

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จิรทีปป์ แสนรัก. 2547. การย่อยสลายไพรีนและสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น โดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ทิมากร แสงดำ. 2547. การแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกาะติดและย่อยสลายไพรีนจากปุ๋ยหมักใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นารีรัตน์ เจริญช่าง. 2544. การใช้วัสดุจากการเกษตรเร่งการย่อยสลายสารพอลิไซคลิกอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุพินดา ศิริวราศิลป์. 2545. การใช้ใบพืชตระกูลถั่วและพารามิเตอร์บางประการในการเสริมการย่อยสลายไพรีนในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Arostein, B. N., and Alexander, M. 1993. Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on the biodegradation of aromatic hydrocarbons within the soil. Appl. Environ. Microbiol. 39: 386-390.
- Babson, J.R., Russo-Rodriguez, S.E., Rastetter, W.H., and Wogan, G.N. 1986. *In vitro* DNA-binding of microsomally-activated fluoranthene: evidence that the major product is a fluoranthene N²-deoxyguanosine adduct. Carcinogenesis 7: 859-865.
- Bastiaens, L., Springeal, D., Wattiau, P., Harms, H., de Wachter, R., Verachtert, H., and Diels, L. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. Appl. Environ. Microbiol. 66(5): 1834-1843.

- Baver, J. E., and Capone, D. G. 1988. Effect of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons marine sediment slurries. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1649-1655.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P.P., Freeman, J.P., and Cerniglia, C.E. 1996. Initial Oxidation Products in the Metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2554-2559.
- Boonchan, S., Britz, M.L., and Stanley, G.A. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1007-1019.
- Bossert, I., Kachel, W.M., and Bartha, R. 1984. Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil. Appl. Environ. Microbiol. 47: 763-767.
- Bouchez, M., Blanchet, D., and Vandecasteele, J-P. 1997. An interfacial uptake mechanism for the degradation of pyrene by a *Rhodococcus* strain. Microbiology 143: 1087-1093.
- Broadbent, F. E., and Norman, A. G. 1946. Some factor affecting of the organic nitrogen in soil. Soil Sci. Amer. Procc. 11 :264-267.
- Bugg, T., Foght, J. M., Pickard, M. A., and Gray, M. R. 2000. Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a. Appl. Environ. Microbiol. 66: 5387-5392.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3: 351-368.
- Christensen, M., Banta, G. T., Anderssen, O. 2002. Effects of polychaetes *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina* on the fate and distribution of pyrene in sediments. Mar. Ecol. Prog. Ser. 237: 159-172.
- Churchill, S. A., Harper, J. P., and Churchill, P. F. 1999. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 65: 549-552.

- Cuny, P., Faucet, J., Acquaviva, M., Bertrand, J.-C., and Gilewicz, M. 1999. Enhanced biodegradation of phenanthrene by a marine bacterium in the presence of a synthetic surfactant. Lett. Appl. Microbiol. 29: 242-245.
- Daugulis, A.J., and McCracken, C.M. 2003. Microbial degradation of high and low molecular weight polyaromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor by two strains of *Sphingomonas* sp. Biotechnology Letters 25: 1441-1444.
- Da Silva, M., Esposito, E., Moody, J.D., Canhos, V. P., and Cerniglia, C.E. 2004. Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cyclothyrium* sp. Chemosphere 57: 943-952.
- Davies, J. I. and Evans, W. C. 1964. Oxidative metabolism of naphthalene by soil Pseudomonads: the ring-fission mechanism. Biochem. J. 91: 251-261.
- Dean-Ross, D., and Cerniglia, C.E. 1996. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 307-312.
- Doick, K. J., and Semple, K. T. 2003. The effect of soil: water ratios on the mineralization of phenanthrene: LNAPL mixtures in soil. FEMS Microbiol. Lett. 220: 29-33.
- EMEA/MRL/696/99-FINAL. 1999. Committee Veterinary Medicinal Products.[Online]. <http://www.eudra.org/emea.html>. Accessed 3 august 2006.
- Faust, R. A. 1998. Toxicity summary for pyrene [On line]. http://rais.ornl.gov/tox/profiles/pyrene_c_V1.shtml. Accessed 13 February 1998.
- 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.
- Fiedler, H., Cheung, C. K., and Wong, M. H. 2002. PCDD/PCDF, chlorinated pesticides and PAH in Chinese teas. Chemosphere 46: 1429-1433.
- Fritzsche C. 1994. Degradation of pyrene at low defined oxygen concentrations by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1687-1689.

- Garivait, H., Laowagul, W., Sukasem, P., Ngod-Ngam, S., Polprasert, C., and Reutergardh, L. B. 2002a. Airborne Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in Bangkok urban air: I characterization and Quantification. Department of environmental quality promotion. Pathumthani.
- Garivait, H., Laowagul, W., Sukasem, P., Ngod-Ngam, S., Polprasert, C. and Reutergardh, L.B. 2002b. Airborne Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in Bangkok urban air: II Level and distribution. Department of environmental quality promotion. Pathumthani.
- 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.
- Gothrie, E. A., and Pfaender, F. K. 1998. Reduces pyrene bioavailability in microbially active soils. Environ. Sci.Technol. 32(4): 501-508.
- Grifoll, M., Selifonov, S.A., Gatlin, C.V., and Chapman, P.J. 1995. Actions of versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723.
- Grimmer, G. H., Bohnke, A., and Glaser. A. 1977. Investigation on the carcinogenic burden by air pollution in marine polycyclic aromatic hydrocarbons in automobile exhaust gas-an inventory. Zentralb I. Bakteriol. Abt. I Orig. Reihe B. 164: 218-234.
- Grosser, R. J., Warshawsky, D., and Yestal, J. R. 1991. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene and carbazole in soil. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3462-3469.
- Guerin, W. F. and Jones, G. E. 1988a. Two-stage mineralization of phenanthrene by estuarine enrichment cultures. Appl. Environ. Microbiol. 54: 929-936.
- Guerin, W. F. and Jones, G. E. 1988b. Mineralization of phenanthrene by *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 54: 937-944.

- Heitkamp, M. A., Freeman, J. P., Miller, D. W., and Cerniglia, C. E. 1988a. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons : Isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 54(10): 2549-2555.
- 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: 535-546.
- Hammel, A. K., and Rich, J. K. 1986. Effect of veratryl (3,4-dimethoxybenzyl) alcohol in oxidation of benzo[a]pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 716-722.
- Ho, Y., Jackson, M., Yang, Y., Mueller, J. G., and Pritchard, P. H. 2000. Characterization of fluoranthene- and pyrene-degrading bacteria isolated from PAH-contaminated soils and sediments. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 24: 100-112.
- Horvath, R.S. 1972. Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 36: 146-155.
- Jimenez, I. Y., and Bartha, R. 1996. Solvent-augmented mineralization of pyrene by *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2311-2316.
- John, T., and Cookson, J. R. 1995. Bioremediation engineering design and application. P.9., Cockson, J. R. (ed.). New York: McGraw-Hill.
- John, T., and Cookson, J. R. 1995. Bioremediation engineering design and application. P.57-59., Cockson, J. R. (ed.). New York: McGraw-Hill.
- Johnsen, A. P., Wick, L. Y., and Harms, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental Pollution 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., Britz, M. L., and Stanley, G. A. 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*. J. Appl. Microbiol. 83: 189-198.

- Juhasz, A. L., Britz, M. L., and Stanley, G. A. 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. Lett. Appl. Microbiol. 30: 396-401.
- Kästner, M., Breuer-Jammali, M., and Mahro, B. 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 267-273.
- Kästner, 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.
- Kazunga, C., and Aitken, M. D. 2000. Products from the Incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66(5): 1917-1922.
- Keith, N. 2006. Pyrene Pathway Map. [Online].
http://www.umbbd.msi.umn.edu/pyr/pyr_map.html. Accessed 15 april 2006.
- Kostenko, E., Dobrikov, M., Pyshmyi, D., and et al. 2001. 5'-bis-pyrenylated oligonucleotides displaying excimer fluorescence provide sensitive probes of RNA sequence and structure. Nucleic Acids Research 29(17): 3611-3620.
- Labare, M. P., and Alexander, M. 1995. Enhanced mineralization of organic compounds in non-aqueous phase liquids. Environ. Toxicol. Chem. 14: 257-265.
- Li, X-F., Cullen, R., Reimer, K. J., and Le, X. C. 1996. Microbial degradation of pyrene and characterization of a metabolite. The Science of the Total Environment. 177: 17-29.
- Lundstedt, S. 2003. Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remediation process (eds.), Academic press, Sweden.
- Manahan, S. E. 1993. Reduction, treatment, and disposal of hazardous waste. In: Fundamentals of Environmental Chemistry. pp. 687-720., Manahan, S. E. (ed.). Lewis Publishers.

- Maron, D. M., and Ames, B. N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Res. 163: 173-215.
- Marcoux, J., Deziel, E., Villemur, R., Lepine, F., Bisailon, J. -G., and Beaudet, R. 2000. Optimization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in two-liquid-phase bioreactor. J. Appl. Microbiol. 88: 655-662.
- Maslin, P., and Maier, R. M. 2000. Rhamnolipid-enhanced mineralization of phenanthrene by indigenous microbial populations in organic-metal co-contaminated soils. Bioremed. J. 4: 295-308.
- Masuko, M., Ohuchi, S., Sode, K., Ohtani, H., and Shumadzu, A. 2000. Fluorescence resonance energy transfer from pyrene to perylene labels for nucleic acid hybridization assays under homogeneous solution conditions. Nucleic Acids Research 28(8) e34: i-viii.
- 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.
- Neurath, G. B. 1972. Recent advances in knowledge of the chemical composition of tobacco smoke. In: The Chemistry of Tobacco and Tobacco smoke. pp. 77-97., Schmeltz, I. (ed.). New York : Plenum Publishing Corp.
- Nieman, J. K. C., Kimball, D. O., McLean, J. E., Sims, R. C., Sims, J. L., Sorensen, D. L., and Rice, J. A. 1998. Humification of pyrene in contaminated soil during landfarming. Proceedings of the 1998 conference on Hazardous waste research, pp. 252-260.
- Ouyang J. 2006. Phenanthrene Pathway Map. [Online].
http://www.umbbd.msi.umn.edu/pyr/pyr_map.html. Accessed 14 March 2006.

- Patnaik, P. 1992. hydrocarbon, Aromatic. In: A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances. pp. 429-445. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Ramirez, N., Curight, T., and Ju, L-K. 2001. Pyrene biodegradation in aqueous solutions and soil slurries by *Mycobacterium* PYR-1 and enriched consortium. Chemosphere 44: 1079-1086.
- Randerath, K., Zhou, G.-D., Randerath, E., Safe, S. H., and Donnelly, K. C. 1997. Comparative ^{32}P -postlabeling analysis of exogenous and endogenous DNA adducts in mouse skin exposed to a wood-preserving waste extract, a complex mixture of polycyclic and polychlorinated chemicals. Environmental and Molecular Mutagenesis 29: 372-378.
- Rehmann, K., Noll, H. P., Steinberg, C. E., and Kettrup, A. A. 1998. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KR2. Chemosphere 36: 2977-2992.
- Schirmer, K., Dixon, D. G., Greenberg, B. M., and Bols, N. C. 1998. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. Toxicol. 127: 129-141.
- Shiaris, M. P., and Cooney, J. J. 1983. Replica plating method for estimating phenanthrene-utilizing and phenanthrene-cometabolizing microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 45: 706-710.
- Straube, W. L., Jones-Meehan, J., Pritchard, P. H., and Jones, W. R. 1999. Bench-scale optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons. Resources Conservation and Recycling. 27: 27-37.
- Stringfellow, W., and Aitken, M. D. 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading *Pseudomonads*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 357-362.

- 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.
- Tiehm, A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons the presence of synthetic surfactants. Appl. Environ. Microbiol. 60: 258-263.
- Tiehm, A., and Fritzsche, C. 1995. Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 964-968.
- Trzesicka-Mlynarz, D., and Ward, O. P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) by mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. Can. J. Microbiol. 41: 470-476.
- 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, Hamme, J. D., and Ward, O. P. 1999. Influence of chemical surfactants on the biodegradation of crude oil by a mixed bacterial culture. Can. J. Microbiol. 45: 130-137.
- Van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., and Zehnder, A. J. B. 1987. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. Appl Environ Microbiol. 53(8): 1893-1897.
- Verschueren, K. 1996. Acenaphthylene. In Handbook of Environmental Data on Organic Chemistry 3rd edition. P. 100., Van Nostrand Reinhold an International Thomson Publishing company.
- Verschueren, K. 1997. Handbook of environmental data on organic chemicals. 596-599. New York: Thomson publishing.
- Verstraete, W., and Devliegher, W. 1996. Formation of non-bioavailable organic residues in soil: Perspectives for site remediation. Biodegradation. 7: 471-485.

- Vila, J., LÓpez, Z., Sabaté, J., MinguillÓn, C., Solanas, A. M., and Grifoll, M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: Actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 67(12): 5497-5505.
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J., and Rehm, H. J. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 671-676.
- Wang, S., Liu, B., Sun, K., and Su, Q. 2004. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons formed during the pyrolysis of phenylalanine. J. Chromatogr. A. 1025: 255-261.
- 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.
- Wilcke, W., Müller, S., Kanchanakool, N., Niamskul, C., and Zech, W. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in hydromorphic soils of the tropical metropolis Bangkok. Geoderma 91: 297-309.
- Wilson, S. C., and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). A review. Environ Pollut. 81: 229-249.
- Yen, K. M. and Gunsalus, I. C. 1982. Plasmid gene organization: Naphthalene/salicylate oxidation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 79: 874-878.
- Zielinska-Park, J., Nakamura, J., Sweberg, J. A., and Aitken, M. D. 2004. Aldehydic DNA lesions in calf thymus DNA and HeLa S3 cells produced by bacterial quinone metabolites of fluoranthene and pyrene. Carcinogenesis. 9: 1727-1733.
- Zhou, N., Fuenmayor, S. L. and Williams, P.A. 2001. *nag* Genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. J. Bacteriol. 183(2): 700-708.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

ก.)	แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5.5	กรัม
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
ข.)	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
	เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม

ซึ่งสารส่วน ก.) ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 จากนั้นนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายในส่วน ข.) ที่ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดและทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ลงในอาหารที่ทำการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM (CFMM agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเหลว CFMM ละลายผงวุ้น 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ลงไปในสารละลายส่วน ก.) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.5 ก่อนนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้จนได้อุณหภูมิ 50-60 °ซ จึงเติมสารละลายในส่วน ข.) ที่ปราศจากเชื้อแล้วก่อนนำไปใช้

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตเนน (tryptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายผงวุ้น 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ลงไปในอาหารก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว oxoid No.2 (Maron และ Ames, 1983)

Oxoid No.2	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	200	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารแข็ง Minimal glucose agar (MGA) (Maron และ Ames, 1983)

ก) - น้ำกลั่นสำหรับละลาย bacto agar	930	มล.
- Bacto agar	15	กรัม

ข) - น้ำกลั่นสำหรับละลาย glucose	67	มล.
-Glucose	10	กรัม
ค) Vogel-Bonner medium E (50x)	100	มล.

นำสารทั้งสามไปนึ่งฆ่าเชื้อแยกกันด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้อุณหภูมิของ bacto agar เย็นลงจนได้อุณหภูมิประมาณ 65 °ซ จากนั้นเติมสารข้อ ข) และ ค) ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป pour plate ลงใน plate ที่อบฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 20 มล. ต่อ plate

7. Vogel-Bonner medium E (50x) (Maron และ Ames, 1983)

MgSO ₄ · 7H ₂ O	10	กรัม
Citric acid (monohydrate)	100	กรัม
K ₂ HPO ₄ anhydrous	500	กรัม
NaNH ₄ HPO ₄ · 4 H ₂ O	175	กรัม

เติมน้ำกลั่นลงไปละลายสารที่ละชนิดจนละลายหมดแล้วจึงเติมสารตัวต่อไปลงไปละลาย จากนั้นเติมน้ำจนครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแยกกันด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

8. Top agar (Maron และ Ames, 1983)

Agar	0.6	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิประมาณ 55 °ซ เติมสารละลายฮิสทีดินและไบโอติน (0.5 มิลลิโมลาร์) ลงในอัตราส่วน 10 มล. ต่อ Top agar 100 มล.

9. 0.5 มิลลิโมลาร์ฮิสทีดิน-ไบโอติน (Histidine-Biotin) (Maron และ Ames, 1983)

D-Biotin (F.W. 247.3)	30.9	มก.
L-Histidine·HCl (F.W. 191.7)	24.0	มก.

นำน้ำกลั่นปริมาตร 250 มล. ที่ต้มจนเดือด เติม D-Biotin และ L-Histidine·HCl ลงไปละลายในน้ำจนหมด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะนำมาใช้งาน

10. การเตรียมสารละลายฮิสทีดินและไบโอติน (Histidine and Biotin stock solution) (Maron และ Ames, 1983)

1). 0.1 โมลาร์ L-Histidine·HCl

L-Histidine·HCl (209.63)	2.096	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

2). 1 มิลลิโมลาร์ L-Histidine·HCl

0.1 โมลาร์ L-Histidine·HCl	1	มล.
น้ำกลั่น	99	มล.

3). 1 มิลลิโมลาร์ Biotin

Biotin (M.W. 244.43)	24.43	มก.
น้ำกลั่น	100	มล.

4). 0.5 มิลลิโมลาร์ Histidine-0.5 มิลลิโมลาร์ Biotin

1 มิลลิโมลาร์ Histidine	100	มล.
1 มิลลิโมลาร์ Biotin	100	มล.

นำสารทั้งสี่ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

11. การเตรียม S9-mix buffer (Maron และ Ames, 1983)

1). NaPO_4 -KCl buffer

0.5 M NaPO_4 pH 7.4	100	มล.
1 M KCl	16.5	มล.
น้ำกลั่น	213.5	มล.

2). 0.5 M NaPO_4 pH 7.4

2.1) 0.5 M Na_2HPO_4 (Na_2HPO_4 anhydrous) 7.098 กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มล.

2.2) 0.5 M NaH_2PO_4 anhydrous 6.899 กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มล.

ปรับ 0.5 M Na_2HPO_4 ให้ได้ pH 7.4 โดยใช้ 0.5 M NaH_2PO_4 จากนั้นนำสารไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

3) การเตรียม 0.16 M MgCl_2

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (M.W. 203.31)	3.253	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

12. การเตรียม S9-mix (Maron และ Ames, 1983)

NaPO_4 - KCl	6.6	มล.
0.16 M MgCl_2	0.5	มล.
0.1 M NADP	0.4	มล.
0.1 M Glucose-6-phosphate	0.5	มล.

S-9 (10% ของ total volumn)	1.0	มล.
Steriled 0.15 M KCl	1.0	มล.

ภาคผนวก ข.

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายไพรีนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์

ชั่งไพรีน 0.1 กรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 1.0 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนผลึกไพรีนละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เติมนลงในอาหารเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

2. สารละลายไพรีนในอะซีโตน

ชั่งไพรีน ชนิดละ 0.3 กรัม ละลายในอะซีโตนปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องผสมจนละลายหมด กรองผ่านหัวกรองชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.2 ไมโครเมตร

หมายเหตุ ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ เนื่องจากอะซีโตนระเหยเร็วมาก ก่อนนำไปใช้ควรแช่ในตู้เย็นก่อน และขณะเติมสาร PAHs ที่ละลายในอะซีโตนลงในดินควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อไม่ให้อะซีโตนระเหยซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงได้

3. สารละลายมาตรฐานของ PAHs และอนุพันธ์ชนิดต่างๆ ในเมธานอล

ชั่งสาร PAHs ที่ต้องการเตรียม ชนิดละ 0.1 กรัม ละลายสารมาตรฐานแต่ละชนิดในเมธานอลปริมาตร 10 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน กรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ด้วยวิธี TLC และ HPLC

4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

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

5. 30% กาลีเซอรอล

นำกาลีเซอรอล 30 มล. ละลายในน้ำกลั่น 70 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมา นึ่งฆ่าเชื้อใหม่อีก 2-3 ครั้ง

6. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

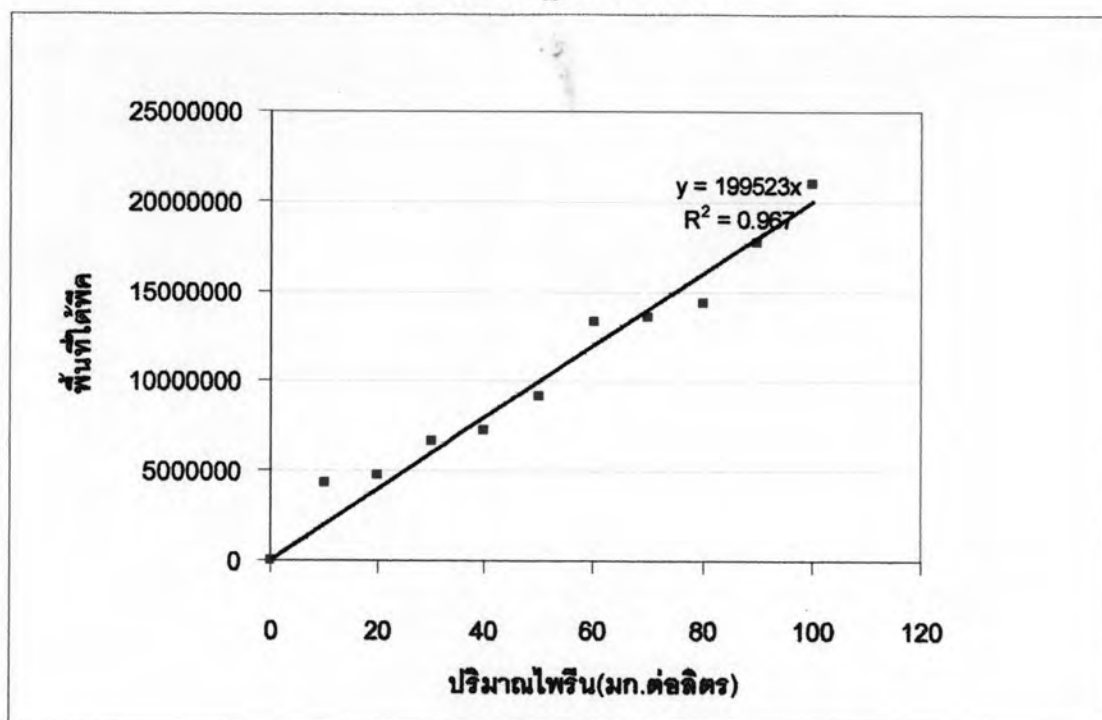
ซิงโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

7. สารละลายเมธานอลเข้มข้น 80% ในน้ำ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

กรองเมธานอลผ่านแผ่นกรองชนิด FH ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร กำจัดฟองอากาศ ด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง จากนั้นผสมเมธานอล ปริมาตร 80 มล. กับน้ำกลั่นที่กรองผ่าน กรองชนิด FH ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตรและกำจัดอากาศออกแล้ว ปริมาตร 20 มล. นำไป กำจัดอากาศด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงอีกครั้งจนไม่เหลือฟองอากาศ

ภาคผนวก ค.

กราฟมาตรฐานของไพรีน



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนและพื้นที่ใต้พีค
ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้นไพรีนคำนวณได้โดยนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC แทนค่าลงในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ใต้พีค} &= (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณไพรีน}) + \text{จุดตัดแกน Y} \\ \text{โดยที่} \quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} &= 160372 \\ \text{จุดตัดแกน Y} &= 0 \end{aligned}$$

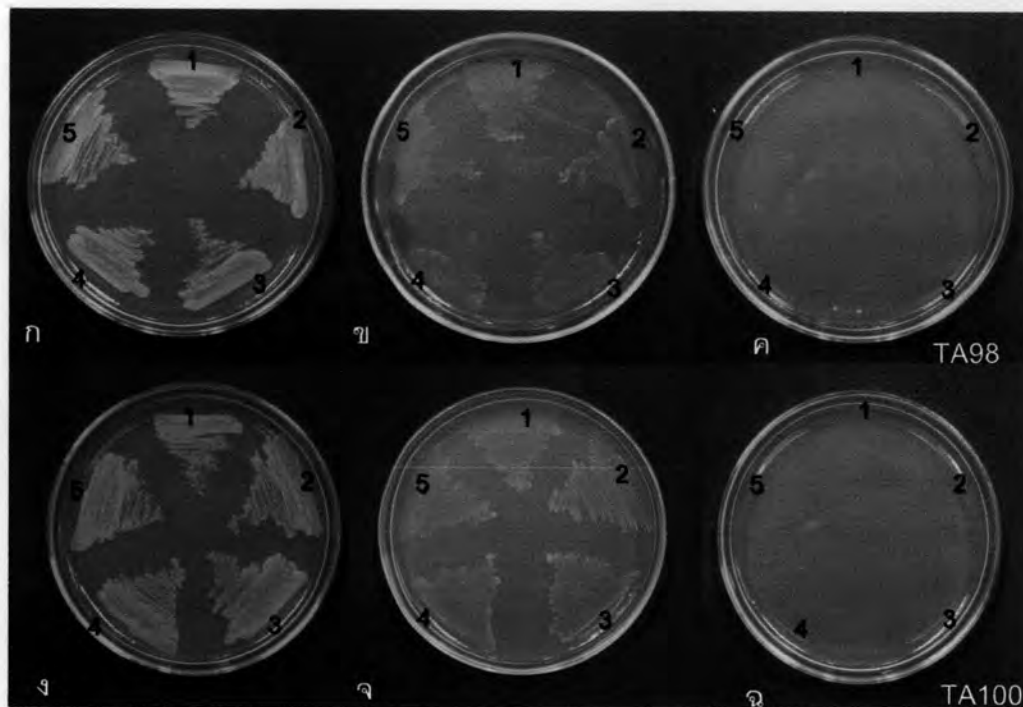
ภาคผนวก ง.

การตรวจสอบคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100

ก่อนจะนำแบคทีเรียไปใช้ในการทดสอบต้องทำการตรวจสอบว่าแบคทีเรียมีคุณสมบัติครบตามต้องการ ซึ่งการตรวจสอบคุณสมบัติควรจะทำทุกๆ 2 เดือน การตรวจสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียแบ่งเป็น 5 คุณสมบัติ

1. Histidine requirement

เชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถทดสอบพร้อมกันได้ในงานเลี้ยงเชื้อเดียวกัน ทำการแบ่งจานเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนๆ สำหรับโคโลนีที่ต้องการทดสอบ เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ที่มีส่วนผสมของฮิสทีดีนและไบโอดีนเปรียบเทียบกับอาหารแข็งที่ไม่มีฮิสทีดีน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ควร จะเจริญได้ดีบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมทั้งฮิสทีดีนและไบโอดีน ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ ง.1

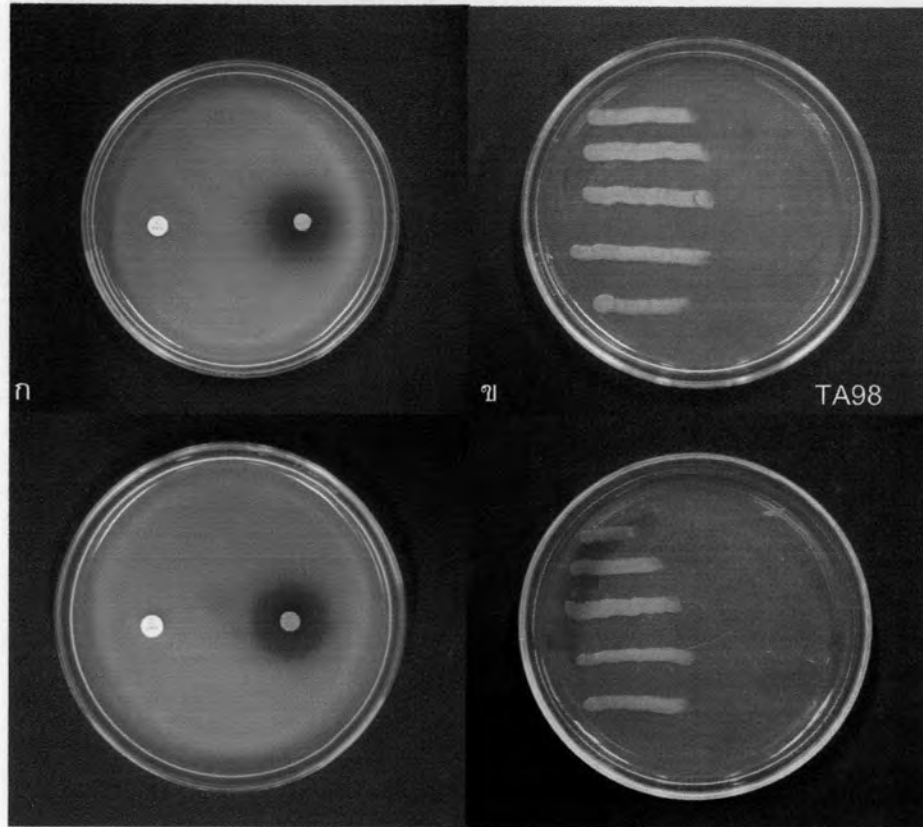


รูปที่ ๑.1 การตรวจสอบคุณสมบัติการเป็น *his⁻* ของ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ที่เจริญบน MGA, ลักษณะโคโลนีกลายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ที่มีส่วนผสมของฮิสทีดินและไบโอติน (ก และ ง), ลักษณะโคโลนีกลายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ที่มีแต่ไบโอติน (ข และ จ), ลักษณะโคโลนีกลายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ธรรมดา (ค และ ฉ)

2. การตรวจสอบ R-factor

เป็นการทดสอบเพื่อดูว่าแบคทีเรียมีพลาสมิด pKM101 หรือไม่ โดยการทดสอบความไวต่อยาแอมพิซิลิน ซึ่งแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pKM101 จะทนต่อยานี้ ทำโดยเขียนเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ที่มีส่วนผสมของฮิสทีดินและไบโอติน จากนั้นทำการถ่ายเชื้อที่มีการเลี้ยงมาแล้ว 14 ชม. ที่อุณหภูมิ 37 °C ปริมาตร 0.1 มล. ลงในหลอดปราศจากเชื้อที่มีส่วนผสมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ หลังจากนั้นทำการเติม Top agar ที่หกลงแล้วซึ่งมีส่วนประกอบของฮิสทีดินและไบโอตินความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 9) ลงไปผสมให้เข้ากัน และทำการเททับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ตั้งทิ้งไว้จนวันแข็ง แล้วนำ ampicillin disc วางทับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งอีกทีหนึ่ง จากนั้น

นำไปปรมที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อทั้งสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ควรจะเจริญ
 ได้รอบ ampicillin disc ดังแสดงในรูปที่ ง.2



รูปที่ ง.2 การตรวจสอบคุณสมบัติการมีพลาสมิด pKM101, *rfa*⁺, *uvrB*⁻ ของเชื้อ *Salmonella typhumurium* TA 98 และ TA 100, ลักษณะโคโลนีกลายพันธุ์ที่ต้องการ
 ตรวจสอบการมีพลาสมิด pKM101 และการเป็น *rfa*⁺ บนอาหารแข็ง MGA ที่มี ampicillin
 disc รวมทั้งฮีสทีดินและไบโอตินโดยอาศัยเทคนิคการ pour plate (ก และ ค), ลักษณะ
 โคโลนีกลายพันธุ์ที่ต้องการตรวจสอบการมี *uvrB*⁻ บนอาหารแข็งฮีสทีดินและไบโอตินโดย
 การขีดเชื้อเป็นเส้นตรงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA (ข และ ง)

3. การตรวจ *rfa* mutation

แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ที่ใช้เป็นตัวทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ นอกจากมีการกลายพันธุ์ของ histidine operon แล้ว ยังมีการกลายพันธุ์อื่นๆ คือไม่สามารถสร้างสารคลุมผิว (lipopolysaccharide barrier) จึงทำให้สารขนาดโมเลกุลใหญ่สามารถซึมผ่านเข้าไปในตัวแบคทีเรีย (ซึ่งปกติสารเหล่านี้ไม่สามารถผ่านผนังเซลล์แบคทีเรีย)

การตรวจว่าแบคทีเรียมีคุณสมบัติข้อนี้ ทดสอบโดยใช้ crystal violet ซึ่งเมื่อซึมเข้าไปในเซลล์แล้วทำให้แบคทีเรียตาย ทำโดยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ที่มีส่วนผสมของฮีสทีดินและไบโอติน จากนั้นทำการถ่ายเชื้อที่มีการเลี้ยงมาแล้ว 14 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°C ปริมาตร 0.1 มล. ลงในหลอดปราศจากเชื้อที่มีส่วนผสมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ หลังจากนั้นทำการเติม Top agar ที่หลอมเหลวแล้วซึ่งมีส่วนประกอบของฮีสทีดินและไบโอตินความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 9) ลงไปผสมให้เข้ากัน และทำการเททับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ตั้งทิ้งไว้จนอุ่นแข็ง แล้ววางกระดาษกรองปราศจากเชื้อที่จุ่ม crystal violet เข้มข้น 0.1 % จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อทั้งสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ไม่ควรจะเจริญได้รอบกระดาษกรองที่จุ่มด้วย crystal violet ดังแสดงในรูปที่ ง.2

4. การตรวจ *uvrB* mutation

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ จะขาดระบบซ่อมแซมดีเอ็นเอ ซึ่งเมื่อดีเอ็นเอของมันผิดปกติ จะไม่สามารถซ่อมแซมให้ปกติได้ จึงเกิดการกลายพันธุ์ในที่สุด การตรวจสอบคุณสมบัตินี้ทำได้โดยการตรวจดูความไวต่อรังสีอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งสามารถทำได้โดยทำการขีดที่เลี้ยงมาแล้ว 14 ชม. อุณหภูมิ เชื้อเป็นเส้นตรงจากซ้ายไปขวาบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีส่วนผสมของฮีสทีดินและไบโอติน 37°C จากนั้นนำเพลทไปฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยทำการฉายแสงเพียงครึ่งเพลทเท่านั้น โดยให้ระยะห่างของหลอดไฟกับเพลทประมาณ 30 ซม. เชื้อทั้งสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 จะไม่มีการเจริญด้านที่ถูกแสงแสงอัลตราไวโอเล็ต ดังแสดงในรูปที่ ง.2

5. การตรวจการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีตามธรรมชาติ (Spontaneous reversion)

เนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบอาจเกิดกลายพันธุ์ได้เองโดยไม่มี การเหนี่ยวนำ จากสารเคมีใดๆ ทำให้สามารถเห็นเป็นโคโลนีได้เรียกว่า Spontaneous mutant colony โดยปกติ จะมีจำนวนโคโลนีเป็นจำนวนหนึ่ง ซึ่งถือเป็น blank หรือ background ที่ต้องนำไปหักลบจากค่า mutant colony ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของสารเคมี ซึ่งในการทดลองจะใช้ DMSO แทนสาร ทดสอบ

ทำโดยเติม DMSO 0.1 มล. ลงในหลอดปราศจากเชื้อ ที่แช่อยู่ในน้ำแข็ง จากนั้นทำการ เติมส่วนผสมของเอนไซม์ S9 หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ลงไป (ในกรณีที่ต้องการทดสอบไม่ ต้องการการกระตุ้นด้วยเอนไซม์) แล้วเติมเชื้อแบคทีเรียที่ทำการเลี้ยงมาแล้ว 14 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°C ลงไป 0.1 มล. จากนั้นเติม Top agar ที่หลอมเหลวแล้วซึ่งมีส่วนประกอบของฮีสทีดีน และไบโอตินความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 9) ลงไปผสมให้เข้ากัน และทำ การเททับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGA ตั้งทิ้งไว้จนอุ่นแข็งจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดเองตามธรรมชาติของแต่ละสายพันธุ์แสดงดัง ตารางที่ ง.1

ตารางที่ ง.1 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติของแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์	
	สถานะที่ไม่ต้องการการ	สถานะที่ต้องการการ
	กระตุ้นด้วยเอนไซม์ S9	กระตุ้นด้วยเอนไซม์ S9
TA97	75-200	100-200
TA98	20-50	20-50
TA100	75-200	75-200
TA102	100-300	200-400
TA104	200-300	300-400
TA1535	5-20	5-20
TA1537	5-20	5-20
TA1538	5-20	5-20

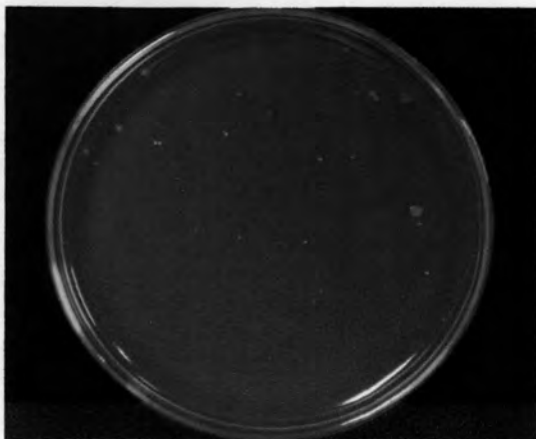
6. การตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน

สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบความไวและความจำเพาะของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในการทดลองนี้คือ เบนโซ(เอ)ไพรีน สำหรับใช้ในการทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ที่ต้องผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึม และ 2-(2-ฟูริล-3-(5-ไนโตร-2-ฟูริล) อะคริลราไมด์ สำหรับใช้ในการทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ที่ไม่ต้องผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึม วิธีทำเหมือนกับข้อ 5 แต่ใช้ เบนโซ(เอ)ไพรีน สำหรับสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100, 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อเพลท ตามลำดับ และ 2-(2-ฟูริล-3-(5-ไนโตร-2-ฟูริล) อะคริลราไมด์ สำหรับสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100, 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อเพลท ตามลำดับ แทนการใช้ DMSO

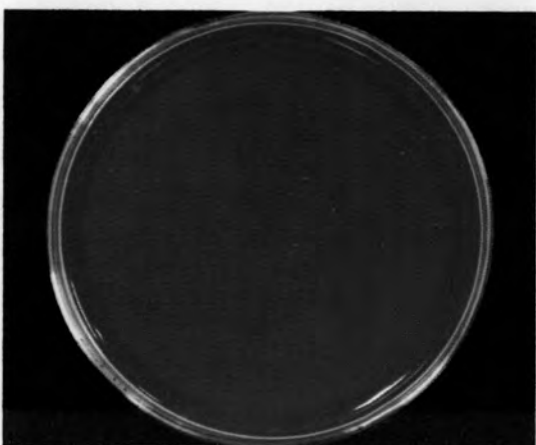


ภาคผนวก จ.

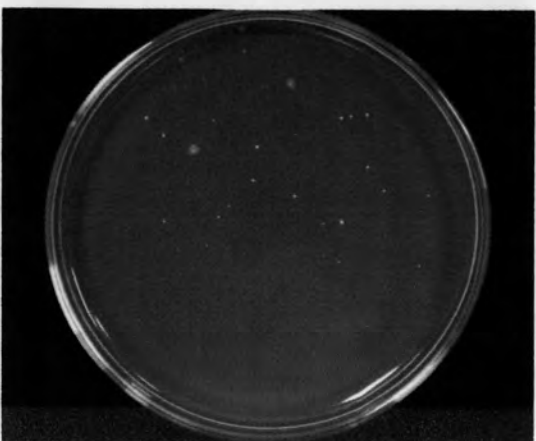
ชุดทดลองความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารมัยันตรีนใน *Salmonella typhumurium* TA 98 ที่เกิดขึ้นเองโดยไม่ผ่านระบบที่กระตุ้นด้วยเอนไซม์



รูปที่ จ. 1 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่ไม่เติมสารมัยันตรีน

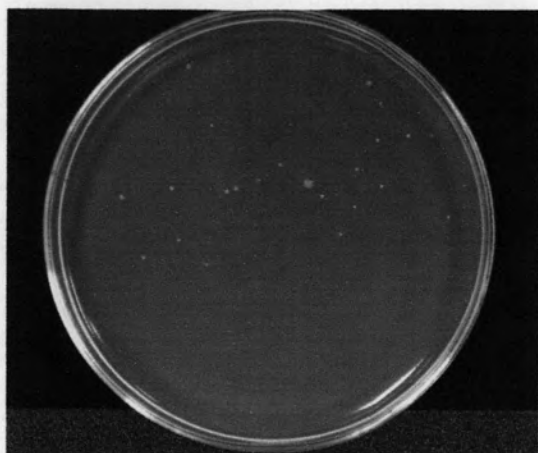


รูปที่ จ. 2 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัยันตรีนปริมาณ 2.5 mg/plate

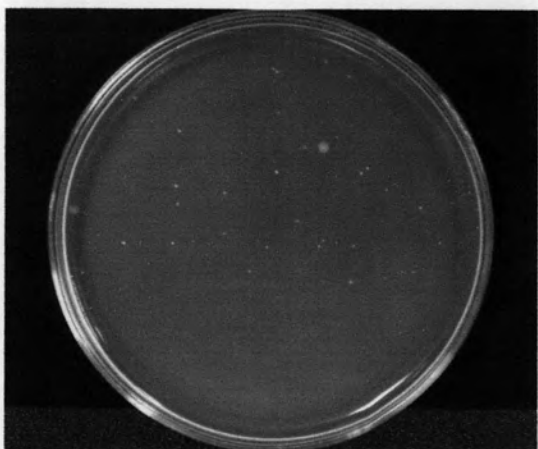


รูปที่ จ. 3 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัยันตรีนปริมาณ 5.0 mg/plate

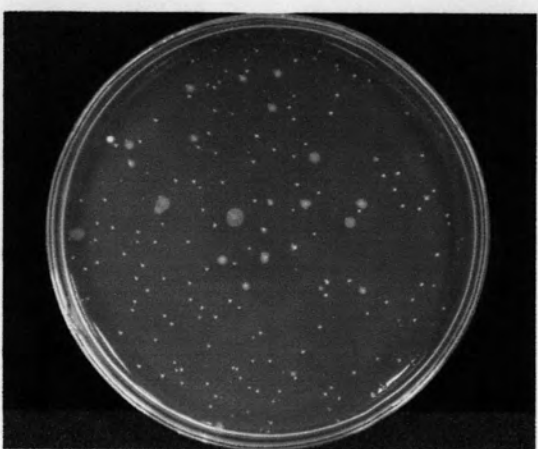
ชุดทดลองความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารมัลธินทรีย์ใน *Salmonella typhumurium* TA 98
ที่เกิดขึ้นโดยไม่ผ่านระบบที่กระตุ้นด้วยเอนไซม์



รูปที่ จ. 4 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่
เติมสารมัลธินทรีย์ปริมาณ 10.0 mg/plate

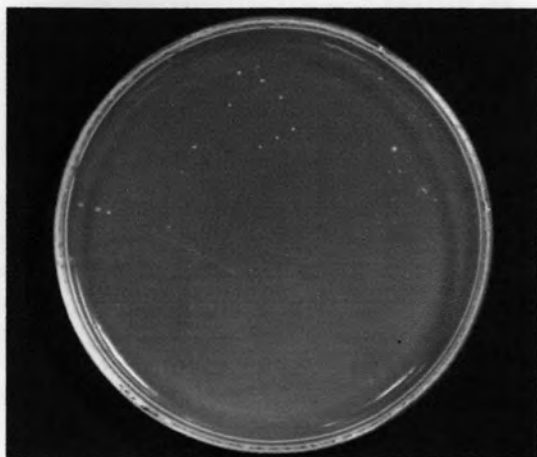


รูปที่ จ. 5 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่
เติมสารมัลธินทรีย์ปริมาณ 20.0 mg/plate

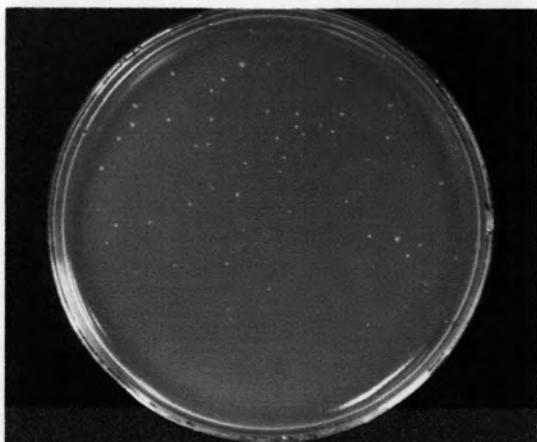


รูปที่ จ. 6 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่
เติม 2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acylamide
ปริมาณ 0.1 mg/plate

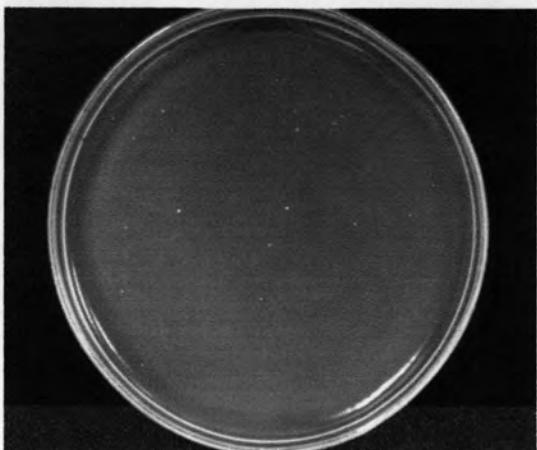
ชุดทดลองความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารมัยยันตรีใน *Salmonella typhumurium* TA 98 ผ่านระบบที่กระตุ้นด้วยเอนไซม์



รูปที่ จ. 7 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่ไม่เติมสารมัยยันตรี

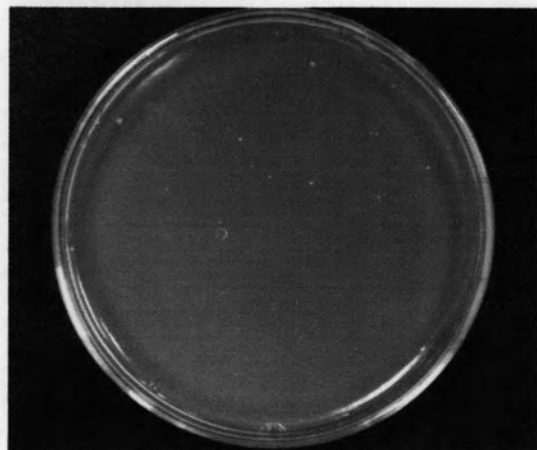


รูปที่ จ. 8 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัยยันตรีปริมาณ 2.5 mg/plate

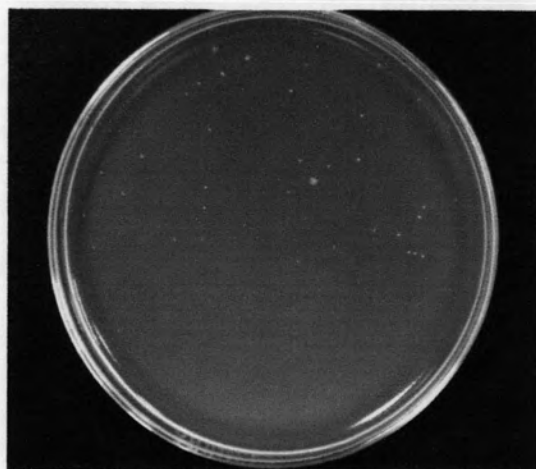


รูปที่ จ. 9 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัยยันตรีปริมาณ 5.0 mg/plate

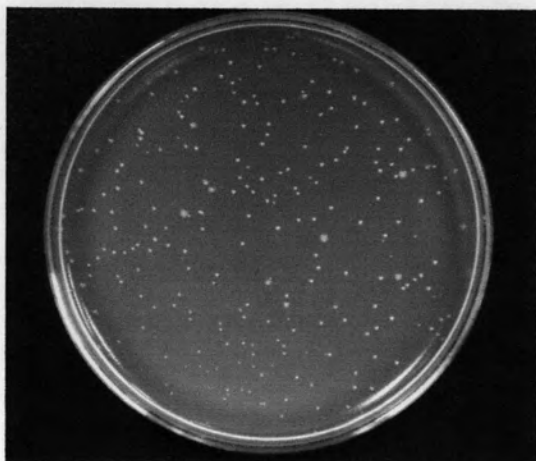
ชุดทดลองความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารมัลธัยนตรีใน *Salmonella typhumurium* TA 98 ผ่านระบบที่กระตุ้นด้วยเอนไซม์



รูปที่ จ. 10 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลอง
ที่เติมสารมัลธัยนตรีความเข้มข้น 10.0 mg/plate

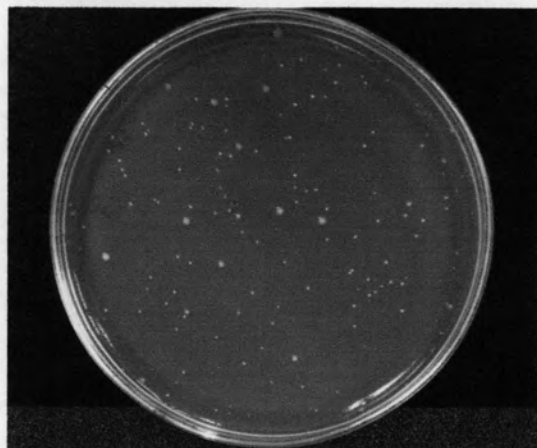


รูปที่ จ. 11 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลอง
ที่เติมสารมัลธัยนตรีปริมาณ 20.0 mg/plate

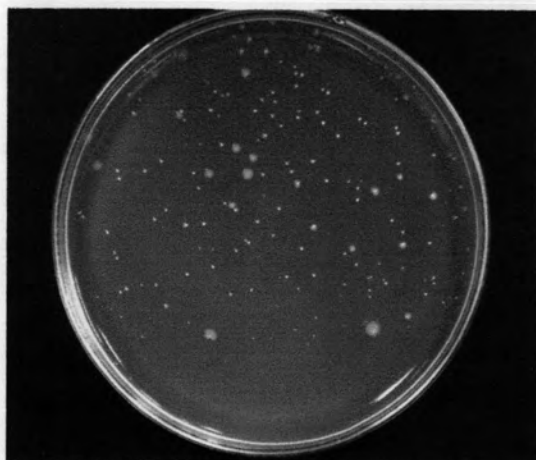


รูปที่ จ. 12 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลอง
ที่เติมเบนโซ(เอ)ไพรีน ปริมาณ 0.1 mg/plate

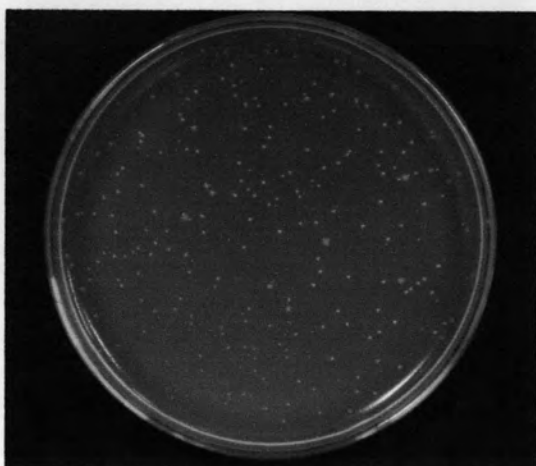
ชุดทดลองความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารมัยยันตรีใน *Salmonella typhumurium* TA100
ที่เกิดขึ้นโดยไม่ผ่านระบบที่กระตุ้นด้วยเอนไซม์



รูปที่ จ. 13 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่ไม่เติมสารมัยยันตรี

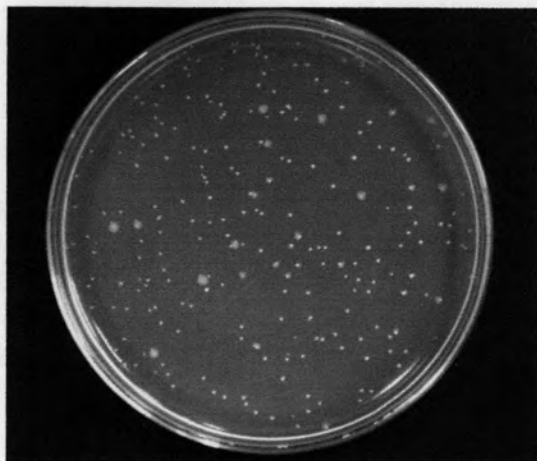


รูปที่ จ. 14 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัยยันตรีปริมาณ 2.5 mg/plate

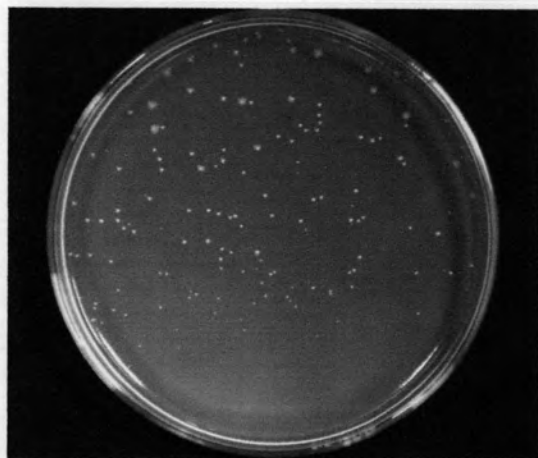


รูปที่ จ. 15 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่เติมสารมัยยันตรีปริมาณ 5.0 mg/plate

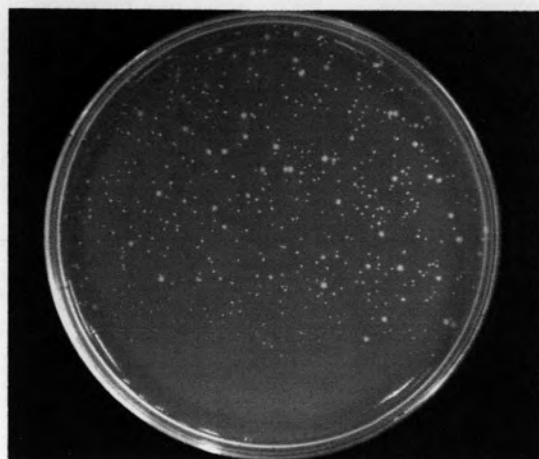
ชุดทดลองความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารมัลธัยนตรีใน *Salmonella typhumurium* TA100
ที่เกิดขึ้นโดยไม่ผ่านระบบที่กระตุ้นด้วยเอนไซม์



รูปที่ จ. 16 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลอง
ที่เติมสารมัลธัยนตรีความเข้มข้น 10.0 mg/plate

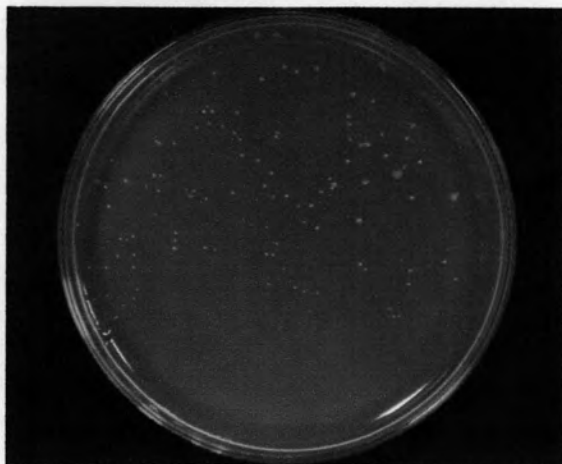


รูปที่ จ. 17 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลอง
ที่เติมสารมัลธัยนตรีปริมาณ 20.0 mg/plate

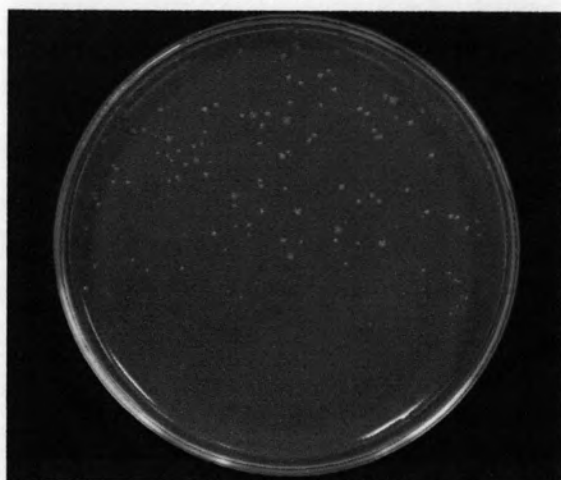


รูปที่ จ. 18 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลอง
ที่เติม 2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acylamide
ปริมาณ 0.1 mg/plate

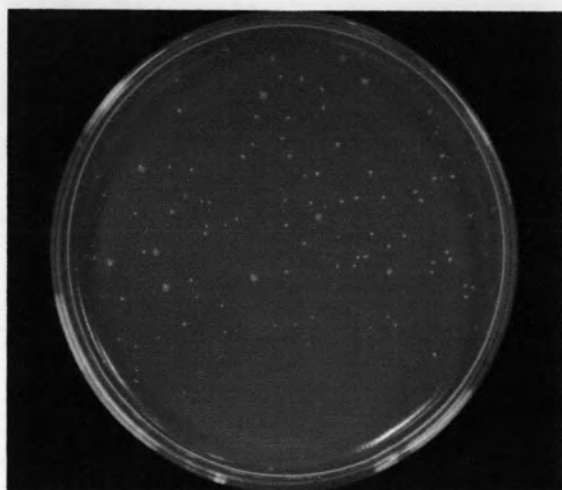
ชุดทดลองความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารมัยยันตรีใน *Salmonella typhumurium* TA100
ที่เกิดขึ้นโดยผ่านระบบที่กระตุ้นด้วยเอนไซม์



รูปที่ จ. 19 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุด
ทดลองที่ไม่เติมสารมัยยันตรี

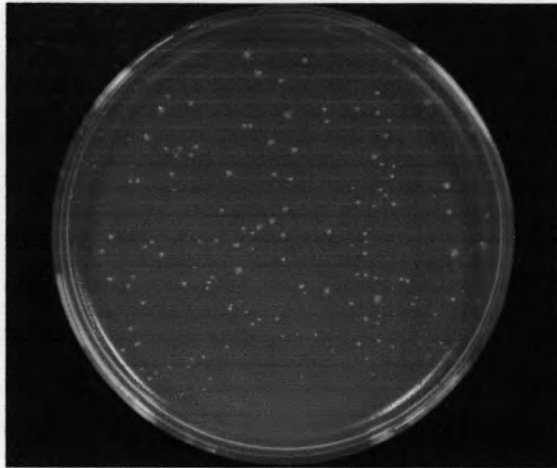


รูปที่ จ. 20 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลอง
ที่เติมสารมัยยันตรีปริมาณ 2.5 mg/plate

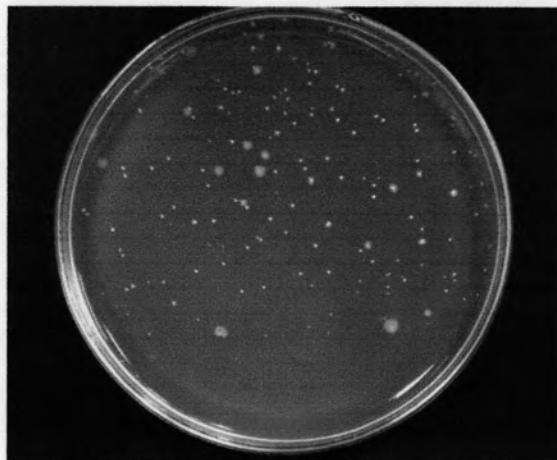


รูปที่ จ. 21 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลอง
ที่เติมสารมัยยันตรีปริมาณ 5.0 mg/plate

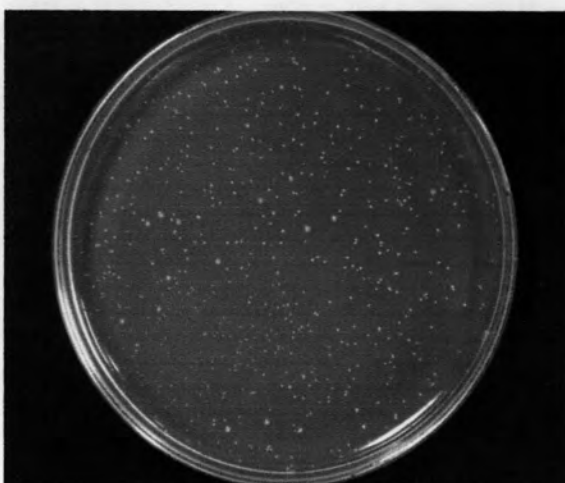
ชุดทดลองความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารมัยันตรีใน *Salmonella typhumurium* TA100
ที่เกิดขึ้นโดยผ่านระบบที่กระตุ้นด้วยเอนไซม์



รูปที่ จ. 22 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลอง
ที่เติมสารมัยันตรีปริมาณ 10.0 mg/plate



รูปที่ จ. 23 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลอง
ที่เติมสารมัยันตรีปริมาณ 20.0 mg/plate



รูปที่ จ. 24 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ในชุดทดลองที่
เติมเบนโซ(เอ)ไพรีน ปริมาณ 0.1 mg/plate

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิยะวรรณ เพชรภา เกิดเมื่อวันที่ 12 ธันวาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546

