

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จิรทีปณ์ แสนรัก. 2547. การย่อยสลายไพรีนและสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น โดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นฤมล ศิลารักษ์ และ สมชัย บวรกิตติ. 2542. โรคมะเร็งเหตุอาชีพ. วารสารเวชศาสตร์สิ่งแวดล้อม 1 (2) : 526-535.
- ประภัสสร ปานมีทรัพย์. 2550. การทำแห้งเยือกแข็งกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 และความสามารถในการย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ภัทรพร กวีสุทธิกุล. 2550. การคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟลูออรีน, ฟลูออแรนธิน และน้ำมันดีเซลจากดินในแหล่งต่างๆที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน. รายงานโครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เสาวลักษณ์ อ้นเมฆ. 2550. การสลายไพรีนและพีแนนทรีนที่ปนเปื้อนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Arlt, V.M. 2005. 3-Nitrobenzanthrone, a potential human cancer hazard in diesel exhaust and urban air pollution: A review of the evidence. Mutagenesis 20(6) : 399–410.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances & Disease Registry). 1995. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) U.S. Department of health and human services.
- Bento, M.F., Camargo, F.A.O., Okeke, B. and Frankenberger-Júnior, W.T. 2003. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. Brazilian Journal of Microbiology 34 (Suppl.1) : 65-68.

- Blanco, A.R., Antoine, V., Pelletier, E., Delille, D. and Ghiglione, J.F. 2010. Effects of temperature and fertilization on total vs. active bacterial communities exposed to crude and diesel oil pollution in NW Mediterranean Sea. Environmental Pollution 158 : 663–673.
- Blomberg, A., Törnqvist, H., desmyter, L., Deneys, V. and Hermans, C. 2005. Exposure to diesel exhaust nanoparticles does not induce blood hypercoagulability in an at-risk population. International Society on Thrombosis and Haemostasis 2103-2105.
- Brand, J.J. and Diller, K.R. 2004. Application and theory of algal cryopreservation. Nova Hedwigia 79(1-2) : 175-189.
- Brown, M.R.W. and Gilbert, P. Microbiological Quality assurance : A guide towards relevance and reproducibility of inocula. United States of America : CRC Press LLC, 1995.
- Carman, K.R. and Means, J.C. 1998. Assessment of PAH composition of diesel fuel sorbed to marine sediments and their toxicity to aquatic food webs. Coastal Marine Institute Louisiana State University. United States of America.
- Cerniglia, C.E. 1992, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3 : 351-368.
- Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., Garcia, N. and Vinās I. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. Journal of Applied Microbiology 89 : 793-800.
- Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N. and Johri, A.K. 2002. Biotechnology and bioremediation : Successes and limitations. Applied microbiology and Biotechnology 59 : 143-152.
- Flink, J.M. and Knudsen, H. 1933. An Introduction to Freeze Drying. Strandberg Bogtryk/offset, Denmark.

- Gastel, K.V., Mergaert, J., Swings, J., Coosemans, J. and Ryckeboer, J. 2003. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. Environmental Pollution 125 : 361-368.
- Heitkamp, M.A., and Cerniglia, C.E. 1988. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. Applied and Environmental Microbiology 54 : 1612-1614.
- Hyman, M. and Dupont, R.R. 1930. Bioremediation systems. p. 203-332. Groundwater and soil remediation: Process design and cost estimating of proven technologies. ASCE press. United States of America.
- IARC (International agency for research on cancer). 1983. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 32 : 431-445.
- Ichinose, T., Yajima, Y., Nagashima, M., Takenoshita, S., Nagamachi, Y. and Sagai, M. 1997. Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles. Carcinogenesis 18(1) : 185–192.
- Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M. and Sait, M. 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. Applied and Environmental Microbiology 68(5) : 2391-2396.
- Juhasz, A.L., Waller, N., Lease, C., Bentham, R. and Stewart, R. 2005. Pilot scale bioremediation of creosote-contaminated soil—efficacy of enhanced natural attenuation and bioaugmentation strategies. Bioremediation Journal 9(3) : 139-154.
- Kästner, M., and Mahro, B. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. Applied Microbiology and Biotechnology 44 : 668-675.
- Kim, S.S., Lee, H.S., Cho, Y.S., Lee, Y.S., Bhang, C.S., Chae, H.S., Han, S.W., Chung, I.S. and Park, D.H. 2002. The effect of the repeated subcultures of *Helicobacter pylori* on adhesion, motility, cytotoxicity, and gastric inflammation. Journal of Korean Medical Science 17 : 302-306.

- Komukai-Nakamura, S., Sugiura, K. and Yamauchi-Inomata, Y. 1996. Construction bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. Journal of Fermentation and Bioengineering 82(6) : 570-574.
- Labana, S., Kapur, M., Malik, D.K., Prakash, D. and Jain, R.K. 2007. Diversity, biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental Bioremediation Technologies 409-443.
- Lee, S. 1995. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. US Patent 5,427,944.
- Lehto, K.M., Puhakka, J.A. and Lemmetyinen, H. 2003. Photodegradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and their amenability to biodegradation. Polycyclic Aromatic Compounds 23 : 401-416.
- Liebermann, J., Nawroth, F., Isachenko, V., Isachenko, E., Rahimi, G. and Tucker, M.J. 2002. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. Biology of Reproduction 67 : 1671-1680.
- Luepromchai, E., Lertthamrongsak, W., Pinphanichakarn, P., Thaniyavarn, S., Pattharagulwanit, K. and Juntongjin, K. 2007. Biodegradation of PAHs in petroleum-contaminated soil using tamarind leaves as microbial inoculums. Songklanakarin Journal of Science and Technology 29(2) : 515-527.
- Mahadevan, B., Luch, A., Bravo, C.F., Atkin, J., Steppan, L.B., Pereira, C., Kerkvliet, N.I. and Baird, W.M. 2005. Dibenzo[a,l]pyrene induced DNA adduct formation in lung tissue in vivo. Cancer Letter 227(1) : 25-32.
- Mandelbaum, R. T., Allan, D.L. and Wackett, L.P. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. Applied and Environmental Microbiology 61(4) : 1451-1457.
- Margesin, R. and Schinner, F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. Applied and Environmental Microbiology 67(7) : 3127-3133 .

- Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T. and Yamazawa, A. 1999. Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. Journal of Biotechnology 70 : 33-38.
- Márquez-Rocha, F.J., Hernández-Rodríguez, V. and Lamela, M.T. 2001. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. Water, Air, and Soil Pollution 128 : 313-320.
- McGann, L.E. 1978. Differing actions of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents. Cryobiology 15 : 382-390.
- Miranda, R.C., Souza, C.S., Gomes, E.B., Lovaglio, R.B., Lopes, C.E. and Sousa, M.F.V.Q. 2007. Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of Suape Port in the state of Pernambuco- Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology. 50(1) : 147-152.
- Ming, L.C., Rahim, R.A., Wan, H.Y. and Ariff, A.B. 2009. Formulation of protective agents for improvement of *Lactobacillus salivarius* I 24 survival rate subjected to freeze drying for production of live cells in powdered form. Food and Bioprocess Technology 2 : 431-436.
- Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R. and Cerniglia, C.E. 2001. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. Applied and Environmental Microbiology 67(4) : 1476-1483.
- Morgan, C.A., herman, N., White, P.A. and Vesey, G. 2006. Preservation of microorganisms by drying; A review. Journal of Microbiological Methods 66 : 183-193.
- Nam, K., and Kukor, J.J. 2000. Combined ozonation and biodegradation for remediation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Biodegradation 11 : 1-9.
- Norman, M.C., Franck, E. B. and Choate, R. V. 1970. Preservation of *Mycoplasma* strains by freezing in liquid nitrogen and by lyophilization with sucrose. Journal of Applied Microbiology 20(1) : 69-71.

- Nwaogu, L.A., Onyeze, G.O.C. and Nwabueze, R.N. 2008. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. African Journal of Biotechnology 7(12) : 1939-1943.
- Oh, S.E., Hassan, S.H.A. and Joo, J.H. 2009. Biosorption of heavy metals by lyophilized cells of *Pseudomonas stutzeri*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25 : 1771-1778.
- Ozaki, S., Kishimoto, N. and Fujita, T. 2007. Change in the predominant bacteria in a microbial consortium cultured on media containing aromatic and saturated hydrocarbons as the sole carbon source. Microbial Environmental 22(2) : 128-135.
- Patnaik, P. 1992. Hydrocarbon, Aromatic. In A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances. p.429-445. New York : Van Nortrand Reinhold.
- Pignatello, J.J. and Xing, B. 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. Environmental Science and Technology 30 : 1-11.
- Potin, O., Rafin, C. and Veignie, E. 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. International Biodeterioration and Biodegradation 54 : 45-52.
- Rojas, J.M., Bernal, P., Dugue, E., Godoy, P., Segura, A. and Ramos, J.L. 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. Applied and Environmental Microbiology 72(1) : 472-477.
- Rojas-Avelizapa, N.G., Rodriguez-Vázquez, R., Saval-Bohorquez, S. and Alvarez, P.J.J. 2000. Effect of C/N/P ratio and nonionic surfactants on polychlorinated biphenyl biodegradation. World Journal of Microbiology & Biotechnology 16 : 319-324.
- Rudell, B., Ledin, M.C., Hammarström, U., Stjernberg, N., Lundbäck, B. and Sandström, T. 1996. Effects on symptoms and lung function in humans experimentally exposed to diesel exhaust Occupational and Environmental Medicine 53 : 658-662.

- Ruberto, L.A.M., Vazquez, S.C., Curtosi, A., Mestre, M.C., Pelletier, E. and Cormack, W.P.M. 2006. Phenanthrene biodegradation in soil using an antarctic bacterial consortium. Bioremediation Journal 10(4) : 191-201.
- Samanta, S.K., Singh, O.V. and Jain, R.K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Trends in Biotechnology 20(6) : 243-248.
- Sar, P. and Souza, S.F.D. 2002. Biosorption of thorium (IV) by a *Pseudomonas* biomass. Biotechnology Letters 24 : 239-243.
- Sar, P., Kazy, S.K. and Souza, S.F.D. 2004. Radionuclide remediation using a bacterial biosorbent. International Biodeterioration and Biodegradation 54 : 193-202.
- Seklemova, E., Pavlova, A. and Kovacheva, K. 2001. Biostimulation based bioremediation of diesel fuel : Field demonstration. Biodegradation 12 : 311-316.
- Sembries, S. and Crawford, R.L. 1997. Production of *Clostridium bifermentans* spores as inoculum for bioremediation of nitroaromatic contaminants. Applied and Environmental Microbiology 63(5) : 2100-2104.
- Tran, T.H., Chang, W.J., Kim, Y.B., Yoon, J.Y., Koo, Y.M., Kim, E.K. and Kim, J.H. 2007. Long-term preservation of high initial bioluminescence of lyophilized *Photobacterium phosphoreum*: Effect of skim milk and saccharose at various temperatures. Korean Journal of Chemical Engineering 24(6) : 1053-1057.
- Ueno, A., Ito, Y., Yumoto, I. and Okuyama, H. 2007. Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23 : 1739-1745.
- Van Veen, J.A., Van Overbeek, L.S., and Van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61(2) : 121-135.
- Verschuere, K, 1977. Handbook of environmental data on organic chemicals. New York : Thomson publishing.

- Venkatadri, R. and Peters, R.W. 1993. Chemical oxidation technologies: Ultraviolet light/hydrogen peroxide, Fenton's reagent and titanium dioxide-assisted photocatalysis. Hazardous Waste and Hazardous Materials 10(2) : 107-149.
- Weekers, F., Jacques, P., Springael, D., Mergeay, M., Diels, L. and Thonart, P. 1998. Effect of drying on bioremediation bacteria properties. Applied Biochemistry and Biotechnology 70-72 : 311-322.
- Wilson, S.C., and Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs), A review. Environmental Pollution 81 : 229-249.
- Wong, J.W.C., Lai, K.M., Wan, C.K., Ma, K.K. and Fang, M. 2002. Isolation and optimization of PAH-degradative bacteria from contaminated soil for PAHs bioremediation. Water, Air, and Soil Pollution 139 : 1-13.
- Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I. and Okuyama, H. 2004. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. Current Microbiology 49 : 415-422.
- Yu, S.H., Ke, L., Wong, Y.S. and Tam, N.F.Y. 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. Environmental International 31 : 149-154.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Medium (CFMM)

ก.	แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5.5	กรัม
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
ข.	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
	เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม

ซึ่งสารส่วน ก. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายในส่วน ข. ที่ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดและทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซิเตท ขนาดรู 0.45 ไมครเมตร ลงในอาหารส่วน ก.

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ซึ่งส่วนผสมทั้งหมดและละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB และละลายผงวุ้น 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 3.9996 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร สุดท้ายจะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ซิงโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. สารละลายนิสแตตินความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซิงนิสแตติน 400 มิลลิกรัมละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) 10 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร เก็บในที่ไม่มีแสง

4. สารละลายฟิแนนทรีนความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ซิงฟิแนนทรีน 100 มิลลิกรัมละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร เก็บในที่ไม่มีแสง

5. สารละลายไพรีนความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ซิงไพรีน 100 มิลลิกรัมละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร เก็บในที่ไม่มีแสง

6. 70% เอทานอล

ละลายเอทานอลสัมบูรณ์ ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร

7. สารละลาย Triton X-100 15%

ปิเปต TritonX-100 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 85 มิลลิลิตร ผสมบนเครื่องคนแม่เหล็กที่มีการให้ความร้อน

8. สารละลายฟิแนนทรีนและไพรีนในอะซีโตน

ซิงฟิแนนทรีนและไพรีนอย่างละ 0.05 กรัม ละลายในอะซีโตนปริมาตร 10 มล. ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร

ควรเตรียมใหม่สำหรับการใช้เสมอเนื่องจากภาระของอะซีโตนที่เร็ว และควรใช้เติมอย่างรวดเร็ว เนื่องจากอาจมีการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของพีแนนทรินและไพรีน

9. 12% **ซูโครส**

ซังซูโครส 12 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 7 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

10. 10% **นมปลอดมันเนย**

ซังนมปลอดมันเนย 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 7 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

11. 5% **โดเมทิลซัลฟอกไซม์**

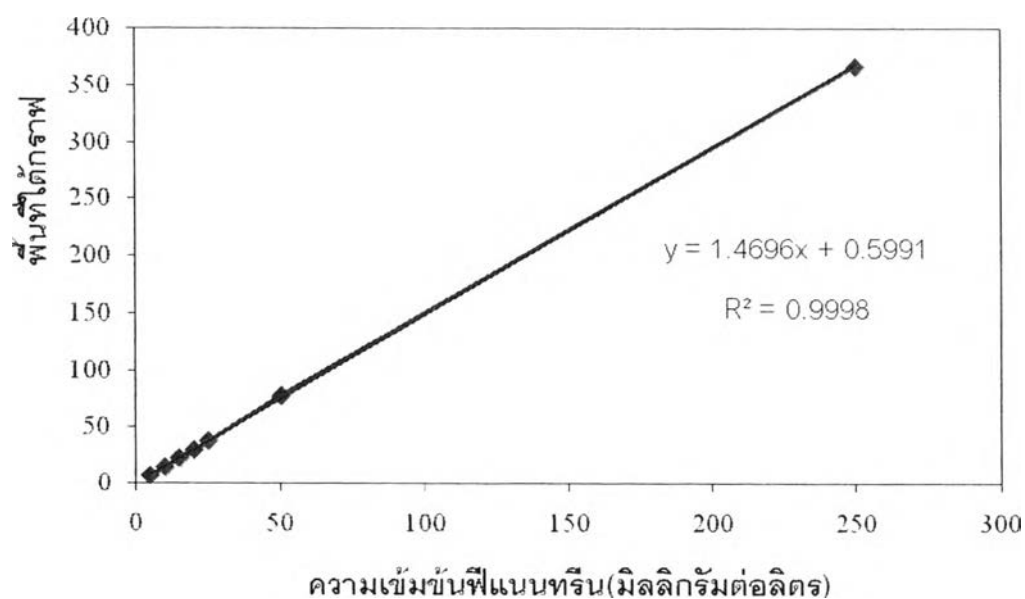
ปิเปตโดเมทิลซัลฟอกไซม์ 5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 7 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ภาคผนวก ค

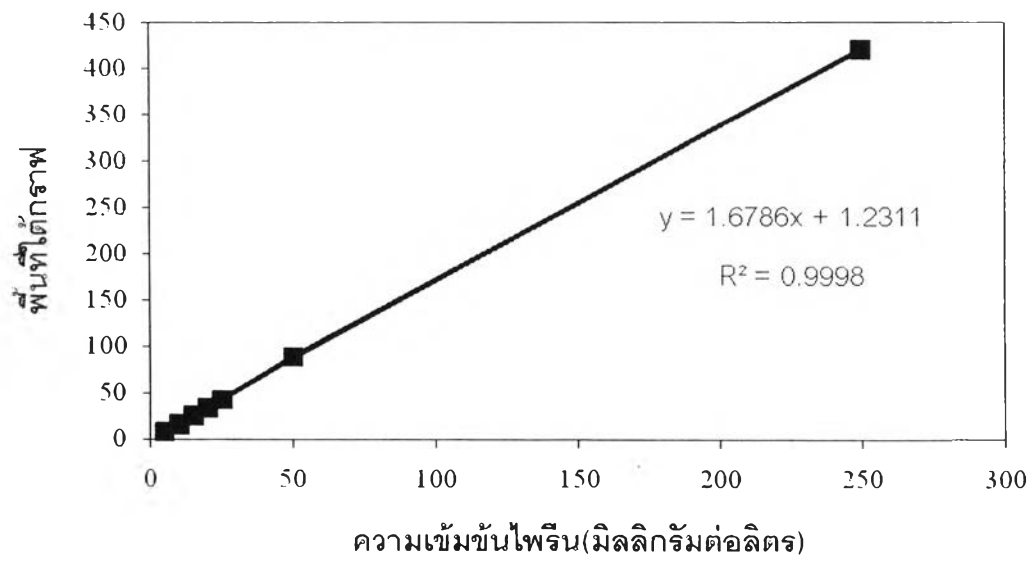
กราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ค.1 พื้นที่ใต้กราฟความเข้มข้นของพีแนนทรินและไพรีน

ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ	
	พีแนนทริน	ไพรีน
5	6.7	8.4
10	14.1	16.6
15	22.4	25.8
20	29.5	34.5
25	37.6	43.4
50	77.6	89.2
250	367.4	420.2



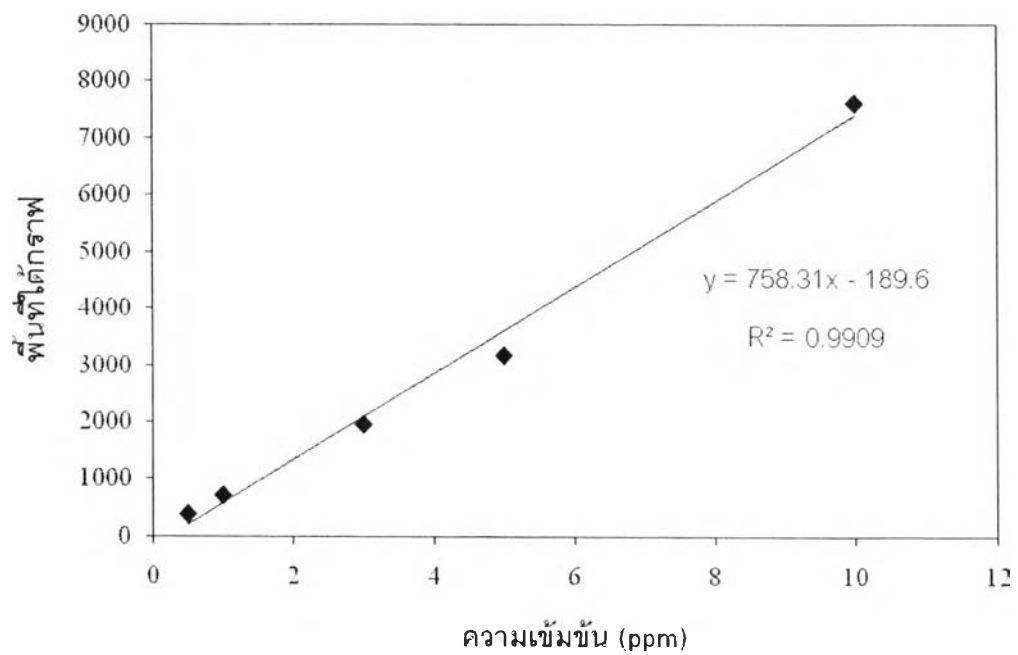
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของพีแนนทริน



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของไพรีน

ตารางที่ ค.2 พื้นที่ใต้กราฟความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล

ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล (ppm)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.5	380.8
1	709.3
3	1951.3
5	3173.2
10	7624.5



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของน้ำมันดีเซล

ภาคผนวก ง

ก. การทดสอบการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอฟิลไลเซชันด้วยสารป้องกันความเย็นชนิดต่างๆ

การทดลองเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 โดยวิธีไลโอฟิลไลเซชันจำเป็นต้องมีสารป้องกันความเย็นเพื่อลดการตายของแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการไลโอฟิลไลเซชัน ซึ่งการทดลองนี้ได้ทำการคัดเลือกสารป้องกันความเย็น 3 ชนิดมาทำการทดสอบคือ 12 เปอร์เซ็นต์ซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์นมปลอดมันเนย และ 5 เปอร์เซ็นต์โดเมทิลซัลฟอกไซด์ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีสารป้องกันความเย็น หลังจากไลโอฟิลไลเซชัน ทำการนับจำนวนกลุ่มแบคทีเรียโดยวิธี viable plate count บนอาหาร LB agar plate ได้ผลดังแสดงในตารางที่ ง.1

ตารางที่ ง.1 การรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอฟิลไลเซชันด้วยสารป้องกันความเย็นชนิดต่างๆ

สารป้องกันความเย็น	จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย (CFU/มล.)	% จำนวนกลุ่มแบคทีเรียที่รอดชีวิตเทียบกับจำนวนกลุ่มแบคทีเรียเริ่มต้น
ก่อนไลโอฟิลไลเซชัน	1.57×10^9	100
12% ซูโครส	1.47×10^9	99.7
10% นมปลอดมันเนย	2.94×10^8	92.0
5% โดเมทิลซัลฟอกไซด์	3.85×10^6	69.4
ไม่มีสารป้องกันความเย็น	2.48×10^6	67.2

ข. การทดสอบการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟไลเซชัน

การทดสอบความสามารถในการเจริญโดยใช้สารป้องกันความเย็นของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟไลเซชัน เพื่อศึกษาว่ากลุ่มแบคทีเรียนี้จะสามารถใช้สารป้องกันความเย็นในการเจริญได้หรือไม่ โดยทำการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนในการเจริญ กับกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟไลเซชันกับสารป้องกันความเย็นชนิดต่างๆ ที่ละลายเซลล์ด้วย 0.85% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 7 และ 10 ทำการนับจำนวนกลุ่มแบคทีเรียโดยวิธี Viable plate count บนอาหาร LB agar plate ได้ผลเป็นดังรูปที่ ง.1

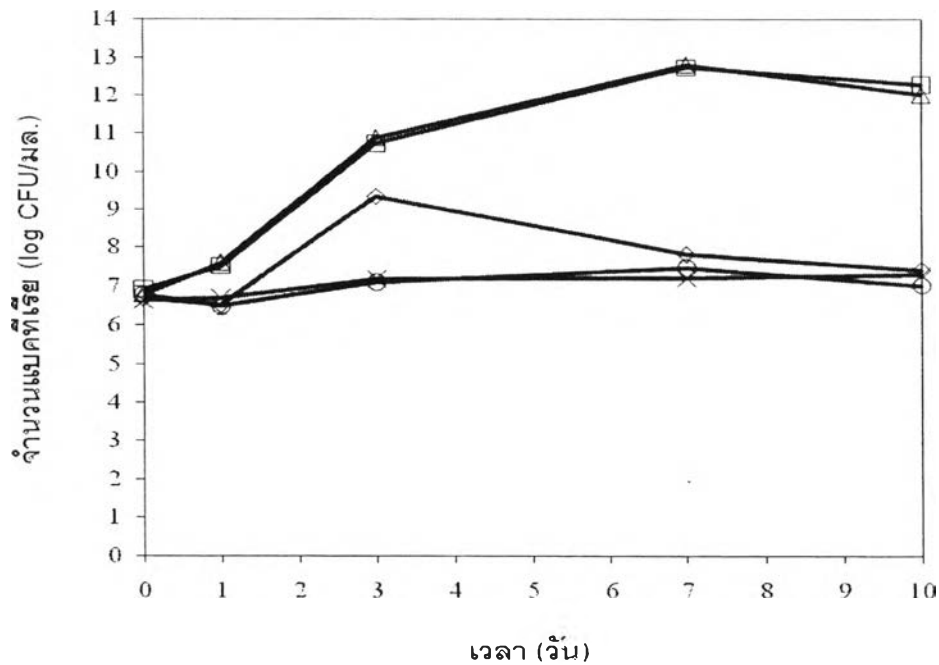
ผลการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟไลเซชันด้วย 12% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็นพบว่า มีการเจริญสูงสุดในวันที่ 7 ของการบ่ม ซึ่งเพิ่มจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 6.92 log CFU/มล. เป็น 12.73 log CFU/มล. จากนั้นลดจำนวนลงเหลือ 12.27 log CFU/มล. (รูปที่ ง.1)

การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟไลเซชันด้วย 10% นมปลอดมันเนยเป็นสารป้องกันความเย็น พบว่า มีการเจริญสูงสุดในวันที่ 7 ของการบ่ม จากเริ่มต้น 6.79 log CFU/มล. เป็น 12.79 log CFU/มล. และลดลงเหลือ 12 log CFU/มล. (รูปที่ ง.1)

ในชุดการทดลองที่มีกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟไลเซชันด้วย 5% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ พบการเจริญในช่วงแรกเล็กน้อยและเริ่มคงที่จากจำนวนกลุ่มแบคทีเรีย 6.62 log CFU/มล. เป็น 7.29 log CFU/มล. ในวันสุดท้ายของการทดลอง (รูปที่ ง.1)

กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟไลเซชันโดยไม่มีสารป้องกันความเย็น พบการเจริญสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการทดลองโดยเพิ่มจำนวนกลุ่มแบคทีเรียจาก 6.69 log CFU/มล. เป็น 9.34 log CFU/มล. และลดจำนวนลงเหลือ 7.43 log CFU/มล. (รูปที่ ง.1)

ชุดการทดลองกลุ่มแบคทีเรียที่เตรียมสดพบการเพิ่มจำนวนกลุ่มแบคทีเรียจาก 6.79 log CFU/มล. เป็น 7.47 log CFU/มล. ในวันที่ 7 ของการทดลอง และลดจำนวนลงเหลือ 7.02 log CFU/มล. (รูปที่ ง.1)



- จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์เซชันด้วย 12% ซูโครส
- △— จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์เซชันด้วย 10% นมปลอดมันเนย
- ×— จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์เซชันด้วย 5% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์
- ◇— จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์เซชันโดยไม่มีสารป้องกันความเย็น
- จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เตรียมสด

รูปที่ ๑.1 การเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์เซชันด้วยสารป้องกันความเย็นชนิดต่างๆ

๓พ. ๒๕๕๒
 เลขทะเบียน..... ๖๙๙๐
 วันเดือนปี..... 10 ส.ค. 2560

ค. การทดสอบเพื่อหาสภาวะที่ใช้ในการเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์ไลเซชัน

โดยทำการเก็บกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์ไลเซชันที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6 เดือน ทำการนับจำนวนกลุ่มแบคทีเรียที่รอดชีวิตทั้งก่อนและหลังการเก็บรักษา โดยวิธี viable plate count บนอาหาร LB agar plate

ผลการทดลองเก็บรักษากลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์ไลเซชันที่ อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียสให้ผลการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ใกล้เคียงกัน เท่ากับ 90.56 และ 90.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีการรอดชีวิตลดลงเล็กน้อยจาก 91.94 และ 91.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ ง.2)

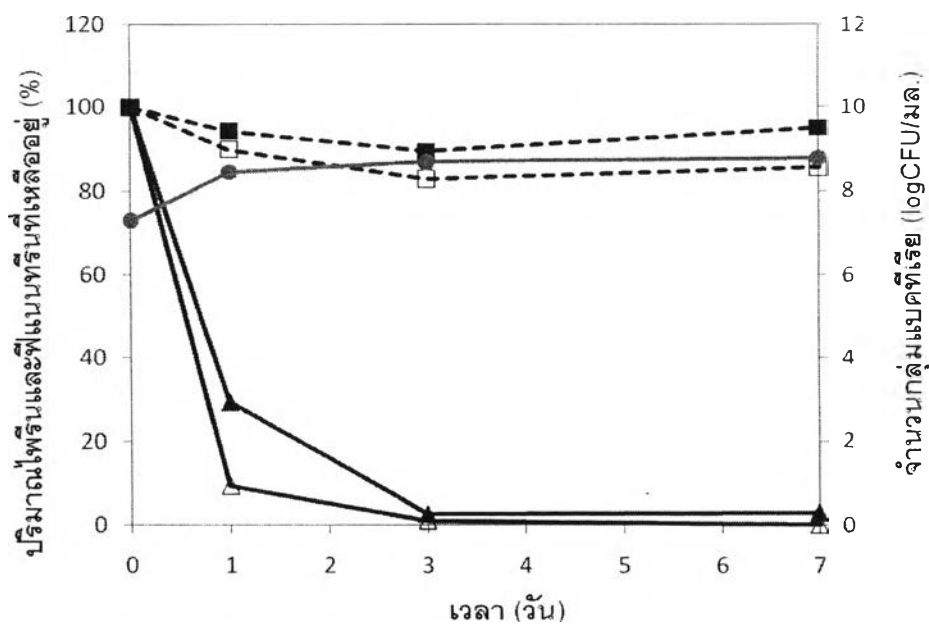
ตารางที่ ง.2 การรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์ไลเซชัน ก่อนและหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

สภาวะที่ทดสอบ	จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย (CFU/มล.)	log จำนวนกลุ่มแบคทีเรียที่รอดชีวิตเทียบกับ log จำนวนกลุ่มแบคทีเรียเริ่มต้น
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ก่อนไลโอไฟล์ไลเซชันและเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส	4.95×10^8	100
ก่อนเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส	9.85×10^7	91.94
หลังเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส	7.45×10^7	90.56
กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ก่อนไลโอไฟล์ไลเซชันและเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส	5.25×10^8	100
ก่อนเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส	9.7×10^7	91.63
หลังเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส	7.45×10^7	90.25

ง. การทดสอบการย่อยสลายไฟรีนและพีแนนทรินในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM โดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์เซชัน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

การทดลองเพื่อนำกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์เซชัน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไฟรีนและพีแนนทรินในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM เพื่อศึกษาผลของการเก็บรักษาต่อความสามารถในการย่อยสลาย โดยให้กลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์เซชัน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน 1 แอมพูลละลายด้วย 0.85% NaCl ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีไฟรีนและพีแนนทรินความเข้มข้นชนิดละ 0.05 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1, 3, 7 ทำการสกัด PAHs ตามวิธีในข้อ 3.3.5 วิเคราะห์ปริมาณ PAHs โดยแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีในข้อ 3.3.6 นับจำนวนกลุ่มแบคทีเรียโดยวิธี Viable plate count บนอาหาร LB agar plate

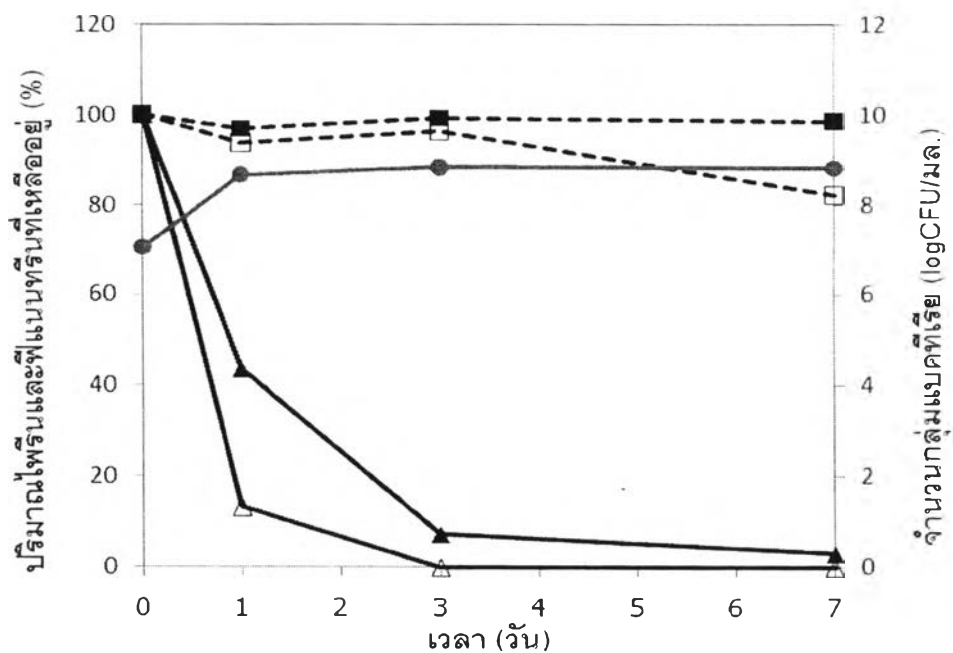
ผลการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน การย่อยสลายไฟรีนและพีแนนทรินในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์เซชัน พบว่าปริมาณไฟรีนเหลือ 2.98 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถตรวจวัดปริมาณพีแนนทรินได้โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟีในวันที่ 7 ชุดควบคุมที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรียมีการสลายตัวของไฟรีนเหลือ 94.94 เปอร์เซ็นต์ และพีแนนทริน 85.63 เปอร์เซ็นต์ จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 เพิ่มขึ้นจาก 7.3 log CFU/มล. เป็น 8.78 log CFU/มล. ในวันที่ 7 (รูปที่ ง.2)



- ปริมาณฟิแชนท์รีนในชุดควบคุมที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย
- ปริมาณไฟรีนในชุดควบคุมที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย
- △— ปริมาณฟิแชนท์รีนในชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย
- ▲— ปริมาณไฟรีนในชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย

รูปที่ ๒ การย่อยสลายไฟรีนและฟิแชนท์รีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์เซชันและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

ผลการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน การย่อยสลายไฟรีนและฟิแชนท์รีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟล์เซชัน พบว่าปริมาณไฟรีนเหลือ 3.01 เพอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 และไม่สามารถตรวจวัดปริมาณฟิแชนท์รีนได้โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟีในวันที่ 3 ชุดควบคุมที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรียมีการสลายตัวของไฟรีนเหลือเท่ากับ 98.61 เพอร์เซ็นต์ และฟิแชนท์รีน 82.14 เพอร์เซ็นต์ จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เพิ่มขึ้นจาก 7.05 log CFU/มล. เป็น 8.84 log CFU/มล. ซึ่งสูงสุดในวันที่ 3 และลดลงเล็กน้อยในวันสุดท้ายของการทดลอง (รูปที่ ๒.3)



- ปริมาณไฟรีนในชุดควบคุมที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย
- ปริมาณไฟรีนในชุดควบคุมที่ไม่เติมกลุ่มแบคทีเรีย
- △— ปริมาณไฟรีนในชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย
- ▲— ปริมาณไฟรีนในชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมกลุ่มแบคทีเรีย

รูปที่ 3 การย่อยสลายไฟรีนและไฟรีนที่แนบที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ของกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่ผ่านการไลโอไฟไลเซชันและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุธาสินี จิตติมณี เกิดเมื่อวันที่ 6 กันยายน พ.ศ.2529 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2550 และเข้ารับการศึกษาคือในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551

