

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- กรมควบคุมมลพิษ. 2537. ของเสียนันตราย รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2537: 139-141.
- สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน. 2542. การกำจัดสารพิษอันตรายจากโรงงานอุตสาหกรรม เอกสาร/ระกอบการศึกษาเผยแพร่โดยสำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน กรมโรงงานอุตสาหกรรม
- นราธิป เลหาดีรานนท์. 1997. ฐานข้อมูลกากของเสียนันตรายในเขตกรุงเทพมหานคร Thai Environment Engineering J. 10: 26-30.
- พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535
- พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535.

### ภาษาอังกฤษ

- Acce, M.J., Moore, C.R., Alexander, M. 1988. Survival and growth of bacteria introduced into soil. Soil Biol. Biochem. 20: 509-515.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 21: 401-410.
- Anon. 1991. Soil cleanup levels for petroleum product spills vary from state to state. The Hazardous Waste Consultant. May/ June 2.12-2.15.
- Barnsley, E.A. 1983. Phthalate pathway of phenanthrene metabolism: formation of 2'-carboxybenzylpyruvate. J. Bacteriol. 154: 113-117.
- Bauer, J.E., and Capone, D.G. 1985. Degradation and mineralisation of polycyclic aromatic hydrocarbons anthracene and naphthalene in intertidal marine sediments Appl. Environ. Microbiol. 50: 81-90.
- Bender, M.E., Hargis, W.J., Huggett, R.T., Robert, M.H. 1988 Effect of polynuclear aromatic hydrocarbons on fishes and shellfish: An overview of research in Virginia. Mar. Environ. Res. 24: 237-241.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P.P., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E. 1996. Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2547-2553.

- Blumer, M. 1976. Polycyclic aromatic hydrocarbons in nature. Sci. Am. 234: 34-44.
- Bos, R.P., Theuws, J.L.C., Leijdekkers, C.M., Henderson, P.T. 1984. The presence of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons benzo[a]pyrene and benz[a]anthracene in creosote P1. Mut. Res. 130: 153-158.
- Boucher, M., Blanchet, D., Vandecasteele, J.P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strain and defined strain association: inhibition phenomena and co-metabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 156-164.
- Bunz, P.V., and Cook, A.M. 1993. Dihenzofuran 4,4a-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW1: angular dioxygenation by three-component enzyme system. J. Bacteriol. 175: 6467-6475.
- CCME. 1991. Canadian Council of Ministers of the Environment: Interim Canadian Environmental Quality Criteria for Contaminated Sites. Report CCME EPC-CS3 Winnipeg, Manitoba, Canada, September 1991.
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3:351-368.
- Cerniglia, C.E., and Yang, S.K. 1984. Stereoselective metabolism of anthracene and phenanthrene by the fungus *Cunninghamiella elegans*. Appl. Environ. Microbiol. 47: 119-124.
- Chatterjee, D.K., Kibane, J.J., Carkrabarty, A.M. 1982. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid in soil by a pure culture of *Pseudomonas* species. Appl. Environ. Microbiol. 44: 514-516.
- Claxton, L.D., Houk, V.S., Williams, R., Kremer, F. 1991. Effect of bioremediation on the mutagenicity of oil spill in Prince William Sound, Alaska. Chemosphere 23: 647-650.
- Cobb, G.P., Feng, Z., Kendall, R.T. 1993. Correlation between polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in soils from western Washington. Toxicol. Environ. Chem. 38: 207-224.
- Considine, D.M. 1974. Coal Tar and Derivatives. In. Chemical and process technology encyclopedia. Copyright McGraw-Hill, Inc. NY. St. Louis USA. pp 128.
- Denneman, C.A.J. 1991, 1992. Personal communications Ministry of Housing, Physical Planning and Environment DGM: Division DWB. PO Box 450, 2260 MB Leidschendam, The Netherlands.

- Denome, S.A., Stanley, D.C., Olson, E.S., Young, K.D. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. J. Bacteriol. 175: 6890-6891.
- Dibble, J.T., and Bartha, R., 1979. Effect of environment parameters on the biodegradation of oil sludge. Appl. Environ. Microbiol. 37: 729-739.
- Errampalli, D., Okamura, H., Lee, H., Trevors, J.T., Van-Elsas, J.D. 1998. Green fluorescent protein as a marker to monitor survival of phenanthrene-mineralizing *Pseudomonas* sp. UG14Gr in creosote-contaminated soil. FEMS. Microbiol. Ecol. 26: 181-191.
- Escheubash, A., Kastner, M., Bierl, R., Schaefer, G., Mahro, B. 1994. Evaluation of a new and more effective method to extract polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. Chemosphere. 28: 683-692.
- Evans, W.C., Fernley, H.N., Griffiths, E. 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads: the ring fission mechanism. Biochem. J. 95: 819-831.
- Geiselhrecht, A.D., Hedlund, B.P., Tichi, M.A., Staley, J.T. 1998. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strain from the Gulf of Mexico and comparison of their PAH degrading ability with that of Puget Sound *Cycloclasticus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4703-4710.
- Goyal, A.K., and Zylstra, G.J. 1996. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. Appl. Environ. Microbiol. 62: 230-236.
- Grifoll, M., Casellas, M., Bayona, M.J., Solanas, A.M. 1992. Isolation and characterization of fluorene-degrading bacteria: identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2910-2917.
- Grifoll, M., Selifonov, S.A., Gatlin, C.V., Chapman, P.J. 1995. Action of versatile fluorene-degrading bacterial isolated on polycyclic aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723.
- Grimmer, G., Jacobs, J., Naujack, K.W. 1983. Profile of polycyclic aromatic compounds from crude oil. Fresenius Z. Anal. Chem. 314: 29-36.
- Grosser, R.J., Warshawsky, D., Yestel, J.R. 1991. Indigenous and enhanced mineralisation of pyrene, benzo[a]pyrene and carbazole in soil. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3462-3469.
- Guerin, W.F., and Jones, G.E. 1988. Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 54: 937-944.

- Haigh, N. 1990. EEC Environmental Policy and Britain, 2<sup>nd</sup> revised edition Longman Group UK Ltd, Harlow, UK.
- Hammel, K.E., Kalyanaraman, B., Kick, T.K. 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon and dibenzo[*p*]dioxin by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. J. Biol. Chem. 291: 16948-16952.
- Hammel, K.E., Gai, W.Z., Green, B., Moen, M.a. 1992. Oxidative degradation of phenanthrene by lignolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1832-1838.
- Harayama, S. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. Curr. Opinion. Biotechnol. 8:268-273.
- Heitkamp, M.A., and Cerniglia, C.E. 1988. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbon by bacterium isolated from sediment below an oil field. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1612-1614.
- I.C.R.C.L. 1987. Interdepartmental Committee on the Redevelopment of contaminated land. Guidance on the assessment and redevelopment of contaminated land. 59/83, HMSO, London, 2<sup>nd</sup> edition.
- Iwabuchi, T., Inomata -Yamauchi, Y., Katsuta, A., Harayama, S. 1997. Isolation and characterization of marine Nocardioideae capable of growing and degrading phenanthrene at 42 °C. J. Mar. Biotech. in press
- Jeflic, L., and Adams, R.N. 1970. Electrochemical oxidation pathway of benzo[*a*]pyrene. J. Amer. Chem. Soc. 92: 1332-1337.
- Juhasz, A.L., Britz, M.L., Stanley, G.A. 1997a. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[*a*]anthracene and dibenz[*a,h*]anthracene by *Burkholderia cepacia*. Microbiol. 83: 189-198.
- Juhasz, A.L., Stanley, G.A., Davey, B., Britz, M.L. 1997b. Evaluation of high molecular weight PAH degradation by a pyrene-enriched microbial community in inoculated soils. In D.L. Wise(ed.): Global Environmental Biotechnology, pp 475-487 Kluwer Academic Publishers Printed in Great Britain.
- Keith, L.H., and Telliard, W.A. 1979. Priority pollutants: A perspective view. Environ. Sci. Technol. 13: 416-423.
- Kesk, J., Sim, R.C., Coover, M.P., Park, K.S., Symon, B. 1989. Evidence for cooxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Water Research 23: 1467-1476.

- Khan, A.A., Wang, R.F., Cao, W.W., Franklin, W. Cerniglia, C.E. 1996. Reclassification of polycyclic aromatic hydrocarbons-metabolizing bacterial strain, *Beijerinckia* sp. strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by fatty acid analysis, protein pattern analysis, and 16S rDNA sequencing. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 341-343.
- Kiyohara, H., Nagao, K., Nomi, R. 1976. Degradation of phenanthrene through o-phthalate by an *Aeromonas* sp. Agric. Biol. Chem. Soc. 99: 8121-8123.
- Kiyohara, H., Nagao, K., Yana, K. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water insoluble, solid hydrocarbon on agar plates. Appl. Environ. Microbiol. 43: 454-457.
- Kiyohara, H., Torigoe, S., Kaida, N., Asaki, T., Iida, T., Hayashi, H., Takizawa, N. 1994. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, pah, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilizing by *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. 176: 2439-2443.
- Kusk, K.O. 1981. Comparison of the effects of aromatic hydrocarbons on a laboratory alga and natural phytoplankton. Bot. Mar. 24: 611-613.
- Lee, S., Cutright, T.J. 1996. Nutrient medium for the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. US Patent 5,508,194.
- Lewis, R.J. 1991. Evaluation of Implanted Materials for Carcinogenic Potential. In Carcinogenically Active Chemicals A Reference Guide. Copyright 1991 Van Nostrand Reinhold printed in NY. USA. pp: 794.
- MacGillivray, A.R., Shiaris, M.P. 1993. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1613-1618.
- Means, J.C., Ward, S.G., Hassett, J.J., Banwart, W.L. 1980. Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediment and soil. Environ. Sci. Technol. 14: 1524-1528.
- Megharaj, M., Wittich, R.M., Blasco, R., Pieper, D.H. 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.
- Menn, F.M., Applegate, B.M., Sayler, G.S. 1993. NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1938-1942.
- Morawski, B., Eaton, R.W., Rossiter, J.T., Guoping, S., Griengl, H., Ribbons, D.W. 1997. 2-Naphthoate catabolic pathway in *Burkholderia* strain JT1500. J. Bacteriol. 179: 115-121.

- Mueller, J.G., Champman, P.J., Pritchard, P.H. 1989. Action of fluorene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3085-3090.
- Narro, M.L., Cerniglia, C.E., Van Balen, C., Gibson, D.T. 1992. Metabolism of phenanthrene on the marine cyanobacterium *Agmellum quadruplicatum* PR-6. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1351-1359.
- Omori, T., Monna, L., Saiki, Y., Komma, T. 1992. Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strain SY1. Appl. Environ. Microbiol. 58: 911-918.
- Palleroni, N.J. 1994. Gram-negative aerobic rods and cocci, p 140-199. In. N.R. Krieg and J.G. Holt(ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The William & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Pipe, R.K., and Moore, M.N. 1986 a. An ultrastructural study on the effect of phenanthrene on lysosomal membranes and distribution of the lysosomal enzyme  $\beta$ -glucuronidase in digestive cells of the periwinkle *Littorina littorea*. Aquat. Toxicol. 8:65-76.
- Pipe, R.K., and Moore, M.N. 1986 b. Arylsulphatase activity associated with phenanthrene induced digestive cell deletion in marine mussel *Mytilus edulis*. Histochem. J. 18: 557-564.
- Pui-ock, S., and Ruchirawat, M. 1999. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Bangkok air samples by HPLC. In *Chemicals in the 21<sup>st</sup> century: The Fourth Princess Chulabhorn international Science Congress*. Bangkok, Thailand. organized by Chulabhorn Research Institute.
- Rehmann, K., Noll, H.P., Steinberg, C.E., Ketrup, A.A. 1998. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KP2. Chemosphere 36: 2977-2992.
- Romero, M.C., Cazau, M.G., Giorgieri, S., Arambari, A.M. 1998. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. Environ. Pollut. 101: 355-359.
- Sack, U., and Gunther, T. 1993. Metabolism of PAH by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities. J. Basic. Microbiol. 33: 269-277.
- Sack, U., Heinze, T.M., Deck, J., Cerniglia, C.E., Martens, R., Zadrazil, F., Fritsche, W. 1997. Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3919-3925.
- Shailubhai, K. 1986. Treatment of petroleum industry oil sludge in soil. Trends in Biotech. (August) 202-206.

- Sim, P., Grover, P.L., Swaisland, A., Pal, K., Hewer, A. 1974. Metabolic activation of benzo[a]pyrene proceeds by a diol-epoxide. Nature 202: 326-328.
- Sim, R.C., and Overcash, M.R. 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. Residue Rev. 88: 1-68.
- Sim, R.C. 1990. Soil remediation techniques at uncontrolled hazardous waste sites. A critical review. J. Air Waste Management Association 40: 704-732.
- Soda, S., Watatani, H., Ike, M., Fugita, M. 1993. Factor affecting the survival of exogenous bacteria in microbial ecosystems: existence of indigenous bacteria with antagonistic activity. Biocont. Sci. 3: 63-72.
- Soil Survey Staff 1951. Soil Survey Manual. U.S.D.A. Handbook No. 13 U.S. Govern. Printing Office, Washington, D.C.
- Stringfellow, W.T., and Aitken, M.D. 1994. Comparative physiology of phenanthrene degradation by two dissimilar pseudomonas isolated from a creosote-contaminated soil. Can. J. Microbiol. 40: 432-438.
- Stringfellow, W.T. and Aitken, M.D. 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes and fluorene by phenanthrene-degrading *Pseudomonas*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 357-362.
- Sutherland, J.B., Fu, P.P., Yang, S.K., Von Tungeln, L.S., Casillas, R.P., Crow, S.A., Cerniglia, C.E. 1993. Enantiomeric composition of the trans-dihydrodiols produced from phenanthrene by fungi. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2145-2149.
- Thakker, D.R., Levin, W., Yagi, H., Tada, M., Conney, A.H., Jerina, D.M. 1979. Comparative metabolism of dihydrodiols of polycyclic aromatic hydrocarbons to bay-region diols epoxides. In *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Biological Effects: Fourth International Symposium* sponsored by U.S. Environmental Protection Agency.
- Van Veen, J.A., Van Overbeek, L.S., Van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 121-135.
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J., Rehm, H.J. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 671-676.
- Weissenfels, W.D., Klewer, H.J., Langhoff, J. 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 689-696.

- Wilson, S.C., and Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbon in soil (PAHs) a review. Environ. Pollution, 81: 229-249.
- Yang, Y., Chen, R.F., Shiaris, G.S. 1994. Metabolism of naphthalene, fluorene, and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. J. Bacteriol. 176: 2158-2164.
- Ye, D., Siddigi, M.A., Maccubbin, A.E., Kumer, S., Sikka, H.C. 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. Environ. Sci. Tech. 30: 136-142.
- Zhou, E. and Grawford, R.L. 1995. Effect of oxygen, nitrogen and temperature on gasoline biodegradation in soil. Biodegradation, 6: 127-140.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว minimum mineral (MM medium)

ประกอบด้วย แอมโมเนียมไนเตรด ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	3	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	5.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.01	กรัม
เฟอร์รึคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.005	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.005	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับความเป็นกรดค่าเป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ.) เป็นเวลา 20 นาที

## 2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง minimum mineral (MM agar)

ละลายส่วน bacto agar 15 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว minimum mineral ปริมาตร 1,000 มล. ปรับความเป็นกรดค่าเป็น 7.5 นำไปต้มให้ละลายและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ.) เป็นเวลา 20 นาที

### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria Bertani (LB agar)

ประกอบด้วย ทริปโตน	10 กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5 กรัม
วุ้นผง	15 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับความเป็นกรดค่าเป็น 7.0 นำไปต้มให้ละลายและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ.) เป็นเวลา 20 นาที

### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง rose bengal (RB medium)

ประกอบด้วย แคมโคโตเปปโตน	5 กรัม
กฏโคส	10 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	1 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.5 กรัม
โรสเบงกอล (rose bengal)	33 มก.
วุ้นผง	20 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับความเป็นกรดค่าเป็น 6.8 นำไปต้มให้ละลายและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ.) เป็นเวลา 20 นาที

## ภาคผนวก ข

## สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายฟิแนนทรีนในไดเมทิลซัลโฟลไซด์ (phenanthrene in DMSO solution)

ชั่งฟิแนนทรีน 0.1 กรัมละลายในไดเมทิลซัลโฟลไซด์ปริมาตร 10 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนฟิแนนทรีนละลายหมด นำมากรองผ่านหัวกรองแบบ PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บไว้ในขวดสีเข้มที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$ . แต่ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้

2. สารละลายฟิแนนทรีนในไดเอทิลอีเทอร์ (phenanthrene in diethylether solution)

ชั่งฟิแนนทรีน 2 กรัมละลายในไดเอทิลอีเทอร์ 100 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนละลายหมดนำมากรองผ่านหัวกรองแบบ PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บไว้ในขวดสีเข้มที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$ . แต่ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 ไมโคร โมลาร์ ( $10\ \mu\text{M NaOH}$ )

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัมละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มล.

4. สารละลายเมทธานอลเข้มข้น 80% (ปริมาตรต่อปริมาตร)

ดูดเมทธานอลปริมาตร 800 มล. ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1,000 มล.

#### 5. สารละลายไดอะโซมีเทน (diazomethane)

ชั่งผง พารา-โทลูอินซัลโฟนิล-เอ็น-เมทริล-เอ็น-ไนโตรซามิด (*p*-toluenesulfonyl-N-methyl-N-nitrosamide) 10 กรัม ตงในขวดทำปฏิกิริยาเคมีชนิดมีท่อระบายก๊าซ เดิมไดเอทริลอีเทอร์ ปริมาณเล็กน้อยลงไปทำละลาย ถ้าไม่ละลายเติมเมทานอลลงไปเล็กน้อยโดยทำปฏิกิริยานี้ใน กล่องน้ำแข็งเมื่อเกิดการละลายโดยสมบูรณ์เติมสารละลายอิ่มตัวของโพแทสเซียมในเอทานอล (KOH in ethanol solution) ลงไปทำปฏิกิริยาในชั้นคอนนี้จะมีก๊าซสีเหลืองของไดอะโซมีเทนเกิดขึ้นและจะทยอยออกจากขวดทำปฏิกิริยาทางท่อระบายก๊าซไปสะสมอยู่ในไดเอทริลอีเทอร์ซึ่งบรรจุ อยู่ในขวดตีเข้มที่ต่อกับขวดทำปฏิกิริยา เก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$ .

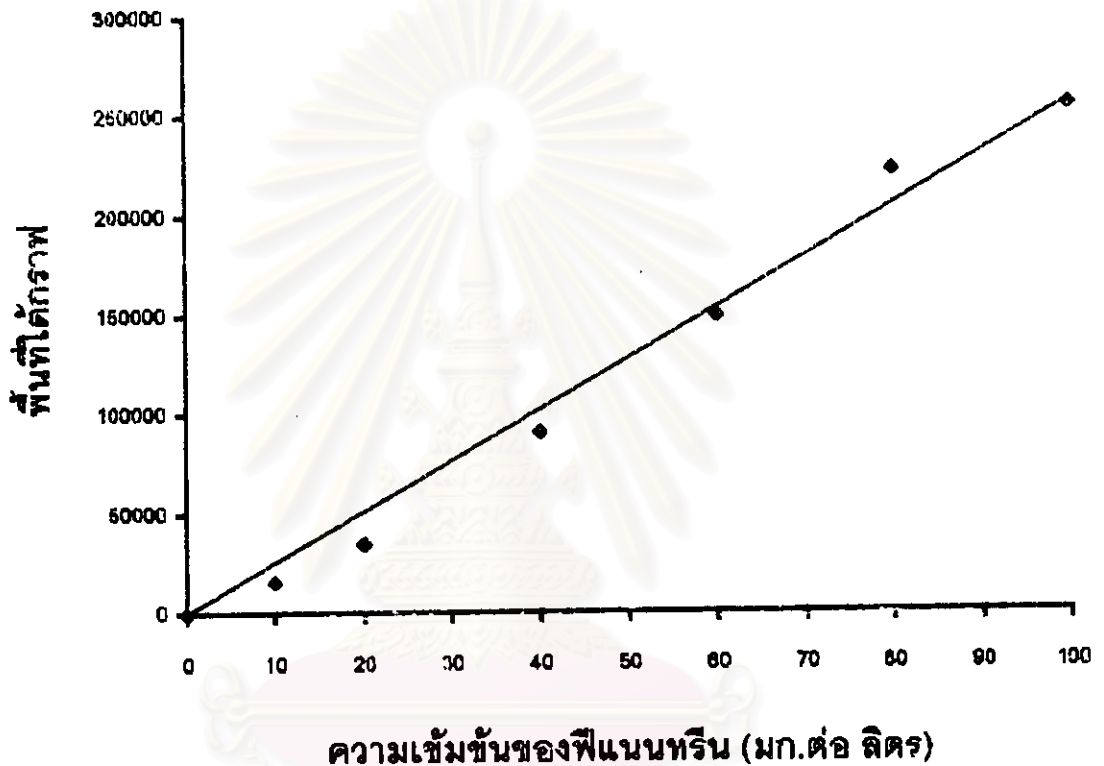
#### 6. สารละลายฟีนแอนทรีนในอะซิโตน (phenanthrene in acetone solution)

ชั่งฟีนแอนทรีน 0.05 กรัม ละลายในอะซิโตนปริมาตร 10 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจน ละลายหมด กรองผ่านหัวกรองชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$ .

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## 1. กราฟมาตรฐานของฟีแนนทริน



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟีแนนทรินกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

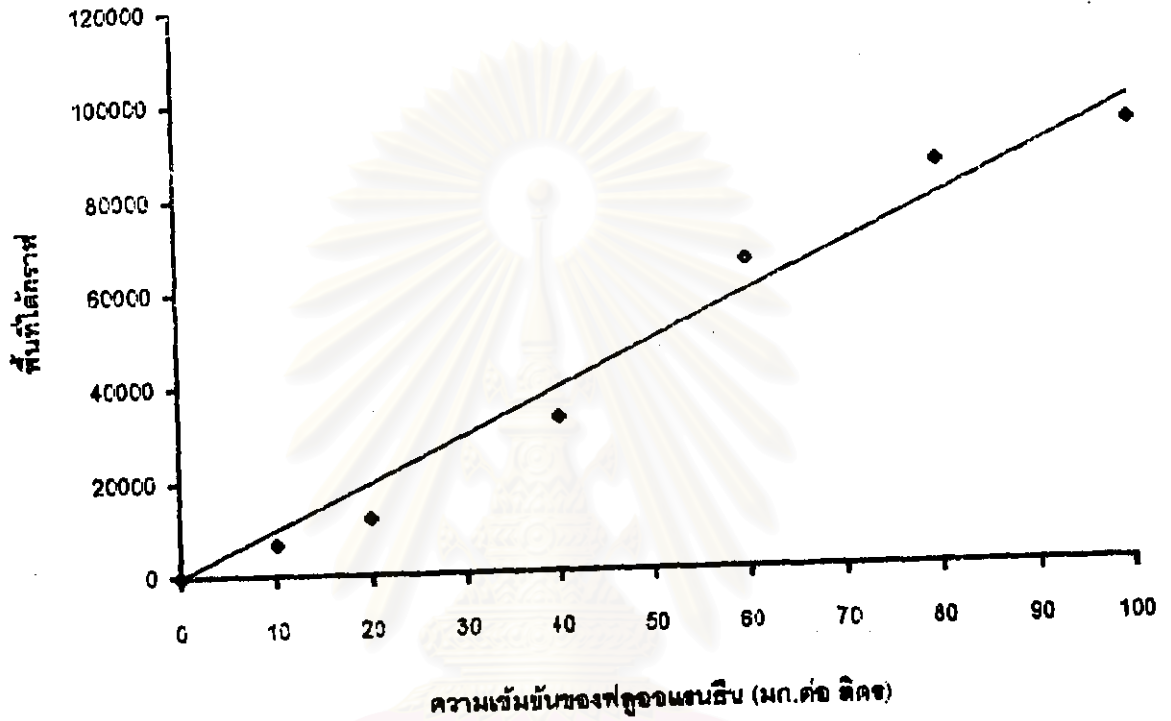
หาความเข้มข้นของฟีแนนทรินได้จากกรณำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณฟีแนนทริน}) - \text{จุดตัดแกนวาย}$$

โดยที่: ความชันของกราฟมาตรฐาน = 2691.942

จุดตัดแกนวาย = -10206.6

## 2. กราฟมาตรฐานของฟลูออเรนซิน



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออเรนซินกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

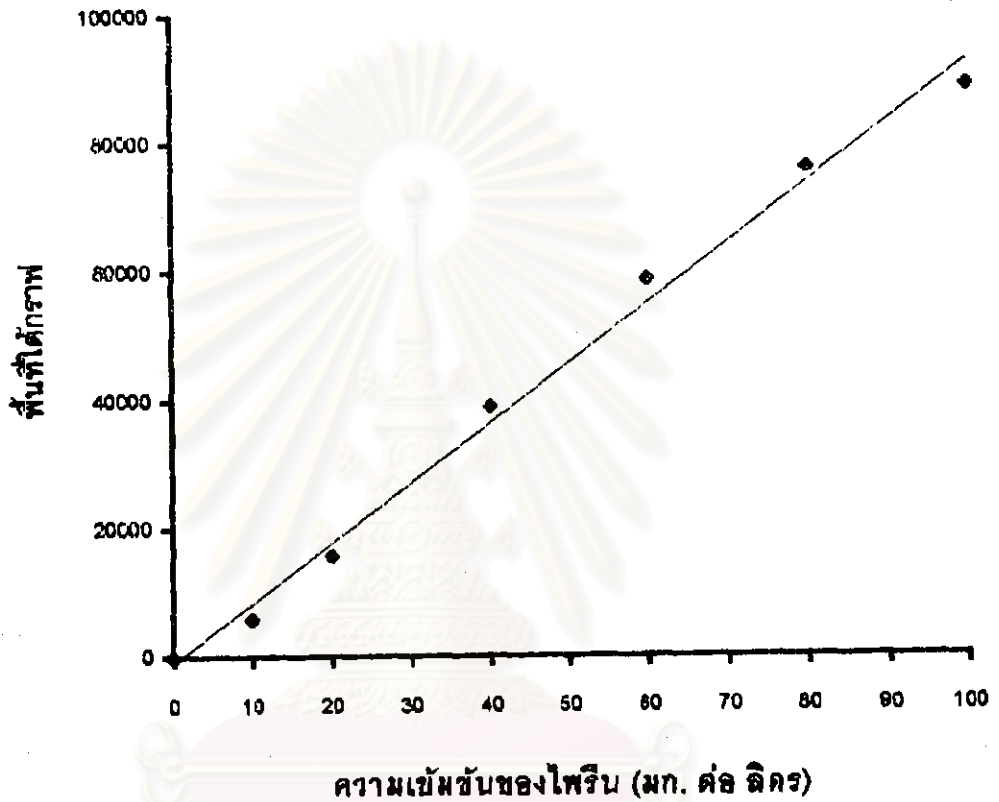
หากความเข้มข้นของฟลูออเรนซิน ได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = (ความชันของกราฟมาตรฐาน x ปริมาณฟลูออเรนซิน) - จุดตัดแกนวาย

โดยที่: ความชันของกราฟมาตรฐาน = 1024.037

จุดตัดแกนวาย = -3286.92

## 3. กราฟมาตรฐานของไพรีน



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไพรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

หาความเข้มข้นของไพรีนได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = (\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาณไพรีน}) - \text{จุดตัดแกนวาย}$$

$$\text{โดยที่: ความชันของกราฟมาตรฐาน} = 930.239$$

$$\text{จุดตัดแกนวาย} = -794.058$$



#### 4. วิธีการสกัดและวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

##### 4.1 การสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรีย

ละลายเซลล์แบคทีเรียใน TE บัฟเฟอร์ เดิมโปรตีนเอส เค เพื่อกำจัดโปรตีนเดิม CTAB เพื่อกำจัดตะกอนจากเซลล์และโปรตีนที่เหลืออยู่ ตกตะกอนดีเอ็นเอในส่วนน้ำใสด้วยไอโซโพรพานอลละลายดีเอ็นเออีกครั้งด้วย TE บัฟเฟอร์ที่มีอาร์เอ็นเอส วัตถุประสงค์จากการดูกลิ่นแสงที่ 260 นาโนเมตร

##### 4.2 การตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี อีเล็กโตรโฟรีซิส

เติมสารละลายดีเอ็นเอของหลอดบน 0.9% อกาโรส เจล นำไปวางได้อีเล็กโตรโฟรีซิสบัฟเฟอร์ตรวจสอบ DNA ที่ได้โดยวิธีอีเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ Marker 6 เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอ ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสีย้อมเอธิเดียม บรอมได์ (ethidium bromide) ตรวจสอบแถบ DNA ภายใต้แสงยูวี

##### 4.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA คือ

ไพรเมอร์ 1 8F 5'-TCGAAATCGGATCCAGTITGATCCTGGCTC-3'

ไพรเมอร์ 2 15R 5'-TCGAATTCGGATCCAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

นำรีเอเจนต์สำหรับทำปฏิกิริยามาผสมกันและนำไปใส่ในเครื่อง PCR ซ้ำ 40 รอบ นำผลผลิตที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านสปีนคอลัมน์ (spin column) ตกตะกอนดีเอ็นเอคู่สม (cDNA) ด้วยเอทานอล วัตถุประสงค์จากการดูกลิ่นแสง

#### 4.4 การวิเคราะห์และหาลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอ

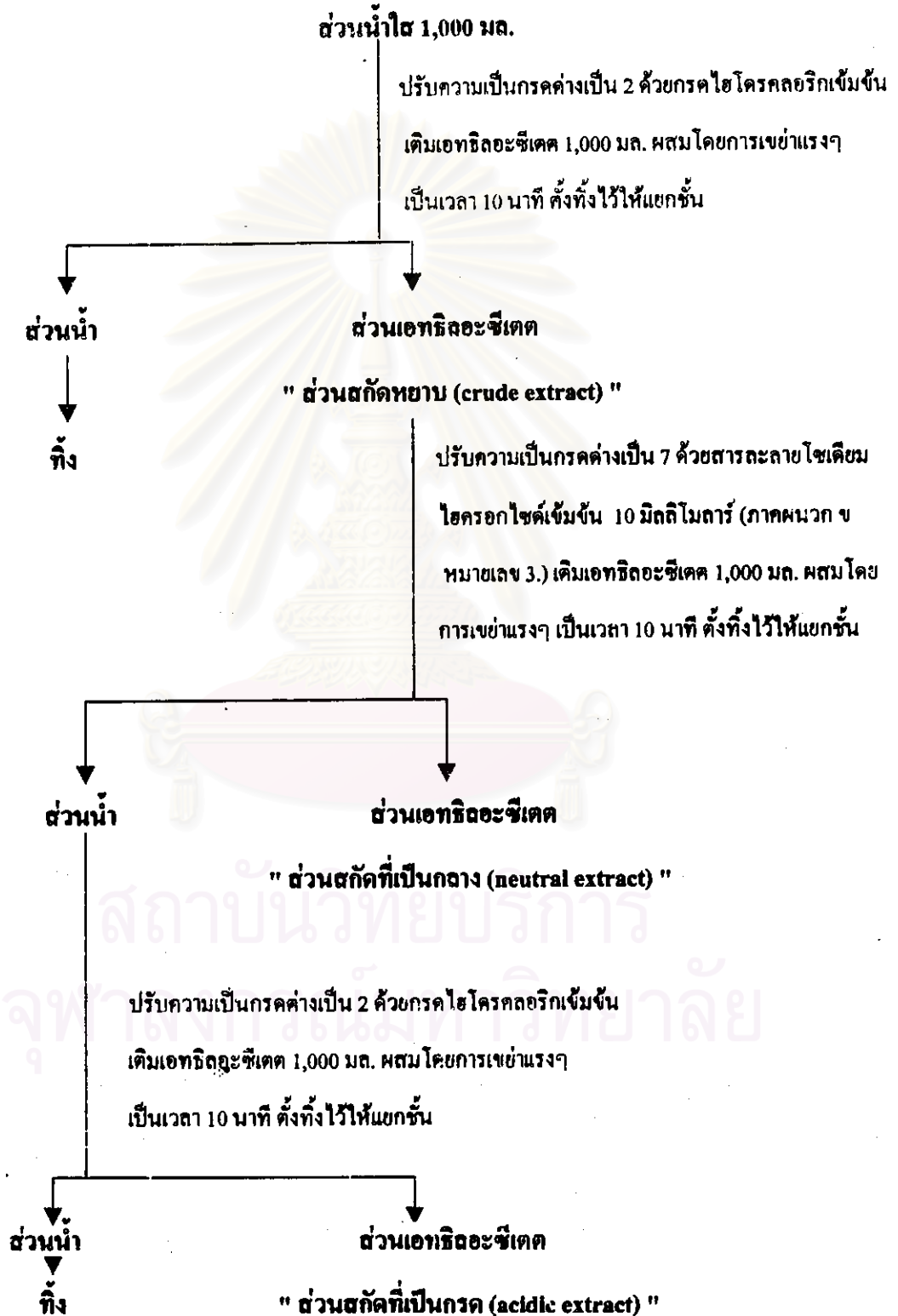
เนื่องจากเครื่องหาลำดับเบส (sequencer) ที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถหาลำดับเบสได้เพียงครั้งละ 400 เบส ดังนั้นจำเป็นต้องใช้ forward และ reverse ไพรมเมอร์เป็นช่วงจำนวน 8 ช่วง นำรีเอเจนต์ผสมกันแล้วนำไปใส่ในเครื่อง PCR ซ้ำ 25 รอบ นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วมาเติมสารละลาย 3 โมลาร์โซเดียมอะซิเตด pH 4.6 ผสมด้วยเครื่องปั่นผสม เติมหเอทานอล แยกส่วนน้ำใสออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 °ซ. เติมสารละลาย 70% เอทานอลลงไปละลายตะกอน DNA และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิมแยกส่วนน้ำใสทิ้งไป

#### 4.5 การหาลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอ

โหลดตัวอย่างลงบนแผ่นเจลโพลีอะคริลามิด (polyacrylamide) หาลำดับเบสโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหาลำดับเบสที่ติดตั้งกับคอมพิวเตอร์ Macintosh R. ซึ่งรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16 เอส โรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดแยกได้กับลำดับเบสที่มีรายงานไว้ใน EMBL และ Gen Bank. โดยใช้โปรแกรม BLAST (Altschul et al., 1990)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. แขนงแสดงวิธีการสกัดสารมัธยันท์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟิแนนทรินจากอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดวก่อนที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์



## 6. การทำสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีซิลิกาเจลคอลลัมน์โครมาโตกราฟี

### 6.1 การเตรียมคอลลัมน์

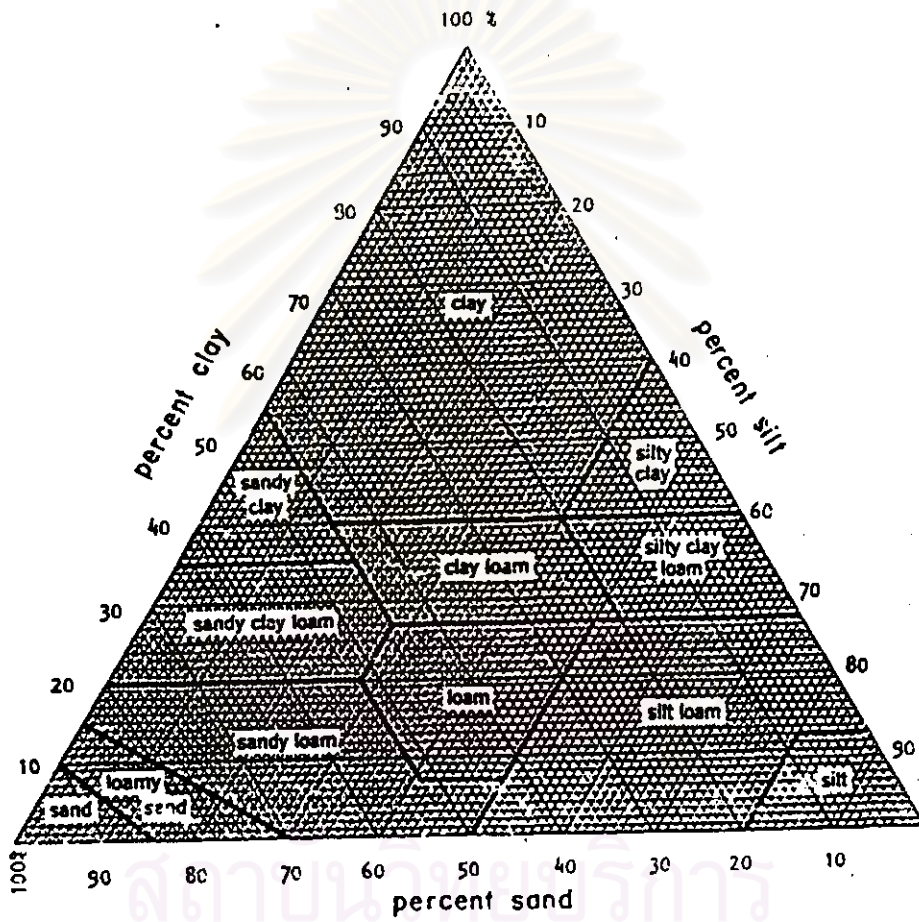
ละลาย Wako gel C-300 25 กรัม ลงในเฮกเซนปริมาตร 100 มล. แล้วนำมาบรรจุลงในคอลลัมน์แล้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. ยาว 8 ซม. หลังจากบรรจุเจลทำการล้างคอลลัมน์ด้วยเฮกเซนปริมาตร 100 มล. สองครั้ง

### 6.2 การทำให้สารมัธยันต์บริสุทธิ์บางส่วน โดยการผ่านซิลิกาเจลคอลลัมน์

นำสารสกัดที่ได้ในข้อ 3.3.1 มาผสมกับ Wako gel C-300 5 กรัม เติมเอทิลอะซิเตตลงไปเล็กน้อยเพื่อทำให้การผสมดีขึ้น จากนั้นนำไประเหยแห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ เติมเฮกเซนปริมาตร 150 มล. ลงไปละลายและนำมาบรรจุลงในคอลลัมน์ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 โดยให้มีอัตราการใช้ 3 มล. ต่อมาทีจากนั้นชะคอลลัมน์ด้วยเอทิลอะซิเตตในเฮกเซนปริมาตร 150 มล. โดยเพิ่มอัตราส่วนของเอทิลอะซิเตตครั้งละ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) จาก 0% ถึง 100% (stepwise) เก็บแต่ละลำดับส่วนที่ผ่านคอลลัมน์ออกมาทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศเพื่อนำไปวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่มีอยู่ในแต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี TLC และ HPLC

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. ไคอะแกรมสามเหลี่ยมมาตรฐาน



รูปที่ ค.4 ไคอะแกรมสามเหลี่ยมมาตรฐาน (Soil Survey Staff, 1951)

หาลักษณะเนื้อดินที่นำมาใช้ในการทดลองโดยนำปริมาณ(%) ของทราย ซิลท์ และ ดินเหนียว ที่ได้จากการส่งตัวอย่างดินไปวิเคราะห์มาเทียบกับไคอะแกรมสามเหลี่ยมมาตรฐาน จุดตัดที่ทั้ง 3 แกนตัดกันคือลักษณะเนื้อดินชนิดนั้น

## 8. ชุดคัดกรองขนาดดิน (soil sieve)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
รูปที่ ค.5 ชุดคัดกรองขนาดดิน (soil sieve)

## ประวัติผู้เขียน

นาย ฉัฐพันธ์ สุภภา เกิดเมื่อวันที่ 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2517 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2539 และเข้ารับการศึกษาค้นคว้าในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย