

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- เกษมศรี ชับซ้อน. 2541. ปฏิวัติวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: นานาส์พิมพ์.
- ศิริชัยบุญ ไพโรจน์บริบูรณ์. 2545. รายงานสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย ปี 2543-2544. [ระบบออนไลน์]. กรมควบคุมมลพิษ. แหล่งที่มา: <http://www.Pcd.go.th> [2545, กุมภาพันธ์ 15].
- สำนักนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม. 2542. รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2540. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์วิฑูรย์การปก.

### ภาษาอังกฤษ

- Alexander, M. 1995. How toxic are toxic chemicals in soil? Environ. Sci. Technol. 29: 2713-2717.
- Atlas, M. R. 1991. Microbial hydrocarbon degradation bioremediation of oil spills. J. Chem. Tech. Biotechnol. 52: 149-156.
- Baker, K. H. 1994. Bioremediation of surface and subsurface soil. In K. H. Baker and D. S. Herson (eds.), Bioremediation, pp. 203-259. New York: McGraw - Hill.
- Bauer, J. E., and Capone, D. G. 1985. Degradation and mineralization of the polycyclic aromatic hydrocarbons anthracene and naphthalene in intertidal marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 50: 81-90.
- Bossert, I.D. and Bartha, R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. In R. Atlas (ed.), Petroleum microbiology, pp. 435-474. New York: Macmillan.
- Bossert, I. D. and Compeau, G. C. 1995. Cleanup of petroleum hydrocarbon contamination in soil. In L. Y. Young and C. E. Cerniglia (eds.), Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, pp. 77-125. New York: Wiley-Liss.
- Bouchez, M., Blanchet D., and Vandecasteele, J.P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strain and defined strain association: inhibition phenomena and cometabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 156-164.
- Carmichael, L.M. and Pfaender, F.K. 1997. The effect of inorganic and organic supplement on The microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. Biodegradation. 8:1-13.

- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.
- Cerniglia, C. E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon. Curr. Opin. Biotechnol. 4: 331 – 338.
- 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.
- Dhawale, S.W., Dhawale, S.S., and Dean-Ross, D. 1992. Degradation of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium* occurs under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 3000-3006.
- Dibble, J. T. and Bartha, R. 1979. Effect of environment parameters on the biodegradation of oil sludge. Appl. Environ. Microbiol. 37:729-739.
- Eschenbach, A., Kastner, M., Bierl, R., Schaefer, G. and Mahro, B. 1994. Evaluation of a new and more effective method to extract polycyclic aromatic hydrocarbons from soil sample. Chemosphere. 28: 683-692.
- Eschenbach, A., Mescher, H., Wienberg, R. and Mahro, B. 2001. Humification of PAHs and TNT during bioremediation-evaluation of long term risk and sustainability. In R. Stegmann, G. Brunner, W. Calmono and G. Matz (eds.), Treatment of contaminated soil, pp. 271-291. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Eschenbach, A., Wienberg R., and Mahro, B. 1998. Fate and stability of nonextractable residues of [<sup>14</sup>C] PAH in contaminated soils under environmental stress conditions. Environ. Sci. Technol. 32: 2585-2590.
- Geiselbrecht, A. D., Hedlund, B. P., Tichi, M. A., and 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.
- Haderlien, A., Legros, R. and Ramsay, B. 2001. Enhancing pyrene mineralization in contaminated soil by the addition of humic acids or composted contaminated soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 555-559.
- Hatzinger, P. B., and Alexander, M. 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. Environ. Sci. Technol. 29: 537-545.

- 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. Biotechnol. 16(1): 19-30.
- Juhasz, A. L., Stanley, G. A., Davey, B. and Britz, M. L. 1997. Evaluation of high molecular weight PAHs degradation by pyrene – enriched microbial community in incubate soils. In D. L. Wise (ed.), Global environment biotechnology, pp. 475-487. Great Britain: Kluwer Academic Publishers.
- Kastner, M., Lotte, S., Heerenklage, J., Breuer-Jammali, M., Stegmann, R. and Mahro, B. 1995. Fate of <sup>14</sup>C-labeled anthracene and hexadecane in compost manured soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 1128-1135.
- Kastner, M. and Mahro, B. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil affected by the organic matrix of compost. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 668-675.
- Kastner, M., Streibich, S., Beyrer, M., Richnow, H. H., and Fretschke, W. 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of (<sup>14</sup>C) anthracene in soil. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1834-1842.
- Kotterman, M. J. J., Heessels, E., Jong, E., and Field, J. A. 1994. The physiology of anthracene biodegradation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. Appl. Environ. Microbiol. 42: 179-186.
- Lee, S. 1995. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. United States Patent. NO. 5, 427, 944.
- Mackay, D., Shiu, W. Y., Ma, K. C. 1992. Illustrated Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Chelsea: Lewis Publishers.
- Mahro, B., Schaefer, G. and Kastner, M. 1994. Pathways of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soils. In A. R. Hinchee, E. Leeson, L. Semprini and S. K. Ong (eds.), Bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons, pp. 203-217. Boca Raton: Lewis Publishers.

- Manilal, V. B. and Alexander, M. 1991. Factor affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 401-405.
- Margesin, R. and Schinner, F. 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2660-2664.
- Mueller, J. G., Chapman, P. J., Blattmann, B. O., and Pritchard P. H. 1990. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1079-1086.
- Sims, R.C., Doucette, W.J., McLean, J.E., Grenney, W.J., and Dupont, R.R. 1988. Treatment potential for 56 EPA listed hazardous chemicals in soil. EPA/600/6-88/001. Robert Kerr Environmental Research laboratory, USA : Ada. OK.
- Sims, J.L., Sim, R.C., and Matthews, J.E. 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil. Hazardous Waste and Hazardous Materials. 7: 117-149.
- Simonich, S. L., and Hites, R. A. 1994. Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ. Sci. Technol. 28: 939-943.
- Suthersan, S. S. 1999. Remediation engineering: design concepts. Boca Raton: CRC Press LLC.
- Trejo, M., and Quintero, R. 2000. Bioremediation of contaminated soils. In J. O. Eugenia, Sanchez Gloria, and H. Elizabeth (eds.), pp. 179-189. Environmental biotechnology and cleaner bioprocess. London: Taylor and Francis Limited.
- Trzesicka-Mlynarz, D. T., and Ward, O. P. 1996. Degradation of fluoranthene in a soil matrix by indigenous and introduced bacteria. Biotechnol. Lett. 18: 181 – 186.
- Tsiros, I. X., Ambrose, R. B., and Chronopoulou-Sereli, A. 1999. Air-vegetation-soil partitioning of toxic chemicals in environmental simulation modeling. Global Nest. 1(3):177-184.
- Van Veen, J. A., Van Overbeek, L. S., and Van Elsas, J. D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 121-135.
- Verschueren, K. 1977. Handbook of environmental data on organic chemicals. New York: Litton Educational Publishing.
- Verstraete, W., and Devliegher, W. 1996. Formation of non-bioavailable organic residues in soil: Perspectives for site remediation. Biodegradation. 7: 471-485.

- Wagner, S. C. and Zablotowicz, R. M. 1997. Effect of organic amendments on the bioremediation of cyanazine and fluometoron in soil. J. Environ. Sci. Health. 32B: 37-54.
- Walter, U., Bayer, M., Klein, J., and Rehm, H.-J. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. Appl. Microbiol. Biotech. 34: 671-676.
- Weissenfels, W. D., Beyer, M. and Klein, J. 1990. Degradation of phenanthrene fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 689-696.
- Weissenfels, W. D., Klewer, H. J., and 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 hydrocarbons (PAHs), A review. Environ. Pol. 81: 229 – 249.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Carbon – Free Mineral Medium ( CFMM medium)

## ประกอบด้วย

แอมโมเนียมไนเตรด ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	3	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟตโคเดคคะไฮเดรท ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	5.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.8	กรัม
เบคโต อการ์ (bacto agar)	15	กรัม

ละลายสารทั้งหมด ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับความเป็นกรดต่างเป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ.) เป็นเวลา 20 นาที

แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.01	กรัม
เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรท ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.05	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.05	กรัม

ละลายส่วนผสมที่เหลือในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มล. และกรองผ่านแผ่นกรองที่ปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมโครเมตร สามารถเตรียมไว้ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงและเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ.

ผสมสารทั้ง 2 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

## 2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria Bertani (LB agar)

## ประกอบด้วย

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

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

## 3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง rose bengal (RB medium)

## ประกอบด้วย

แบคโตเปปโตน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.5	กรัม
โรสเบงกอล (rose bengal)	33	มก.
วุ้นผง	20	กรัม

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



## ภาคผนวก ข

## สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

## 1. สารละลายพีแนนทรีน ฟลูออเรนธิน และไพรีนในอะซีโตน

ชั่งพีแนนทรีน ฟลูออเรนธิน และไพรีน ชนิดละ 0.03 กรัม ละลายในอะซีโตน ปริมาตร 30 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมจนละลายหมด กรองผ่านหัวกรองชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร

หมายเหตุ ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ เนื่องจากอะซีโตนระเหยเร็วมาก ก่อนนำไปใช้ ควรแช่ในตู้เย็นก่อน และขณะเติมสาร PAHs ที่ละลายในอะซีโตนลงในดินควรทำอย่างรวดเร็ว เพื่อไม่ให้อะซีโตนระเหยซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงได้

## 2. สารละลายพีแนนทรีนในไดเอทิลอีเทอร์ (phenanthrene in diethylether solution)

ชั่งพีแนนทรีน 2 กรัม ละลายในไดเอทิลอีเทอร์ 100 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนละลายหมดนำมากรองผ่านหัวกรองแบบ PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บไว้ในขวดสีชา ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดลอง

## 3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (0.85 % NaCl)

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ.) เป็นเวลา 20 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4. สารละลายเมทธานอลเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

กรองเมทธานอลผ่านแผ่นกรองชนิด FH ขนาดความกว้างรู 0.5 ไมโครเมตร จัดฟองอากาศ (degas) ครั้งละ 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง โดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ร่วมกับเครื่องสูบอากาศ (vacuum pump) วัดปริมาตรของเมทธานอล

กรองน้ำกลั่นชนิด DDW (Deionized Distillated Water) ผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดความกว้างของรู 0.22 ไมโครเมตร ทำการจัดฟองอากาศ 2 ครั้ง

ผสมเมทธานอลและน้ำกลั่นที่ผ่านการจัดฟองอากาศแล้วเข้าด้วยกัน โดยใช้อัตราส่วนของเมทธานอลต่อน้ำเป็น 80 : 20 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จัดฟองอากาศสารละลายเมทธานอล 80 % อีกครั้ง หรือจนกว่าไม่พบฟองอากาศ ปิดผนึกภาชนะที่บรรจุสารละลายดังกล่าวด้วยพาราฟิล์ม

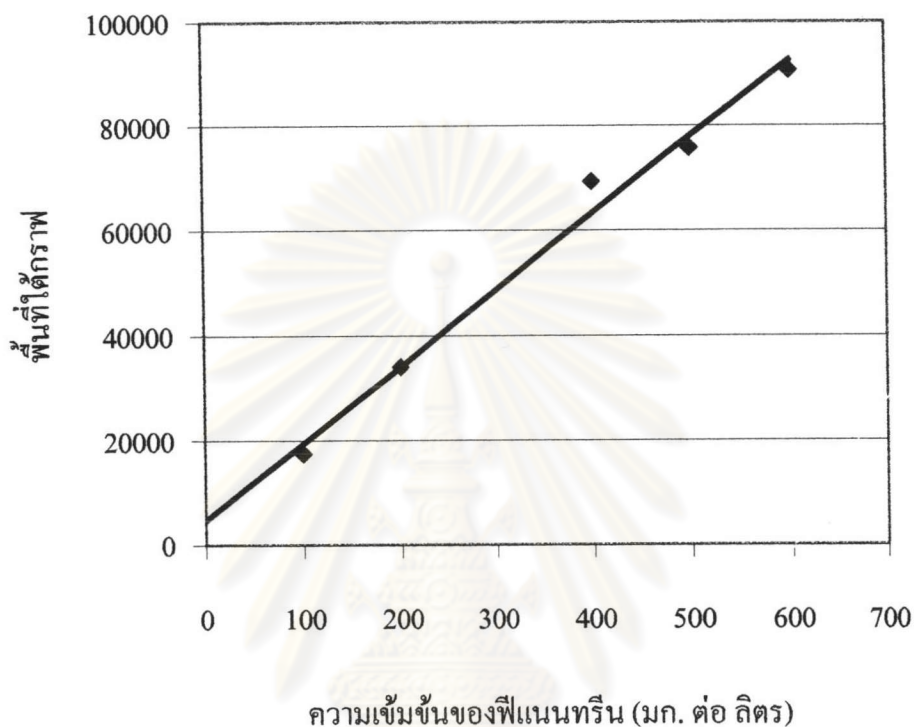
#### 5. สารมาตรฐาน PAHs สำหรับฉีด HPLC

ชั่ง PAHs 1 มก. ละลายในเมทธานอลปริมาตร 1 มล. ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจน PAHs ละลายหมด นำมากรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปแบบ PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร ปิดผนึกด้วยพาราฟิล์มและห่อด้วยกระดาษฟอยด์เพื่อป้องกันไม่ให้ PAHs เกิดการสลายตัวด้วยแสง เก็บที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$ .

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## 1. กราฟมาตรฐานของฟีแนนทริน



รูปที่ ก. 1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟีแนนทรินกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

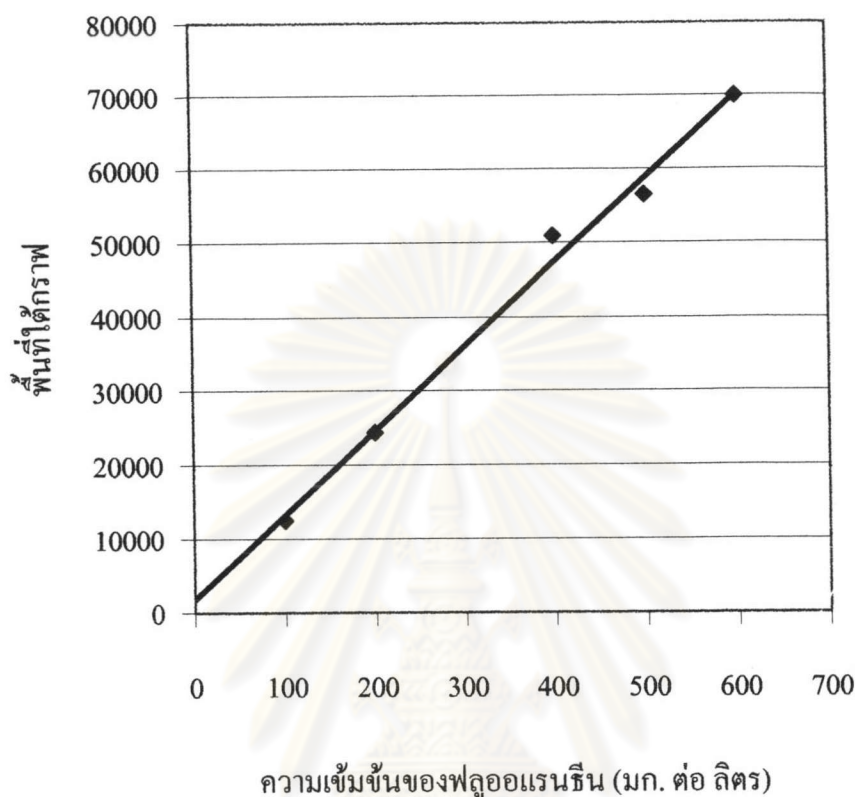
หาความเข้มข้นของฟีแนนทรินได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

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

โดยที่ : ความชันของกราฟมาตรฐาน = 146.55

จุดตัดแกนวาย = 4703.2

## 2. กราฟมาตรฐานของฟลูออเรนธิน



รูปที่ ค. 2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออเรนธินกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

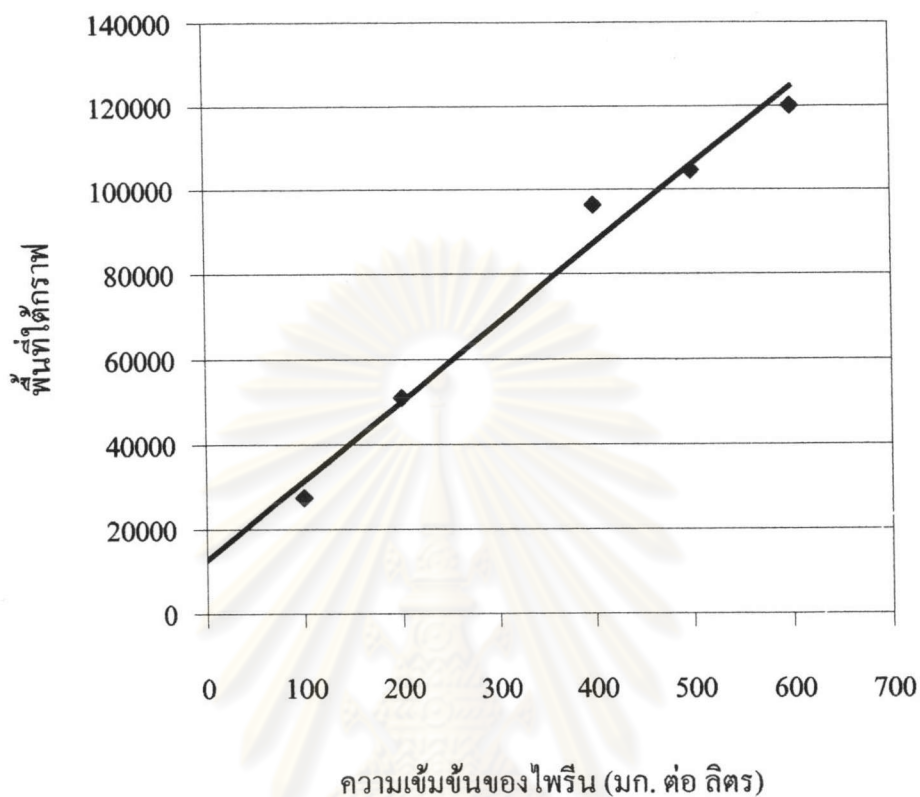
หาความเข้มข้นของฟลูออเรนธินได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = (ความชันของกราฟมาตรฐาน x ปริมาณฟลูออเรนธิน) - จุดตัดแกนวาย

โดยที่ : ความชันของกราฟมาตรฐาน = 113.77

จุดตัดแกนวาย = 1840.6

## 3. กราฟมาตรฐานของไพรีน



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ ไพรีนกับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

หาความเข้มข้นของไพรีน ได้จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มาแทนค่าในสมการเส้นตรงดังนี้

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

โดยที่ : ความชันของกราฟมาตรฐาน = 186.27

จุดตัดแกนวาย = 12826

ตารางที่ ก.1 ปริมาณสารพีแนนทริน ฟลูออแรนธิน และ ไพรีนที่สกัดได้ด้วยไดคลอโรมีเทนจาก  
ชุดการทดลองต่างๆ ในวันที่ 0 ของการทดลองในการศึกษาการดูดซับสาร PAHs ในดินของ  
เปลือกถั่ว และ ใบจามจุรีในสภาวะปลอดเชื้อ

ชุดการทดลอง*	ปริมาณสาร PAHs ที่สกัดได้ (มก.)		
	พีแนนทริน	ฟลูออแรนธิน	ไพรีน
ดิน 2 กรัม	0.1596	0.160	0.144
ดินผสมเปลือกถั่ว (1.8 / 0.2 กรัม)	0.1591	0.159	0.143
ดินผสมใบจามจุรี (1.8 / 0.2 กรัม)	0.175	0.173	0.157
เปลือกถั่ว 0.5 กรัม	0.118	0.113	0.097
ใบจามจุรี 0.5 กรัม	0.121	0.122	0.109

หมายเหตุ \*ทำให้ปนเปื้อนสาร PAHs มีความเข้มข้นชนิดละ 0.2 มก.ต่อชุดการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

น.ส.นารีรัตน์ เจริญช่าง เกิดเมื่อวันที่ 19 มิถุนายน พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดราชบุรี  
ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
ในปีการศึกษา 2541 และเข้ารับการศึกษาคือในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยา  
ทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา  
2542



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย