รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จิรทีปม์ แสนรัก. 2547. การย่อยสลายไพรีนและสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นโดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทิมากร แสงดำ. 2547. การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกาะติดและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นารีรัตน์ เจริญช่าง. 2544. การใช้วัสดุจากการเกษตรเร่งการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรัษยา สุนทรศารทูล. 2542. ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดนก พันธุ์พืช และการจัดการสวนสาธารณะเขตกรุงเทพมหานคร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิธัญญา ชวเจริญพันธ์. 2549. การสร้างกล้าเชื้อในวัสดุพาหะเพื่อเสริมการรอดชีวิตของกลุ่มแบคทีเรีย STK ในดินที่ปนเปื้อนไพรีน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพินดา ศิริวราศิลป์. 2545. การใช้ใบพืชตระกูลถั่วและพารามิเตอร์บางประการในการเสริมการย่อยสลายไพรีนในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักจัดการกากของเสียและสารอันตราย กรมควบคุมมลพิษ. 2547. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการของสารเคมีเฉพาะเรื่องพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน. กรุงเทพมหานคร : หจก. ไอเดียสแควร์.

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 activites 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: occurence, 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 Fretsche, W. 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of (^{14}C) 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. Biorediation 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 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

2. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง** Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ละลายวุ้น (Bacto Agar) 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

ก.		
แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	5.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
ข.		
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
เฟอริกคลอไรด์เ ($FeCl_3.6H_2O$)	0.005	กรัม

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) 0.005 กรัม

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

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM (CFMM agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว CFMM แต่ละลายแบคโตอะการ์ 15 กรัมต่ออาหาร 1,000 มล. ลงไปในสารส่วน ก. ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้จนได้อุณหภูมิ 50-60°ซ จึงเติมสารส่วน ข. ที่ฆ่าเชื้อแล้วก่อนนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

สารปฏิชีวนะ

ละลายนิสเตติน (Nystatin) 40 มิลลิกรัมใน ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 °ซ

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

ประกอบด้วย

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

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลครั้งแรกให้เติม น้ำปลอดประจุ ปริมาตร 280 มิลลิลิตร และ เอธานอล 100% ปริมาตร 310 มิลลิลิตร ลงใน New Wash ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15-30 °ซ จนกว่าจะใช้ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

3. สารละลาย 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 °ซ ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ 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. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

5. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

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

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ 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

ปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ 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. แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ 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 °ซ ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ 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 °ซ 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 ลงไปอีกครั้ง เขย่าให้เข้ากันทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งชั้นฟีนอลมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.8 สุดท้ายเติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายชั้นบนทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ในอัตราส่วน 1:1 อีกครั้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่น

11. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

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

12. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

13. Loading dye

Bromphenolblue	0.025 %
ซูโครส	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

14. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

15. สารละลายโซเดียมอะซีเตท เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

16. สารละลายโปรตีเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ

17. สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ

18. 70% เอธานอล

99% เอธานอล	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
ฟอร์มาไมด์	16	มิลลิลิตร
ยูเรีย	16.82	กรัม
น้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร	50	มิลลิลิตร

22. **แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น** 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

23. สารละลายฟีแนนทรีนและไพรีนในไดเมธิลซัลฟอกไซด์

ชั่งฟีแนนทรีนและไพรีนอย่างละ 0.05 กรัม ละลายในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.0 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจนผลึก PAHs ละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ –20 °ซ เติมลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

24. สารละลายฟีแนนทรีนและไพรีนในอะซีโตน

ชั่งฟีแนนทรีนและไพรีนอย่างละ 25 มิลลิกรัม ละลายในอะซีโตนปริมาตร 50 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจนผลึก PAHs ละลายหมด กรองผ่านหัวกรองชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.2 ไมโครเมตร

หมายเหตุ ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ เนื่องจากอะซีโตนระเหยเร็วมาก และขณะเติมสาร PAHs ที่ละลายในอะซีโตนลงในดินควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อไม่ให้อะซีโตนระเหยซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงได้

25. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

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

26. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 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 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547