

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ปราณี พันธุมสินชัย. 2539. **มลพิษอุตสาหกรรมเบื้องต้น**. สมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.
- พงษ์เทพ บวรธรรม. 2545. **การกำจัดน้ำกากส่าโดยยีสต์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พิมพ์ชนก เต็งเจริญ. 2544. **การกำจัดสีในน้ำทิ้งของโรงงานผลิตลิกนินโดยราไต้หวัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มาลี วิศวจารย์. 2530. **การใช้ประโยชน์จากน้ำกากส่าโรงงานสุราในการผลิตก๊าซชีวภาพ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สันต์ ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2528. **การคัดเลือกเชื้อราเพื่อใช้ในการฟอกสีของน้ำกากส่า**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Bapiraju, K.V.V.S.N., Sujatha, P., Ellaiah, P. and Ramana, T. 2004. Mutation induced enhanced biosynthesis of lipase. *African Journal Biotechnology*. 3: 618-621.
- Benito, G.G., Miranda M.P. and Santos D.R. 1997. Decolorization of wastewater from an alcoholic fermentation process with *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*. 61: 33-37.
- Dahiya, J., Singh, D. and Nigam, P. 2001. Decolorization of synthetic and spentwash melaniodin using the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* JAG-40. *Bioresource Technology*. 78:95-98.
- Hag, I.U., Javed, s. and Ashraf, H. 2002. Production of amyloglucosidase by UV Irradiated strain of *Aspergillus niger*. *Biotechnology*. 1:34-39.
- Kuhad R.C. Kumar, M. and Singh A. 1994. A hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Letters in Applied Microbiology*. 19: 397-400.
- Kumar, V., Wati, L., Nigam, P., Banat I.M., Yadav, B.S., Simgh, D. and Merchant R. 1998. Decolorization and biodegradation of anaerobic digested sugarcane molasses

- spent wash effluent from biomethanation plant by white-rot fungi. *Process Biochemistry*. 33: 83-88.
- Li, S. and Chang, S.T. 1991. Selection and characterization of crystal-violet- and malachite-green-resistant mutant in *Volvariella volcae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 7: 541-550.
- Lin C.F. and Iizuka H. 1982. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*. 43: 671-676.
- Migo, V.P., Matsumura, M., Rosario, E.J.D. and Kataoka, H. 1993. Decolorization of molasses wastewater using an inorganic flocculant. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 75:438-442.
- Miranda M.P., Benito, G.G., Cristobal, N.S. and Nieto, C.H. 1996. Color elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 57: 229-235.
- Miyata, N., Mori, T., Iwahori, K. and Fugita, M. 2000. Microbial decolorization of Melanoidin-containing wastewater combined use of activated sludge and the fungus *Coriolus hirsutus*. *Journal and Bioscience and Bioengineering*. 89: 145-150.
- Miura, M., Deguchi, T., Matsubara, M. and Kakezawa, M. 1997. Isolation of Manganese peroxidase-producing mutants of the hyper-lignolytic fungus IZU-154 under nitrogen nonlimiting conditions. *Journal of fermentation and bioengineering*. 83: 191-193
- Pena, M., Coca, M., Gonzalez, G., Rioja, R. and Garcia, M.T. 2003. Chemical oxidation of wastewater from molasses fermentation with ozone. *Chemosphere*. 51:893-900.
- Raghumar, C., Mohandass, C., Kamat, S. and Shailaja M.S. 2004. Simultaneous detoxification and decolorization of molasses spent wash by the immobilized white-rot fungus *Flavodon flavas* isolated from a marine habitat. *Enzyme and Microbial Technology*. 35: 197-202.
- Sirianuntapiboon, S., Phothilangka, P. and Ohmomo, S. 2004 Decolorization of molasses wastewater by a strain No.BP103 of acetogenic bacteria. *Bioresource*

Technology. 92: 31-39.

Sirianuntapiboon, S., Zohsalam, P. and Ohmomo, S. 2003. Decolorization of molasses wastewater by *Citeromyces* sp. WR-43-6. *Process Biochemistry*. 39:917-924.

Zhou, Z., Miwa, M. & Hogetsu T. (1999). Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytologist*. 144: 55-63



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Rose Bengal Agar

Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
KH ₂ PO ₄	1	กรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	กรัม
Rose Bengal	0.025	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดยกเว้น Agar ลงในน้ำกลั่น และปรับ pH เป็น 5.6 ปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Agar แล้วนำไปต้มให้เดือดด้วยไมโครเวฟ แล้วบรรจุใส่ขวด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

2. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่ง แล้วหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด 1×1×1 เซนติเมตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำกลั่น ให้มันฝรั่งนิ่ม แล้วกรอกมันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นเติม Dextrose แล้วคนให้ละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร จากนั้นเติม Agar แล้วต้มให้เดือดอีกครั้ง บรรจุใส่ขวดรูปชมพู่ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ

3. Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่ง แล้วหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋ายาวขนาด 1×1×1 เซนติเมตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำกลั่น ให้มันฝรั่งนิ่ม แล้วกรองมันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นเติม Dextrose แล้วคนให้ละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร บรรจุใส่ขวดรูปชมพู่ขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ

4. อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อราที่มีน้ำกากสำเป็นองค์ประกอบ 10% (MoA)

Malt extract	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกากสำสดที่ผ่านการกรองและตกตะกอนแล้ว	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

น้ำกากสำสดที่เก็บตัวอย่างจากโรงงานแสงโสม จ. นครปฐม นำตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 93 จากนั้นนำน้ำกากสำ 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร จากนั้นละลาย Malt extract ในสารละลายน้ำกากสำ แล้วเติม Agar จากนั้นนำไปอุ่นให้เดือดด้วยเครื่องไมโครเวฟ เพื่อให้ผงวุ้นละลายเข้ากัน จากนั้นบรรจุใส่ขวดรูปชมพู่ขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ

5. อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อราที่มีน้ำกากส่าเป็นองค์ประกอบ 10% (MoB)

Malt extract	20	กรัม
น้ำกากส่าสดที่ผ่านการกรองและตกตะกอนแล้ว	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

น้ำกากส่าสดที่ผ่านการกรองและตกตะกอนแล้ว 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร จากนั้นละลาย Malt extract ในสารละลายน้ำกากส่า นำบรรจุใส่ขวดรูปชมพู่ขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ

6. อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อราที่มีน้ำกากส่าเป็นองค์ประกอบ ตามสูตรของ Miyata และคณะ (2000)

Glucose	1	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10	มิลลิกรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1	มิลลิกรัม
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	1	มิลลิกรัม
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1	มิลลิกรัม
น้ำกากส่าสดที่ผ่านการกรองและตกตะกอนแล้ว	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

น้ำกาสดำสดที่ผ่านการกรองและตกตะกอนแล้ว 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร จากนั้นละลายสารทุกชนิดลงในสารละลายน้ำกาสดำ จากนั้นนำไปบรรจุใส่ขวดรูปชมพู่ขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ

7. Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติมสารยับยั้งการเจริญ มาลาไซท์กรีน หรือคีโตโคนาโซล

ผง Potato Dextrose Agar สำเร็จรูป	39	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
มาลาไซท์กรีน ความเข้มข้น	1	กรัมต่อมิลลิลิตร หรือ
คีโตโคนาโซล ความเข้มข้น	1	กรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง PDA สำเร็จในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วนำไปต้มจนเดือด ด้วยเครื่องไมโครเวฟ นำไปบรรจุใส่ขวดรูปชมพู่ขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ ก่อนนำอาหารไปเทในจานเพาะเชื้อ เติมสารยับยั้งอย่างใดอย่างหนึ่งตามความเข้มข้นที่ต้องการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. 0.1M Sodium Acetate Buffer pH5.0

CH_3COONa	4.1	กรัม
---------------------------	-----	------

Glacial Acetic Acid	300	มิลลิลิตร
---------------------	-----	-----------

ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วย 1M Acetic Acid หรือ NaOH ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

2. 0.2 M Citric Buffer pH 5.0

Citric acid	4.2	กรัม
-------------	-----	------

ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วย 0.1 M Na_2HPO_4 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

3. 1 M Tris -HCl

Tris-base	121	กรัม
-----------	-----	------

ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH 8.0 ด้วย HCl ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร

4. 0.5 M EDTA

EDTA	186.1	กรัม
------	-------	------

ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH 8.0 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร

5. Washing buffer

PVP	2.0	กรัม
Ascorbic acid	1.76	กรัม
Tris-HCl (pH 8.0)	20	ml of 1M stocking solution
2-mercaptoethanol	4.0	ml

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร

6. 2X CTAB

CTAB	4.0	กรัม
Tris-HCl (pH 8.0)	20	ml of 1 M stocking solution
EDTA (pH 8.0)	8	ml of 0.5 M Stocking solution
NaCl	16.36	กรัม
Mercaptoethanol	1	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร

7. Chloroform/isoamyl alcohol (24:1, v/v)

Choroform	192	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร

8. 20% Polyethylene glycol

Polyethylene glycol	20	กรัม
NaCl	14.6	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร

9. TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)	10	มิลลิลิตร
1 mM EDTA (pH 8.0)	2	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร

10. 5X TBE buffer

Tris-base	54.0	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 M EDTA	40.0	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร

11. 1.5% Agarose

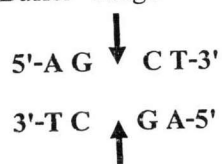
Agarose	3.0	กรัม
0.5 TBE buffer	200	มิลลิลิตร

ให้ความร้อนด้วยการเข้าไมโครเวฟ จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติม ethidium bromide 7 ไมโครลิตร

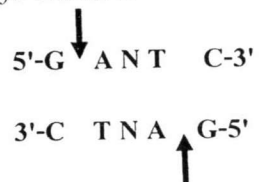
12. เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Fermentus)

เอนไซม์ตัดจำเพาะมีตำแหน่งที่จดจำ ดังต่อไปนี้

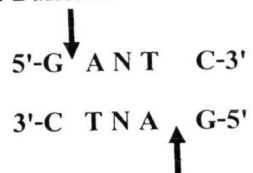
AluI: Buffer Tango



*Hinf*I: Buffer R



*Mbo*I: Buffer R



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ตารางทางสถิติ

ตารางที่ 4 อัตราการอยู่รอดของเชื้อ CM5 เมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต

เวลาที่ฉายรังสี (วินาที)	จำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตเฉลี่ย (โคโลนี)	อัตราการอยู่รอด (เปอร์เซ็นต์)
0	72.60±12.05	100
1	57.85±4.00	57.85
3	30.30±5.83	30.30
5	1.38±0.70	1.38
10	0.55±0.45	0.55
15	0.2 ±0.89	0.28
20	0	0.00

ตารางที่ 5 ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของเชื้อรามิวแทนต์ UV1 - UV8

ชนิดของเชื้อรา	ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่า	
	วันที่ 4	วันที่ 8
CM5	10.24 ±8.89	31.42 ±19.24
UV1	15.09 ±2.04	23.02 ±6.92
UV2	20.37 ±4.08	48.30 ±8.99
UV3	19.88 ±5.73	33.96 ±6.67
UV4	13.66 ±2.37	23.77 ±11.46
UV5	17.97 ±7.21	25.71 ±6.45
UV6	7.06 ±9.50	30.48 ±8.45
UV7	12.28 ±2.91	16.61 ±7.66
UV8	0.47 ±6.66	0.00 ±0

ตารางที่ 6 อัตราการย่อยของ UV2 มิวแทนต์ เมื่อได้รับสาร MNNG

ความเข้มข้นของ MNNG (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	จำนวนโคโลนีที่รอดชีวิต เฉลี่ย (โคโลนี)	อัตราการย่อย (เปอร์เซ็นต์)
0	88.20±12.5	100
0.0003	27.60±3.85	31.29
0.0030	23.36±4.56	23.36
0.0300	15.87±0.20	15.87
0.3000	3.63±0.54	3.63
3.0000	0	0.00

ตารางที่ 7 ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของ UV2-NG1 ถึง UV2-NG16

มิวแทนต์

ชนิดของเชื้อรา	ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่า	
	วันที่ 4	วันที่ 8
CM5	33.90±20.44	45.39±16.88
UV2	38.62±4.24	48.10±3.24
UV2-NG1	17.82±14.14	28.51±1.64
UV2-NG2	10.31±10.62	35.85±4.30
UV2-NG3	42.57±9.44	32.82±8.75
UV2-NG4	30.26±0.66	28.02±7.17
UV2-NG5	11.30±6.61	26.32±12.37
UV2-NG6	10.55±5.42	34.09±3.33
UV2-NG7	20.15±4.07	38.66±2.04
UV2-NG8	30.69±8.64	22.62±8.87
UV2-NG9	36.07±5.45	22.62±9.14
UV2-NG10	40.47±13.54	84.15±10.29
UV2-NG11	38.42± 2.20	14.93±12.74
UV2-NG12	38.68±0.90	12.63±3.85
UV2-NG13	33.08±2.33	66.19±8.34
UV2-NG14	5.56±3.43	71.36±7.65
UV2-NG15	14.12±2.98	40.51±4.47
UV2-NG16	10.35±8.17	72.38±6.16

ตารางที่ 11 การเติบโตของรา CM5 บนอาหาร PDA ที่เติมคีโตโคนาโซลความเข้มข้น
ต่างๆ

ความเข้มข้นของ คีโตโคนาโซล (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ (ซม.)					อัตราการ เติบโตใน วันที่ 7 (%)
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 7	
0.00	0.90	1.84±0.51	4.04±0.54	6.94±0.45	8.01±0.85	100
0.03	0.90	0.90	0.90	2.25±0.25	1.75±0.85	11.95
0.06	0.90	0.90	0.90	1.05±0.48	1.65±0.24	10.55
0.09	0.90	0.90	0.90	1.32±0.52	1.54±0.21	8.98
0.12	0.90	0.90	0.90	1.18±0.21	1.22±0.19	4.48
0.15	0.90	0.90	0.90	0.97±0.10	1.12±0.21	3.08
0.18	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.00
0.21	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.00

ตารางที่ 12 การเติบโตของเชื้อราไวต์ไทป์และมิวแทนต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมมาลา
ไซต์กรีน

ความเข้มข้นของ มาลาไซต์กรีน (มล./มก.)	อัตราการเจริญเติบโต (เปอร์เซ็นต์)		
	CM5	UV2	UV2-NG10
0	100.00	100.00	100.00
0.001	66.34	54.77	83.01
0.005	59.50	47.66	68.90
0.010	46.10	37.96	58.37
0.030	0.00	5.65	55.26
0.060	0.00	0.00	44.98
0.090	0.00	0.00	38.28
0.120	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ 13 การเติบโตของเชื้อราไวค้ำไทป์และมิวแทนต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม คีโตโคนาโซล

ความเข้มข้นของ คีโตโคนาโซล (มล./มก.)	อัตราการเจริญเติบโต (เปอร์เซ็นต์)		
	CM5	UV2	UV2-NG10
0	100.00	100.00	100.00
0.03	11.95	13.22	40.67
0.06	10.55	0.00	0.00
0.09	8.98	0.00	0.00
0.12	4.48	0.00	0.00
0.15	3.08	0.00	0.00
0.18	0.00	0.00	0.00
0.21	0.00	0.00	0.00

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวณัญญา สมจิตร เกิดเมื่อวันที่ 5 มีนาคม พ.ศ. 2523 ที่อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี จากภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ เมื่อปีพ.ศ. 2545 จากนั้นศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยโดยระหว่างที่ทำการศึกษาอยู่นั้น ได้รับทุนผู้ช่วยสอนจากบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2547 และได้เสนอผลงานภาคโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการนานาชาติเรื่อง ราววิทยาแห่ง เอเชียแปซิฟิกครั้งที่ 4 และการประชุมนานาชาติราน้ำจืดและรน้ำเค็มครั้งที่ 9 ระหว่างวันที่ 14-19 พฤษภาคม 2547 ณ โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว จ. เชียงใหม่ และในงานประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 14 ประจำปี 2548 ระหว่างวันที่ 11-13 มีนาคม 2548 ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย