รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จิรฑีปฆ์ แสนรัก. 2547. การย่อยสลายไพรีนและสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น โดยกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากใบพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

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

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

เสาวลักษณ์ อ้นเมฆ. 2550 . การสลายไพรีนและฟีแนนทรีนที่ปนเปื้อนในดินโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 ที่เลี้ยงบนใบจามจุรี วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุธาวัลย์ ดีสวัสดิ์. 2550 . ผลของวัสดุทางการเกษตรในการช่วยสลายไพรีนและฟีแนนทรีนโดยกลุ่มแบคทีเรีย RRM-V3 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Akhtar, N., Iqbal, J., and Lqbal, M. 2004. Removal and recovery of nickel(II) from aqeous solution by loofa sponge immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies. Journal of Hazardous Materials. 108: 85-94.

Albert, L. J., Grant, A. S., and Margaret, L. B. 2000 Degradation of high molecular weight PAHs in contaminated soil by a bacterial consortium: Effects on microtox and mutagenicity bioassays. Bioremediation Journal. 4(4,): 271-283.

Ashok, B. T., Saxena, S., Singh, K. P. and Musarrat, J. 1995. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil around Mathuna oil refinery, India. World Jornal of Microbiology and Biotechnology. 11(6): 691-92.

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.

Bouchez, M., Blanchet, D., and Vandecasteele, J-P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain association: Inhibition phenomena and cometabolism. Applied Microbiology and Biotechnology. 43: 156-164.

Cerniglia, C. E. 1992. Biodegardation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.

Cerniglia, C. E. and Heitkamp, M. A. 1989. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: Varanasi, U., (Ed.). Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 41-68.

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. Journal of Scientific Research Chulalongkorn University. 28(Special Issue I): 1-13.

Chung, P. Y. and Brain, K. 2001. *Mycobacterium* diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. Applied and Environmental Microbiology. 67(5): 222-229

Daengrueng, P. 2005. Survival and PAHs degradative ability of *Sphingomonas* sp. strain P2 in PAHs contaminated soil after soil acclimatization. Thesis. Environmental Management. Chulalongkorn University.

Dean-Ross, D. and Cerniglia, C. E. 2002. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. Applied Microbiology and Biotechnology. 46: 307-312.

Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., and Johri, A. K. 2002. Biotechnology and bioremediation: Successes and limitations. Applied Microbiology and Biotechnology. 59: 143-152.

Ezikpe, M. N. I., Gbenle, O. G., Ilori, M. O., Okpuzor, J. and Osuntoki, A. A. 2010. Mixture of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation by tropical bacteria and via co-metabolism with phenanthrene. Research Journal of Environmental Sciences. 4: 317-326.

Gibson, D. T., and Subramanian, V. 1984 Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In Gibson, D. T. (ED.), Microbial Degradation of Organic Compounds.. pp. 181-252. New York: Marcel Dekker.

Gothrie, E. A., and Pfaender, F. K. 1998. Reduces pyrene bioavailability in microbially active soils. Environmental Sciences and Technology. 32(4): 501-508.

Gundel, J., Mannschreck, C., Buttner, K. Ewers, U., and Angerer, J. 1996. Urinary levels of 1-hydroxypyrene, 1-,2-,3-, and 4-hydroxyphenanthrene in females living in an industrial area of Germany. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 31(4): 585-590.

Habe, H., and Omori. T. 2003. Genetic of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 67(2): 225-243.

Haderlein, A., Legros, R., and Ramsay, B. 2001. Enhancing pyrene mineralization in contaminated soil by the addition of humic acids or composted contaminated soil. Applied Microbiology and Biotechnology. 56: 555-559.

Haigh, S. D. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. Science of the Total Environment. 185: 161-170.

Hamdi, H., Benzart, S., Manusadzianas, L., Aoyama, I., and Jedidi, N. 2007. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controled conditions. Soil Biology and Biochemistry. 39(8): 1926 -1935.

Hati, S. S., Dimari, G. A., Egwu, G. O. and Ogugbuaja, V. O. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination of synthetic industrial essential oils utilized in Northern Nigeria. African Journal of Pure and Applied Chemistry. 3 (5): 86-91.

He-Ping, Z., Qing-Sheng, W., Lei, W., Xue-Tao, Z., Hong-Wen, G. 2009. Degradation of phenanthrene by bacterial strain isolated from soil in oil refinery fields in Shanghai China. Journal of Hazardous Materials. 164: 863–869.

Hupe, K., Koning, M., Luth, J.-C., Heerenklage, J., and Stegmann, R. 2001. Optimisation of microbial soil treatment. In: R. Stegmann, G. Brunner, W. Calmono and G. Matz, (eds.), Treatment of contaminated soil. pp. 342-353. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

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 Biotechnologica. 16(1): 19-30.

Jain, R. K., Kapur, M., Labana, S., Lal, B., Sarma, P.M., Bhattacharya, D. and Thakur, I.S. 2005. Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. Current Science. 89(1):101-112.

Johnsen, A. R., Schmidt, S., Hybholt, T. K., Henriksen, S., Jacobsen, C. S., and Andersen, O. 2006. Strong impact on the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading community of a PAH-polluted soil but marginal effect on PAHs degradation when priming with bioremediated soil dominated by Mycobacteria. Applied and Environmental Microbiology. 73(5): 1474-1480.

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.

Kästner, M. and Mahro, B. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. Applied Microbiology and Biotechnology. 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. Applied and Environmental Microbiology. 68: 699-700.

Komukai-Nakamura, S., Sugiura, K., and Yamauchi-Inomata, Y. 1996. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. Journal of Fermentation and Bioengineering. 82(6): 570-574.

Kriipsalu, M., Marques, M., Nammari, D. R., and Hogland, W. 2007. Bio-treatment of oily sludge: The contribution of amendment material to the content of target contaminants, and the biodegradation dynamics. Journal of Hazardous Materials. 148(3): 616-22.

Krishna, C. 2005. Solid-state fermentation systems – An overview. Critical Reviews in Biotechnology. 25: 1-30.

Labana, S., Kapur, M., Malik, K., Prakash, D., and Jain, RK., 2007. Diversity biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon. Environmental Bioremediation Technologies. 88: 409-443.

Lafortune, I., Juteau, P., Déziel, E., Lépine, F., Beaudet, R.and Villemur, R. 2009. Bacterial diversity of a consortium degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-liquid phase biosystem. Microbial Ecology. 57(3): 455-68.

Lee, S. 1995. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. US. Patent. 5: 427-944.

Luepromchai, E., Lertthamrongsak, W., Pinphanichakarn, P., Thaniyavarn, S., Pattaragulwanit, K., and Juntongjin, K. 2007. Biodegradation of PAHs in petroleum-contaminated soil using tamarind leaves as microbial inoculums. Songklanakarin Journal Science Technology. 29(2): 515-527.

Lundstedt, S., Haglund, P.and Öberg, L. 2003. Degradation and formation of polycyclic aromatic compounds during bioslurry treatment of an aged gasworks soil Environmental Toxicology and Chemistry. 22(7): 1413-1420.

Mahadevan, B., Luch, A., Bravo, C. F., Atkin, J., Steppen, L. B.,Pereira, C., Kerkvliet, N.I. and Baird, W. M. 2005. Dibenzo[a]pyrene induced DNA adduct formation in lung tissue in vivo. Cancer Letter. 227(1): 25-32.

Mahro, B. 2000. Bioavailability of contaminants. In: H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler and P. Stadler, Editors. Biotechnology. (Wiley-VCH, Weinheim). 11: 61–88.

Maria, C. S. 1999. Bioremediation of organic contaminants. In : Microbiological examination of water and wastewater. pp.79-84. CRC Florida, USA : Press LLC.

Means, J. C., J. J. Hassett, S. G. Wood, W. L. Banwart, S. Ali and A. Khan. 1980. Sorption properties of polynuclear aromatic hydrocarbons and sediments: heterocyclic and substituted compounds. Environmedtal Sciences and Technology. 14 (12): 1524–1528.

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.

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. Proceeding of the 1998 Conference on Hazardous Waste Research. 252-260.

Ogbonna, J. C., Liu, Y. C., Liu, Y. K., and Tanaka, H. 1994. Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for microbial cell immobilization. Journal of Fermentation and Bioengineering. 78(6): 437-442.

Ozaki, S., Kishimoto, N., and Fujita, T. 2007. Change in the predominant bacteria in a microbial consortium cultured on media containing aromatic and saturated hydrocarbons as the sole carbon source. Microbes and Environments. 22(2): 128-135.

Parekh, N. R., Hartmann, A., Charnay, M.-P., and Fournier, J.-C. 1995. Diversity of carbofuran-degrading soil bacteria and detection of plasmid encoded sequences homologous to the *mcd* gene. FEMS Microbiology Ecology. 17: 149 -160.

Patnaik, P. 1992. A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substrances. pp. 429-445. New York: Van Nortrand Reinhold.

Pattanasupong, A., Nagase, H., Inoue, M., Hirata, K., Tani, K., Nasu, M., and Miyamoto, K. 2004a. Ability of a microbial consortium to remove pesticide, carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 20: 517-522.

Pattanasupong, A., Nagase, H., Sugimoto, E., Hori, Y., Hirata, K., Tani, K., Nasu, M., and Miyamoto, K. 2004b. Degradation of carbendazim and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid by immobilized consortium on loofa sponge. Journal of Bioscience and Bioengineering. 98(1): 28-33.

Reda, A. and Bayoumi., 2009. Bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy oil contaminated soil. Journal of Applied Sciences Research. 5(2): 197-211.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sardar, K., Qing, C., Lin, A. and Zhu, Y.G. 2008. Concentrations and bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater-irrigated soil using in vitro gastrointestinal test. Environmental Science and Pollution Research. 15: 344–353.

Šašek, V., Bhatt, M., Cajthaml, K., and Lednická, D. 2003. Compost-mediated removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 44: 336-342.

Sei, K., Asano, 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(4): 193-204.

Seo, J. S., Keum, Y. S., and Li, Q. X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. International Journal of Environmental Research and Public Health. 6(1): 278-309.

Siddique, T., Okeke, B. C., Zhang, Y., Arshad, M., Han, S. K., and Frankenberger, W. T. 2005. Bacterial diversity in selenium reduction of agricultural drainage water amended with rice straw. Journal of Environmental Quality. 34(1): 217-226.

Simonich, S. L. and Hites, R. A. 1994. Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental Sciences and Technology. 28: 939-943.

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. PP.89

Staci, L., Simonich, S. L., and Hites, R. A. 1994. Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental Sciences and Technology. 28: 939-943.

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-Hernandez, 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 Bioprocesses. London: Tayler and Francis Limited.

Trzesicka-Mlynarz, D. T. and Ward, O. P. 1996. Degradation of fluoranthrene in a soil matrix by indigenous and introduced bacteria. Biotechnology Letters. 18: 181-186.

U.S. EPA. 1987. Health and environmental effects profile for phenanthrene: The environmental criteria and assessment office, office of health and environmental assessment, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, for the office of solid waste and emergency response ECAO-CIN-P226.

Valentín, L., Lu-Chau, T. A., López C., Feijoo, G., Moreira, M.T., Lema, J.M. 2007 Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by white rot fungus *Bjerkandera sp.* BOS55. Process Biochemistry. 42: 641-648.

Van Dyked, M. I.and Prosser, J. I. 2000. Enhanced survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil following establishment of inoculum in a sterile soil carrier. Soil Biology and Biochemistry. 32(10): 1377-1382.

Van Veen, J. A., Van Overbeek, L. S., and Van Elsas, J. D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 61: 121-135.

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.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. Pure and Applied Chemistry. 73(7): 1163 - 1172.

Wang, J. K., Liu, J. X., Li, J. Y., Wu, Y. M. and Ye, J. A. 2005. Histological and rumen degradation changes of rice straw stem epidermis as influenced by chemical pretreatment. Animal Feed Science and Technology.136: 51–62.

Weissenfels, W. D., Klewer, H. J., and Langhoff, J. 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: Influence on biodegradability and biotoxicity. Applied Microbiology and Biotechnology. 36: 689-696.

Wilson, S. C. and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Environmental Pollution. 81: 229-249.

Ying, C. Q., Hui, M. C., Tang, W. Q., Yun, Z. Q., Katsoyiannis, A., and Férard, J. F. 2007. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated sewage sludge by different composting processes. Journal of Hazardous Materials. 142: 535-542.

Yu, S. H., Ke. L., Wong, Y. S. and Tam, N. F. Y. 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. Environmental International. 31: 149-154.

Zanieri, L., Galvan, P., Checchini, L., Cincinelli, A., and Lepri, L. 2007. Policyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women : Influence of cigarette smoking and residential area. Chemosphere. 67: 1265-1274

Zhou, E. and Ronald, L. 1995. Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. Biodegradation. 6: 127-140.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM)

ก.

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	5.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม

ข.

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพทะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม
เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.005	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.005	กรัม

ชั่งสารส่วน ก. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้เป็น 7.นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที สารละลายส่วน ข. ทำการเตรียมแยกแต่ละชนิดแล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงเติมลงในอาหารส่วน ก.

2. **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

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** Luria-Bertani (LB broth)

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

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

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

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ละลายวุ้น (Bacto Agar) 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. **สารละลายโซเดียมคลอไรด์** 0.85%

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

2. **สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล**

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

3. **สารละลายฟีแนนทรีน ความเข้มข้น** 5,000 **มิลลิกรัมต่อลิตร ในไดเมธิลซัลฟอกไซด์**

ชั่งฟีแนนทรีน 0.1 กรัม ละลายในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 20 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจน PAHs ละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ –20 °ซ

4. **สารละลายไพรีน ความเข้มข้น** 5,000 **มิลลิกรัมต่อลิตร ในไดเมธิลซัลฟอกไซด์**

ชั่งไพรีนอย่างละ 0.05 กรัม ละลายในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 20 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจน PAHs ละลายหมด ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บในขวดสีชาหรือห่อให้มิดชิดเก็บที่อุณหภูมิ –20 °ซ

5. **สารละลายฟีแนนทรีนและไพรีนในอะซีโตน**

ชั่งฟีแนนทรีนและไพรีนอย่างละ 25 มิลลิกรัม ละลายในอะซีโตนปริมาตร 50 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจน PAHs ละลายหมด กรองผ่านหัวกรองชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.2 ไมโครเมตร (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ เนื่องจากอะซีโตนระเหยเร็วมาก และขณะเติมสาร PAHs ที่ละลายในอะซีโตนลงในดินควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อไม่ให้อะซีโตนระเหยซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงได้)

6. **สารละลาย** Triton X-100 15%

Triton X-100	15	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	85	มิลลิลิตร

7. **สารปฏิชีวนะ**

ละลายนิสเตติน (Nystatin) 40 มิลลิกรัมใน ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ

8. **สารละลาย 10% SDS**

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

9. 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 15 นาที

10. 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 15 นาที

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

CTAB	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 ^{o}ซ ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที

12. **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. เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที

13. **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 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที

14. High extraction buffer

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

15. **สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์**

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

16. **สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์**

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

17. Loading dye

Bromphenolblue	0.025 %
ซูโครส	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

18. **สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์**

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

19. **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 15 นาที

20. **สารละลายโปรตีเนสเค** (proteinase K) **ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

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

21. **สารละลาย** RNase A **เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

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

22. 70% **เอธานอล**

99% เอธานอล	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

23. **อะกาโรสเจลเข้มข้น** 1.0%

อะกาโรสเจล	1	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน

24. 0% denaturing solution

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

25. 80% denaturing solution

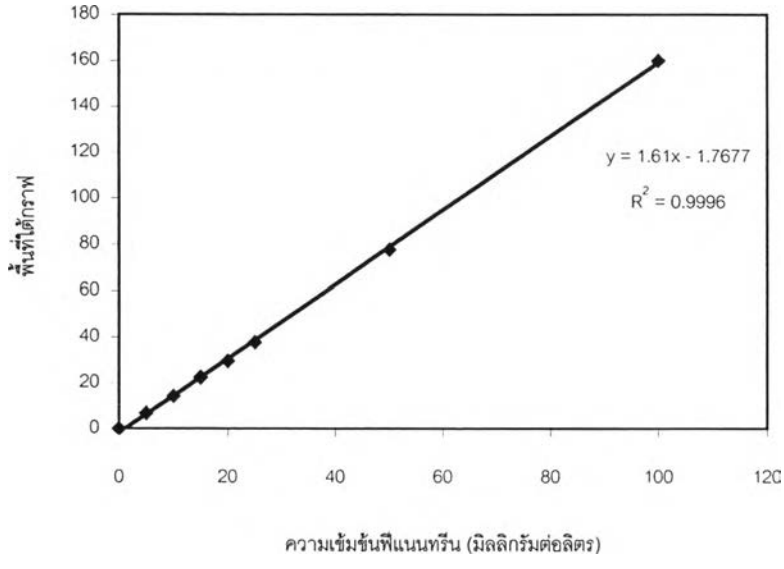
40% อะคริลาไมด์/บิส	8.13	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	1	มิลลิลิตร
ฟอร์มาไมด์	16	มิลลิลิตร
ยูเรีย	16.82	กรัม
น้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร	50	มิลลิลิตร

26. **แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น** 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน



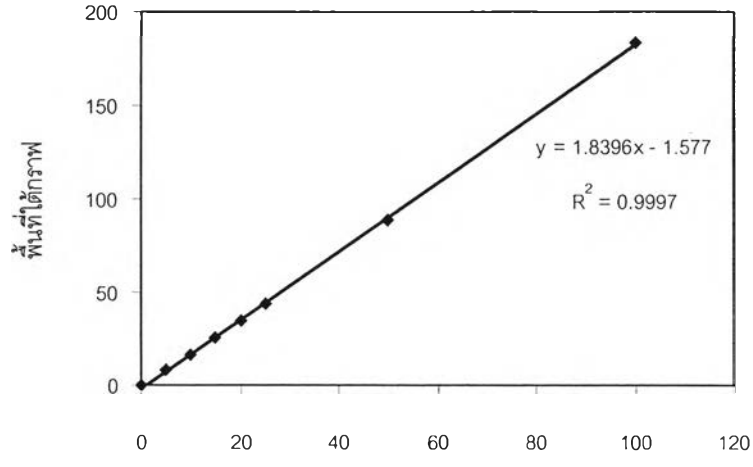
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นฟีแนนทรีน

ความเข้มข้นของฟีแนนทรีนคำนวนได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี มาแทนในค่าสมการเส้นตรงดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = (ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน x ปริมาณฟีแนนทรีน) - จุดตัดแกน y

โดยที่ ความชันของกราฟมาตรฐาน = 1.61

จุดตัดแกน y = 1.7677



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นไพรีน

ความเข้มข้นของไพรีนคำนวนได้จากนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี มาแทนในค่าสมการเส้นตรงดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = (ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน x ปริมาณฟีแนนทรีน) - จุดตัดแกน y

โดยที่ ความชันของกราฟมาตรฐาน = 1.8396

จุดตัดแกน y = 1.577

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวณัฐธิดา สุปัญญากร เกิดวันที่ 8 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2526 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ในปีการศึกษา 2548 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549

ผลงานที่เผยแพร่

Supanyakorn, N., Juntongjin, K., Pinpanichakarn, P., and Pattaragulwanit, K. 2009. Pyrene and phenanthrene degradation by bacterial consortium RRM-V3 prepared in agriculturel materials. The 21th Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology. pp.368-374.