจากโรงงานอุตสาหกรรมสู่แหล่งน้ำ จึงเป็นปัญหาสำคัญเพราะความเป็นพิษของโครเมตมีผลต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ การบำบัดความเป็นพิษของโครเมต อาจทำได้โดยวิธีทางเคมีและทางชีววิทยา แต่วิธีทางเคมีต้องใช้สารเคมีเป็นจำนวนมาก สิ้นเปลืองพลังงาน และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญชั้นสูง วิธีทางชีววิทยาโดยใช้แบคทีเรียที่สามารถรีดิวส์โครเมตไปเป็นไตรวาเลนซ์โครเมียมซึ่งมีความเป็นพิษลดลง จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและลดค่าใช้จ่ายได้มากกว่า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกแบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวส์โครเมต ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม รวมทั้งการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ผลจากการวิจัยในครั้งนี้จะเป็นแนวทางหนึ่งในการใช้แบคทีเรียในการบำบัดสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนสารโลหะหนักที่เป็นพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเฉพาะประเทศไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อนชื้นอุณหภูมิโดยทั่วไปค่อนข้างสูง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การตรวจเอกสาร

โครเมียม (Chromium)

โครเมียม เป็นธาตุทรานสิชั่นในกลุ่ม VI-B ตามตารางธาตุ โดยล้อมรอบด้วยธาตุวานาเดียม, แมงกานีส และโมลิบดินัม (Burrows, 1983) เลขอะตอมของโครเมียมเท่ากับ 24 และมีมวลอะตอมเท่ากับ 52.01 ไอโซโทรปที่พบได้แก่ ^{50}Cr, ^{52}Cr, ^{53}Cr และ ^{54}Cr โครเมียมเป็นโลหะที่มีความแข็ง จุดหลอมเหลวสูงถึง 1857 °C และจุดเดือดเท่ากับ 2672 °C โครเมียมละลายได้ช้า ๆ ที่อุณหภูมิ 600 °C ในสารละลายไฮโดรเจนฟลูออไรด์ (HF) ไฮโดรเจนคลอไรด์ (HCl) และไฮโดรเจนไอโอไดด์ (HI) (Shamberger, 1979)

โครเมียมอยู่ในสภาวะออกซิเดชั่นหลายรูป ตั้งแต่ Cr^{2-}, Cr^{1-}, Cr^{0}, Cr^{1+}, Cr^{2+}, Cr^{3+}, Cr^{4+}, Cr^{5+} และ Cr^{6+} ไตรวาเลนซ์โครเมียม, Cr(II), เป็นสภาวะที่เสถียรที่สุดของโครเมียม ในสภาวะที่เป็นกลาง $Cr(OH)_3$ จะตกตะกอนร่วมกับโลหะไฮดอกไซด์หลายชนิด (Langard, 1982)

โครเมียมเป็นธาตุที่พบมากเป็นอันดับ 7 ของโลก โดยพบที่ผิวเปลือกโลก 100-300 ไมโครกรัมต่อลิตร พบในดิน 5-3,000 ไมโครกรัมต่อกรัม มีการใช้โครเมียมในโรงงานอุตสาหกรรมประมาณ 10^7 ตันต่อปี โดยใช้ในอุตสาหกรรมอัลลอยด์และเหล็กกล้า 60-70 เปอร์เซนต์ ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมสารสีและอุตสาหกรรมเคลือบโลหะประมาณ 15 เปอร์เซนต์

จุลินทรีย์ที่รีดิวส์โครเมต (Chromate-reducing microorganisms)

แบคทีเรียสามารถรีดิวส์โครเมตในสภาวะแตกต่างกัน บางชนิดรีดิวส์โครเมตในสภาวะที่มีออกซิเจน บางชนิดรีดิวส์โครเมตในสภาวะไร้ออกซิเจน บางชนิดรีดิวส์โครเมตได้ทั้งสองสภาวะ ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas fluorescens* LB300 ซึ่งคัดแยกได้จากตะกอนของแม่น้ำที่ปนเปื้อนโครเมต สามารถรีดิวส์โครเมตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Bopp and Ehrlich, 1988) เมื่อนำแบคทีเรียชนิดนี้มาเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (batch culture) ที่อุณหภูมิ 30 °C พบว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของโครเมตเท่ากับ 1.6 mM, 1.02 mM และ 0.57 mM แบคทีเรียสามารถรีดิวส์โครเมตได้เท่ากับ 61%, 69% และ 99.7% ตามลำดับ ภายในเวลา 289 ชั่วโมง สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture) แบคทีเรียสามารถรีดิวส์โครเมตได้เท่ากับ 28%, 39% และ 57% โดยมีระยะเวลาที่อยู่ในถังหมักเท่ากับ 11.7, 20.8 และ 38.5 ชั่วโมง ตามลำดับ (De Leo and Ehrlich, 1994)

Enterobacter cloacae HO1 ซึ่งคัดแยกได้จากเอคติเวตเตสลลาสน์ (activated sludge) สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโครเมตในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน แต่การรีดิวส์ โครเมตจะเกิดขึ้นในสภาวะไร้ออกซิเจนเท่านั้นและใช้โครเมตเป็นตัวให้อิเลคตรอน การรีดิวส์โครเมตโดย *E. cloacae* HO1 เกิดขึ้นที่ pH 6.0-8.5 โดยมี pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0 ช่วงอุณหภูมิที่เกิดการรีดิวส์โครเมต คือ 20-40 °C โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 °C (Wang, *et al.*, 1989)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ในทางตรงกันข้าม *Escherichia coli* ATCC 33456 ซึ่งสามารถเจริญและรีดิวส์โครเมตได้ทั้งสองสภาวะ แต่อัตราการรีดิวส์โครเมตในสภาวะไร้ออกซิเจนจะสูงกว่าในสภาวะที่มีออกซิเจน การรีดิวส์โครเมตโดย *E. coil* พบอยู่ในช่วง pH 3.0-8.0 และอุณหภูมิในช่วง 10-45 ^{o}C โดยมีอัตราการรีดิวส์สูงสุดที่ pH 7.0 และ 36^{o}C นอกจากนี้ยังพบว่าการรีดิวส์โครเมตของเชื้อนี้เกิดขึ้นบริเวณผิวเซลล์และมีไดรวาเลนซ์โครเมียมสะสมอยู่ภายนอกเซลล์ (Shen and Wang, 1993)

Wang and Xiao (1995) รายงานว่าการรีดิวส์โครเมตโดยเชื้อ *Bacillus* sp. และ *P. fluorescens* LB300 เกิดขึ้นในสภาวะที่มีออกซิเจน ใช้กลูโคสเป็นตัวให้อิเลคตรอนและออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอน *Bacillus* sp. สามารถรีดิวส์โครเมตที่ความเข้มข้นในช่วง 0.1-0.5 mM แต่การรีดิวส์ที่สมบูรณ์จะเกิดขึ้นที่ความเข้มข้นไม่เกิน 0.1 mM ภายใน 96 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *P. fluorescens* LB300 ไม่สามารถรีดิวส์โครเมตที่ความเข้มข้นต่ำสุดได้ในระยะเวลาเท่ากัน

Microbacterium sp. MP30 ที่แยกจากเขตอุตสาหกรรมที่มีการปนเปื้อนของโครเมตในประเทศปากีสถาน สามารถรีดิวส์โครเมตที่ความเข้มข้น 0.1 mM ได้ภายใน 30 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน โดยใช้อะซิเตรทเป็นตัวให้อิเลคตรอน เมื่อนำแบคทีเรียชนิดนี้ตรึงด้วย polyvinyl alcohol ในลักษณะของลูกปัดตรึงเซลล์ (immobilised cell beads) แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ที่มีการไหลผ่านของสารละลายบัฟเฟอร์ผสมโครเมต พบว่าสามารถกำจัดโครเมตออกจากสารละลายบัฟเฟอร์ได้ถึง 95 % ในช่วงเวลา 20 วันที่ทำการทดลอง (Pattanapipitpaisal *et al.*, 2001a; Pattanapipitpaisal *et al.*, 2001b)

จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์รีดิวส์โครเมตส่วนใหญ่เจริญและรีดิวส์โครเมตได้ดีในช่วงอุณหภูมิปานกลาง คือ ประมาณ 30 ^{o}C สำหรับประเทศไทยเป็นประเทศในแถบร้อน อุณหภูมิโดยทั่วไปค่อนข้างสูง ซึ่งมีผลกระทบต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียที่ทนต่ออุณหภูมิสูงและรีดิวส์โครเมตได้ดีจึงเป็นแนวทางนำไปสู่การบำบัดน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพและบรรลุเป้าหมายได้ดียิ่งขึ้นต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการรีดิส์ซ์โครเมต
2. เพื่อศึกษาการรีดิวส์โครเมตของแบคทีเรียภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง
4. จัดจำแนกแบคทีเรียรีดิวส์โครเมตโดยวิธี16S rRNA sequence analysis

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

วิธีการทดลอง

1. **การเก็บตัวอย่าง**

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและดินจากโรงงานทอผ้าไหมคำปุนจังหวัดอุบลราชธานี และตัวอย่างดินพรุจากเขตป่าพรุจังหวัดพัทลุง ใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บรรจุในถังน้ำแข็งและขนส่งสู่ห้องปฏิบัติการวิจัย

2. **การแยกเชื้อและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์**

นำตัวอย่างดินและน้ำ มาบ่มเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ Acetate Minimal Medium (AMM) (Pattanapipitpaisal *et al.*, 2001a) ที่มีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจวิเคราะห์ปริมาณโครเมต และทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างที่มีปริมาณโครเมตลดลงมากที่สุดโดยวิธี spread plate technique บนอาหาร AMM agar คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกันและนำมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี cross streak technique ตรวจลักษณะและสีของโคโลนี ตรวจลอบรูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ และการติดสีย้อมแกรม ทำการเก็บ stock culture เพื่อการศึกษาต่อไป

3. **การคัดเลือกแบคทีเรียรีดิวส์โครเมตภายใต้สภาวะมีออกซิเจน**

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียรีดิวส์โครเมตที่แยกได้จากข้อ 2 โดยเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50% nutrient broth บ่มด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM (โดยให้มี OD_{600} ของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.05) บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดยนำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปิเปตสารละลายตัวอย่างตามช่วงเวลาต่างๆ นำไปวัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ OD_{600} จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ และนำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณโครเมตที่เหลือ

4. **การคัดเลือกแบคทีเรียรีดิวส์โครเมตภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน**

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียรีดิวส์โครเมตที่แยกได้จากข้อ 2 โดยเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50% nutrient broth บ่มด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงในขวดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

(โดยให้มี OD_{600} ของเชื้อเริ่มต้นเท่า กับ 0.05) บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปิเปตสารละลายตัวอย่างตามช่วงเวลาต่างๆ นำไปวัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ OD_{600} จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ และนำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณโครเมตที่เหลือ

5. สภาวะที่เหมาะสมต่อการรีดิวส์โครเมต

5.1 ความเป็นกรด-ด่าง

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียรีดิวส์โครเมต โดยเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50% nutrient broth บ่มด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงในขวดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งปรับความเป็นกรด-ด่างที่ระดับต่าง ๆ (pH 4, pH 5, pH6, pH7, pH8 และ pH9) และมีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM (โดยให้มี OD_{600} ของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.05) บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้แบคทีเรียที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclaving) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่า pH 7 เป็นหลอดควบคุม ปิเปตสารละลายตัวอย่างตามช่วงเวลาต่าง ๆ วัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ OD_{600} จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยก ตะกอนเซลล์ และนำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณโครเมตที่เหลือ

5.2 อุณหภูมิ

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียรีดิวส์โครเมต โดยเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50% nutrient broth บ่มด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงในขวดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งปรับความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 และมีความเข้มข้นของโซเดียมโครเมตเท่ากับ 100 µM นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 40 45 50 55 และ 60 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลองหลอดควบคุมโดยใช้แบคทีเรียที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปิเปตสารละลายตัวอย่างตามช่วงเวลาต่างๆ วัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ OD_{600} จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และนำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณโครเมตที่เหลือ

5.3 ความหนาแน่นของเซลล์

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียรีดิวส์โครเมต โดยเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50% nutrient broth บ่มด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงในขวดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM โดยให้มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นระดับต่าง ๆ ปรับความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจาก ข้อ 5.1 และมีความเข้มข้นของโซเดียมโครเมตเท่ากับ 100 µM บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5.2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลองหลอดควบคุม A (control A) ที่ไม่มีการถ่ายหัวเชื้อและหลอดควบคุม B (control B) เป็นแบคทีเรียที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปิเปตสารละลายตัวอย่างตามช่วงเวลาต่างๆ วัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ OD_{600} จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ และนำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณโครเมตที่เหลือ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

6. **การจำแนกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่รีดิวส์โครเมตโดยวิธี** 16S rRNA sequence analysis

การเพิ่มจำนวน rDNA gene โดยเทคนิค PCR กระทำได้โดยใช้ชีวมวล (biomass) ของแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงรีดิวส์โครเมตที่คัดเลือกได้ โดยเตรียมสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย crude cell lysate, primer pairs pA/pH′, deoxynucleoside triphosphate, *Tag* DNA polymerase และ PCR buffer อุณหภูมิที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาคือ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที, 55 °C เป็นเวลา 1 นาที และ 72°C เป็นเวลา 2 นาที จำนวนปฏิกิริยาเท่ากับ 35 cycles นำสารละลาย PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของ rDNA ด้วยเทคนิค restriction fragment length polymorphism analysis คัดแยกโคลนที่ได้มาวิเคราะห์หา ลำดับเบส (sequencing) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับ 16S rRNA gene sequence ในฐานข้อมูลของ EMBL database โดยใช้ BLAST search

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ผลการทดลอง

1. **การคัดแยกเชื้อและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์**

จากการนำตัวอย่างน้ำและดินจากโรงงานทอผ้าไหมคำปุน จังหวัดอุบลราชธานีและตัวอย่างดินพรุจากเขตป่าพรุ จังหวัดพัทลุง จำนวนทั้งสิ้น 6 ตัวอย่าง มาทำการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ที่มีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างดินพรุ มีปริมาณโครเมตเหลืออยู่น้อยที่สุดคือ 0.59 µM ดังแสดงในตารางที่ 1 จากการนั้นนำตัวอย่างที่มีปริมาณโครเมตเหลือน้อยกว่า 20 µM ไปทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ได้เชื้อบริสุทธิ์ทั้งสิ้น 17 isolates ดังแสดงในตารางที่ 2

2. **การศึกษาประสิทธิภาพการรีดิวส์โครเมตของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ภายใต้สภาวะมีออกซิเจน**

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 17 isolates มาศึกษาประสิทธิภาพการรีดิวส์โครเมตภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูงและมีออกซิเจน โดยวัดความหนาแน่นของเซลล์และวิเคราะห์ปริมาณโครเมตที่เหลือ แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซนต์การรีดิวส์ (percentage of reduction) พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 17 isolates สามารถเจริญได้ดี ดังแสดงในภาพที่ 1 สำหรับการรีดิวส์โครเมตพบว่า isolate ที่มีเปอร์เซนต์การรีดิวส์สูงสุด เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะมีออกซิเจน คือ NTR12 มีค่าเท่ากับ 66.85 % และ isolate ที่มีเปอร์เซนต์การรีดิวส์ต่ำสุดที่สภาวะเดียวกันคือ NTR5 และ NTR3 เท่ากับ 8.28 และ 9.79 % ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 นอกจากนี้ในขวดควบคุม (control) ซึ่งไม่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย พบว่าไม่มีการลดปริมาณของโครเมต จึงสรุปได้ว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเคมีภายนอกเซลล์

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ตารางที่ 1 ชนิดของตัวอย่างและปริมาณโครเมตที่เหลือ

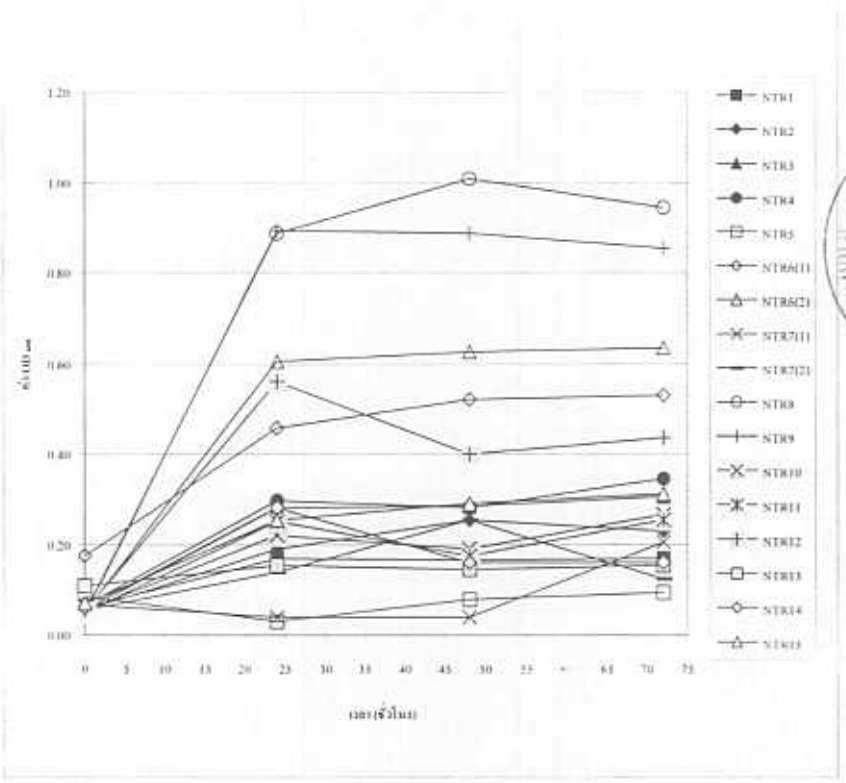
ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งตัวอย่าง	ปริมาณโครเมต (μM)
ตัวอย่างน้ำ 1	บ่อบำบัดที่ 1 โรงงานทอผ้าไหมคำปุน จ. อุบลราชธานี	42.20
ตัวอย่างน้ำ 2	บ่อบำบัดที่ 2 โรงงานทอผ้าไหมคำปุน จ. อุบลราชธานี	16.10
ตัวอย่างน้ำ 3	บ่อบำบัดที่ 3 โรงงานทอผ้าไหมคำปุน จ. อุบลราชธานี	2.86
ตัวอย่างน้ำ 4	บ่อบำบัดที่ 4 โรงงานทอผ้าไหมคำปุน จ. อุบลราชธานี	15.26
ตัวอย่างดิน	บริเวณย้อมผ้า โรงงานทอผ้าไหมคำปุน จ.อุบลราชธานี	0.85
ตัวอย่างดินพรุ	เขตป่าพรุ จ. พัทลุง	0.59

ตารางที่ 2 ชนิดของตัวอย่างและลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้

ชนิดของตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีย้อมแกรม
ตัวอย่างน้ำ 2	NTR1	irregular, undulate, raised, opaque, สีขาวขุ่น	rod	Gram positive
	NTR2	irregular, undulate, raised, opaque, สีขาวขุ่น	rod	Gram positive
	NTR3	irregular, undulate, raised, opaque, สีขาวขุ่น	rod	Gram negative
	NTR4	irregular, undulate, raised, opaque, สีขาวขุ่น	rod	Gram negative
	NTR5	irregular, undulate, raise, opaque, สีขาวขุ่น	rod	Gram positive
ตัวอย่างน้ำ 3	NTR6(1)	circular, entire, convex, opaque, สีขาวขุ่น	rod	Gram positive
	NTR6(2)	circular, entire, convex, opaque, สีขาว	rod	Gram positive
	NTR7(1)	circular, entire, raised, opaque, สีขาวอมเหลือง	rod	Gram negative
	NTR7(2)	circular, entire, raised, opaque, สีขาวขุ่น	rod	Gram positive
ตัวอย่างน้ำ 4	NTR8	circular, entire, raised, opaque, สีขาว	rod	Gram positive
	NTR9	circular, entire, raised, opaque, สีขาวขุ่น	rod	Gram positive
	NTR10	irregular, undulate, raised, transparent, สีเหลือง	short rod	Gram positive
ตัวอย่างดิน	NTR11	circular, entire, convex, opaque, สีขาวขุ่น	rod	Gram positive
	NTR12	circular, entire, convex, opaque, สีขาวอมชมพู	short rod	Gram positive
ตัวอย่างดินพรุ	NTR13	irregular, undulate, raised, opaque, สีขาว	rod	Gram positive
	NTR14	circular, entire, convex, opaque, สีเหลืองอมชมพู	rod	Gram positive
	NTR15	irregular, undulate, convex, opaque, สีขาวขุ่น	short rod	Gram positive

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



ภาพที่ 1 การเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมต เท่ากับ 100 µM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะมีออกซิเจน

ขท 16 27
ข้อมูลท้องถิ่น

ใช้เฉพาะใน
ศูนย์ข้อมูลท้องถิ่นเท่านั้น

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

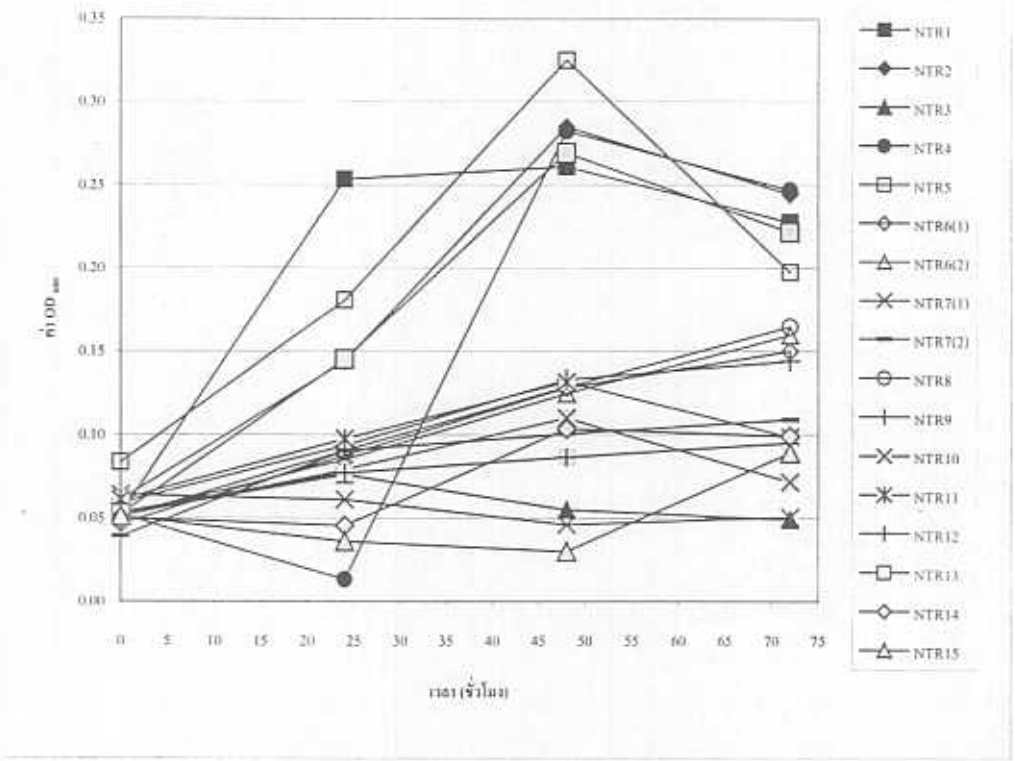
3. การศึกษาประสิทธิภาพการรีดิวส์โครเมตของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

นำแบคทีเรีย 17 isolates ที่คัดแยกได้ มาศึกษาประสิทธิภาพการรีดิวส์โครเมตภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูงและไร้ออกซิเจน โดยวัดความหนาแน่นของเซลล์และวิเคราะห์ปริมาณโครเมตที่เหลือ แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซนต์การรีดิวส์ (percentage of reduction) พบว่า isolate NTR6(2), NTR9, NTR8, NTR6(1) มีเปอร์เซนต์การรีดิวส์เท่ากับ 99.52, 98.93, 97.56 และ 97.10% ตามลำดับ สำหรับ isolate ที่มีเปอร์เซนต์การรีดิวส์ต่ำสุดในสภาวะเดียวกันคือ NTR7(2) มีค่าเท่ากับ 40.77% ดังแสดงในภาพที่ 3 สำหรับขวดควบคุม (control) ไม่พบการลดลงของโครเมต

จากภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 17 isolates ที่คัดแยกได้สามารถรีดิวส์โครเมตได้ทั้งสองสภาวะ แบคทีเรียส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการรีดิวส์โครเมตในสภาวะไร้ออกซิเจนสูงกว่าภายใต้สภาวะมีออกซิเจน ยกเว้น isolate NTR 11 และ NTR 12 ซึ่งเปอร์เซนต์การรีดิวส์โครเมตภายใต้สภาวะมีออกซิเจน (48.68 % และ 66.85 % ตามลำดับ) สูงกว่าสภาวะไร้ออกซิเจนเล็กน้อย (43.29% และ 58.36% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามเปอร์เซนต์การรีดิวส์โครเมตในสภาวะไร้ออกซิเจนโดย isolate NTR6(2) และ NTR9 (99.52 และ 98.93 % ตามลำดับ) สูงกว่าการรีดิวส์โครเมตในสภาวะมีออกซิเจนโดย isolate NTR 11 และ NTR 12 ซึ่งเป็นข้อดีเหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่อไป เนื่องจากการใช้ระบบไร้ออกซิเจน จะช่วยลดการใช้พลังงานในการให้อากาศ การกวน การเกิดฟอง และช่วยลดต้นทุนการผลิตอีกด้วย ดังนั้นจะเลือกเฉพาะการรีดิวส์โครเมตในสภาวะไร้ออกซิเจนในการทดลองขั้นต่อไป สำหรับแบคทีเรีย isolate NTR6(2) แม้ว่าจะมีเปอร์เซนต์การรีดิวส์สูงสุด แต่ต้องใช้เวลาในการเจริญในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อช้ากว่า isolate NTR9 ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาความล่าช้าในการเพิ่มขนาดหัวเชื้อ จึงเลือกใช้ isolate NTR9 ในการทดลองขั้นต่อไป

Ubon Rajathanee University

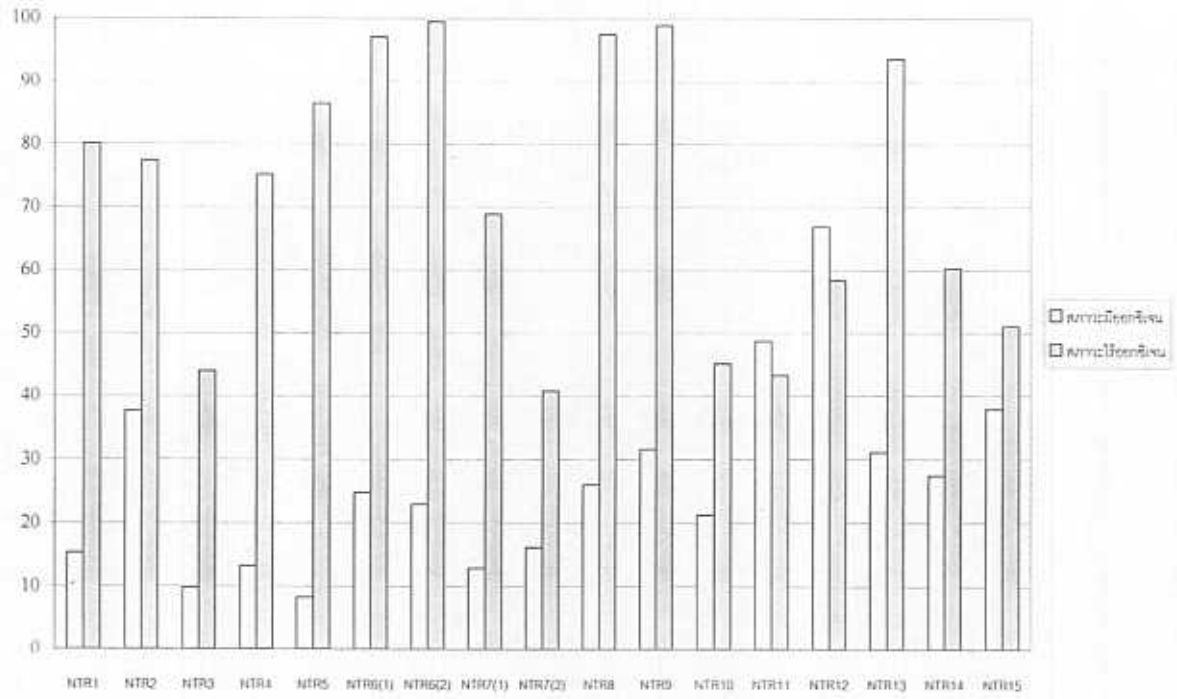
Ubon Rajathanee University



ภาพที่ 2 การเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมต เท่ากับ 100 µM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

4. สภาวะที่เหมาะสมต่อการรีดิวส์โครเมต

4.1 ความเป็นกรด-ด่าง

นำแบคทีเรีย isolate NTR9 มาศึกษาประสิทธิภาพการรีดิวส์โครเมต โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ที่ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างที่ระดับต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ตรวจสอบการเจริญเซลล์และวิเคราะห์ปริมาณโครเมตที่เหลือ จากการทดลองพบว่าในสภาวะที่เป็นกรด (pH 4-5) แบคทีเรียสามารถเจริญและรีดิวส์โครเมตได้เล็กน้อยในช่วง 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นไม่พบการเจริญและปริมาณโครเมตจะคงที่ เนื่องจากสภาพความเป็นกรด อาจมีผลต่อการเจริญของเซลล์ ส่วนที่ pH 9 เชื้อเชื้อสามารถเจริญและรีดิวส์โครเมตได้ประมาณ 40% ที่ระดับ pH 6-8 เชื้อสามารถเจริญและรีดิวส์โครเมตได้ดี โดยที่ pH 7 เชื้อสามารถเจริญและรีดิวส์โครเมตได้ดีที่สุด โดยโครเมตลดลงเหลือ 3.18 µM หรือประมาณ 97% ในเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 3-4 ภาพที่ 4-5

ตารางที่ 3 การเจริญของแบคทีเรีย isolate NTR9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อAMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

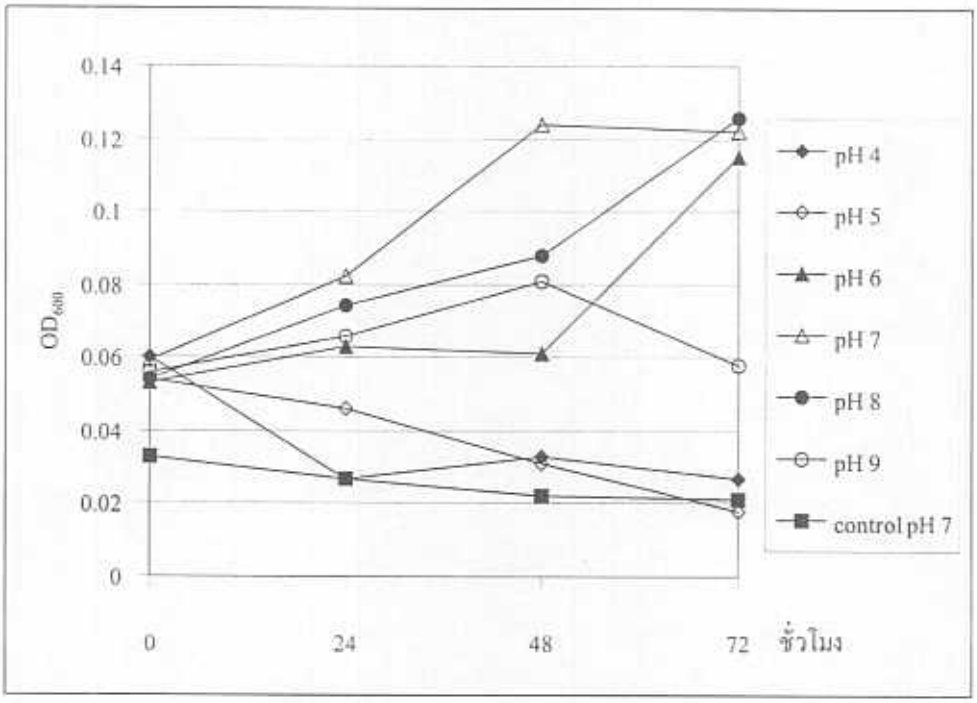
เวลา (ชั่วโมง)	ความหนาแน่นของเซลล์ (OD_{600})						
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	control pH 7
0	0.060	0.054	0.053	0.059	0.054	0.056	0.033
24	0.027	0.046	0.063	0.082	0.074	0.066	0.027
48	0.033	0.031	0.061	0.124	0.088	0.081	0.022
72	0.027	0.018	0.115	0.122	0.126	0.058	0.021

ตารางที่ 4 การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย isolate NTR9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 40 °C

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของโครเมตที่ระดับ pH ต่าง ๆ						
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	control pH 7
0	100.21	101.14	100.71	104.61	97.81	100.99	98.58
24	79.98	87.51	90.98	65.38	65.59	84.34	96.47
48	77.43	88.08	83.97	21.44	39.75	75.91	93.21
72	74.13	80.70	63.42	3.18	15.15	64.86	94.64

Ubon Rajathanee University

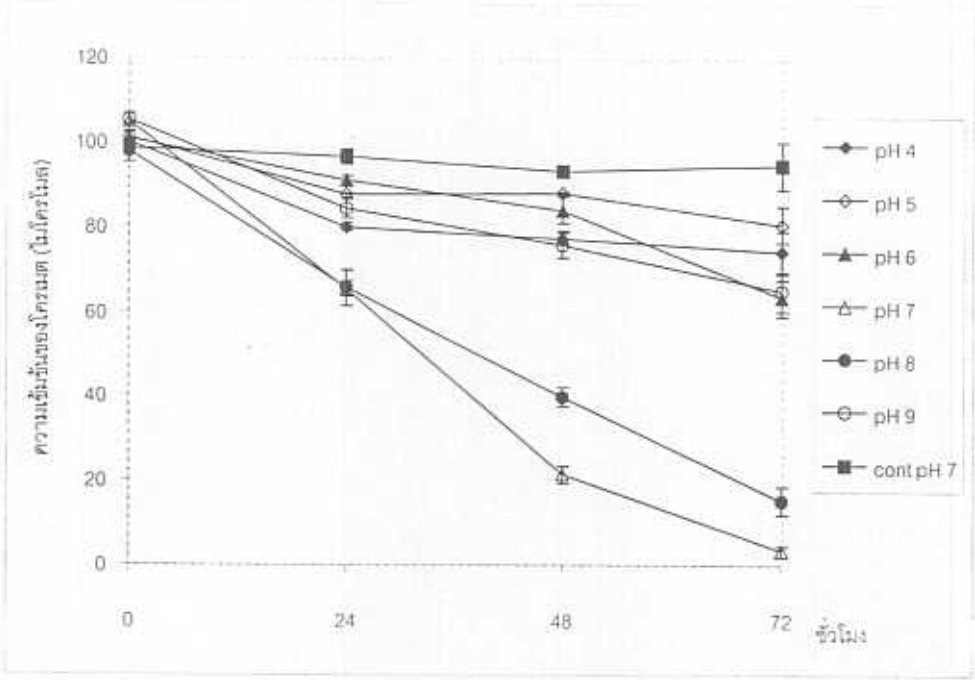
Ubon Rajathanee University



ภาพที่ 4 การเจริญของแบคทีเรีย isolate NTR9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อAMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมต เท่ากับ 100 µM และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



ภาพที่ 5 การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย isolate NTR9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

4.2 อุณหภูมิ

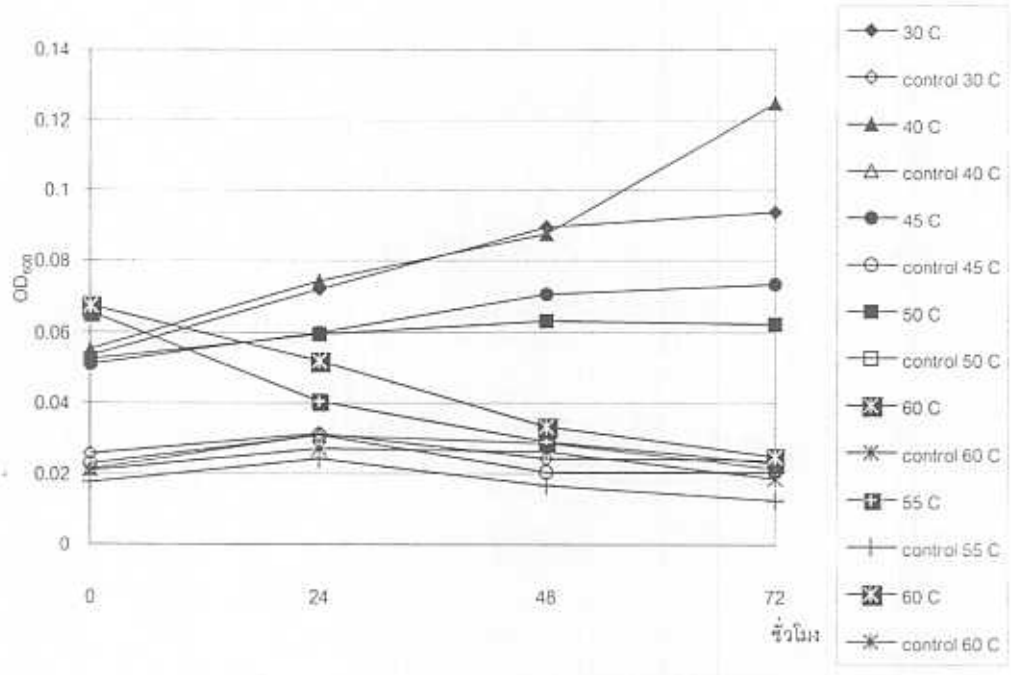
นำแบคทีเรีย isolate NTR9 มาศึกษาประสิทธิภาพการรีดิวส์โครเมต โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ที่ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 40 45 50 55 และ 60 °C ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ตรวจสอบการเจริญของเซลล์และวิเคราะห์ปริมาณโครเมตที่เหลือ จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและรีดิวส์โครเมตได้ในช่วงอุณหภูมิ 30-55°C โดยที่อุณหภูมิ 55°C เชื้อสามารถเจริญและรีดิวส์โครเมตได้ประมาณ 20% ในช่วง 48 ชั่วโมงแรก ส่วนที่อุณหภูมิ 60 °C เชื้อไม่สามารถเจริญหรือรีดิวส์โครเมตได้ อุณหภูมิที่เชื้อสามารถรีดิวส์โครเมตได้ดีที่สุดคือ อุณหภูมิ 40 °C ดังแสดงในตารางที่ 5-6 ภาพที่ 6-7

ตารางที่ 5 การเจริญของแบคทีเรีย isolate NTR9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

	ความหนาแน่นของเซลล์ (OD_{600})			
อุณหภูมิ	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
30 °C	0.053	0.072	0.090	0.094
control 30 °C	0.026	0.031	0.024	0.024
40 °C	0.055	0.075	0.088	0.125
control 40 °C	0.021	0.031	0.028	0.021
45 °C	0.051	0.060	0.071	0.073
control 45 °C	0.023	0.031	0.020	0.020
50 °C	0.052	0.060	0.063	0.062
control 50 °C	0.065	0.040	0.029	0.023
55 °C	0.025	0.040	0.029	0.023
control 55 °C	0.017	0.024	0.017	0.012
60 °C	0.067	0.0515	0.033	0.025
control 60 °C	0.021	0.027	0.026	0.019

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



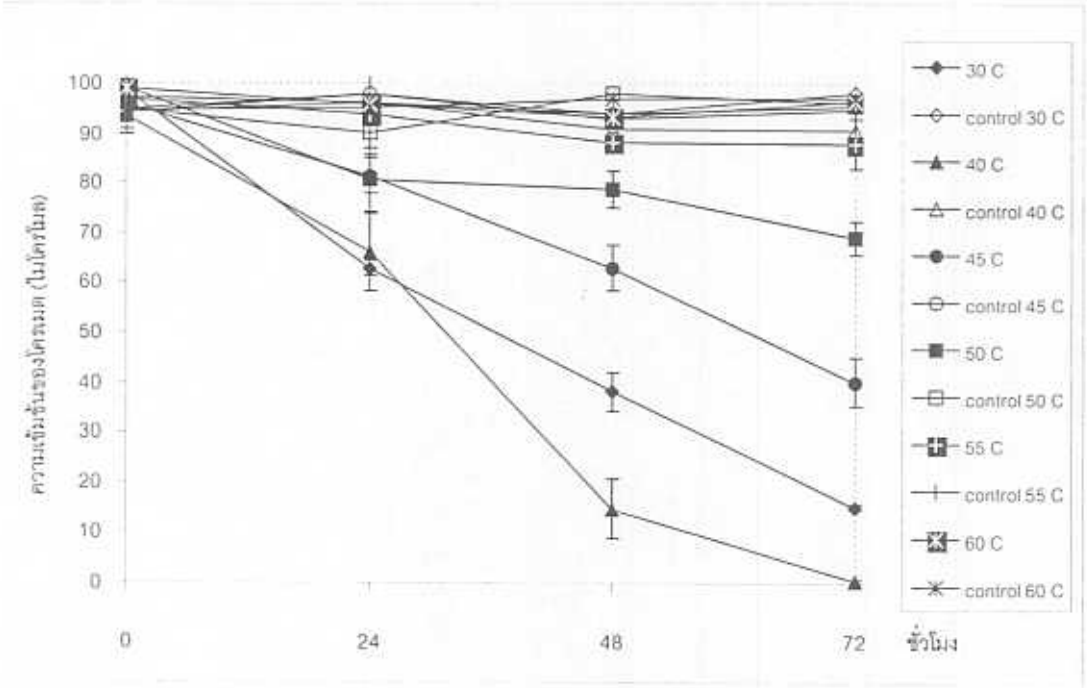
ภาพที่ 6 การเจริญของแบคทีเรีย isolate NTR9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ตารางที่ 6 การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย isolate NTR9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของโครเมตที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ											
	30 °C	Control 30 °C	40 °C	Control 40 °C	45 °C	Control 45 °C	50 °C	Control 50 °C	55 °C	Control 55 °C	60 °C	Control 60°C
0	98.77	97.15	93.63	94.25	95.84	94.10	99.23	94.83	96.87	94.93	98.82	94.43
24	62.9	96.15	66.24	96.18	81.54	98.13	80.80	90.28	93.89	97.87	95.89	95.41
48	38.01	93.86	14.68	90.9	62.99	93.81	78.71	97.89	88.21	92.77	93.15	96.88
72	15.01	98.09	0.33	90.45	40.03	95.11	68.88	95.80	87.95	94.67	96.43	96.96



ภาพที่ 7 การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย isolate NTR9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

4.3 ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น

นำแบคทีเรีย isolate NTR9 มาศึกษาประสิทธิภาพการรีดิวส์โครเมต โดยเลี้ยงเชื้อให้มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น (OD_{600}) เท่ากับ 0.01 0.05 0.1 0.15 0.2 และ 0.25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ที่ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °C ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ตรวจสอบการเจริญของเซลล์และวิเคราะห์ปริมาณโครเมตที่เหลือ จากการทดลองพบว่าที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.05 และ 0.1 แบคทีเรียให้เปอร์เซนต์การรีดิวสรีดิวส์โครเมตได้ 99% ภายใน 72 ชั่วโมง และที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.15 0.2 และ 0.25 แบคทีเรียมีเปอร์เซนต์การรีดิวส์โครเมตได้ประมาณ 93-95% ภายใน 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 6-7 ภาพที่ 7-8

ตารางที่ 7 การเจริญของแบคทีเรีย isolate NTR9 ที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นระดับต่าง ๆ ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมต เท่ากับ 100 µM และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

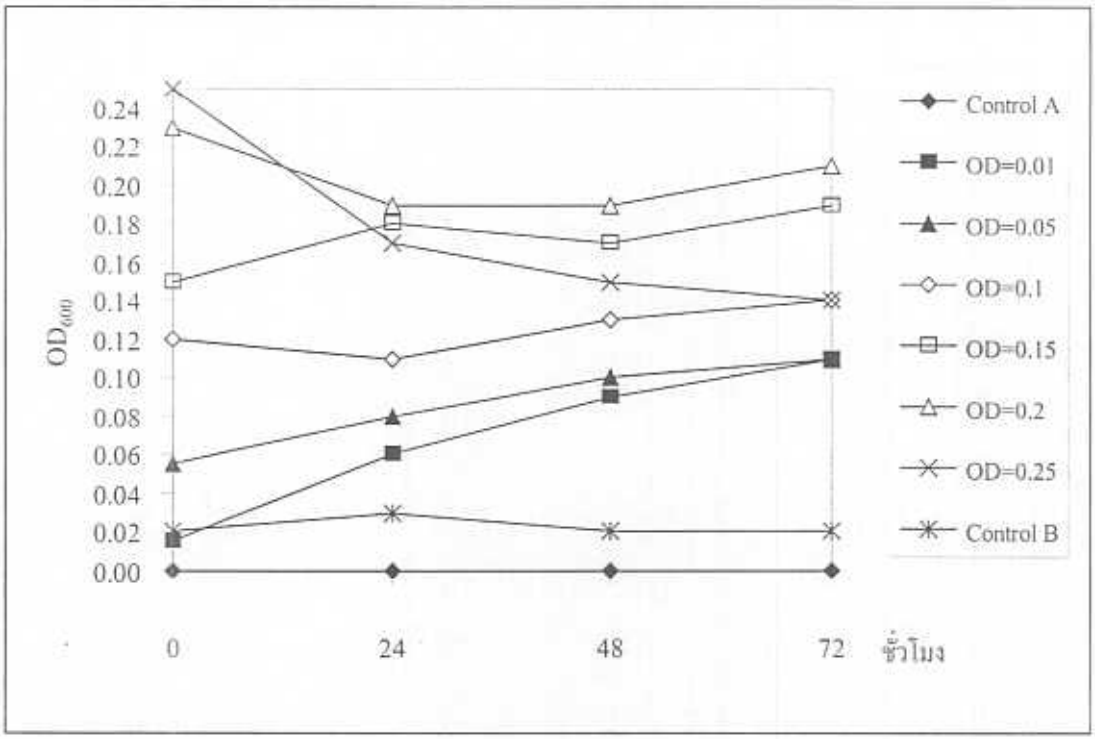
เวลา (ชั่วโมง)	ความหนาแน่นของเซลล์ (OD_{600})							
	Control A	OD_{600}= 0.01	OD_{600}= 0.05	OD_{600}= 0.1	OD_{600}= 0.15	OD_{600}= 0.2	OD_{600} = 0.25	Control B
0	0.00	0.015	0.055	0.12	0.15	0.23	0.25	0.02
24	0.00	0.06	0.08	0.11	0.18	0.19	0.17	0.03
48	0.00	0.09	0.1	0.13	0.17	0.19	0.15	0.02
72	0.00	0.11	0.11	0.14	0.19	0.21	0.14	0.02

ตารางที่ 8 การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย isolate NTR9 ที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นระดับต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของโครเมตที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นระดับต่าง ๆ							
	Control A	OD_{600}= 0.01	OD_{600}= 0.05	OD_{600}= 0.1	OD_{600}= 0.15	OD_{600}= 0.2	OD_{600} = 0.25	Control B
0	101.16	98.16	100.37	100.32	99.51	98.96	96.91	101.76
24	114.21	76.54	65.41	58.12	40.12	25.48	36.05	101.51
48	110.36	54.36	34.26	18.3	3.16	3.04	5.24	93.06
72	112.09	26.74	6.58	0.85	0.76	0.84	0.75	99.85

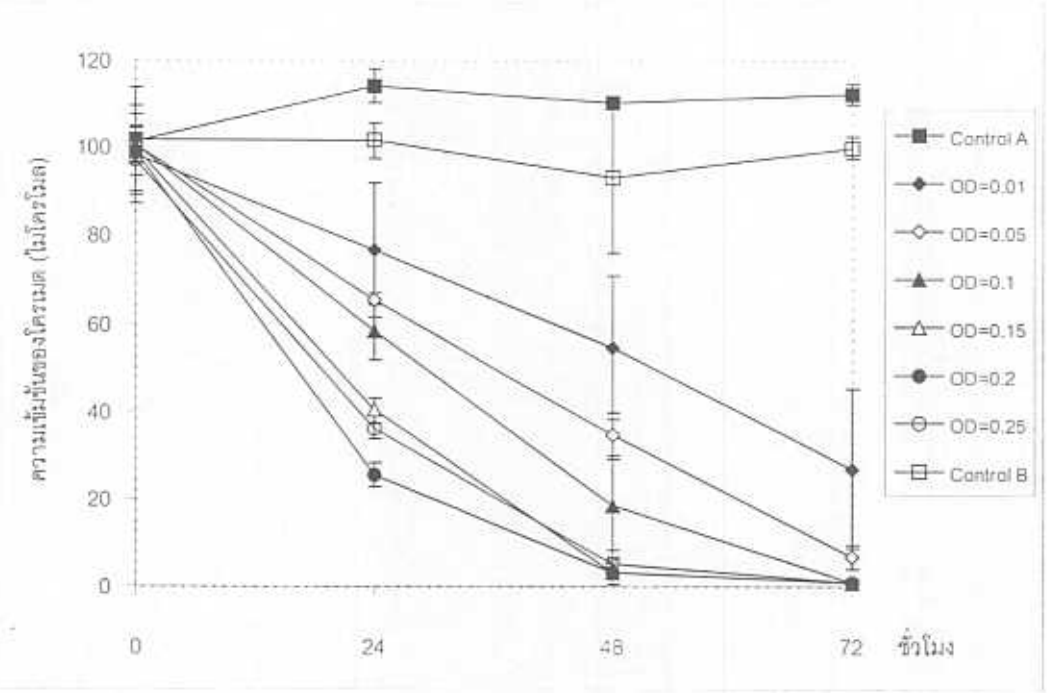
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



ภาพที่ 8 การเจริญของแบคทีเรีย isolate NTR9 ที่มีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นระดับต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Ubon Rajathanee University



ภาพที่ 9 การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย isolate NTR9 ที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นระดับต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM ซึ่งมีความเข้มข้นของโครเมตเท่ากับ 100 µM และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °C ในช่วงเวลาต่างๆ

Ubon Rajathanee University

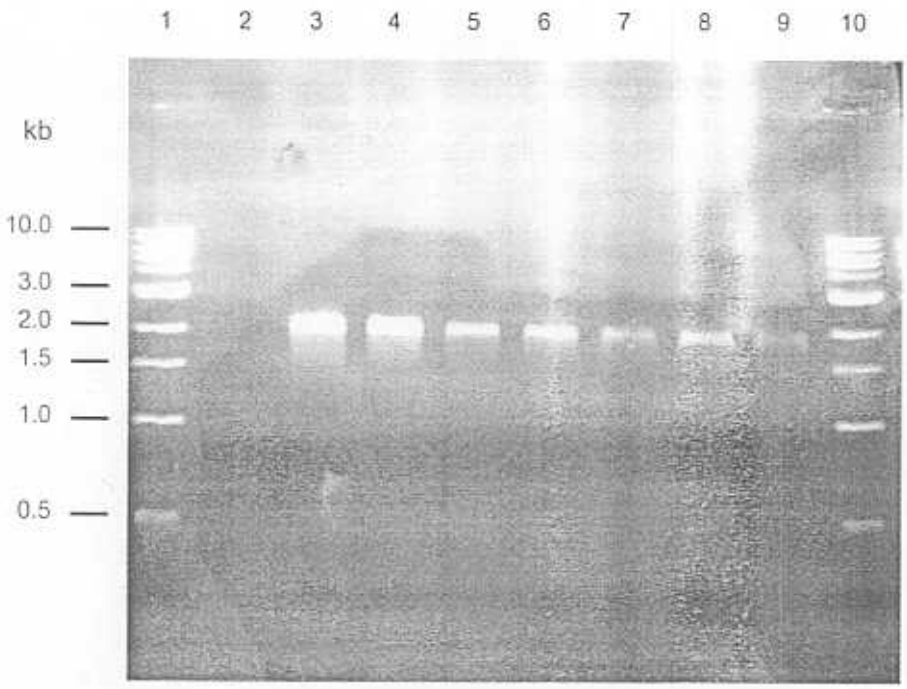
5. การจำแนกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่รีดิวส์โครเมตโดยวิธี 16S rRNA sequence analysis

แบคทีเรีย NTR9 เป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมบวก เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ AMM จะให้ลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ตรงกลางนูนเล็กน้อย โคโลนีทึบแสง สีขาวขุ่น เมื่อนำมาศึกษาชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มจำนวน rDNA fragments โดยใช้ primer pairs pA/pH′ ดังแสดงในภาพที่ 10 พบว่าได้ DNA fragment ขนาดเดียวกับ positive control (lane 3;*E. coli*, lane 9; NTR9) และไม่มี DNA fragment เกิดขึ้นใน negative control (lane 2) เมื่อนำ PCR product ที่ได้ไปย่อยด้วย restriction enzyme *Sau*3AI และ *Hae*III และตรวจสอบด้วย 2% low melting point agarose พบว่าแบบแผนการถูกย่อยด้วย restriction enzyme ของ NTR6 และ NTR9 มีลักษณะคล้ายคลึงกัน จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียทั้งสองน่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน

เมื่อนำ PCR product ที่ได้จากเซลล์ของ NTR9 มาวิเคราะห์หาลำดับเบส (direct sequencing) โดยใช้ primer 943 reverse แล้วนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบหาลำดับเบสที่เหมือนกันที่สุดในฐานข้อมูลของ EMBL database โดยใช้ BLAST search ผลการสืบค้นข้อมูลพบว่าลำดับเบสของ NTR9 สอดคล้อง 98% กับลำดับเบสของ *Bacillus fusiformis* 16S rRNA gene ดังนั้นจึงสรุปว่า NTR9 เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ซึ่งแบคทีเรียในจีนัสนี้เป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมบวก สร้างสปอร์ ดำรงชีวิต ในสภาวะ aerobic และ facultative anaerobic เซลล์เคลื่อนที่ได้ มีขนาด 0.5-1.5x2-6 μm เรียงตัวแบบเดี่ยวๆ เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่ กระบวนการเมตาบอลิซึมเป็นแบบ respiratory หรือ facultatively fermentative ทุกสปีชีส์เป็น chemoorganoheterotrophs มี G+C content เท่ากับ 30-70 mol% (Claus and Berkeley, 1986) Ash และคณะ (1991) ได้ศึกษา 16S rRNA sequence ของจีนัส *Bacillus* ทั้งหมด 51 สปีชีส์ สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมออกเป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *B. subtilis* ซึ่งเป็น type species ของจีนัส และ 27 สปีชีส์อื่น ๆ ตัวอย่างเช่น *B. anthracis*, *B. cereus*,*B. medusa*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquifaciens*, *B. lautus*, *B. lentimorbus*, *B. licheniformis*, *B. popilliae*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. maroccanus*, *B. simplex* และ *B. psychrosaccharolyticus*. กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *B. fusiformis*, *B. globisporus*, *B. insolitus*, *B. pasteurii*, *B. psychrophilus* และ *B. sphaericus*. กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *B. macerans* และสปีชีส์ อื่น ๆ อีก 9 สปีชีส์ กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *B. laterosporus* and *B. brevis* ซึ่งแสดงเส้นสายความสัมพันธ์ ต่างจากแบคทีเรียในจีนัสเดียวกันเล็กน้อย กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *B. stearothermophilus*, *B. kaustophilus* และ *B. thermoglucosidasius*

Ubon Rajathanee University

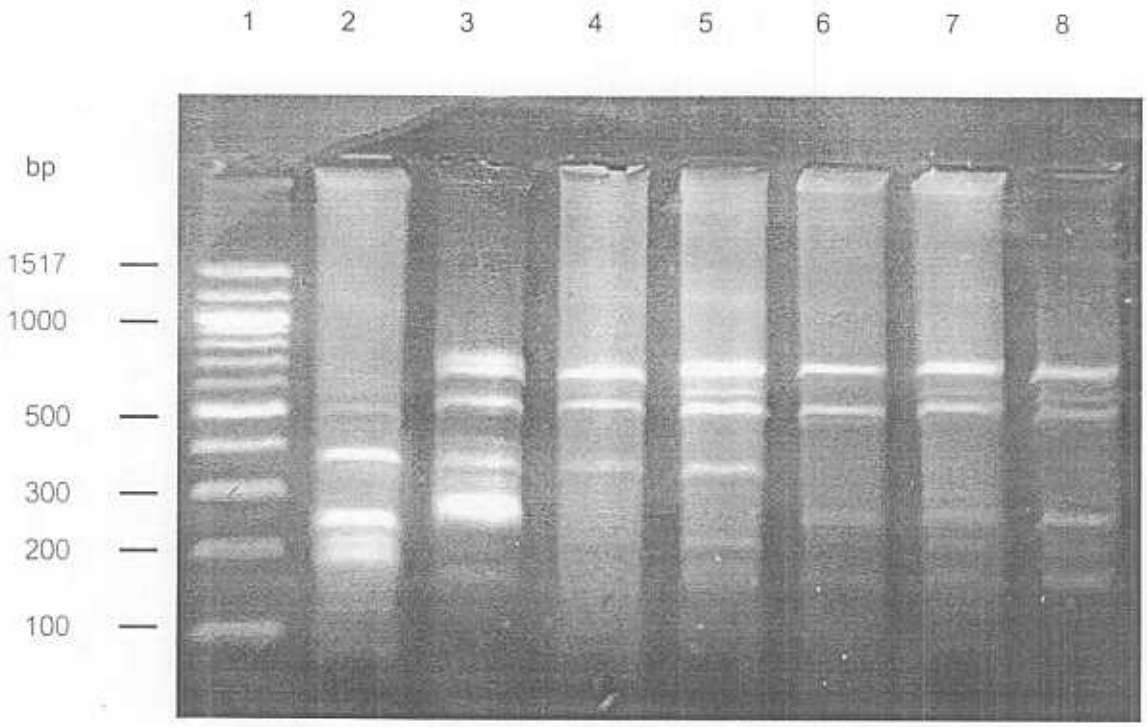
Ubon Rajathanee University



ภาพที่ 10 PCR amplification ของ 16S rDNA product ด้วย pA และ pH' primers. Lane 1 : 1Kb DNA Ladder (0.5-1-1.5-2-3-4-5-6-8-10 Kb), Lane 2 : negative control, Lane 3 : positive control, Lane 4 : แบคทีเรีย KM11, Lane 5 : แบคทีเรีย KM13, Lane 6 : แบคทีเรีย KM13(a), Lane 7 : แบคทีเรีย KM14, Lane 8 : แบคทีเรีย NTR6 และ Lane 9 : แบคทีเรีย NTR9

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



ภาพที่ 11 RFLP patterns ของ 16S rDNA product เมื่อตัดด้วย *Sau*3AI และ *Hae*III. Lane 1 : 100 bp DNA Ladder (100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000-1200-1517 bp), Lane 2 : positive control, Lane 3 : แบคทีเรีย KM11, Lane 4 : แบคทีเรีย KM13, Lane 5 : แบคทีเรีย KM13a, Lane 6 : แบคทีเรีย KM14, Lane 7 : แบคทีเรีย NTR6, Lane 8 :แบคทีเรีย NTR9

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

1 ttttaaccnttgncggccgtactccccaggcggtcgacttaacgcgttagctccggaagccacgcctcaagggca

76 caacctccaagtcgacatcgtttacggcgtggactaccagggntatctaatcctgtttgctccccacgctttcgc

151 acctgagcgtcagtcttcgtccaggggggccgccttcgccaccggntattcctccagatctctacgcatttcaccg

226 ctacacctggaattctacccccctctacgagactcaagcttgccagtatcagatgcagttcccaggttgagcccg

301 gggatttcacatctgacttaacaaaccgcctgcgtgcgctttacgcccagtaattccgattaacgcttgcaccct

376 ccgttattaccgcggctgctggcacggagttagccggtgcttcttctgcgggtaacgtcaatgagcaaaggtatt

451 aactttactcccttcctccccgctgaaagtactttacaacccgaaggccttcttcatacacgcggcatggctgca

526 tcaggcttgcgcccattgtgcaatattccccactgctgcctcccgtaggagtctggaccgtgtctcagttccagt

601 gtggctggtcatcctctcagaccagctagggatcgtcgcctaggtgagcctttaccccacctactagctaatcca

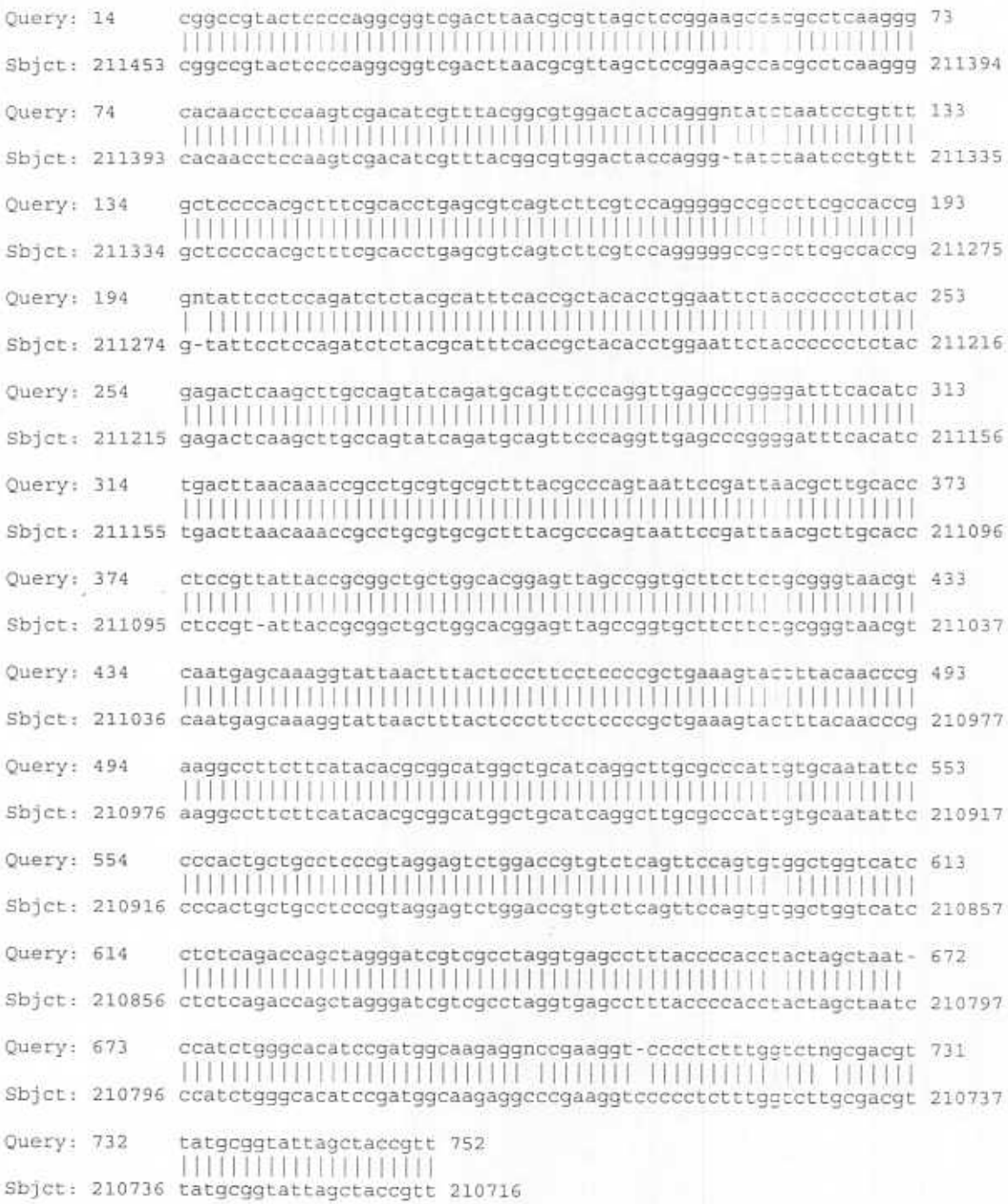
676 tctgggcacatccgatggcaagaggnccgaaggtcccctctttggtctngcgacgttatgcggtattagctaccg

751 ttncagtantatcccctcatcaggcagttnccanaataatcaccgtcgcantcgtagaaaaagaagctgttctgt

826 tacgttcaatgcatgtttagcctgcg 851

ภาพที่ 12 ลำดับเบสของ 16S rDNA gene ของ positive control (851 nucleotides) "n" หมายถึง Unidentified nucleotides

Ubon Rajathanee University



ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบการเข้าคู่ของลำดับเบสของ positive control isolate และลำดับเบสของ subject sequence; *Escherichia coli* (Accession no. AEO16709)

Ubon Rajathanee University

1 tcttgncgaccgtactccccaggcggagtgcttaatgcgttagctgcagcactaaggggcggaaaccccctaaca

76 cttagcactcatcgtttacggcgtggactaccagggntatctaatcctgtttgctccccacgctttcgcgcctca

151 gcgtcagttacagaccagaaagtcgccttcgccactggtgttcctccaaatctctacgcatttcaccgctacact

226 tggaattccactttcctcttctgcactcaagtcccccagtttccaatgaccctccacggnttgagccgtgggctt

301 tcacatcagacttaaaggaccgcctgcgcgcgctttacgcccaataattccggacaacgcttgccacctacgtat

376 taccgcggctgctggcacgtagttagccgtggctttctaataaggtaccgtcaaggtacagccagttactactgt

451 acttgttcttcccttacaacagagttttacgatccgaaaaccttcttcactcacgcggcgttgctccatcaggct

526 ttcgcccattgtggaagattccctactgctgcctcccgtaggagtctgggccgtgtctcagtcccagtgtggccg

601 atcaccctctcaggtcggctacgcatcgtcgccttggtgagccgttacctcacaaactagctaatgcgccgcggg

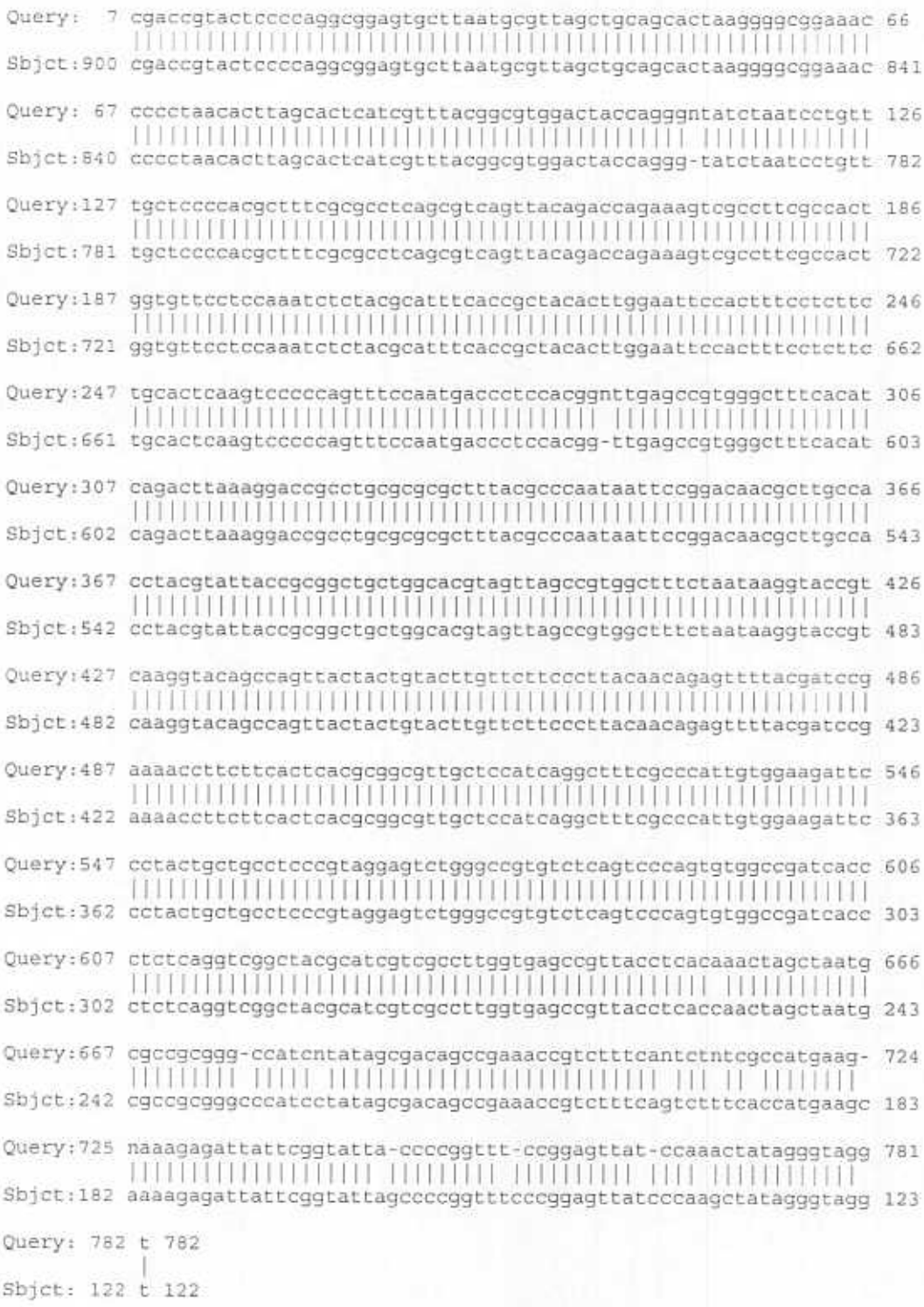
676 ccatcntatagcgacagccgaaaccgtctttcantctntcgccatgaagnaaagagattattcggtattaccccg

751 gtttccggagttatccaaactatagggtaggtggccacgtgt 792

ภาพที่ 14 ลำดับเบสของ 16S rDNA gene ของแบคทีเรีย isolate NTR9 (792 nucleotides) "n" หมายถึง Unidentified nucleotides

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบการเข้าคู่ของลำดับเบสของแบคทีเรีย isolate NTR9 และลำดับเบสของ subject sequence; *Bacillus forsiformis* (Accession no. AY548950)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

วิจารณ์ผลการทดลองและสรุป

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวส์โครเมตภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง โดยทำการเก็บตัวอย่างดินและน้ำจากโรงงานทอผ้าไหมคำปุนในเขตจังหวัดอุบลราชธานี และตัวอย่างดินพรุ จากเขตป่าพรุ จังหวัดพัทลุง สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 17 isolates เมื่อเปรียบเทียบการรีดิวส์โครเมตภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน พบว่าแบคทีเรียทั้ง 17 isolates ที่คัดแยกได้สามารถรีดิวส์โครเมตได้ทั้งสองสภาวะ แต่แบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการรีดิวส์ในสภาวะไร้ออกซิเจนสูงกว่าภายใต้สภาวะมีออกซิเจน ยกเว้น isolate NTR11 และ NTR12 จากรายงานของ Shen และ Wang (1993) พบว่าแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC33456 สามารถรีดิวส์โครเมตได้ทั้งสองสภาวะ แต่อัตราการรีดิวส์ โครเมตภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนสูงกว่าภายใต้สภาวะมีออกซิเจน อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดรีดิวส์โครเมตภายใต้สภาวะมีออกซิเจนเท่านั้น ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas putida* PRS2000 (Ishibashi *et al.*, 1990), *Pseudomonas ambigua* G-1 (Suzuki *et al.*, 1992), *Pseudomaonas aeroginosa* HPO14 (Oh and Choi, 1997), *P. putida* MK1 (Park *et al.*, 2000), *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas fluorescens* LB300 (Wang and Xiao, 1995), *Bacillus subtilis* (Garbisu *et al.*, 1998) และแบคทีเรียบางชนิดรีดิวส์โครเมตภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนเท่านั้น เช่น *Enterobacter cloacae* HO1 (Wang *et al.*, 1990) และ *Microbacterium* sp. MP30 (Pattanapipitpaisal *et al.*, 2001a, Pattanapipitpaisal *et al.*, 2001b)

เมื่อนำมาศึกษา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการรีดิวส์โครเมต พบว่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการรีดิวส์โครเมตจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมของเซลล์ด้วยเช่นกัน นั่นคือแบคทีเรีย isolate NTR 9 สามารถเจริญและรีดิวส์โครเมตได้ในช่วง pH 6-9 และช่วงอุณหภูมิ 30-55°C โดย pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการรีดิวส์โครเมตที่สุดคือ pH 7 และอุณหภูมิ 40 °C ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่นคือการรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* HOI พบที่ pH 6.0-8.5 และที่อุณหภูมิ 20-40 °C โดย pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการรีดิวส์โครเมตที่สุดคือ pH 7 และ 30 °C ตามลำดับ (Komori *et. al.*,1989, Wang, *et al.*, 1989) สำหรับการรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC33456 พบที่ pH 3.0-8.0 และที่อุณหภูมิ 10-45 °C โดย pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการรีดิวส์โครเมตที่สุดคือ pH 7 และ 36 °C ตามลำดับ (Bopp and Ehrlich, 1988, Shen and Wang, 1993) ขณะที่การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. พบที่ pH 7 และ 30 °C (Wang and Xiao, 1995)

จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่รีดิวส์โครเมตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 °C แต่แบคทีเรีย isolate NTR9 เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญและรีดิวส์โครเมตได้ที่อุณหภูมิสูง จึงเป็นแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวส์โครเมต นอกจากนี้ยังพบว่าการรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรีย isolate NTR9 จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น นั่นคือเมื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น ประสิทธิภาพในการ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

รีดิวส์โครเมตจะเพิ่มขึ้นด้วย เช่นเดียวกับเชื้อ *E. cloacae* HOI (Wang, *et al*., 1989) *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas fluorescens* (Wang and Xiao, 1995) *E. coli* ATCC33456(Shen and Wang, 1994), , *Agrobacterium radiobacter* EPS-916 (Llovera *et al*.,1993)

เมื่อนำมาศึกษาชนิดของแบคทีเรีย isolate NTR9 โดยใช้ universal primer (Primer pA และ pH') (Edward *et. al*.,1989) ในการเพิ่มจำนวน rDNA fragment จากแบคทีเรีย isolate NTR9 ในปฏิกิริยา polymerase chain reaction ได้ PCR product ขนาดเดียวกับ 16S rRNA gene เมื่อนำไปทำการ sequencing ด้วย primer 943 reverse, one direction ทำให้ได้ลำดับเบสประมาณ 45-50% ของ 16S rDNA sequence จากการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลพบว่าลำดับเบสของแบคทีเรีย isolate NTR9 สอดคล้องกับลำดับเบสของ *Bacillus fusiformis* 16S rRNA gene ถึง 98% ดังนั้นจึงสรุปว่า NTR9 เป็นแบคทีเรีย *Bacillus fusiformis* NTR9

แบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวส์โครเมต ยังไม่มีการศึกษาวิจัยมาก่อน งานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียรีดิวร์โครเมตที่มีการตีพิมพ์เผยแพร่ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่รีดิวส์โครเมตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 $^{\circ}$C งานวิจัยนี้จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาเพื่อนำแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้นี้ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีการปนเปื้อนของโครเมตในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงต่อไป

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เอกสารอ้างอิง

Ash, C., J.A.E. Farrow, S. Wallbanks and M.D. Collins. (1991) Phylogenetic heterogeneticity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunits-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 13: 202-206.

Bopp, L.H. and H.L. Ehrlich. 1988. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. Arch. Microbiol. 155: 4426-4431.

Belilles, R.P. 1979. The lesser metals pp.547-616. In *Toxicity of Heavy Metals in the Environment*: 2 nd edited by Oehme, F.W. Marcel Dekker Inc. New York.

Burrows, D. (1983) *Chromium-Metabolism and Toxicity*. CRC Press Inc. London.

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

Claus, D. and R.C.W. Berkeley. (1986) The genus *Bacillus* pp.1105-1139. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol.2* edited by Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. The Williams and Williams Company. Baltimore.

Garbisu, C., I. Alkorta, M.J. Llama and J.L. Serra. 1998. Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*. *Biodegradation*. 9: 133-141.

Gibb, H.J., P.S.J. Lees, P.F. Pinsky and B.C. Rooney. 2000. Lung cancer among workers in chromium chemical production. *American J. Ind. Med.* 38: 115-126.

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

Komori, K., P. Wang, K. Toda, and H. Ohtake. 1989. Factors affecting chromate reduction in *Enterobacter cloacae* HO1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 567-570.

Langard, S. 1982. *Biological and Environmental Aspects of Chromium*. Elsevier Biomedical Press. New York.

Llovera, S., R. Bonet, M.D. Simon-Pujol, and F. Congregado. 1993. Chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium radiobacter* EPS-916. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3515-3519.

Oh, Y.S. and S.C. Choi. 1997. Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas aeruginosa* HPO14. *J. Microbiol.* 35: 25-29.

Park, C.H., M. Keyhan, B. Wielinga, S. Fendorf and A. Matin. 2000. Purification to homogeneity

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

and characterisation of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1788-1795.

Pattanapipitpaisal, P., N.L. Brown and L.E. Macaskie. 2001a. Chromate reduction by *Microbacterium liquefaciens* immobilised in polyvinyl alcohol. *Biotechnol. Lett.* 23: 61-65.

Pattanapipitpaisal, P., N.L. Brown and L.E. Macaskie. 2001b. Chromate reduction and 16S rRNA identification of bacteria Isolated from a Cr(VI)-contamInated sIte. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 257-261.

Patterson, J.W. 1985. *Industrial Wastewater Treatment Technology*. Butterworth Publishers. Stoneham.

Pederson, N.B. 1982. The effects of chromium on the skin pp.249-276. In *Biological and Environmental Aspects of Chromium* edited by Langard, S. Elsevier. New York.

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

Shamberger, R.J. (1979) Beneficial effects of trace elements pp. 689-696. In *Toxicity of Heavy Metals in the Environment: Part 2* edited by F.W. Oehme. Marcel Dekker Inc. New York.

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

Shen, H. and Y.T.Wang. 1994. Biological reduction of chromium by *E. coli*. *J. Environ. Eng.* 120: 560-572.

Suzuki, T., N. Miyata, H. Horitsu and K. Kawai. 1992. NAD(P)H-dependent chromium(VI) reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1: a Cr(V) intermediate is found during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). *J. Bacteriol.* 174: 5340-5345.

Wang, P., T. Mori, K. Toda and H. Ohtake. 1990. Membrane-associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*. *J. Bacteriol.* 172: 1670-1672.

Wang, Y. and C. Xiao. 1995. Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure cultures of bacteria. *Wat. Res.* 24: 2467-2474.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ : ผศ. ดร. ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล

   Assist. Prof. Dr. Pranee Pattanapipitpaisal

2. ตำแหน่งปัจจุบัน : ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่ติดต่อได้ : ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
   อำเภอ วารินชำราบ จังหวัด อุบลราชธานี รหัสไปรษณีย์ 34190
   โทรศัพท์: 045-433110-2 ต่อ 4228 โทรสาร: 045-288380

4. ประวัติการศึกษา

   ปริญญาตรี: ชีววิทยา สถาบัน: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน
   ปีที่สำเร็จการศึกษา: 2527 คะแนนเฉลี่ยสะสม: 2.86
   หัวข้อสารนิพนธ์: ผลของอัลตรินและกรัมม็อกโซนต่อการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila*
   ปริญญาโท: จุลชีววิทยา สถาบัน: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
   ปีที่สำเร็จการศึกษา: 2531 คะแนนเฉลี่ยสะสม: 3.78
   หัวข้อวิทยานิพนธ์: การศึกษาส่วนของเอนไซม์ย่อยแป้งจากเชื้อราที่ทนอุณหภูมิสูง
   ปริญญาเอก: Biological Sciences สถาบัน: The University of Birmingham
   ปีที่สำเร็จการศึกษา: 2544 คะแนนเฉลี่ยสะสม: (research)
   หัวข้อวิทยานิพนธ์: Bioreduction of chromate and detection of chromate resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ : การบำบัดวัตถุมีพิษ/ของเสียโดยจุลินทรีย์ พันธุศาสตร์แบคทีเรีย และเอนไซม์เทคโนโลยี

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

   6.1 ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย Characterisation of transposable elements of the actinomycete *Rhodococcus*. โดยทำงานวิจัยที่ F.A. Janssens Laboratory of Genetics, Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Katholieke University Leuven. ประเทศเบลเยี่ยม เมื่อ พ.ค.- ส.ค. 3539

   6.2 ผลงานวิจัยตีพิมพ์เผยแพร่ :

   ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2545. การลดความเป็นพิษของโครเมียมโดยแบคทีเรีย. วารสารวิชาการ ม.อบ. 2: 30-35 โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี.

   ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2547. การคัดแยกแบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวส์โครเมต. วารสารวิชาการ ม.อบ. 6: 53-63. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

อุบลราชธานี.

Badar, U., N. Ahmed, A. J. Beswick, P. Pattanapipitpaisal and L. E. Macaskie. 2000. Reduction of chromate by microorganisms isolated from metal contaminated sites of Karachi, Pakistan. *Biotechnol. Lett.* 22: 829-836.

De Mot R., I. Nagy, A. De Schrijer, P. Pattanapipitpaisal, G. Schoofs and J. Vanderleyden. 1997. Structural analysis of the 6-kb crytic plasmid pFAJ2600 from *Rhodococcus erythipolis* N186/21 and construction of *Eschericia coli* - Rhodococcus shuttle vectors. *J. Microbiol.* 143: 3137-3147.

Pattanapipitpaisal, P., N. L. Brown and L. E. Macaskie. 2001. Chromate reduction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI) contaminated site. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 57: 257-261.

Pattanapipitpaisal, P., N. L. Brown and L. E. Macaskie. 2001. Chromate reduction by *Microbacterium liquefaciens* immobilised in polyvinyl alcohol. *Biotechnol. Lett.* 23: 61-65.

Pattanapipitpaisal, P., A. N. Mabbett, J. A. Finlay, A. J. Beswick, M. Paterson-Beedle, A. Essa, J. Wright, M. R. Tolley, U. Badar, N. Ahamed, J. L. Hobman, N. L. Brown and L. E. Macaskie. 2002. Reduction of Cr (VI) and Bioaccumulation of Chromium by Gram-positive and Gram-negative Microorganisms not previously exposed to Cr-stress. *Environ. Technol.* 23: 731-745.

6.3 Proceeding :

Pattanapipitpaisal, P., J. L. Hobman, N. L. Brown and L. E. Macaskie. 2001. Bioreduction of Cr(VI) by *Microbacterium* sp. isolated from tannery waste and used of immobilised cells for continuous removal of Cr(VI). Proceeding of the International Biohydrometallurgy Symposium, Brazil, September.

6.4 งานวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุน :

1). โครงการวิจัยเรื่อง การคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สร้างเอนไซม์ไลเปส ทุนสนับสนุนการทำวิจัยเงินรายได้มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2546 (1 พ.ค. 46 – 30 เม.ย. 47)

สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

การดำเนินการ : ดำเนินการเสร็จสมบูรณ์และส่งรายงานแล้ว

2) โครงการวิจัยเรื่อง การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง ทุนอุดหนุนจากเงินงบประมาณ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เพื่อการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2547 (1 ต.ค. 46 – 30 ก.ย. 47)
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
การดำเนินการ : อยู่ระหว่างดำเนินการ

3) โครงการวิจัยเรื่อง การรีดิวส์โครเมตโดยเซลล์และเอนไซม์โครเมตรีดัสเตสที่ถูกตรึง ทุนอุดหนุน
จากเงินงบประมาณเพื่อการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2548 (1 ต.ค. 47 – 30 ก.ย. 48)
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
การดำเนินการ : อยู่ระหว่างดำเนินการ

Ubon Rajathanee University