

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จิราภรณ์ สุขุมวาที. 2540. รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยการใช้แบคทีเรียกำจัดคราบน้ำมันปิโตรเลียมที่สถานีบริการน้ำมัน. รายงานฉบับสมบูรณ์ (ตุลาคม).
- ชรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์. 2533. ผลกระทบของน้ำมันต่อสิ่งแวดล้อม. น้ำมัน : 1-8
- ปราโมทย์ ไชยเวช. 2537. น้ำมันปิโตรเลียมดิบ. ปิโตรเลียมเทคโนโลยี. ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. : 33-62.
- วิมล ชอบชื่นชม. การย่อยสลายสารพิษตกค้างด้วยจุลินชีพ. Thai Environmental Engineering Journal (พฤษภาคม - มิถุนายน). : 42-45.
- วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2537. เทคโนโลยีชีวภาพช่วยแก้ปัญหาคร่าบน้ำมัน (พฤษภาคม – สิงหาคม). : 8-15.

ภาษาอังกฤษ

- Aislabie, J., Mcleod, M., and Fraser, R. 1998. Potential for biodegradation of hydrocarbons in soils from the Ross Dependency , Antarctica. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 210-214.
- Ajisebutu, S.O. 1988. Effect of sodium chloride on biodegradation of crude oil by two species of *Aeromonas*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 203-208.
- April, T.M., Abbott, S.P., Foght, J.M., and Currah, R.S. 1998. Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii*. Can. J. Microbiol. 44: 270-278.
- Ashok, I.T., Saxena, S., and Musarra, J. 1995. Isolation and characterization of four polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from soil near an oil refinery. Lett. Appl. Microbiol. 21: 246-248.
- Atlas, R.M. 1975. Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. Appl. Microbiol. 30: 396-403.
- Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiol. Rev. 45: 180-209.
- Atlas, R.M. editor. 1984. Petroleum microbiology. New York: Macmillan.
- Atlas, R.M. 1991. Microbial hydrocarbon degradation-Bioremediation of oil spills. J. Chem. Technol. Biotechnol. 52: 149-156.

- Atlas, R.M. 1995. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. Mar. Pollut. Bull. 31: 178-182.
- Atlas, R.M., and Bartha, R. 1972. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. Can. J. Microbiol. 18: 1851-1855.
- Atlas, R.M., and Bartha, R. 1972. Degradation and mineralization of petroleum in sea water: limitation by nitrogen and phosphorus. Biotechnol. Bioeng. 14: 309-317.
- Atlas R.M., and Bartha, R. 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. In: Marshall K.C. (ed) . Advances in microbial ecology. 12 : 287-388.
- Atlas, R.M., and Cerniglia, C.E. 1995. Bioremediation of petroleum pollutants. Biosci. 45: 332-338.
- Atlas, R.M., and Heintz, C.E. 1973. Ultrastructure of two species of oil-degrading marine bacteria. Can. J. Microbiol. 19: 43-45.
- Austin, B., Calomiris, J.J., Walker, J.D., and Colwell, R.R. 1977. Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 34: 60-68.
- Babu, P.S., Deshpande, M., Juwarkar, A., and Khanna, P. 1994. Characterization and properties of the microbial biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain BS1. Austrasian Biotechnol. 4: 302-305.
- Bailey, N.J.L., Jobson, A.M., and Rogers, M.A. 1973. Bacterial degradation of crude oil: comparison of field and experiment data. Chem. Geol. 11: 201-203.
- Baker, J.M. 1990. The effects of oils on plants. Environ. Pollut. 1: 27-44.
- Banat, I.M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation : a review. Bioresource Technol. 51: 1-12.
- Bangchak Petroleum Pub Co Ltd, compiler. 1990. Crude oil composition [datasheet].
- Barnett, J.A., and Pankhurst, R.J. 1974. A New Key to Yeasts. Amsterdam: North Holland.
- Bartha, R. 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. Microb. Ecol. 12: 155.
- Beckmann, H. 1981. Composition and properties of petroleum. Pliezhausen: Grammlich.
- Benson, S.A. 1979. Local anaesthetics block induction of the *Pseudomonas alk regulon.* J. Bacteriol. 140: 1123-1125.
- Berg, G., Alan, G.S., Lee, H., and Trevors, J.T. 1990. Identification and characterization of a soil bacterium with extracellular emulsified activity. J. Environ Sci Health. 7: 753-764.

- Bertrand, J.C., Alamallah, M., Acquaviva, M., and Mille, M. 1990. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. Lett Appl Microbiol. 11 : 260-263.
- Bertrand, J.C., Micheline Bianchi Mallah, M.A., Acquaviva, M., and Mille, G. 1993. Hydrocarbon biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in sea water as a function of sodium chloride concentration. J. Exp Mar Biol Ecol. 168 : 125-138.
- Bertrand, J.C., Rambeloarisoa, E., Rotani, J.F., Guisti, G., and Mattei, G. 1983. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. Biotechnol Lett. 5: 567-572.
- Bestetti, G., Gennaro, P.D., Galli, E., Leoni, B., Pelizzoni, F., Sello, G., and Bianchi, D. 1994. Bioconversion of substituted naphthalenes to the corresponding salicylic acids. Appl Microbiol Biotechnol. 40: 791-793.
- Blasig, R., Mauersberger, S., Riege, P., Schunck, W.H., Jockisch, W., Franke, P., and Muller, H.G. 1988. Degradation of long-chain n-alkanes by the yeast *Candida maltosa* II oxidation of n- alkanes and intermediates using microsomal membrane fractions. Appl Microbiol Biotechnol. 28: 589-597.
- Bossert, I., and Bartha, R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas RM, Editor. Petroleum microbiology. New York : Macmillan. : 436-473.
- Bossert, I., and Compeau, G.C. 1995. Cleanup of petroleum hydrocarbon contamination in soil. Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. : 77-125.
- Braddock F.J., Linstrom, E.J., and Brown J.E. 1995. Distribution of hydrocarbon - degrading microorganisms in sediments from Prince William Sound , Alaska , following the Exxon Valdez Oil Spill. Marine Pollution Bulletin. 30: 125-132.
- Brodskob, T.S., and Legge, R. 1992. Enhance biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soil supplemented with *Phenerochaete chrysosporium*. Appl Environ Microbiol. 58: 3117-3121.
- Bruheim, P., Bredholt, H., and Eimhjellen, K. 1997. Bacterial degradation of emulsified crude oil and the effect of various surfactants. Can. J. Microbiol. 43: 17-22.
- Bruheim, P., Bredholt, H., and Eimhjellen, K. 1999. Effect of surfactant mixtures, including Corexit 9527, on bacterial oxidation of acetate and alkanes in crude oil. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1658-1661.

- Buckley, E.N., Jonas, R.B., and Pfaender, F.K. 1976. Characterization of microbial isolates from an estuarine ecosystem : relationship of hydrocarbon utilization to ambient hydrocarbon concentrations. Appl Environ Microbiol. 32: 232-237.
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., and Van Baalen, C. 1984. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. J. Gen Microbiol. 116: 495-500.
- Chakrabarty, A.M., and Latham, N.Y. 1981. Microorganisms having multiple compatible degradative energy-generating plasmids and preparation thereof. US Patent. 4, 259, 444. Mar 31.
- Colwell, R.R., Mill, A.L., Walker, J.D., Garcia-Tello, P., and Compos-P, V. 1978. Microbial ecology of the Metula spill in the Straits of Magellan. J.Fish Res Board Can. 35: 573-580.
- Cooper, D.G. 1986. Biosurfactants. Microbiol. Sci. 3: 145-149.
- Cowell, E.B. editor. 1984. The ecological effects of oil pollution on littoral communities. London : Applied Science.
- Cooney, J.J. 1984. The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems. In : Atlas RM, editor. Petroleum microbiology. New York : Macmillan.: 399-433.
- Cooney, J.J., Silver, S.A., and Beck, E.A. 1976. Hydrocarbon-using microorganisms in three fresh-water ecosystem. Applies Science. : 141-155.
- Dagher, F., Deziel, E., Lirette, P., Paquette, G., Bisailon, G. J., and Villemur, R. 1997. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. Can. J. Microbiol. 43: 368-377.
- Davis, S.J., and Gibbs, C.F. 1975. The effect of weathering on crude oil residue exposed at sea. Wat. Res. 9: 275-285.
- Dennis, E. 1979. In : ชรัคณ์ รุ่งเรืองศิลป์. 2533. ผลกระทบของน้ำมันต่อสิ่งแวดล้อม. น้ำมัน : 1-8.
- Deziel, E., Paquette, F., Villemur, R., Lepine, F., and Bisailon, G. J. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strains growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 62(6) :1908-1912.
- Dibble, T.J., and Bartha, R. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Appl. Environ. Microbiol. 37(4): 729-739.
- Dodd, E.N. 1974. Oil and dispersants : chemical considerations., ecological aspects of toxicity testing of oils and dispersant. Applied Science Pblisher, LTD.

- Dunn, N.W., Gunsalus, I.C. 1973. Transmissible plasmid coding early enzyme of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 114: 974-979.
- Enley, B.D., Ratzkin, B.J., Osslund, T.D., Simon, M.J., Wackett, L.P., and Gibson, D.T. 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. Science 222: 167-169.
- Floodgate, G.D. 1984. The fate of petroleum in marine ecosystems. In: Atlas, R.M., editor. Petroleum Microbiology. New York : Macmillan. : 355-397.
- Foght, J.M., Gutnick, D.L., and Westlake, W.S. 1989. Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. Appl. Environ. Microbiol. 55: 36-42.
- Fu, M.H., and Alexander, M. 1995. Use of surfactants and slurring to enhance the biodegradation in soil of compounds initially dissolved in nonaqueous-phase liquids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 551-558.
- Golestein, R.M., Mallory, L.M., and Alexander, M. 1985. Reason for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. Appl. Environ. Microbiol. 50: 977-983.
- Grey, M.R., Banerjee, D.K., Fedorak, P.M., Hashimoto, A., Masliyah, J.H., Pikard, A.M. 1994. Biological remediation of anthracene-contaminated soil in rotating bioreactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 933-940.
- Grund, A., Shapiro, J., Feenewald, M., Bach, P., Leathy, J., Markbreiter, K., Nieder, M., and Toepfer, M. Regulation of alkane oxidation in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 123: 546-556.
- Hanson, K. G., Anuranjini, N., Madhavi, K., and Anjana, J. D. 1997. Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacter sp.* A3. Current Microbiol. 35: 191-193.
- Harayama, S., and Rekik, M. 1989. Bacterial aromatics ring-cleavage enzymes are classified into different gene families. J. Biol. Chem. 264: 15328-15333.
- Heitkamp, M.A., Freeman, J.P., Miller, D.W., Cerniglia, C.E. 1988. Pyrene degradation by *Mycobacterium sp.* : identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2556-2565.
- Herbes, S.E., Schwall, L.R. 1978. Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbon in pristine and petroleum contaminated sediments. Appl. Environ. Microbiol. 35: 306-316.
- Hoff, R.Z. 1993. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. Mar. Pollut. Bull. 16: 476-481.

- Hollaway, S.L., Faw, R.M., and Sizemore, R.K. 1980. The bacterial community composition of an active oil field in the Northwestern gulf of Mexico. Mar. Pollut. Bull. 11: 153-156.
- Holt, J.G., Krieng, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition., U.S.A.: Williams & Wilkins.
- Horowitz, A., Gutnick, D., and Rosenberg, E. 1975. Sequential growth of bacteria on crude oil. Appl. Microbiol. 30: 10-12.
- Horowitz, A., and Atlas, R.M. 1977. Continuous open flow-through system as a model for crude oil degradation in the Arctic ocean. Appl. Environ. Microbiol. 33: 647-653.
- Huddleston, R.L., and Cresswell, L.W. 1976. Environmental and nutritional constraints of microbial hydrocarbon utilization in the soil In: Proceeding of the 1975 Engineering Foundation Conference: The Role of Microorganisms in the recovery of oil (WC). National Science Foundation. : 71-72.
- Hughes, J.B., Beckles, D.M., Chandra, S.D., and Ward, C.H. 1997. Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. J. Ind. Microbiol. 18: 152-160.
- Ijah, U.J.J. 1998. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. Waste Management. 18: 293-299.
- Jain, D. K., Collins – Thompson, D. L., Lee, H., and Trevors, J. T. 1991. A drop collapsing test for screening surfactant - producing microorganisms. J. Microbiol. Methods. 13: 271-279.
- Jain, D.K., Lee, H., and Trevors, J.T. 1992. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. J. Ind. Microbiol. 10: 87-93.
- Jobson, A., Cook, F. D., and Westlake, D. W. S. 1972. Microbial utilization of crude oil. Appl. Microbiol. 23(6): 1082-1089.
- Jones, J.G., Edington, M.A. 1968. An ecological survey of hydrocarbon oxidizing microorganisms. J. Gen. Microbiol. 52: 381-390.
- Jones, J.G., Knight, M., Byron, J.A. 1970. Effect of gross pollution by kerosine hydrocarbons on the microflora of moorland soil. Nature (London). 227: 1166.
- Kampfer, P., Steiof, M., Becker, P.M., and Dott, W. 1993. Characterization of chemoheterotrophic bacteria associated with *in situ* bioremediation of a waste-oil contaminated site. Microb. Ecol. 26: 161-188.

- Kappeli, P., Finnerty, W.R. 1979. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. J. bacteriol. 140: 707-712.
- Kastner, M., Jammali, M.B., and Mahro, B. 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil site able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH). Appl. Microbiol. Biotechnol. : 267-273.
- Kiyohara, H., and Nagao, K. 1978. The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria. J. Gen. Microbiol. 105: 69-75.
- Kiyohara, H., Nagao, K., and Yana, K. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble solid hydrocarbons on agar plates. Appl. Environ. Microbiol. 43: 454-457.
- Kohler, A., Bryniok, D., Eichler, B., Mackenbock, K., Freire-Schroder, D., and Knackmuss, H.J. 1990. In: Dechema Biotechnology Conferences 4,VCH; Weinheim. : 585-587.
- Komogara, K., Nakase, T., and Katsuya, N. 1964. Assimilation of hydrocarbons by yeasts , Preliminary screening. J. Gen Appl. Microbiol. 10: 313-321.
- Komukai, S.,ed. 1996. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. J. Ferment. Bioeng. 82: 570-574.
- Korda, A., Santas, P., Tenente, A., and Santas, R. 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation : sampling and analytical techniques , in situ treatments and commercial microorganisms currently used. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 677-686.
- Lai, B., and Khanna, S. 1996. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. J. Appl. Bacteriol. 81: 355-362.
- Lambert, M., Kremer, S., Sterner, O., and Anke, H. 1994. Metabolism of pyrene by the basidiomycetes *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrene-quinones and their hydroxylated in strain JK375. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3597-3601.
- Lange, F., Kremer, S., Strener, O., and Anke, H. 1994. Pyrene metabolism in *Crinipellis stipitaria*: identification of *trans*-4,5-dihydro-4,5-dehydroxypyrene and 1-pyrene sulfate in strain JK364. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3602-3607.
- Leathy, J.G., and Colwell, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev. 54: 305-315.
- Leathy, J.G., Somerville, C.C., Cunningham, K.A., Admantiades, G.A., Byrd, J.J., and Colwell, R.R. 1990. Hydrocarbon mineralization in sediments and plasmid incidence in sediment bacteria from the Campeche Bank. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1565-1570.
- Lodder, J. 1972. The Yeast. Second edition., U.S.A.: Williams & Wilkins.

- Maeng, J.H., Sakei, Y., Tani, Y., and Kato, N. 1996. Isolation and characterization of novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. Strain M-1. J. Bacteriol. 178: 3695-3700.
- Margesin, R., and Schinner, F. 1997. Bioremediation of diesel-oil-contaminated Alpine soils at low temperatures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 462-468.
- Mateles, R.I., Baruah, J.N., Tanenbaum, S.R. 1967. Growth of a thermophilic bacteria on hydrocarbons: a new source of single cell protein. Science. 157: 1322-1323.
- Mattei, G., and Bertrand, J.D. 1985. Production of biosurfactants by a mixed bacteria population grown in continuous culture on crude oil. Biotechnol. Lett. 7: 217-222.
- Mattei, G., Rambeloarisoa, E., Giusti, G., Rontani, J.F., and Bertrand, J.C. 1986. Fermentation procedure of a crude oil in continuous culture on seawater. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 302-304.
- Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., and Imanaka, T. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. J. Bacteriol. 175: 6459-6466.
- Morkan, J.G., Watkinson. 1989. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. Crit. Rev. Biotechnol. 8: 305-333.
- Mueller, G. M., Resnick, M. S., Shelton, E. M., and Pritchard, H. P. 1992 . Effect of inoculation on the biodegradation of weathered Prudhoe Bay crude oil. J. Ind. Microbiol. 10: 95-102.
- Mulkins-Phillips, G.J., and Stewart, J.E. 1974. Distribution of hydrocarbon-utilizing bacteria in Northwestern Atlantic waters and coastal sediments. Can J. Microbiol. 20: 955-962.
- Mulkins-Phillips, G.J., and Stewart, J.E. 1974. Effect of environmental parameters on bacterial degradation of Bunker C oil , crude oils , hydrocarbons. Appl. Microbiol. 28: 915-922.
- Mulkins-Phillips, G.J., and Stewart, J.E. 1974. Effect of four dispersants on biodegradation and growth of bacteria on crude oil. Appl. Microbiol. 28: 547-552.
- Munk, V., Dostalek, M., and Volfova, O. 1960. Cultivation of yeast on gas oil. Biotechnol. Bioeng. 6: 383-391.
- Nakamura, K. S., Sugiura, K., Inomata, Y. Y., Toki, H., Venkateswaran, K., Yamamoto, S., Tanaka, H., and Harayama, S. 1996. Construction of bacterial consortia that degrade arabian light crude oil. J. Ferment. Bioeng. 82(6): 570-574.

- Nieboer, M., Gunnewijk, M., VanBeilen, J.B., and Witholt, B. 1997. Determinants for overproduction of the *Pseudomonas oleovorans* cytoplasmic membrane protein alkane hydrolase in *alk⁺ Escherichia coli* E3110. J. Bacteriol. 179: 762-768.
- Nyns, E.J., Auquiere, I.P., and Wiaux, A.L. 1968. Taxonomic value of properties of fungi to assimilate hydrocarbons. Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. 34: 441-457.
- Oberbremer, A., and Muller, H.R. 1989. Aerobic stepwise hydrocarbon degradation and formation of biosurfactants by an original soil population in a stirred reactor. Appl. Environ. Microbiol. 31: 582-586.
- Oberbremer, A., Muller, H. R., and Wagnee, F. 1990. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 485-489.
- Omar, S.H., and Rehm, H.J. 1988. Degradation of n-alkane by *Candida parapsilosis* and *Penicillium frequentans* immobilized on granular clay and aquifer sand. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 103-108.
- Omar, S.H., Rehm, H.J., and Budecker, U. 1990. Degradation of oily sludge from a flotation unit by free immobilized microorganisms. Appl. Microbiol Biotechnol. 34: 259-263.
- Pareilluex, A. 1979. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica* : Formation of a biosurfactant ; Effects of respiration activity and growth. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8: 91-101.
- Parekh, V.R., Traxler, R.W., and Sobek, J.M. 1977. N-alkane oxidation enzyme of a *Pseudomonad*. Appl. Environ. Microbiol. 33: 881-884.
- Pfaender, F.K., and Buckley, N. 1984. Effect of petroleum on microbial communities. In: Atlas, R.M., editor. Petroleum Microbiology. New York: Macmillan: 507-536.
- Pinholt, Y., Struwe, S., and Kjoller, A. 1979. Microbial changes during oil decomposition in soil. Holarct. Ecol. 2: 195-200.
- Pirnik, M.P., Atlas, R.M., and Bartha, R. 1974. Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. J. Bacteriol. :868-878.
- Raymond, R.L., Jamison, V.W., and Hudson, V.W. 1967. Microbial hydrocarbon co-oxidation. I. Oxidation of mono-, and dicyclic hydrocarbons by soil isolates of the genus *Norcadia*. Appl. Microbiol. 15: 857-865.
- Raymond, R.L., Hudson, J.O., and Jamison, V.W. 1976. Oil degradation in soil. Appl. Environ. Microbiol. 31: 522-535.

- Reddy, P.G., Singh, H.D., Pathak, M.G., Bhagat, S.D., and Baruah, J.N. 1983. Isolation and functional characterization of hydrocarbon emulsifying and solubilizing factors produced by a *Pseudomonas* species. Biotechnol. Bioeng. 25: 387-401.
- Reisfeld, A., Rosenberg, E., and Gutnick, D. 1972. Microbial degradation of oils: factors affecting oil dispersion in seawater by mixed and pure cultures. Appl. Microbiol. 24: 363-368.
- Robson, A., Cook, F.D., and Westlake, D.W.S. 1972. Microbial utilization of crude oil. Appl. Microbiol. 23: 1082-1089.
- Rocha, C., and Infante, C. 1997. Enhanced oily sludge biodegradation by a tensio-active agent isolated from *Pseudomonas aeruginosa* USB-CS1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 615-619.
- Rosenberg, M., and Rosenberg, E. 1981. Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. J. Bacteriol. 148: 51-57.
- Rosenberg, M., and Rosenberg, E. 1985. Bacterial adherence at the hydrocarbon-water interface. Oil Petrolchem. Pollut. 2: 155-162.
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Adler, E., Raube, R., Taube, A., and Ron, E.Z. 1992. Petroleum bioremediation- a multiphase problem. Biodegrad. 3: 337-350.
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Adler, E., Ron, E.Z., and Abir, H. 1996. Oil bioremediation using insoluble nitrogen source. J. Biotechnol. 51: 273-278.
- Rossini, F.D. 1960. Hydrocarbons in petroleum. J. Chem. Educ. 39: 554-561.
- Roy, P.K., Singh, H.D., Bhagat, S.D., and Baruah, J.N. 1979. Characterization of hydrocarbon emulsification and solubilization occurring during the growth of *Endomycopsis lipolytica* on hydrocarbons. Biotechnol. Bioeng. 21: 955-974.
- Samiullah, Y. 1989. Biological effects of marine oil pollution. Mar. Pollut. Bull. 20: 430-432.
- Sarkar, A.K., Goursaud, J.C., Sharma, M.M., and Georgiou, G. 1989. A critical evaluation of MEOR processes. Appl. Biochem. 12: 370-375.
- Schoberdt, H.H. 1990. The chemistry of hydrocarbon fuels. Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Scotsky, J.B., Greer, C.W., and Atlas, R.M. 1994. Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments. Can. J. Microbiol. 40: 981-985.
- Setti, L., Peffer, P.G., and Lanzarini, G. 1995. Surface tension as a limiting factor for aerobic n-alkane biodegradation. J. Chem. Tech. Biotechnol. 64: 41-48.

- Sexstone, A.J., and Atlas, R.M. 1977. Response of microbial populations in Arctic tundra soils to crude oil. Can. J. Microbiol. 23: 1327-3333.
- Shailubhai, K., Rao, N.N., and Modi, V.V. 1984. Treatment of petroleum industry oil sludge by *Rhodotorula* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 437-438.
- Sheila, A. 1976. Effect of oil pollution. In : ชรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์. 2533. ผลกระทบของน้ำมันต่อสิ่งแวดล้อม. น้ำมัน : 1-8.
- Sielicki, M., Focht, D.D., Martin, J.P. 1978. Microbial transformations of styrene and (¹⁴C) styrene in soil and enrichment culture. Appl. Environ. Microbiol. 35: 124-128.
- Singer, M.E., and Finnerty, W.R. 1984. Microbial metabolism of straight-chain and branched alkane. In: Atlas, R.M., editor. Petroleum Microbiology. New York.: Macmillan : 1-60.
- Singh, A.K., and Gaur, J.P. 1990. Effects of petroleum oils and their paraffinic, asphaltic, and aromatic fractions on photosynthesis and respiration of microalgae. Ecotoxicol. Env. Safety. 19: 8-16.
- Smith, J.E., editor. 1968. "Torrey Canyon" pollution and marine life. Cambridge. Cambridge University.
- Sneath, P.H.A. 1984. Endospore-forming gram positive rods and cocci. Bergey's Manual of System Bacteriology, Vol.2. Baltimore/London : Willium & Wilkins. P 1104-1207.
- Song, H.G., and Bartha, R. 1990. Effects of Jet fuel spills on the microbial community of soil. Appl. Environ. Microbiol. 56: 646-651.
- Sorkhoh, N.A., Ghannoum, M.A., Ibrahim, A.S., Stretton, R.J., and Radwan, S.S. 1990. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environment in Kuwait. Environ. Pollut. 65: 1-7.
- Sorkhoh, N.A., Ibrahim, A.S., Ghannoum, M.A., and Radwan, S.S. 1993. High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwaiti desert. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39 : 123-126.
- Speight, L.G. 1991. The chemistry and technology of petroleum. 2nd ed. New York: Marcel Dekker.
- Stanley, et al. 1979. In : ชรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์. 2533. ผลกระทบของน้ำมันต่อสิ่งแวดล้อม. น้ำมัน : 1-8.
- Stelmack, P.L., Gray, M.R., and Pickard, M.A. 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. Appl. Environ. Microbiol. 65: 163-168.
- Stone, R.W., ed. 1942. Bacteria attacking petroleum and oil fraction. J.Bacteriol. 44: 77-80.

- Sukhumavasi, J. 1997. Bioremediation of gas-station oily wastewater by local bacteria In: The Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King, editor. 23rd Congress on science and technology of Thailand:1997 Oct.20-22; The Lotus Hotel Pang Suan Kaew (CM). The Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King. ; 57.
- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., and Harayama, S. 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. Environ. Sci. Technol. 31: 45-51.
- Thomas, et al. 1979. In : ชรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์. 2533. ผลกระทบของน้ำมันต่อสิ่งแวดล้อม. น้ำมัน : 1-8.
- Tongpubesra, K. 1998. Feasibility study for appropriate technologies in bioremediation of oil spill in Thailand. Bangkok.
- Van, D. M., Gulley, M., Lee, S., and Trevors, J. 1993. Evolution of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soils. J. Ind. Microbiol. 11: 163-170.
- Venkateswaran, K., and Harayama, S. 1995. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. Can. J. Microbiol. 41: 767-775.
- Volkering, F., Breure, A.M., Andel, J.G., and Rulkens, W.H. 1995. Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. : 1699-1705.
- Walker, J.D., and Colwell, R.R. 1974. Microbial petroleum degradation: used of mixed hydrocarbon substrate. Appl. Environ. Microbiol. 27: 1053-1060.
- Walker, J.D., and Colwell, R.R. 1975. Factors affecting enumeration and isolation of Actinomycetes from Chesapeake bay and Southeastern Atlantic ocean sediments. Mar. Biol. 30: 193-201.
- Walker, J.D., and Colwell, R.R. 1976. Enumeration of petroleum-degrading microorganism. Appl. Environ. Microbiol. 31: 198-207.
- Ward, D.M., and Brock, T.D. 1976. Environmental factors influencing the rate of hydrocarbon oxidation in temperate lades. Appl. Environ. Microbiol. 31: 764-772.
- Wardley, J., and Smith, J. 1980. Source of oil pollution. Preventing of Oil Pollution. Washington DC, USA.
- Whyte, L.G., Bourbonniere, L., and Greer, C.W. 1997. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3719-3723.

- Widdel, F. 1988. Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria. In: Biology of Anaerobic Microorganisms. Zehnder (ed.). John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 469-585.
- Williams, D.L., Kriel, K.D., Stewart, G.A., Hulse, R.C., Holsomback, J.E., and Stewart, J.R. 1998. Bioremediation of oil-contaminated soils by stimulating indigenous microbes. Environ. Geosciences. 5: 1-8.
- Wilson, N.G., and Bradley, G. 1996. Enhanced degradation of petrol (Slovene diesel) in an aqueous system by immobilized *Pseudomonas fluorescens*. J. Appl. Bacteriol. 80: 99-104.
- Wilson, S.C., and Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbon in soil (PAHs) a review. Environ. Pollut. 84: 229-249.
- Wodzinsky, R.S., and LaRocca, D. 1977. Bacterial growth kinetics on diphenylmethane and naphthalene-heptamethylnonane. Appl. Environ. Microbiol. 33: 660-665.
- Wrenn, B.A., Haines, J.R., Venosa, A.D., Kadkhodaya, M., and Suidan, M.T. 1994. Effects of nitrogen source on crude oil biodegradation. J. Ind. Microbiol. 3: 279-286.
- Yamamoto, S., and Harayama, S. 1995. PCR Amplification and direction sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1104-1109.
- Zobell, C.E. 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriol. Rev. 10: 1-49.
- Zuofa, K., Loganathan, P., and Isirmah, N.O. 1988. Effects of crude oil applications to soil on the growth and yield of maize, okaro, and cassava in Nigeria. Oil Chem. Pollut. 4: 249-259.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

การเตรียมน้ำมันดิบ

น้ำมันดิบที่ใช้ในการทดลองผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง (Gelman Super-450) ขนาด $0.45\ \mu\text{m}$

1. อาหาร Bushnell-Haas (BH) (Difco)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษาการย่อยสลายของไฮโดรคาร์บอน โดยจุลินทรีย์ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้

แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.02	กรัม
โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0	กรัม
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรท	1.0	กรัม
เฟอร์ริกคลอไรด์	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121°C เป็นเวลา 15-20 นาที)

2. อาหารทริปโทเฟน (Tryptophan medium) ต่อ 100 มล.

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษาเรื่องการเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (dioxygenase enzyme) ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้

สารสกัดยีสต์	0.3	กรัม
ดีแอล-ทริปโทเฟน	0.5	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5	กรัม

ผงวุ้น	1.2	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121°C เป็นเวลา 15-20 นาที)

3. อาหารแข็งแอล-บี (LB-Agar)

สารสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
ทริปโตเนน	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	50.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

4. อาหารเหลวแอล-บี (LB-Broth)

สารสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
ทริปโตเนน	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	50.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

5. อาหารแข็งนิวเทรียนท์ (Nutrient Agar)

เนื้อสกัด	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตเนน	5.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

6. อาหารเหลวนิวเทรียนท์ (Nutrient Broth)

เนื้อสกัด	3.0	กรัม
-----------	-----	------

แบคโคเปปโตน	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ใส่หลอดขนาด 20.0 มล. หลอดละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

7. อาหารเลี้ยงเชื้อวี-พี (Voges-Proskaver Broth)

โปรติโอสเปปโตน	7.0	กรัม
กลูโคส	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 ใส่หลอดขนาด 20.0 มล. หลอดละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

8. อาหารเหลวฟีนอล เรด เบส (Phenol Red Broth Base)

โปรติโอสเปปโตน	10.0	กรัม
เนื้อสกัด	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ฟีนอลเรด	0.018	กรัม
น้ำตาล	1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)	
น้ำกลั่น	1000	มล.

น้ำตาลที่ใช้ได้แก่ ดี-กลูโคส ดี-ฟรุกโตส ดี-แมนนิทอล ดี-ไซโลสและ แอล-อะราบิโนส
ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 ใส่หลอดขนาด 20.0 มล. หลอดละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

9. อาหารอินโดลโปรดักชัน (Indole Production Medium)

ทริปโตน	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ใส่หลอดขนาด 20.0 มล. หลอดละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

10. อาหารแข็งสตาร์ช (Starch Agar)

แป้งมันฝรั่ง	1.0	กรัม
อาหารแข็งนิวเทรียนท์ (ภาคผนวกหมายเลข 3)	100	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

11. อาหารแข็งนิวเทรียนท์ เจลาติน (Nutrient Gelatin Agar)

อาหารแข็งนิวเทรียนท์ (ภาคผนวกหมายเลข 3)	100	มล.
เจลาติน	0.4	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

12. อาหารแข็งสกีมมิลค์ (Skim Milk Agar)

อาหารส่วนที่ 1

สกีมมิลค์พาวเดอร์ (Skim Milk Powder)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	50	มล.

อาหารส่วนที่ 2

วุ้นผง	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	50	มล.

อาหารส่วนที่ 1 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110⁰ซ อาหารส่วนที่ 2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121⁰ซ ที่ความดันและเวลามาตรฐาน เมื่ออุณหภูมิลดลงจนถึง 45⁰ซ จึงผสมอาหารทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน

13. อาหารกึ่งแข็ง (Semi-Solid Medium)

ทริปโตส	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	2.0	กรัม
วุ้นผง	1.0	กรัม
ไตรฟีนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์ (Triphenyl Tetrazolium Chloride)	20.0	มล.
น้ำกลั่น	180	มล.

หลอมอาหารให้เข้ากันแล้วจึงเติมไตรฟีนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์ (0.5% น้ำหนัก/ปริมาตร) 20.0 มล. หลอกละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

ภาคผนวก ข

สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายแกรมคริสตอลไวโอเลต (Gram's Crystal Violet Solution)

สารละลาย ก

คริสตอลไวโอเลต	2	กรัม
เอธานอล 95%	20	มล.

สารละลาย ข

แอมโมเนียมออกซาลेट	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มล.

ผสมสารละลาย ก และ ข ที่เตรียมไว้เข้าด้วยกัน เก็บในขวดสีชา

2. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's Iodine Solution)

ไอโอดีนคริสตอล	1.0	กรัม
โปแตสเซียมไอโอไดด์	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

3. สารละลายแกรมซาฟรานินไอ (Gram's Safranin Staining Solution)

ซาฟรานิน	0.25	กรัม
เอธานอล 95%	10	มล.
น้ำกลั่น	100	มล.

ละลายซาฟรานินในเอธานอล แล้วจึงเติมน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

4. สารละลายมอลาไคท์กรีน (Malachite Green Solution)

มอลาไคท์กรีน	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

5. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

สารละลายไฮโครเจนเปอร์ออกไซด์ (ที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์) น้ำกลั่น	10 90	มล. มล.
6. สารละลายวี-พี (VP Reagent)		
สารละลาย ก (สารละลาย 5% แอลฟาเนฟทอล)		
แอลฟาเนฟทอล (α -Naphthol)	5.0	กรัม
เอธานอลเข้มข้น 100%	100	มล.
ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา		
สารละลาย ข (สารละลาย 40% โปตัสเซียมไฮโครกไซด์)		
โปตัสเซียมไฮโครกไซด์	40.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.
ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา		
7. สารละลายโคแวก (Kovac's Solution)		
พาราไดเมทิลอะมีโนเบนซัลดีไฮด์ (p-Dimethylaminobenzaldehyde)	5.0	กรัม
เอมิลหรือบิวทิลแอลกอฮอล์ (Amyl or Butyl Alcohol)	75	มล.
กรดไฮโครคลอริกเข้มข้น	25	มล.
ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^o ซ		
8. สารละลายบัฟเฟอร์ TAE		
เตรียมที่ความเข้มข้น 5 เท่า		
ทริสมาเบส	24.2	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	5.71	มล.
0.5 โมลาร์ อีดีทีเอ pH 8.0	10	มล.
น้ำกลั่น	990	มล.
ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า		

9. สีดติดตาม (Tracking Dye)

เตรียมที่ความเข้มข้น 5 เท่า

ซูโครส	60%	
โบรโมไฟีนอลบลู	0.25%	
ทริสมาไฮโดรคลอไรด์ pH 8.0	100	มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	100	มิลลิโมลาร์
Na ₂ EDTA pH 8.0	0.5	มิลลิโมลาร์

10. Denaturation Buffer

โซเดียมไฮดรอกไซด์	20.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	87.75	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

11. Neutralization Buffer

โซเดียมคลอไรด์	1.5	โมลาร์
ทริสมาไฮโดรคลอไรด์ pH 7.2	0.5	โมลาร์
อีดีทีเอ	1	มิลลิโมลาร์

12. สารละลายบัฟเฟอร์ปฐมภูมิ

ยูเรีย	2	โมลาร์
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	1%	
โซเดียมฟอสเฟต pH 7.0	50	มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	150	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์	10	มิลลิโมลาร์
Blocking reagent	0.2%	

13. สารละลายบัฟเฟอร์ทุติยภูมิ

ทริสเบส	100	มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	200	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์	2	มิลลิโมลาร์

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 10.0

ภาคผนวก ก

การย้อมสีแกรม (Gram staining)

นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ เป็นเวลา 24 ชม. มากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ย้อมสีด้วยสารละลายแกรมคริสตอล ไวโอเล็ต (Gram 's crystal violet solution) ภาคผนวก ข. เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้งแล้วย้อมด้วย สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram 's iodine solution) ภาคผนวก ข. เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล เป็นเวลา 20 วินาที และน้ำกลั่น แล้วย้อมด้วยสารละลายแกรม ซาฟานิน โอ (Gram 's safranin staining solution) ภาคผนวก ข. เป็นเวลา 30 วินาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การวัดขนาดเซลล์

นำ ocular micrometer ใส่ลงในช่องเลนส์ตา จากนั้นนำเอา stage micrometer มาวางลงบนแท่นกล้อง ใช้หัวเลนส์กำลังขยายต่ำ (x10) ปรับให้เห็นขีดแบ่งบน stage micrometer หลังจากนั้นปรับให้ขีดบน ocular micrometer มาขนานกับขีดบน stage micrometer ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยายสูง (x100 , หัวน้ำมัน) ปรับโฟกัสให้ชัดพร้อมกับการเลื่อน stage กับ ocular micrometer ให้ซ้อนทับกันพอดี สังเกตดูว่าจำนวนช่องของ ocular micrometer ก็ช่องจึงเท่ากับ 1 ช่องของ stage micrometer (โดยที่ 1 ช่องของ stage micrometer เท่ากับ 10 ไมโครเมตร) แล้วนำเอา stage micrometer ออก ใส่สไลด์ที่ทำการย้อมสีด้วยสีไนโกรซิน (nigrosin) เข้ามาแทนที่ แล้ววัดขนาดคำนวณผลที่ได้เป็น ไมโครเมตร

การย้อมแคปซูล (Capsule 's staining)

นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ เป็นเวลา 48 ชม. มากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด โดยหยดสีคองโกเรด (congo red) ลงไป กระจายผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยด acid alcohol ลงบนสไลด์ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที เทสีทิ้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง ย้อมทับด้วย acid fuchsin ซ้ำทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที เทสีทิ้งโดยไม่ต้องล้างน้ำ เมื่อส

ไลค์แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า โดยเซลล์จะติดสีแดง ส่วนพื้น
ด้านหลัง (background) ติด สีน้ำเงิน ส่วนแคปซูลจะใสไม่ติดสี

การย้อมสีพาราสปอรัล – คริสตัล (parasporal – crystal)

นำแบคทีเรียอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มาเกลี่ยลงบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้ง (air dry)
แล้วผ่านเปลวไฟ (heat fix) พออุ่นๆ หยดสารละลายอะมิโดแบลค (amido black) ทิ้งไว้ประมาณ
2 นาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำมาหยดด้วยสารละลายซาฟรานิน โอ (safranin O) ใน
ขณะที่สไลด์ยังเปียกอยู่ ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำเย็น ปล่อยให้แห้งเอง แล้ว
นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า โดยที่คริสตัลจะติดสีน้ำเงินดำ ส่วน
สปอร์จะติดสีชมพูและเซลล์จะติดสีม่วงแดง

ภาคผนวก ง

น้ำมันดิบ (Tapis crude oil) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้มาจากโรงกลั่นน้ำมัน บางจาก, สุขุมวิทซอย 64 , ถ.สุขุมวิท , กรุงเทพฯ ซึ่งมีคุณสมบัติดังแสดงในตารางที่ 1
ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติบางประการของน้ำมันดิบ (Tapis crude oil)

คุณสมบัติบางประการ	ค่าที่ได้
ทางกายภาพ	
ค่าความถ่วงจำเพาะ (Gravity)	46.7 API
ค่าความหนืด (Viscosity) ที่ 30 °ซ	10.32 cSt
ทางเคมี	
ปริมาณซัลเฟอร์ (Sulfur content)	0.036 %wt
ปริมาณไนโตรเจน (Total Nitrogen content in total crude)	1914 ppm wt (Distillates) 8410 ppm wt (Residue)
ปริมาณฟอสฟอรัส(Phosphorus content)	ไม่มีข้อมูล
แอสฟัลทีน (Asphaltene)	0.17% โดยน้ำหนัก (wt)
ปริมาณน้ำ (Water content)	0.05% โดยน้ำหนัก (wt)
สัดส่วนของไฮโดรคาร์บอน (Assay yield on Crude Gas to C ₄) ได้แก่ Ethane, Propane, Isobutane, n-Butane	2.15% โดยน้ำหนัก (wt)
Light distillate to 149 °C	23.95% โดยน้ำหนัก (wt)
เคโรซีน (Kerosine) 149-232 °C	20.50% โดยน้ำหนัก (wt)
กาซน้ำมัน (Gas oil) 232-342 °C	28.25% โดยน้ำหนัก (wt)
ส่วนที่เหลือ (Residue) above 342 °C	25.15% โดยน้ำหนัก (wt)
สัดส่วนของไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon composition) ที่เป็นองค์ประกอบ	
พาราฟิน (Paraffins)	62.30% โดยน้ำหนัก (wt)
แนฟธาไลน์ (Naphthenes)	26.50% โดยน้ำหนัก (wt)
อะโรมาติก (Aromatics)	11.20% โดยน้ำหนัก (wt)
นอร์มอล-พาราฟิน (n-Paraffins)	25.50% โดยน้ำหนัก (wt)



การคำนวณหาปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ปริมาณของไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ที่ใช้ โดยคิดในรูปของเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ได้ฟีด ซึ่งพื้นที่ฟีดของไฮโดรคาร์บอนจะมีค่าเท่ากับ อัตราส่วนของผลรวมของพื้นที่ได้ฟีดของไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในโครมาโตแกรมกับค่าพื้นที่ฟีดของสารมาตรฐานในการสกัด (Internal standard) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยภาวะเดียวกัน ดังสมการข้างล่างนี้

สมการ 1

$$\text{พื้นที่ฟีดของไฮโดรคาร์บอน} = \frac{\text{ผลรวมของพื้นที่ฟีดไฮโดรคาร์บอน}}{\text{พื้นที่ของฟีดสารมาตรฐานในการสกัด}}$$

โดยที่ * พื้นที่ของฟีดสารมาตรฐานในการสกัด = พื้นที่ได้ฟีดของฟีด internal standard (ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ 1 - อีโคซิน)

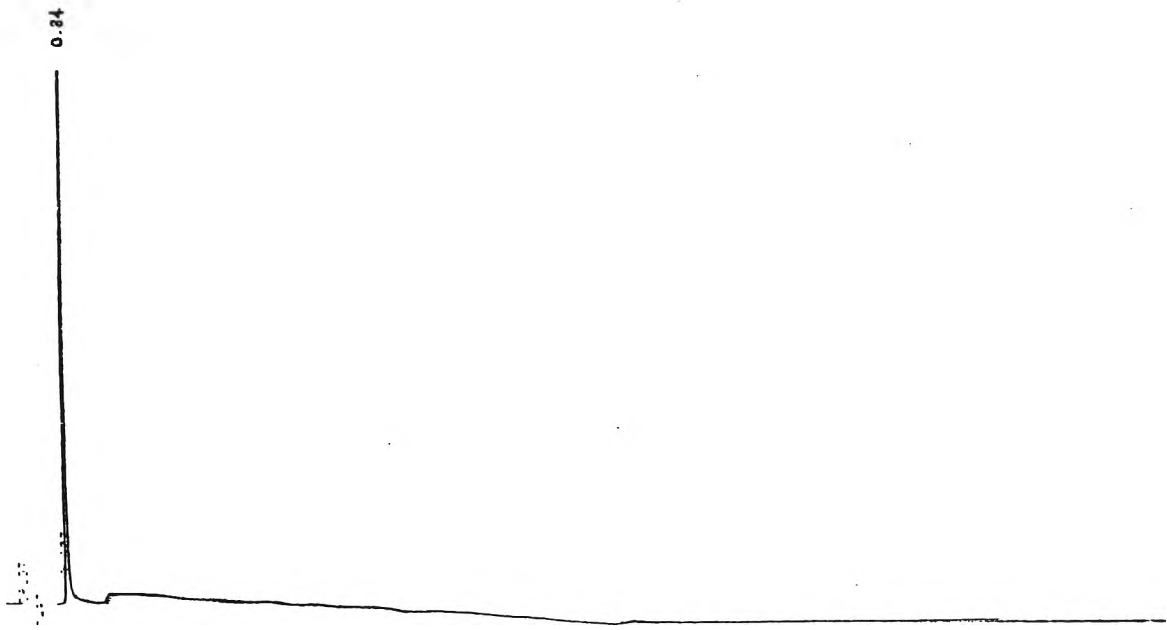
* ผลรวมของพื้นที่ฟีดไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำมันดิบที่นำมาคำนวณในสมการ 1 เป็นเปอร์เซ็นต์ของไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

* ผลรวมของพื้นที่ฟีดไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำมันดิบ = พื้นที่ทั้งหมดของโครมาโตแกรม - พื้นที่ทั้งหมดของสารประกอบที่ไม่เกี่ยวข้อง (สารประกอบที่ไม่เกี่ยวข้อง คือ ตัวทำละลาย, สารมาตรฐานในการสกัด และสารปนเปื้อนอื่นที่มีในตัวทำละลาย)

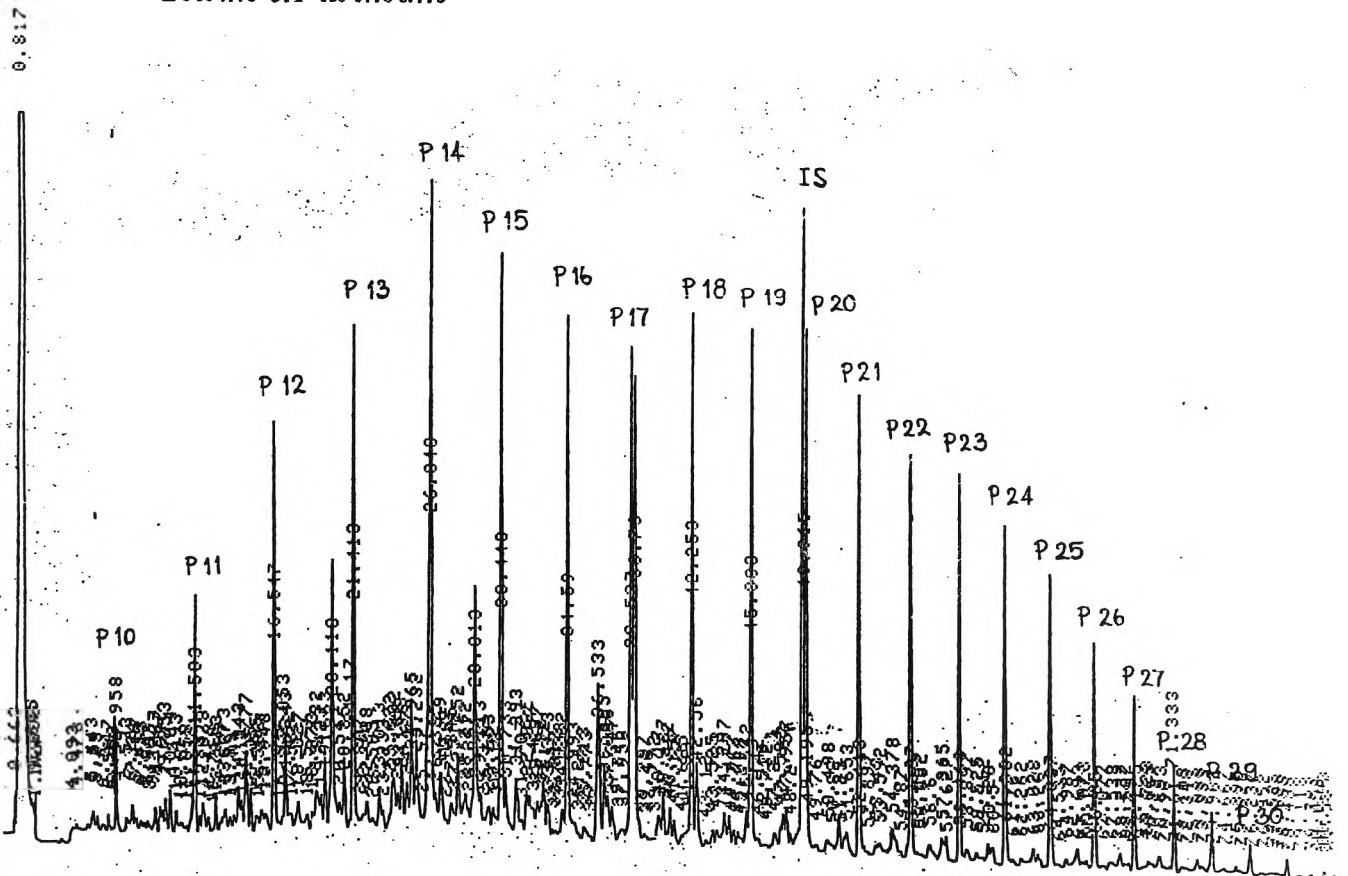
เปอร์เซ็นต์ของไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ คำนวณได้จากสมการ

สมการ 2

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไฮโดรคาร์บอนที่เหลือ} = \frac{\text{พื้นที่ของไฮโดรคาร์บอนที่เหลือ (สมการ 1.)} \times 100}{\text{พื้นที่ของไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดเฉลี่ยของชุดควบคุมวันที่ 0}} \\ \text{(ซึ่งไม่มีการเติมจุลินทรีย์ : Abiotic loss)}$$



รูปที่ 1 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีของเฮกเซน ซึ่งใช้เป็นตัวแทนละลาย ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีของ 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำมันดิบ Tapis ในการทดลองชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์

ตารางที่ 2 พื้นที่ได้ฟีดของไฮโดรคาร์บอนและองค์ประกอบต่างๆ ที่พบในน้ำมันดิบ Tapis 0.5 เปอร์เซ็นต์ในการทดลองหาคความคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์

ลำดับที่ของฟีด	เวลา (นาท)	พื้นที่ ($\mu\text{V}/\text{วินาที}^2$)	ลำดับที่ของฟีด	เวลา (นาท)	พื้นที่ ($\mu\text{V}/\text{วินาที}^2$)
1	0.663	348	25	14.04	471
2	0.817	4447702	26	14.343	1246
3	5.54	257	27	14.53	723
4	6.447	248	28	14.777	2133
5	6.958	1303	29	15.05	883
6	7.573	397	30	15.385	404
7	7.94	490	31	15.502	303
8	8.167	404	32	15.737	816
9	8.458	268	33	15.943	784
10	9.287	483	34	16.547	8929
11	9.547	448	35	16.837	240
12	9.67	417	36	17.053	398
13	9.853	745	37	17.243	2242
14	10.14	874	38	17.452	404
15	10.493	332	39	17.585	441
16	11.583	4972	40	18.027	1462
17	11.88	298	41	18.573	882
18	12.078	864	42	18.873	587
19	12.423	370	43	19.132	1846
20	12.913	790	44	19.423	970
21	13.227	247	45	19.663	1853
22	13.373	321	46	20.118	7780
23	13.52	536	47	20.547	1000
24	13.8	430	48	20.85	2060

ลำดับที่ของพืช	เวลา (นาที)	พื้นที่ ($\mu\text{V}/\text{วินาที}^2$)	ลำดับที่ของพืช	เวลา (นาที)	พื้นที่ ($\mu\text{V}/\text{วินาที}^2$)
49	21.17	293	76	31.393	2020
50	21.413	14420	77	31.707	439
51	22.01	215	78	32.025	1346
52	22.238	606	79	32.227	977
53	23.013	1022	80	32.427	819
54	23.233	385	81	32.677	1160
55	23.902	2495	82	32.92	869
56	24.138	1202	83	33.12	1476
57	24.38	1987	84	33.373	854
58	24.672	1566	85	34.262	890
59	24.965	3580	86	34.59	12147
60	25.232	3250	87	34.993	664
61	25.57	287	88	35.613	389
62	26.048	22875	89	36.533	5438
63	26.69	1265	90	36.885	1888
64	27.345	531	91	37.088	1295
65	27.752	2433	92	37.347	1137
66	28.212	1902	93	37.958	688
67	28.387	487	94	38.537	12042
68	28.813	7979	95	38.76	12545
69	29.113	934	96	39.297	251
70	29.332	401	97	40.17	1152
71	29.653	1198	98	40.437	1344
72	29.92	759	99	40.712	225
73	30.12	488	100	40.88	926
74	30.448	13949	101	41.157	631
75	30.733	1906	102	41.625	252

ลำดับที่ของทิศ	เวลา (นาที)	พื้นที่ ($\mu\text{V}/\text{วินาที}^2$)	ลำดับที่ของทิศ	เวลา (นาที)	พื้นที่ ($\mu\text{V}/\text{วินาที}^2$)
103	41.89	467	130	53.592	515
104	42.253	1644	131	54.378	1681
105	42.56	2586	132	55.507	9357
106	43.12	236	133	56.6	643
107	43.525	584	134	57.365	761
108	43.783	520	135	57.627	567
109	44.207	1457	136	58.468	8605
110	44.477	855	137	58.897	731
111	44.763	505	138	59.525	431
112	45.048	406	139	59.912	276
113	45.218	306	140	60.26	604
114	45.542	1057	141	60.5	613
115	45.803	11754	142	61.302	7742
116	46.142	396	143	62.262	230
117	47.2	651	144	63.028	770
118	47.592	432	145	63.28	450
119	47.767	970	146	64.037	6735
120	47.957	1008	147	64.987	298
121	48.2	339	148	65.693	906
122	48.965	15819	149	65.973	205
123	49.195	10972	150	66.65	5000
124	50.498	624	151	67.538	454
125	50.82	233	152	68.227	654
126	51.23	1251	153	68.507	249
127	51.653	1264	154	69.175	3867
128	52.413	10953	155	70.023	262
129	53.43	317	156	70.693	494

ลำดับที่ของพิก	เวลา (นาท)	พื้นที่ ($\mu\text{V}/\text{วินาที}^2$)	ลำดับที่ของพิก	เวลา (นาท)	พื้นที่ ($\mu\text{V}/\text{วินาที}^2$)
157	71.61	2246		รวม	4791954
158	72.103	229			
159	73.088	553			
160	73.333	257			
161	73.962	1479			
162	74.667	201			
163	76.237	731			
164	77.52	289			
165	78.438	370			
166	81.212	243			

ตารางที่ 3 พื้นที่ใต้พิกขององค์ประกอบที่พบในเฮกเซน ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร

ลำดับที่ของพิก	เวลา (นาท)	พื้นที่ ($\mu\text{V}/\text{วินาที}^2$)
1	0.84	4447702
	รวมทั้งหมด	4447702

ตัวอย่างการคำนวณ

พื้นที่ของไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด

$$= \frac{\text{พื้นที่ทั้งหมดในโครมาโตแกรม} - \text{พื้นที่ของสารปนเปื้อน} - \text{พื้นที่ของสารมาตรฐานในการสกัด}}{\text{พื้นที่ของสารมาตรฐานในการสกัด}}$$

เมื่อ พื้นที่ทั้งหมดในโครมาโตแกรม = 4791954

พื้นที่พิกของตัวทำละลาย = 4447702

พื้นที่ของสารปนเปื้อน = 0

(อาจเนื่องมาจากเฮกเซนที่ใช้เป็นแบบเกรดสำหรับการวิเคราะห์)

พื้นที่ของสารมาตรฐานในการสกัด = 15819

แทนที่ในสมการ พบว่า

พื้นที่ของไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด = 20.76

ภาคผนวก จ

ตารางที่ 4.15 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น

ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือจากการย่อยสลายของเชื้อผสม (%)				
	0 วัน	1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
ค่าความเป็นกรดต่าง 4.0	100	56.9	45.3	33.8	25.7
ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0	100	30.6	21.2	19.8	15.1
ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0	100	28.2	20.0	12.8	11.43

ตารางที่ 4.16 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น

อุณหภูมิที่ใช้ทดลองในการเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือจากการย่อยสลายของเชื้อผสม (%)				
	0 วัน	1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
อุณหภูมิ 20 °ซ	100	27.5	18.9	14.6	10.2
อุณหภูมิ 30 °ซ	100	28.2	20.0	12.8	11.4
อุณหภูมิ 40 °ซ	100	48.7	26.5	21.0	18.1

ตารางที่ 4.17 ผลของความเร็วยรอบการเขย่าที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น

ความเร็วยรอบ การเขย่าที่ใช้ใน การเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือจากการย่อยสลายของเชื้อผสม (%)				
	0 วัน	1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
ความเร็วยรอบ 100 รอบต่อนาที	100	34.6	29.1	25.8	22.4
ความเร็วยรอบ 200 รอบต่อนาที	100	27.51	18.9	14.6	10.2
ความเร็วยรอบ 250 รอบต่อนาที	100	26.0	17.5	12.4	9.8

ตารางที่ 4.18 ผลของอัตราที่เหมาะสมระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น

อัตราส่วนที่ใช้ ในการเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณของน้ำมันดิบที่เหลือจากการย่อยสลายของเชื้อผสม (%)				
	0 วัน	1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
อัตราส่วน 0 : 1	100	26.0	17.5	12.4	9.8
อัตราส่วน 1 : 1	100	20.8	9.9	9.8	9.6
อัตราส่วน 2 : 1	100	21.8	10.0	9.7	9.6
อัตราส่วน 4 : 1	100	20.5	9.7	9.6	9.5



ประวัติผู้เขียน

นายปัญญาพล ชีโนคม เกิดวันที่ 6 กรกฎาคม พ.ศ.2518 ที่อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานทางวิชาการที่เข้าร่วมประชุม

The 10th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and The 1998 Annual Meeting of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology for a Self-Sufficient Economy , ระหว่างวันที่ 25 – 27 พฤศจิกายน 2541 ณ โรงแรมโซลทวิน กรุงเทพฯ