ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสโดยสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus fusiformis* NTR9

Factors Affecting Cr(VI) Reductase Activity by Cell-Free Extract of Thermophillic *Bacillus fusiformis* NTR9

ทิพย์มณฑา ฤกษ์ใหญ่ และ ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล*
หน่วยบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
Tipmomtar Laryai and Pranee Pattanapipitpaisal*
Bioremediation unit, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University.

บทคัดย่อ

สารประกอบโครเมียมที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมเป็นปัญหาที่สำคัญ เพราะเฮกซาวาเลนซ์โครเมียมหรือโครเมตมีความเป็นพิษสูง และมีผลทำให้เกิดการผ่าเหล่าและก่อมะเร็งในสิ่งมีชีวิต การรีดิวส์โครเมตเกี่ยวข้องกับเอนไซม์โครเมตรีดักเทสที่พบในแบคทีเรียเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดความเป็นพิษของโครเมต งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการรีดิวส์โครเมตโดยสารสกัดจากเซลล์ (cell free extract) หรือ S_{12} fraction ของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus fusiformis* NTR9 ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของสารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 คือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และพีเอชเท่ากับ 7.0 กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเหลืออยู่เท่ากับ 60.30 และ 26.44 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 70 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์มีความคงทนต่อความร้อน นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์มีความคงทนภายใต้สภาวะที่เป็นกรดและเป็นกลาง แต่ความคงทนของเอนไซม์จะลดลงภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง สารประกอบโลหะ $CuCl_2$ และ $FeCl_3$ มีผลในการกระตุ้นให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นเท่ากับ 188.19 และ 180.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ $MnSO_4$ และ AgCl มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือเท่ากับ 72.19 และ 8.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน $MgCl_2$, $ZnSO_4$ และ KH_2AsO_4 รวมทั้งสารรับอิเล็กตรอน (Na_2SO_4 และ $NaNO_3$) ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์โครเมตรีดักเทสไปประยุกต์ใช้เพื่อบำบัดความเป็นพิษของโครเมตในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ : โครเมตรีดักเทส การรีดิวส์โครเมต การบำบัดความเป็นพิษของโครเมตโดยชีววิธี

***Corresponding author.** E-mail: scpranpa@gmail.com

Abstract

Residual chromium compounds in discharged effluents is an important of serious problem, due to hexavalent chromium or chromate [Cr(VI)] is extremely toxic and shows mutagenic and carcinogenic effects on living organisms. The bacterial enzymatic Cr(VI) reduction mostly involves and could be an effective method of detoxifying Cr(VI) pollution. The present study evaluated factors that affect Cr(VI) reductase activity of cell-free extracts or S_{12} fraction of thermophilic chromate-reducing bacteria, *Bacillus fusiformis* NTR9. Results showed that Cr(VI) reductase activity of S_{12} fraction was maximum at 80°C and pH 7. The reductase activity still remained 60.34% and 26.44% after 30 minutes of exposure to 70 and 90°C, respectively, suggesting a heat stable enzyme. Moreover, the enzyme was resistant under acidic and neutral condition but its stability was decreased under alkaline condition. The Cr(VI) reductase activity of S_{12} fraction was enhanced by $CuCl_2$ and $FeCl_3$ which were 188.19% and 180.38%, respectively. The Cr(VI) reductase activity could be reduced to 72.19% and 8.95% in the presence of $MnSO_4$ and AgCl, respectively. While $MgCl_2$, $ZnSO_4$, KH_2AsO_4 and electron acceptors like Na_2SO_4 and $NaNO_3$ had no affect on Cr(VI) reductase activity. The results showed that Cr(VI) reductase could be a good candidate for detoxification of Cr(VI) in industrial effluents.

Keywords : Cr(VI) reductase, Cr(VI) reduction, bioremediation of chromate

***Corresponding author.** E-mail: scpranpa@gmail.com

บทนำ

โครเมียม (chromium, Cr) เป็นสารในกลุ่มโลหะหนักที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตเหล็กกล้า อุตสาหกรรมการผลิตอัลลอยด์ อุตสาหกรรมการฟอกหนัง อุตสาหกรรมสิ่งทอ การชุบโลหะด้วยไฟฟ้าและการผลิตเยื่อกระดาษ นอกจากนี้โครเมียมยังเป็นส่วนผสมที่สำคัญในน้ำหล่อเย็น สารดับเพลิงและสารป้องกันการเน่าสลายของเนื้อไม้ (Patterson, 1985) สภาวะออกซิเดชั่นของโครเมียม ได้แก่ Cr^{2-}, Cr^{1-}, Cr^{0}, Cr^{1+}, Cr^{2+}, Cr^{3+}, Cr^{4+}, Cr^{5+}และ Cr^{6+} แต่ที่พบมาก คือ Cr^{2+} [Cr(II), โครมัส], Cr^{3+} [Cr(III), โครมิค] และ Cr^{6+} [Cr(VI), โครเมต] (Langard, 1982) สารประกอบเฮกซาวาเลนซ์โครเมียมหรือโครเมต มีความคงตัวต่ำ ความสามารถในการละลายและมีความเป็นพิษสูง สามารถซึมผ่านเซลล์เมมเบรนของเซลล์ยูคาริโอตและโปรคาริโอต และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม ทำให้เกิดการผ่าเหล่าหรือเซลล์ตายในที่สุด (Cervantes & Silver, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าโครเมตสามารถจับกับสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย ทำให้เกิดการผ่าเหล่าแบบ frameshift mutation และ base substitutions และที่ความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Petrilli & De Flora, 1977) สำหรับความเป็นพิษต่อมนุษย์ มีรายงานว่าสารประกอบเฮกซาวาเลนซ์โครเมียม เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดการอักเสบภายในช่องจมูก แผลผุพองที่ผิวหนัง การเป็นมะเร็งที่ปอด และมะเร็งในระบบทางเดินหายใจกับพนักงานที่ทำงานในโรงงานที่ใช้สารประกอบนี้ (Beliles, 1979; Pederson, 1982; Gibb *et al*., 2000)

ดังนั้นการปนเปื้อนของสารประกอบโครเมียมในน้ำทิ้งหรือของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม จึงเป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญ เพราะความเป็นพิษของโครเมตมีผลต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ และมีผลโดยรวมต่อสภาวะแวดล้อม การบำบัดความเป็นพิษของโครเมตอาจทำได้โดยวิธีทางเคมีและทางชีววิทยา สำหรับการกำจัดโดยวิธีทางเคมี ทำได้โดยการเติมสารเคมี เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) หรือเกลือซัลไฟต์ในรูปต่างๆ ที่ระดับค่าพีเอชประมาณ 2 เพื่อทำปฏิกิริยารีดักชันทำให้โครเมตเปลี่ยนเป็นไตรวาเลนซ์โครเมียม โดยเกิดเป็นตะกอนผลึกในรูป $Cr(OH)_3$ ได้ หรือการเติมโซดาไฟหรือปูนขาวเพื่อปรับพีเอชให้ได้ประมาณ 8-9 ซึ่งเป็นช่วงที่โครเมตละลายน้ำได้น้อยที่สุด หรือใช้กระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนและกระบวนการดูดซับด้วยตัวกลางโลหะออกไซด์ (กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรมและสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2545) ดังจะเห็นได้ว่าวิธีทางเคมีต้องใช้สารเคมีเป็นจำนวนมาก สิ้นเปลืองพลังงานและต้องอาศัยวิธีการและผู้ที่มีความเชี่ยวชาญสูง ในปัจจุบันจึงมีการคิดค้นพัฒนาวิธีการลดความเป็นพิษของโครเมตโดยวิธีทางชีวภาพ ทั้งนี้เนื่องจากวิธีทางชีววิทยาเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ และลดค่าใช้จ่ายได้มากกว่า มีสารตกค้างซึ่งมีความเป็นพิษต่อระบบนิเวศและสิ่งมีชีวิตน้อยกว่าวิธีการทางเคมี (Ganguli & Tripathi, 2002)

การรีดิวส์ทางชีวภาพโดยการเปลี่ยนโครเมตเป็นไตรวาเลนซ์โครเมียมหรือโครมิค เป็นกระบวนการที่ประหยัดและมีประสิทธิภาพในการบำบัดความเป็นพิษของโครเมต มีรายงานการวิจัยหลายฉบับที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับการรีดิวส์โครเมตโดยเซลล์แบคทีเรีย พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถรีดิวซ์เฮกซาวาเลนซ์โครเมียมให้อยู่ในสภาพของไตรวาเลนซ์โครเมียมภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและ/หรือไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้แก่ *Pseudomonas fluorescens* LB300 (Bopp & Ehrlich, 1988) *Enterobacter cloacae* HO1 (Wang *et al*., 1989) *Escherichia coli* ATCC33456 (Shen & Wang, 1993) *Agrobacterium radiobacter* EPS-916 (Llovera *et al*., 1993) *Microbacterium* sp. MP30 (Pattanapipitpaisal *et al*., 2001) *Achromobacter* sp. Ch-1 (Ma *et al*., 2007) *Arthrobacter* sp. CR47 (Córdoba *et al*., 2008) *Pseudomonas aeruginosa* (Pang *et al*., 2011) การรีดิวส์โครเมตส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์โครเมตรีดักเทสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* (Garbisu *et al*., 1998) *P. putida* PRS2000 (Ishibashi *et al*., 1990); *Bacillus* sp. (Wang & Xiao, 1995); *Ent. cloacae* HO1 (Komori *et al*., 1989); *E. coli* ATCC33456 (Shen & Wang, 1993) *Pseudomonas ambiguo* G-1 (Suzuki *et al*., 1992) และ *Pseudomonas putida* MK1 (Park *et al*., 2000) และมีรายงานว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Chardin *et al*., 2003) ไนโตรรีดักเทส (Kwak *et al*., 2003) และคิวโนนรีดักเทส (Gonzáles *et al*., 2005) มีกิจกรรมโครเมตรีดักเทสเช่นกัน ดังนั้น การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการรีดิวส์โครเมตโดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์จากแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวส์โครเมต (thermophilic chromate-reducing bacteria) ยังไม่มีรายงานมาก่อน งานวิจัยนี้จึงเป็นรายงานวิจัยฉบับแรกที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์รีดิวส์โครเมตจากแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูง *B. fusiformis* NTR9 ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวจะคงทนและสามารถเก็บรักษาได้นาน จึงเหมาะสำหรับการบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่ปนเปื้อนโครเมต

และมีอุณหภูมิค่อนข้างสูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *B. fusiformis* NTR9 เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมที่ปนเปื้อนโครเมตต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากเซลล์ (Cell-Free Extracts; CFE)

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. fusiformis* NTR9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) medium บ่มด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อเป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน บ่มด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง (4,800 *xg*) ล้างเซลล์และตกตะกอนสองครั้ง จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายในสารละลาย MOPS-NaOH buffer pH 7.0 ทำการบดเซลล์ให้แตกด้วยเครื่องอุลตร้าโซนิคที่ 100 วัตต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 *xg* เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้คือ สารสกัดจากเซลล์ (cell free extracts or CFE; S_{12} fraction) มากรองผ่านแผ่นกรอง (Milipore) ขนาด 0.45 ไมครอน และนำมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสตามวิธีของ Park *et al* (2000) ดังนี้ สารละลายผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 1.0 µM Cr(VI) ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH buffer (พีเอชเท่ากับ 7.0) ปริมาตร 0.78 มิลลิลิตร สารสกัดจากเซลล์ ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร บ่มสารละลายผสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดปริมาณโครเมตที่เหลือที่ A_{540} โดยใช้ S-diphenyl carbazide เป็นสารร่วมในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ (ยูนิต) คือ ปริมาณที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยารีดิวส์โครเมต 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2. ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมการรีดิวส์โครเมต

2.1 ผลของอุณหภูมิ

นำสารสกัดจากเซลล์มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid-NaOH (MOPS-NaOH buffer) พีเอชเท่ากับ 7.0 แล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง (28) ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

2.2 ผลของพีเอช

นำสารสกัดจากเซลล์มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH ที่มีพีเอชระดับต่างๆ ตั้งแต่ 4.0-10.0 แล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

2.3 ผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์โครเมตรีดักเทส

นำสารสกัดจากเซลล์มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH พีเอชเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 40-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

นำสารสกัดจากเซลล์มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH ที่พีเอชระดับต่างๆ ตั้งแต่ 4.0-10.0 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

2.4 ผลของสารประกอบโลหะและสารรับอิเล็กตรอน

นำสารสกัดจากเซลล์มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH ที่ระดับพีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.2 นำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในสภาวะที่มีสารประกอบโลหะอื่น ๆ ร่วมด้วย ได้แก่ $CuCl_2$, $FeCl_2$, $MgCl_2$, $MnSO_4$, AgCl และ $ZnSO_4$ และสารรับอิเล็กตรอนได้แก่ $NaNO_3$และ Na_2SO_4 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

2.5 ผลของสารให้อิเล็กตรอน

นำสารสกัดจากเซลล์มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH ด้วยระดับพีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.2 นำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในสภาวะที่มีสารให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ ได้แก่ 0.5 mM acetate, 1.0 % glycerol, 0.5 mM glucose, 0.5 mM citrate, 0.5 mM malate และ 0.5 mM succinate โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมการรีดิวส์โครเมต

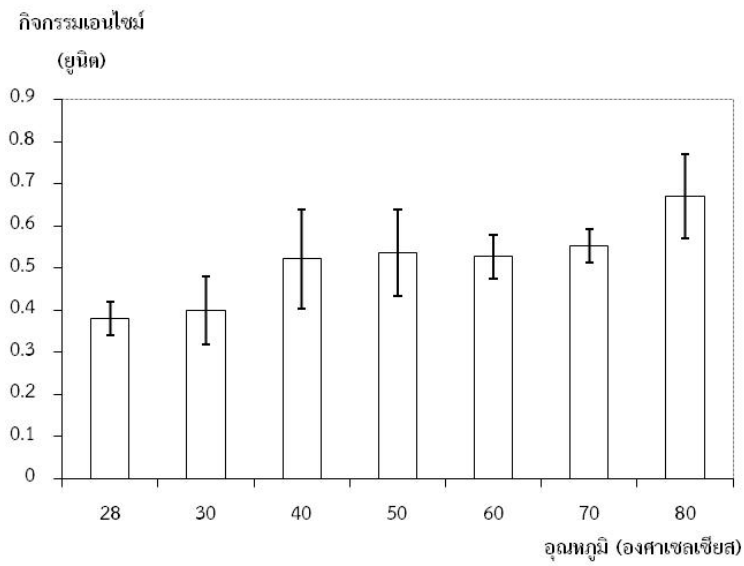
1.1 ผลของอุณหภูมิ

กิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของสารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 มีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ดังแสดง

ในภาพที่ 1 โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 80 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.67 ยูนิต อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ทดสอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ พบว่ามีการตกตะกอนเกิดขึ้นอันเป็นผลจากความร้อน ดังนั้นเพื่อไม่ให้เป็นการสิ้นเปลืองพลังงาน จึงใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในการทดลองต่อไป จะเห็นได้ว่าเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของ *B. fusiformis* NTR9 มีกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของ *P. putida* MK1 (Park *et al*., 2000) แต่สูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรียชนิดอื่น ได้แก่ *Bacillus firmus* (Sau *et al*., 2010), *Thermus scotoductus* SA-01 (Opperman *et al*., 2008), *P.ambigua* G-1 (Suzuki *et al*., 1992), *Amphibacillus* sp. KSUCr3 (Ibrahim *et al*., 2012), *Providencia* sp. (Thacker *et al*., 2006) และ *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 (Xu *et al*., 2012) ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 70, 65, 50, 40, 37 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่การรีดิวส์โครเมตโดยเซลล์แบคทีเรียส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้แก่ *P. fluorescens* LB300 (Bopp & Ehrlich, 1988) *Ent. cloacae* HO1 (Wang *et al*., 1989) *P. putida* PRS2000 (Ishibashi *et al*., 1990) *P. aeruginosa* HPO14 (Oh & Choi, 1997) *B. subtilis* (Garbisu *et al*., 1998) *Bacillus* sp. (Wang & Xiao, 1995) *Rhodobacter sphaeroides* (Nepple *et al*., 2000) *Pseudomonas* sp. CRB5 (McLean & Beveridge, 2001) *Microbacterium* sp. MP30 (Pattanapipitpaisal *et al*., 2001) และ *Pseudomonas* sp. G1DM21 (Desai *et al*., 2008)

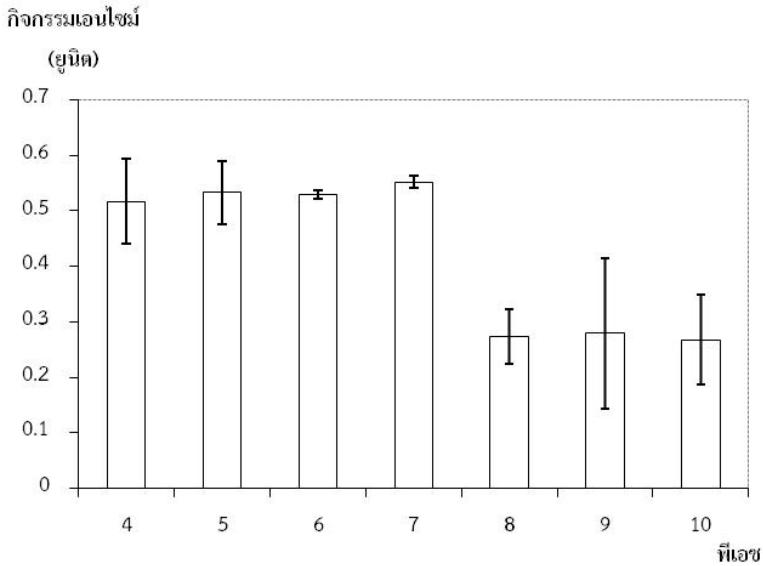
1.2 ผลของพีเอช

กิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของสารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 อยู่ในช่วงพีเอชตั้งแต่ 4-7 และเมื่อค่าพีเอชสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือพีเอชเท่ากับ 7.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.55 ยูนิต (ภาพที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับพีเอชที่เหมาะสมต่อการรีดิวส์โดยเซลล์และสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียหลายชนิดได้แก่ *A. radiobacter* EPS-916 (Llovera *et al*.,1993) *Bacillus* sp. ES29 (Camargo *et al*., 2003) *Microbacterium* sp. MP30 (Pattanapipitpaisal *et al*., 2001) *P. fluorescens* LB300 (Bopp & Ehrlich, 1988) *P. putida* PRS2000 (Ishibashi *et al*., 1990) *P. aeruginosa* HPO14 (Oh & Choi, 1997) *Pseudomonas* sp. CRB5 (McLean & Beveridge, 2001) *Ent. cloacae* HO1 (Wang *et al*., 1989) *E. coli* ATCC33456 (Shen & Wang, 1993) *B. subtilis* (Garbisu *et al*., 1998) *Bacillus* sp. (Wang & Xiao, 1995) *R. sphaeroides* (Nepple *et al*., 2000) *Desulfovibrio vulgaris* (Lovley & Phillips, 1994) และ *Providencia* sp. (Thacker *et al*., 2006) อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากเซลล์ที่มีกิจกรรมรีดิวส์โครเมตได้ดีที่



ภาพที่ 1 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของสารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 โดยทำการวิเคราะห์ในสารละลาย MOPS-NaOH buffer (พีเอชเท่ากับ 7.0) บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ (28-80 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

อุณหภูมิสูง อาจมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน คือ สารสกัดจากเซลล์ *P. putida* MK1 รีดิวส์โครเมตได้ดีที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แต่มีกิจกรรมสูงสุดในสภาวะที่เป็นกรด (พีเอชเท่ากับ 5) สารสกัดจากเซลล์ *P. ambigua* G-1 รีดิวส์โครเมตได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่มีกิจกรรมสูงสุดในสภาวะที่เป็นด่าง (พีเอชเท่ากับ 8.6) สารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 ในงานวิจัยนี้รีดิวส์โครเมตได้ดีที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แต่มีกิจกรรมสูงสุดในสภาวะที่เป็นกลาง ซึ่งมีข้อดีคือจะช่วยให้ไตรวาเลนซ์โครเมียมที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยนเป็นออกไซด์และไฮดรอกไซด์ที่ไม่ละลายน้ำได้อย่างรวดเร็ว (Rai *et al*., 1987; Xu *et al*., 2005)



ภาพที่ 2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของสารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 โดยทำการวิเคราะห์ในสารละลาย MOPS-NaOH buffer ที่ระดับพีเอชต่างๆ (4.0-10.0) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

1.3 ความคงทนของเอนไซม์โครเมตรีดักเทส

เอนไซม์โครเมตรีดักเทสของสารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 มีความคงทนต่อความร้อนได้ดี เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมหลังการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มสูงขึ้น โดยกิจกรรมการรีดิวส์โครเมตยังคงเหลืออยู่ 60.34 และ 26.44 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 70 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สรุปได้ว่าเอนไซม์โครเมตรีดักเทสที่สกัดจากแบคทีเรีย *B. fusiformis* NTR9 เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อน (heat stable) เช่นเดียวกับเอนไซม์ทนความร้อนที่สกัดจากแบคทีเรีย *P. putida* MK1 (Park *et al*., 2000) *P. ambigua* G-1 (Suzuki *et al*.,1992) แต่พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มสูงกว่าเอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรียทั้งสองชนิด โดยพบว่าเอนไซม์จากแบคทีเรีย *P. putida* MK1 มีกิจกรรมเหลืออยู่ 20 เปอร์เซ็นต์หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาการบ่มเท่ากัน (Park *et al*., 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าความคงทนของเอนไซม์จะลดลงภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง แต่ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดและเป็นกลางมีผลต่อความคงทนของเอนไซม์เล็กน้อย โดยพบว่าที่ระดับพีเอชเท่ากับ 4.0 และ 7.0 กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเหลืออยู่เท่ากับ 97.70 และ 62.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สรุปได้ว่าเอนไซม์โครเมตรีดักเทสที่สกัดจากแบคทีเรีย *B. fusiformis* NTR9 มีความคงทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและเป็นกลาง จึงเหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีสภาพเป็นกรดหรือเป็นกลางได้อย่างเหมาะสม

1.4 ผลของสารประกอบโลหะ

กิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของสารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 ในสภาวะที่มีสารประกอบโลหะอื่นร่วมด้วย จากผลการทดลองพบว่าสารประกอบ $CuCl_2$ และ $FeCl_3$ มีผลในการกระตุ้นให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นเป็น 188.19 และ 180.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารประกอบของ $MgCl_2$, $ZnSO_4$, และ KH_2AsO_4 ไม่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ แต่สารประกอบของ $MnSO_4$ และ AgCl มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือเท่ากับ 72.19 และ 8.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 อิออนของโลหะแต่ละชนิดมีผลต่อการรีดิวส์โครเมตแตกต่างกัน สารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 มีกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสสูงขึ้นเมื่อมี Fe^{3+} ร่วมในปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการรีดิวส์โครเมตโดยเซลล์แบคทีเรีย *Cellulomonas flavigena* (Xu *et al*., 2005) แต่มีผลในการยับยั้งการรีดิวส์โครเมตโดย *A. radiobacter* EPS-916 (Llovera *et al*., 1993) *E. coli* ATCC33456 (Shen & Wang, 1993) และยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของ *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 (Xu *et al*., 2012) อย่างไรก็ตาม Fe^{3+} ไม่มีผลต่อการรีดิวส์โครเมตโดยสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ES29 (Camargo *et al*., 2003) Cu^{2+} กระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของ *B. fusiformis* NTR9 เช่นเดียวกับเอนไซม์จาก *Amphibacillus* sp. KSUCr$_3$ (Ibrahim *et al*., 2012) *P. phragmitetus* LSSE-09 (Xu *et al*., 2012) และ *Pseudomonas* sp. G1DM21 (Desai *et al*., 2008) แต่ไม่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ของ *Desulfovibrio vulgaris* (Lovley & Phillips, 1994) *P. putida* MK1 (Park *et al*., 2000) *Pseudomonas* sp. CRB5 (McLean & Beveridge, 2001) อย่างไรก็ตาม Cu^{2+} มีผลทำให้การรีดิวส์โครเมตของ *Enterobacter cloacae* HO$_1$ ลดลง (Shen & Wang, 1994)

Zn^{2+} และ Mg^{2+} ไม่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของ *B. fusiformis* NTR9 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Camargo และคณะที่กล่าวว่า Zn^{2+} และ Mg^{2+} ไม่มีผลต่อการรีดิวส์โครเมตโดยเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ES29 (Camargo et al., 2003) แต่ Zn^{2+} มีผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ของ *P. putida* MK1 (Park *et al*., 2000) *Thermus scotoductus* SA-01 (Opperman *et al*., 2008) ส่วน Mg^{2+} จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์ของ *Pseudomonas* sp. G1DM21 (Desai *et al*., 2008) และ *T. scotoductus* SA-01 (Opperman *et al*., 2008) เพิ่มขึ้น สำหรับ As^{3+} ไม่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ของ *B. fusiformis* NTR9 เช่นเดียวกับเอนไซม์ทนร้อนของ *P. putida* MK1 (Park *et al*., 2000)

Mn^{2+} มีผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของ *B. fusiformis* NTR9 ลดลงเช่นเดียวกับเอนไซม์ของ *P. phragmitetus* LSSE-09 (Xu *et al*., 2012) *T. scotoductus* SA-01 (Opperman *et al*., 2008) และการรีดิวส์โครเมตโดย *Ent. cloacae* HO1 (Wang *et al*., 1989) แต่ไม่มีผลต่อการรีดิวส์โครเมตโดย *D. vulgaris* (Lovley & Phillips, 1994) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า Mn^{2+} กระตุ้นการรีดิวส์โครเมตโดย *Bacillus* sp. ES29 ได้เล็กน้อย (Camargo *et al*., 2003) สำหรับ Ag^{+} มีผลในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของ *B. fusiformis* NTR9 เช่นเดียวกับเอนไซม์จาก *P. putida* PRS2000 (Ishibashi *et al*., 1990) และ *Pseudomonas* sp. G1DM21 (Desai *et al*., 2008) แต่ไม่มีผลในกิจกรรมการรีดิวส์โครเมตโดยสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ES29 (Camargo *et al*., 2003)

1.5 ผลของสารรับอิเล็กตรอน

กิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของสารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 ในสภาวะที่มีสารรับอิเล็กตรอนร่วมด้วย ผลการทดลองพบว่า Na_2SO_4 ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดย

ตารางที่ 1 ผลของสารประกอบโลหะต่อกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของสารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 โดยทำการวิเคราะห์ในสารละลาย MOPS-NaOH buffer (พีเอชเท่ากับ 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

ชนิดของสารประกอบ	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต)	Relative enzyme activity (%)
$Na_2Cr_2O_4$	0.525±0.10	100.00
$Na_2Cr_2O_4$+$CuCl_2$	0.988±0.02	188.19
$Na_2Cr_2O_4$+$FeCl_3$	0.947±0.01	180.38
$Na_2Cr_2O_4$+$ZnSO_4$	0.609±0.15	116.00
$Na_2Cr_2O_4$+KH_2AsO_4	0.576±0.02	109.71
$Na_2Cr_2O_4$+$MgCl_2$	0.530±0.01	100.95
$Na_2Cr_2O_4$+$MnSO_4$	0.379±0.05	72.19
$Na_2Cr_2O_4$+AgCl	0.047±0.04	8.95

กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 0.583 ยูนิต หรือ 111.04 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมโครเมตรีดักเทสของ *D. vulgaris* (Lovley & Phillips, 1994) *P. putida* PRS2000 (Ishibashi *et al*., 1990) *E. coli* ATCC33456 (Shen & Wang, 1993) *Bacillus* sp. (Wang & Xiao, 1995) *Bacillus* sp. QC1-2 (Campos *et al*., 1995) และ *Bacillus* sp. ES29 (Camargo *et al*., 2003) แต่มีผลยับยั้งกิจกรรมโครเมตรีดักเทสของ *P. putida* MK1 (Park *et al*., 2000) *A. radiobacter* EPS-916 (Llovera *et al*., 1993) *Ent. cloacae* HO1 (Wang *et al*., 1989) และ *Comamonas testosterone* VMC-2 (Cooke *et al*., 1995) ส่วน $NaNO_3$ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 0.568 ยูนิต หรือ 108.19 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2 สอดคล้องกับกิจกรรมโครเมตรีดักเทสของ *P. putida* PRS2000 (Ishibashi *et al*., 1990) *E. coli* ATCC33456 (Shen & Wang, 1993) *Bacillus* sp. (Wang & Xiao, 1995) และ *B. subtilis* (Garbisu *et al*., 1998)

ตารางที่ 2 ผลของสารรับอิเล็กตรอนต่อกิจกรรมของเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของสารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 โดยทำการวิเคราะห์ในสารละลาย MOPS-NaOH buffer (พีเอชเท่ากับ 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

ชนิดของสารประกอบ	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต)	Relative enzyme activity (%)
$Na_2Cr_2O_4$	0.525±0.10	100.00
$Na_2Cr_2O_4$+Na_2SO_4	0.583±0.19	111.04
Na_2Cr_2O+$NaNO_3$	0.568±0.09	108.19

1.6 ผลของสารให้อิเล็กตรอนต่อกิจกรรมของเอนไซม์โครเมตรีดักเทส

กิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของสารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 ในสภาวะที่มีสารให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ ผลการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อมีกลูโคส กลีเซอรอล ซิเตรท มาเลท ซัคซิเนทและอะซิเตรทเป็นสารให้อิเล็กตรอน โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.71-0.93 ยูนิต หรือ 135.25-177.14% และพบว่า NADH ไม่จำเป็นต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wang และคณะ (Wang *et al*., 1989) Cooke และคณะ (Cooke *et al*., 1995) Llovera และคณะ (Llovera *et al*., 1993) Wang และ Xiao (Wang & Xiao, 1995) และรายงานของ McLean และ Beveridge (McLean & Beveridge, 2001) แต่กิจกรรมโครเมตรีดักเทสของแบคทีเรียบางชนิดต้องการ NADH เข้าร่วมในปฏิกิริยา (Bopp & Ehrlich, 1988; Ishibashi *et al*., 1990; Suzuki *et al*., 1992; Shen & Wang, 1993; Campos *et al*., 1995; Oh & Choi, 1997; Garbisu *et al*., 1998; Park *et al*., 2000; Thacker *et al*., 2006) ถึงแม้ว่าโครเมตรีดักเทส

ตารางที่ 3 ผลของสารให้อิเล็กตรอนต่อกิจกรรมของเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของสารสกัดจากเซลล์ *B. fusiformis* NTR9 โดยทำการวิเคราะห์ในสารละลาย MOPS-NaOH buffer (พีเอชเท่ากับ 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

ชนิดของสารประกอบ	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต)	Relative enzyme activity (%)
None	0.53±0.10	100.00
Glucose	0.93±0.09	177.14
Citrate	0.92±0.04	175.24
Glycerol	0.92±0.09	175.24
Malate	0.91±0.01	173.33
Succinate	0.85±0.17	161.90
Acetate	0.71±0.07	135.24
NADH	0.46±0.08	87.62

จาก *B. fusiformis* NTR9 จะเป็นเอนไซม์ทนความร้อนเช่นเดียวกับเอนไซม์จาก *P. ambigua* G-1 (Suzuki *et al*., 1992) และ *P. putida* MK1 (Park *et al*., 2000) แต่แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ทั้งสองสายพันธุ์รีดิวส์โครเมตได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น จึงต้องการ NADH เป็นสารให้อิเล็กตรอนในการรีดิวส์โครเมต ในขณะที่แบคทีเรีย *B. fusiformis* NTR9 รีดิวส์โครเมตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้ดีกว่าในสภาวะมีออกซิเจน (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2547) จึงไม่ต้องการ NADH เป็นสารให้อิเล็กตรอน สามารถใช้โครเมตหรือสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นเป็นสารให้อิเล็กตรอนได้

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากเซลล์ หรือ S_{12} fraction ของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *B. fusiformis* NTR9 มีกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 7.0 เอนไซม์มีความคงทนต่อความร้อน สภาวะที่เป็นกรดและเป็นกลาง สารประกอบ $CuCl_2$ และ $FeCl_3$ มีผลในการกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์โครเมตรีดักเทส แต่สารประกอบ $MnSO_4$ และ AgCl มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ สารประกอบ $MgCl_2$, $ZnSO_4$, และ KH_2AsO_4 รวมทั้งสารรับอิเล็กตรอน Na_2SO_4 และ $NaNO_3$ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *B. fusiformis* ไปประยุกต์ใช้เพื่อการบำบัดน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมที่มีอุณหภูมิสูง ภายใต้สภาวะที่เป็นกลาง เนื่องจากสภาวะดังกล่าวนี้จะช่วยให้ไตรวาเลนซ์โครเมียมที่เกิดจากปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นตะกอนของไฮดรอกไซด์ที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้สามารถกำจัดสารประกอบโครเมียมออกจากน้ำเสียได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังเหมาะสำหรับบำบัดน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมที่ปนเปื้อนโครเมตและโลหะชนิดอื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพเพราะโลหะหลายชนิด (ยกเว้นแมงกานีสและซิลเวอร์) ส่งเสริมเอนไซม์โครเมตรีดักเทสของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *B. fusiformis* NTR9 ให้มีกิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงบประมาณ และมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่สำหรับทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กรมโรงงานอุตสาหกรรม. (2545). *ตำราระบบบำบัดมลพิษน้ำ*. กรุงเทพมหานคร: สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2547). การคัดแยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวส์โครเมต. *วารสารวิชาการ ม. อบ.*, 6, 53-63.

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2549). การลดปริมาณโครเมตที่มีความเป็นพิษโดยเซลล์และสารสกัดจากเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยโพลีไวนิลแอลกอฮอล์. *วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง*, *15*, 1-11.

Beliles, R.P. 1979. The lesser metals In Oehme, F.W. (Ed.), *Toxicity of Heavy Metals in the Environment: 2 nd* (pp. 547-616). New York: Marcel Dekker.

Bopp, L. H. & Ehrlich, H. L. (1988). Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. *Archives of Microbiology, 155*, 4426-4431.

Camargo, F. A. O., Okeke, F. M., Bento, B. C., & Frankenberger, W. T. (2003). In vitro reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES29 stimulated by Cu^{2+}. *Applied Microbiology and Biotechnology, 62*, 569-573.

Campos, J., Martinezpacheco, M., & C. Cervantes. (1995). Hexavalent-chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. strain. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 68*, 203-208.

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

Chardin, B., Giudici-Orticoni, M. T., DeLuca, G., Guigliarelli, B., & Bruschi, M. (2003). Hydrogenases in sulfate-reducing bacteria function as chromium reductase. *Applied and Environmental Microbiology, 63*, 315-321.

Cooke, V. M., Hughes, M. N., & Poole, R. K. (1995). Reduction of chromate by bacteria isolated from the cooling water of an electricity generating station. *Journal of Industrial Microbiology, 14*, 323-328.

Córdoba, A., Vargas, P. & Dussan, J. (2008). Chromate reduction by *Arthobacter* CR47 in biofilm packed bed reactors. *Journal of Hazardous Materials, 151*, 274-279.

Desai, C., Jain, K., & Madamwar, D. (2008). Hexavalent chromate reductase activity in cytosolic fraction of *Pseudomonas* sp. G_1DM_{21} isolated from Cr(VI) contaminated industrial landfill. *Process Biochemistry, 43*, 713-721.

Ganguli, A., & Tripathi, A. K. (2002). Bioremediation of toxic chromium from electroplating effluent by chromate-reducing *Pseudomonas aeruginosa* A2Chr in two bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology, 58*, 416–420.

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

Gibb, H. J., Lees, P. S. J., Pinsky, P. F., & Rooney, B. C. (2000). Clinical findings of irritation among chromium chemical production workers. *American Journal of Industrial Medicine, 38*, 127-131.

Gonzáles, C. F., Ackerly, D. F., Lynch, S. V., & Martin, A. (2005). ChrR, a soluble quinine reductase of *Pseudomonas putida* that defends against H_2O_2. *The Journal of Biological Chemistry, 43*, 713-721.

Ibrahim, A. S. S., Mohamed, A., El-Tayeb, Elbadawi, Y. B., Al-Salamah, A. A., & Antranikian, G. (2012). Hexavalent chromate reduction by alkaliphilic *Amphibacillus* sp. KSUCr3 is mediated by copper-depend membrane-associated Cr(VI) reductase. *Extremophiles, 16*, 659-668.

Ishibashi, Y., Cervantes, C., & Silver, S. (1990). Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology, 56*, 2268-2270.

Komori, K., Wang,P., Toda, K., & Ohtake, H. (1989). Factors affecting chromate reduction in *Enterobacter cloacae* HO1. *Applied and Environmental Microbiology, 31*, 567-570.

Kwak, Y. H., Lee, D. S., & Kim, H. B. (2003). *Vibrio harveyi* nitroreductase is also a chromate reductase. *Applied and Environmental Microbiology, 69*, 4390-4395.

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

Laxman, R. S., & More, S. (2002). Reduction of hexavalent chromium by *Streptomyces griseus. Minerals Engineering, 15*, 831-837.

Llovera, S., Bonet, R., Simon-Pujol, M. D., & Congregado, F. (1993). Chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium radiobacter* EPS-916. *Applied and Environmental Microbiology, 59*, 3516-3518.

Lovley, D. R. & Phillips, E. J. P. (1994). Reduction of chromate by *Desulfovibrio vugaris* and its C_3 Cytochrome. *Applied and Environmental Microbiology, 60*, 726-728.

Ma, Z., Zhu, W., Long, H., Chai, L., & Wand Q. (2007). Chromate reduction by resting cells of *Achromobacter* sp. Ch-1 under aerobic conditions. *Process Biochemistry, 42*, 1028-1032.

McLean, J. & Beveridge, T. J. (2001). Chromate reduction by a Pseudomonad isolated from a site contaminated with chromate copper arsenate. *Applied and Environmental Microbiology, 67*, 1076-1084.

Nepple, B. B., Kessi, J. & Bachofen R. (2000). Chromate reduction by *Rhodobacter sphaeroides. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 25*, 198-203.

Oh, Y. S. & Choi, S. C. (1997). Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas aeruginosa* HPO14. *Journal of Microbiology, 35*, 25-29.

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*, 3076-3082.

Pang, Y., Zeng, G-M, Tang, L., Zhang, Y., Liu, Y-Y, Lei, X-X, Wu, M-S, Li, Z., & Liu, C. (2011). Cr(VI) reduction by *Pseudomonas aeruginosa* immobilized in a polyvinyl alcohol/ sodium alginate matrix containing multi-walled carbon nanotube. *Bioresource Technology. 102*, 10733-10736.

Park, C. H., Keyhan, M., Wielinga, B., Fendorf, S., & Matin, A. (2000). Purification to homogeneity and characterisation of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Applied and Environmental Microbiology, 66*, 1788-1795.

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

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

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

Petrilli, F.L. & De Flora, S. (1977). Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium on *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology, 33,* 805-809.

Rai, D., Sass, B. M., & Moore, D. A. (1987). Chromium (III) hydrolysis constants and solubility of chromium (III) hydroxide. *Inorganic Chemistry, 26*, 345-349.

Sau, G. B., Chatterjee, S. & Mukherjee, S. K. (2010). Chromate reduction by cell-free extract of *Bacillus firmus* KUCr1. *Polish Journal of Microbiology, 59*, 185-190.

Shen, H. & Wang, Y. T. (1993). Characterisation of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. *Applied and Environmental Microbiology, 59*, 3771-3777.

Suzuki, T., Miyata, N., Horitsu, H. & Kawai, K. (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). *Journal of Bacteriology, 174*, 5340-5345.

Thacker, U., Parikh, R., Shouche, Y., & Madamwar, D. (2006). Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. *Process Biochemistry, 41*, 1332-1337.

Wang, Y. T. & Xiao, C. (1995). Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure cultures of bacteria. *Water Research*, 24, 2467-2474.

Wang, P., Mori, T., Komori, K., Sasatsu, M., Toda, K., & Ohtake, H. (1989). Isolation and characterisation of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology, 55,* 1665-1669.

Xu, W., Liu, Y., Zeng, G., Li, X., Tang, C., & Yuan, X. (2005). Enhancing effect of iron on chromate reduction by *Cellulomonas flavigena*. *Journal of Hazardous Materials, 126*, 17-22.

Xu , L., Lou, M., Jiang, C., Wei, X., Kong, P., Liang, X., Zhao, J., Yang, L., & Liu, H. (2012). In vitro reduction of hexavalent chromium by cytoplasmic fractions of *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 under aerobic and anaerobic conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 166*, 933-941.