

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จิรทีปณ์ แสนรัก. 2547. การย่อยสลายไพรีนและสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นโดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ทิมากร แสงดำ. 2547. การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกาะติดและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นารินทร์ เจริญช่าง. 2544. การใช้วัสดุจากการเกษตรเร่งการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วรัชยา สุนทรสารทูล. 2542. ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดนก พันธุ์พืช และการจัดการสวนสาธารณะเขตกรุงเทพมหานคร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิธัญญา ชวเจริญพันธ์. 2549. การสร้างกล้าเชื้อในวัสดุพาหะเพื่อเสริมการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินที่ปนเปื้อนไพรีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุพินดา ศิริวรศิลป์. 2545. การใช้ใบพืชตระกูลถั่วและพารามิเตอร์บางประการในการเสริมการย่อยสลายไพรีนในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักจัดการกากของเสียและสารอันตราย กรมควบคุมมลพิษ. 2547. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการของสารเคมีเฉพาะเรื่องพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน. กรุงเทพมหานคร : หจก. ไอเดีย สแควร์.

ภาษาอังกฤษ

- Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M.A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., Colombo, M., and Gianfreda, L. 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. Chemosphere. 57: 401-412.
- Aronstein, B.N., Calvillo, Y.M., and Alexander, M. 1991. Effects of surfactant at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. Environ. Sci. Technol. 25: 1728-1731.
- Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidan, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. 1999. Current Protocols in Molecular Biology. 4th ed. John Wiley & Sons, New York.
- Bauer, J.E., and Capone, D.G. 1985. Degradation and mineralisation of the polycyclic aromatic hydrocarbons anthracene and naphthalene in intertidal marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 50: 81-90.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Dizer, H., and Hansen, P.D. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. Marine Environ. Res. 47: 17-47.
- Blumer, M. 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. Scientific American. 234: 34-45.
- Bosma, T.N.P., Middeldorp, P.J.M., Schraa, G., and Zender, A.J.B. 1997. Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. Environ. Sci. Technol. 31: 248-252.
- Bouchez, M., Blanchet, D., and Bardin, V. 1999. Efficiency of defined strains and of soil consortium in the biodegradation of PAH mixtures. Biodegradation. 10: 429-435.
- Bouchez, M., Blanchet, D., and Vandecasteele, J.P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 154-156.
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.

- Chang, B.V., Shiung, L.C., and Yuan, S.Y. 2002. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. Chemosphere. 48: 717-724.
- Charoenchang, N., Pinphanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S. and Juntongjin, K. 2003. Utilization of agricultural materials to enhance microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. J. Sci. Res. Chula. Univ. 28(Special Issue I): 1-13.
- Chin, Y.P., Aiken, G.R., and Danielsen, K.M. 1997. Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromaticity. Environ. Sci. Technol. 1630-1635.
- Coates, J.D., Anderson, R.T., Lovley, D.R. 1996a. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1099-1101.
- Coates, J.D., Anderson, R.T., Woodward, J.C., Phillip, E.J.P., Lovley, D.R. 1996b. Anaerobic hydrocarbon degradation in petroleum-contaminated harbor sediments under sulfate-reducing and artificially imposed iron-reducing conditions. Environ. Sci. Tech. 30: 2784-2789.
- Dangrueng, P. 2005. Survival and PAHs degradative ability of *Sphingomonas* sp.strain P2 in PAHs contaminated soil after soil acclimatization. Master thesis. Environmental Management Program. Chulalongkorn University, Bangkok.
- Dick, R.P., Breakwell, D.P., and Turco, R.F. 1996. Soil enzyme activities and biodiversity measurement as integrative microbiological indicators. In: Doran, J. W., Jones, A. J.(Eds.), Methods for Assessing Soil Quality. SSSA Special Publication. No. 49. Madison WI, USA, pp. 247-272.
- Geiselbrecht, A.D., Hedlund, B.P., Tichi, M.A., and Stanley, J.T. 1998. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the Gulf of Mexico and comparison other PAH degradation ability with that of Puget Sound *Cycloclasticus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4703-4710.
- Grosser, R.J., Friedrich, M., Ward, D.M., and Inskeep, W.M. 2000. Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: different enrichment conditions influence

- bioavailability and selection of phenanthrene-degrading isolates. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2695-2702.
- Grosser, R.J., Warshewsky, D., and Vestal, J.R. 1991. Indigenous and enhanced mineralisation of pyrene, benzo[a]pyrene and carbazole in soils. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3462-3469.
- Guerin, T.F. 1999. Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using *ex-situ* land treatment. J. Hazard. Mater. 65: 305-315.
- Guerin, T.F. 2000. The differential removal of aged PAHs from soil during bioremediation. Environ. Sci. Poll. Res. 7: 19-26.
- Guo, C.L., Zhou, H.W., Wong, Y.S., and Tam, N.F.Y. 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. Marine Pollutant Bulletin. 51: 1054-1061.
- Haderlein, A., Legros, R., and Ramsay, B. 2001. Enhancing pyrene mineralization in contaminated soil by the addition of humic acids or composted contaminated soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 555-559.
- Haigh, S.D. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. Sci. Total Environ. 185: 161-170.
- Harayama, S. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. Curr. Opin. Biotechnol. 8: 268-273.
- Harms, H., and Bosma, T.N.P. 1997. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. J. Indust. Microbiol. 18: 97-105.
- Heitkamp, M.A., and Cerniglia, C.E. 1987. Effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 6: 35-46.
- Heitkamp, M.A., Freeman, J., and Cerniglia, C.E. 1987. Naphthalene biodegradation in environmental microcosm: estimates of degradation rates and characterisation of metabolites. Appl. Environ. Microbiol. 53: 129-136.

- Heitkamp, M.A., and Cerniglia, C.E. 1988. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1612-1614.
- Hupe, K., Luth, J.C., Heerenklage, J., and Stegmann, R. 1996. Enhancement of the biological degradation of soils contaminated with oil by the addition of compost. Acta. Biotechnol. 16: 19-30
- Hwang, S., and Cutright, T. J. 2002. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. Chemosphere. 47: 891-899.
- IARC (International agency for research on cancer). 1983. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 32: 431-445.
- Jacques, J.S.R., Okeke, C.B., Bento, M.F., Teixeira, S.A., Peralba, C.R.M., and Camargo, A.O.F. 2007. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Bioresource Technology. (In press).
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., and Harms, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environ. Pollut. 133: 71-84.
- Jones, K.C., Stratford, J.A., Waterhouse, K.S., and Vogt, N.B. 1989. Organic contaminants in welsh soils : polynuclear aromatic hydrocarbons. Environ. Sci. Technol. 23: 540-550.
- Juhasz, A.L., and Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. International Biodeterioration & Biodegradation. 45: 57-88.
- Kastner, M., Streibich, S., Beyrer, M., Richnow, H.H., and Fretschke, W. 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of (¹⁴C) anthracene in soil. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1834-1842.
- Kastner, M., and Mahro, B. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 668-675.
- Kawai, M., Matsutera, E., Kanda, H., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M. 2002. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in

- pharmaceutical manufacturing process by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 68: 699-700.
- Komukai-Nakamura, S., Sugiura, K., and Yamauchi-Inomata, Y. 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.
- Lee, S. 1995. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. US Patent 5,427,944.
- Luan, L.G., Yu, S.H.K., Zhong, Y., Zhou, H.W., Lan, C.Y., and Tam, F.Y.N. 2006. Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. Chemosphere. 65: 2289-2296.
- Luthy, R. G. 1997. Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. Environ. Sci. Technol. 31: 3341-3347.
- Madsen, T., and Kristensen, P. 1997. Effects of bacterial inoculation and nonionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. chem. 16: 631-637.
- Mahro, B. 2000. Bioavailability of contaminants. In: H.J. Rehm, G. Reed, A. Puhler and P. Stadler, Editors. Biotechnology. (Wiley-VCH, Weinheim). 11: 61-88.
- Martens, R. 1982. Concentrations and microbial mineralization of four to six ring polycyclic aromatic hydrocarbons in composted municipal waste. Chemosphere. 11: 761-770.
- Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L., and Varanasi, U. 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 143: 79-165.
- Megharaj, M., Wittich, R.M., Blasco, R., Pieper, D.H., and Timmis, K.N. 1997. Superior

- survival and degradation of dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran in soil by soil-adapted *Sphingomonas* sp. strain RW1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 109-114.
- Molina, M., Araujo, R., and Hodson, R.E. 1999. Cross-induction of pyrene and phenanthrene in a *Mycobacterium* sp. isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated river sediments. Can. J. Microbiol. 45: 520-529.
- Mueller, J.G., Chapman, P.J., and Pritchard, P.H. 1989. Action of fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3085-3090.
- Nakatsu, C.H., Torsvik, V., and Ovreås, L. 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. Soil. Sci. Soc. AM. J. 64: 1382-1388.
- 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.
- Ogram, A.V., Jessup, R.E., Ou, L.T., and Rao, P.S.C. 1985. Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-Dichlorophenoxy) acetic acid in soils. Appl. Environ. Microbiol. 49: 582-587.
- Pattanasupong, A., Nagase, H., Sugimoto, E., Hori, Y., Hirata, K., Tani, K., Nasu, M., and Miyamoto, K. 2004. Degradation of carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by immobilized consortium on loofa sponge. J. Biosci. Bioeng. 98(1): 28-33.
- Pignatello, J.J. and Xing, B. 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. Environ. Sci. Technol. 30: 1-11.
- Rhee, S.-K., Lee, G.M., and Lee, S.-T. 1996. Influence of a supplementary carbon source on biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pimelobacter* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 816-822.
- Rijnaarts, H.H.M., Bachmann, A., Jumelet, J. C., and Zehnder, A. J. B. 1990. Effect of desorption and intraparticle mass-transfer on the aerobic biomineralization of alpha-hexachlorocyclohexane in a contaminate calcareous soil. Environ. Sci. Technol. 24: 1349-1354.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3rd edition. Cold spring harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.



- Šašek, V., Bhatt, M., Cajthaml, K., and Lednická, D. 2003. Compost-mediated removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 44: 336-342.
- Scelza, R., Rao, M.A., Gianfreda, L. 2007. Effects of compost and of bacterial cells on the decontamination and the chemical and biological properties of an agricultural soil artificially contaminated with phenanthrene. Soil Biology and Biochemistry. 39: 1303–1317.
- Sei, K., Asono, K., Tateishi, N., Mori, K., Ike, M., Kohno, T., and Fujita, M. 2000. Development of simple methods of DNA extraction from environmental samples for monitoring microbial community based on PCR. Japanese Journal of Water Treatment Biology. 36: 193-204.
- Sei, K., Inoue, D., Wada, K., Mori, K., Ike, M., Kohno, T., and Fujita, M. 2004. Monitoring behaviour of catabolic genes and change of microbial community structures in seawater microcosms during aromatic compound degradation. Water Res. 38: 4405-4414.
- Semple, K.T., Reid, B.J., and Fermor, T.R. 2001. Review of composting strategies to treat organic pollutants in contaminated soils. Environ. Pollut. 112: 269-283.
- Sims, J.L., Sims, R.C., and Matthews, J.E. 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil. Hazardous Waste and Hazardous Materials. 7: 117-149.
- Siriwarasin, S., Pattaragulwanit, K., Pinpanichakarn, P., Thaniyavarn, S., and Juntongjin, K. 2002. Utilization of leguminous leaves for enhancing polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in soil. Abstract: The 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology: Biotechnology for Better Living in the New Economy. November 12-15, 2002. Khon Kaen, Thailand. P89.
- Simonoich, S.L., and Hites, R.A. 1994. Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ. Sci. Technol. 28: 939-943.
- Supaka, N., Pinphanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., Omori, T., and Juntongjin, K. 2001. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading

- Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade fluoranthene and pyrene via cometabolism. Science Asia. 27: 21-28.
- Tomas, J.M., Lee, M.D., Scott, M.J., and Ward, C.H. 1989. Microbial ecology of the subsurface at an abandoned creosote waste site. J. Indust. Microbiol. 4: 109-120.
- Trejo-Hernandez, M.R., Ortiz, A., Okoh, A.I., Morales, D., and Quintero R. 2007. Biodegradation of heavy crude oil Maya using spent compost and sugar cane bagasse wastes. Chemosphere. 68: 848-855.
- Trejo, M.R., and Quintero, R. 2000. Bioremediation of contaminated soil. In J. O. Eugenia, S. Gloria, and H. Elizabeth (eds), pp. 179-189. Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocess. London: Tayler and Francis Limited.
- Trzesicka – Mlynarz, D.T. and Ward, O.P. 1996. Degradation of fluoranthene in a soil matrix by indigenous and introduced bacteria. Biotechnol Lett. 18: 181-186.
- Van Veen, J.A., Van Overbeek, L.S., and Van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. Microbiol.Mol. Boil. Rev. 61: 121-135.
- Verstraete, W., and Devliegher, W. 1996. Formation of non-bioavailable organic residues in soil : Perspectives for site remediation. Biodegradation. 7: 471-485.
- Volkering, F., Breure, A.M., Sterkenburg, A., and van Andel, J.G. 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 548-552.
- Volkering, F., Breure, A.M., and van Andel, J.G. 1993. Effect of microorganisms on the bioavailability and biodegradation of crystalline naphthalene. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 535-540.
- Watanabe, K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. Curr. Opin. Biotechnol. 12: 2637-2641.
- Weissenfels, W.D., Klewer, H.-J., and Langhoff, J. 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particle: Influence on biodegradability and biotoxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 686-696.
- Wilson, S.C., and Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs), A review. Environ. Pollut. 81: 229-249.

Yan, J., Wang, L., Fu, P.P., and Yu, H. 2004. Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. Mutat. Res. 557: 99-108.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

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

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ละลายก้อน (Bacto Agar) 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

ก.

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม

ข.

แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
เฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม

แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

0.005 กรัม

ละลายสารส่วน ก. ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ในส่วนของสารละลายส่วน ข. ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดแล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมครอนเมตร แล้วจึงเติมลงในอาหารส่วน ก. ที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM (CFMM agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว CFMM แต่ละลายแบคทีโอะการ์ 15 กรัมต่ออาหาร 1,000 มล. ลงไปในสารส่วน ก. ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ซึ่งไว้จนได้อุณหภูมิ $50-60^\circ\text{C}$ จึงเติมสารส่วน ข. ที่ฆ่าเชื้อแล้วก่อนนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

สารปฏิชีวนะ

ละลายนิสเตติน (Nystatin) 40 มิลลิกรัมใน ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อ โดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.20 ไมครอนเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครพีพิจ์ที่อุณหภูมิ -20°C

2. ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ GeneClean II Kit (Q-BIOgene, USA)

ประกอบด้วย

1. NaI
2. New Wash
3. TBE Modifier
4. Glassmilk

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลครั้งแรกให้เติมน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 280 มิลลิลิตร และ เอทานอล 100% ปริมาตร 310 มิลลิลิตร ลงใน New Wash ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ $15-30^{\circ}\text{C}$ จนกว่าจะใช้ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

3. สารละลาย 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60°C ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที (หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วจะไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำได้อีกเพราะสารละลาย SDS จะเสียสภาพ)

4. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Trismabase ($C_4H_{11}NO_3$)	121.1 กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42 มล.

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

5. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20 กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

6. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0 มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0 มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มล. เติมน้ำ

ปลอดประจุเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

7. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100	มล.

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

8. สารละลาย CTAB/NaCl (10%CTAB ใน 0.7 M NaCl)

CTAB	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 °C ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

9. High extraction buffer

Tris-HCl, pH 8.0	250	มิลลิโมลาร์
สารละลาย EDTA, pH 8.0	50	มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	125	มิลลิโมลาร์
น้ำปลอดประจุ		

10. สารละลายฟีนอล (phenol)

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 68 °C จากนั้นเติมผงไฮดรอกซีควิโนลีน ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น ดูดชั้นฟีนอลมาวัดความเป็นกรด-ด่างให้ได้เท่ากับ 7.8 (ใช้ pH paper วัด) ถ้ายังไม่ได้ให้ดูดสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 ลงไปอีกครึ่ง เขย่าให้เข้ากันทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งชั้นฟีนอลมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.8 สุดท้ายเติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายชั้นบนทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ในอัตราส่วน 1:1 อีกครึ่ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่น

11. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25 : 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C

12. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

13. Loading dye

Bromphenolblue	0.025 %
ซูโครส	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

14. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

15. สารละลายไซเตียมอะซีเตท เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.2

ละลายไซเตียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

16. สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

17. สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

18. 70% เอทานอล

99% เอทานอล	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

19. อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0%

อะกาโรสเจล	1	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน

20. 0% denaturing solution

40% อะคริลาไมด์/บิส	8.13	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	1	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร	50	มิลลิลิตร

21. 80% denaturing solution

40% อะคริลาไมด์/บิส	8.13	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	1	มิลลิลิตร
ฟอร์มามาไมด์	16	มิลลิลิตร
ยูเรีย	16.82	กรัม
น้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร	50	มิลลิลิตร

22. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

23. สารละลายฟิแนทรีนและไพรีนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์

ซังฟิแนทรีนและไพรีนอย่างละ 0.05 กรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.0 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจนผลึก PAHs ละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ เดิมลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

24. สารละลายฟิแนทรีนและไพรีนในอะซีโตน

ซังฟิแนทรีนและไพรีนอย่างละ 25 มิลลิกรัม ละลายในอะซีโตนปริมาตร 50 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจนผลึก PAHs ละลายหมด กรองผ่านหัวกรองชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.2 ไมโครเมตร
หมายเหตุ ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ เนื่องจากอะซีโตนระเหยเร็วมาก และขณะเติมสาร PAHs ที่ละลายในอะซีโตนลงในดินควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อไม่ให้อะซีโตนระเหยซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงได้

25. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ซังโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

26. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ซังโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. หนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

27. สารละลาย Triton X-100 15%

Triton X-100	15	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	85	มล.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเสาวลักษณ์ อ้นเมฆ เกิดเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2546 และเข้ารับการศึกษาคือในระดับปริญญาโทวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547



