



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการลดคลอรีนแบบรีดักชันของสารประกอบอินทรีย์คลอรีนเสี่ยงอันตรายในตะกอน

โดย รศ.ดร. จินต์ อโณทัย

พฤศจิกายน 2552

สัญญาเลขที่ RMU5080012

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการลดคลอรีนแบบรีดักชันของสารประกอบอินทรีย์คลอรีนเสี่ยงอันตรายในตะกอน

รศ.ดร. จินต์ อโณทัย
ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้รับทุนขอขอบคุณอย่างยิ่งต่อสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ร่วมกันให้ความสนับสนุนทางการเงินแก่โครงการนี้โดยผ่าน “ทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษา” ตามสัญญาเลขที่ RMU5080012 ตลอดจนให้อิสระและอำนวยความสะดวกแก่ผู้รับทุนอย่างเต็มที่ในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

โครงการวิจัยนี้ดำเนินการในรูปของคณะวิจัยซึ่งประกอบด้วย ผศ. จารุรัตน์ วรนิสรากุล และ รศ.ดร. เฉลิมราช วันทวิน จากภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และ Assoc. Prof. Dr. I-Ming Chen จาก Department of Environmental Resources Management, Chia-Nan University of Pharmacy and Science ประเทศไต้หวัน นอกจากนี้ยังมีนิสิตและนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาหลายรุ่นด้วยกันซึ่งประกอบด้วย นางสาวทีรณัฐ จิรจิตตยากร นางสาวสุกานดา เสนาะนิตี นางสาววิจิตรา สุจริต นางสาวโรสณี สะมาแอ นางสาววัชรภรณ์ มั่นคง นางสาวอรอุมา พิสิทธิ์ศักดิ์ นางสาวนิตยา ผิวโชติ นายวนิช วณิชภิชาติ นายประภัทร์ ศิริเมือง และนายธีรนนท์ กระจับทอง ด้วยความทุ่มเทและร่วมแรงร่วมใจของสมาชิกทุกท่านในคณะวิจัยที่ได้กล่าวมาแล้ว จึงทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้รับทุนจึงขอขอบคุณสมาชิกทุกท่านในคณะวิจัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และ Chia-Nan University of Pharmacy and Science ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูงสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

ผู้รับทุน

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU5080012

ชื่อโครงการ: การลดคลอรีนแบบรีดักชันของสารประกอบอินทรีย์คลอรีนเสี่ยงอันตรายในตะกอน

ชื่อนักวิจัย: รศ.ดร. จินต์ อโนทัย

ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

อีเมล: jin.ano@kmutt.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 ธันวาคม พ.ศ. 2549 ถึง 30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2552

โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงการย่อยสลายทางชีวภาพภายใต้สภาวะไร้อากาศในตะกอนลำน้ำของเฮกซะคลอโรเบนซีนและโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิลซึ่งถูกจัดให้เป็นสารมลพิษอินทรีย์คงทนในสิ่งแวดล้อมตามอนุสัญญาสตอกโฮล์มว่าด้วยสารมลพิษที่ตกค้างยาวนานโดยใช้ตะกอนและน้ำจาก 10 ลำน้ำรวม 28 ตัวอย่างในรูปแบบของน้ำตะกอน ตะกอนเหลว และชั้นตะกอนที่จำลองสภาพลำน้ำ ผลการศึกษาพบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้เป็นอย่างดีในทุกรูปแบบที่ทดลอง โดยการย่อยสลายเกือบทั้งหมดผ่านทางกลไกหลักเป็นเพนตะคลอโรเบนซีน 1,2,3,5-เตตระคลอโรเบนซีน และ 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนตามลำดับ มีเพียงส่วนน้อยที่เกิดการย่อยสลายผ่านกลไกรองเป็นเพนตะคลอโรเบนซีน 1,2,4,5-เตตระคลอโรเบนซีน 1,2,4-ไตรคลอโรเบนซีน และ 1,4-ไดคลอโรเบนซีนตามลำดับ ตัวแปรที่สำคัญที่สุดคืออุณหภูมิซึ่งพบว่าในช่วง 15 ถึง 45 เซลเซียสการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนจะเกิดได้ดีในช่วง 30 ถึง 40 เซลเซียสซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิทั่วไปของประเทศไทย ในขณะที่ประเทศพัฒนาแล้วซึ่งพบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนย่อยสลายได้ยากจะมีความแปรปรวนของอุณหภูมิค่อนข้างมาก เป็นผลให้ตะกอนลำน้ำในประเทศไทยมีความหลากหลายทางจุลชีพมากกว่า เฮกซะคลอโรเบนซีนจึงถูกย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและไม่เป็นสารมลพิษอินทรีย์คงทนในประเทศไทย จุลชีพที่สามารถย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนคือแบคทีเรียกลุ่มสร้างมีเทนและกลุ่มแกรมบวกที่สามารถทนต่อการยับยั้งของแวนโคมัยซินได้ดี จลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายสามารถอธิบายได้ด้วยสมการของ Michaelis-Menten โดยมีค่าคงที่การลดคลอรีนสูงสุดปรากฏและค่าคงที่ครึ่งอิ่มตัวของการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนเท่ากับ 0.45-0.73 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวันและ 3.2-17.2 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิลพบว่าย่อยสลายทางชีวภาพได้ยาก กล่าวคือจากทั้งหมด 21 คอนเจนเนอร์ที่ทดสอบมีเพียง 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลเท่านั้นที่สามารถย่อยสลายได้ในทุกชุดทดสอบแต่ใช้เวลานานกว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนมาก ในขณะที่ 2,4,4'- และ 3,4,5-ไตรคลอโรไบฟีนิล, 2,4,2',5'-, 2,3,2',5'- และ 2,3,4,4'-เตตระคลอโรไบฟีนิลสามารถย่อยสลายได้เพียงบางสภาวะ ส่วนคอนเจนเนอร์ที่เหลือไม่สามารถย่อยสลายได้เลย ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิลย่อยสลายทางชีวภาพได้ยากกว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนและเป็นสารมลพิษอินทรีย์คงทนภายใต้สภาวะแวดล้อมของประเทศไทย

คำสำคัญ: การฟื้นฟูสภาพทางชีววิทยา เฮกซะคลอโรเบนซีน พีซีบี โพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิล

Abstract

Project Code: RMU5080012

Project Title: Reductive Dechlorination of Hazardous Chlorinated Organic Compounds in Sediment

Investigator: Assoc. Prof. Dr. Jin Anotai

Dept. of Environmental Engineering, King Mongkut's U. of Tech. Thonburi

E-mail Address: jin.ano@kmutt.ac.th

Project Period: December 1, 2006 to November 30, 2009

This research project studied the biodegradability of hexachlorobenzene and polychlorinated biphenyls, both of which have been classified as the persistent organic pollutants (POPs) in the Stockholm Convention, under anaerobic condition in the stream sediments. Twenty eight sediment and water samples from 10 streams were collected and used in the study in three medium forms, i.e., filtered sediment slurry, non-filtered sediment slurry, and sediment layer to simulate actual condition of the stream sediment. Hexachlorobenzene could be dechlorinated effectively in all three media tested under all conditions via the major pathway to pentachlorobenzene, 1,2,3,5-tetrachlorobenzene, and 1,3,5-trichlorobenzene, respectively. Minor pathway to pentachlorobenzene, 1,2,4,5-tetrachlorobenzene, 1,2,4-trichlorobenzene, and 1,4-dichlorobenzene, respectively, was also detected in some cases. The most important factor was temperature. Within the studied range of 15 to 45°C, the optimum temperature were found in between 30 and 40°C, very close to the typical temperature in Thailand. This was significantly different from most developed countries, where the hexachlorobenzene was found to be very persistent in the environment, that have very fluctuated temperature. As a result from temperature variation, the indigenous microbes in the stream sediments in Thailand were more diverse than those in developed countries. Hence, hexachlorobenzene could be effectively degraded and, thus, should not be considered as a persistent organic pollutant in Thailand. Hexachlorobenzene dechlorinators were methanogens and gram-positive bacteria which could resist to vancomycin. The dechlorination kinetics followed the Michaelis-Menten equation with the apparent maximum dechlorination rate constant and the half-saturation constant of hexachlorobenzene were 0.45-0.73 mg/(l.day) and 3.2-17.2 mg/l, respectively. Dechlorination of polychlorinated biphenyls, however, was unimpressive as compared to hexachlorobenzene. Of all 21 congeners being tested, only 2,3,4-trichlorobiphenyl could be dechlorinated in all scenarios but took much longer time than hexachlorobenzene. The 2,4,4'-, 3,4,5-trichlorobiphenyls, 2,4,2',5'-, 2,3,2',5'- and 2,3,4,4'-tetrachlorobiphenyls could be merely degraded under certain conditions whereas the remaining congeners could not be dechlorinated by any means. These results indicate that polychlorinated biphenyls are highly resisted to biodegradation and become the persistent organic pollutants in Thailand.

Keywords: bioremediation, hexachlorobenzene, PCBs, polychlorinated biphenyls

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
 บทที่ 1 บทนำ	 1
1.1 ปัญหาที่ทำการวิจัยและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 ระยะเวลาวิจัย	3
 บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	 4
2.1 เฮกซะคลอโรเบนซีน	4
2.1.1 ข้อมูลทั่วไป	4
2.1.2 ผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต	4
2.1.2.1 ความเป็นพิษเฉียบพลัน	6
2.1.2.2 ความเป็นพิษเรื้อรัง	6
2.1.3 ความคงตัวและการย่อยสลายทางชีวภาพ	7
2.1.4 ผลของสารให้อิเลคตรอน สารรับอิเลคตรอน และธาตุอาหาร	9
2.1.5 ผลของอุณหภูมิ	10
2.1.6 จลนพลศาสตร์ของการย่อยสลาย	11
2.1.7 จุลชีพที่มีส่วนต่อการลดคลอรีน	12
2.2 โพลีคลอรีเนเต็ดไบฟีนิล	14
2.2.1 ข้อมูลทั่วไป	14
2.2.2 ผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต	15
2.1.2.1 ความเป็นพิษเฉียบพลัน	15
2.1.2.2 ความเป็นพิษเรื้อรัง	16
2.2.3 ความคงตัวและการย่อยสลายทางชีวภาพ	17
2.2.4 ผลของสารให้อิเลคตรอน สารรับอิเลคตรอน และธาตุอาหาร	21
2.2.5 ผลของอุณหภูมิ	22
2.2.6 จลนพลศาสตร์ของการย่อยสลาย	22
2.2.7 จุลชีพที่มีส่วนต่อการลดคลอรีน	23

บทที่ 3 วิธีการศึกษาวิจัย	25
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	25
3.1.1 ตัวอย่างน้ำและตะกอน	25
3.1.2 การเตรียมตะกอนและน้ำตะกอนสำหรับทดลอง	38
3.2 การวิเคราะห์	40
3.2.1 วิธีการสกัด	40
3.2.2 วิธีการวิเคราะห์	41
3.3 การทดลอง	42
บทที่ 4 ผลการศึกษา	43
4.1 ลักษณะสมบัติของตะกอนและน้ำตะกอน	43
4.2 การลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน	46
4.2.1 ผลการศึกษาในน้ำตะกอน	46
4.2.1.1 ความสามารถในการย่อยสลายของจุลชีพแบบไร้อากาศ	46
4.2.1.2 ผลของธาตุอาหารเสริม	48
4.2.1.3 ผลของสารอาหาร	50
4.2.1.4 ผลของสารยับยั้งเอนไซม์	51
4.2.1.5 ผลของอุณหภูมิ	53
4.2.1.6 กลุ่มจุลชีพที่มีส่วนร่วมต่อการลดคลอรีน	55
4.2.1.7 จลนพลศาสตร์ของการลดคลอรีน	58
4.2.2 ผลการศึกษาในตะกอนเหลว	61
4.2.3 ผลการศึกษาในแบบจำลองลำน้ำ	62
4.3 การลดคลอรีนของโพลีคลอรีเนเต็ดไบฟีนิล	63
4.3.1 ผลการศึกษาในน้ำตะกอน	63
4.3.1.1 ความสามารถในการย่อยสลายของจุลชีพแบบไร้อากาศ	63
4.3.1.2 ผลของสารอาหาร	67
4.3.2 ผลการศึกษาในตะกอนเหลว	67
4.3.3 ผลการศึกษาในแบบจำลองลำน้ำ	67
4.4 บทความทางวิชาการที่เผยแพร่	69
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	
5.1 การย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีน	71
5.2 การย่อยสลายโพลีคลอรีเนเต็ดไบฟีนิล	72
5.3 ผลลัพธ์จากโครงการวิจัย	73

5.4 งานวิจัยในอนาคต	73
เอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก	80
ภาคผนวก ก ภาพสถานที่และการเก็บตัวอย่างตะกอน	81
ภาคผนวก ข ผลงานตีพิมพ์	103

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ปัญหาที่ทำการวิจัยและความสำคัญของปัญหา

การพัฒนาด้านอุตสาหกรรมของประเทศไทยในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมาได้ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของสารมลพิษอินทรีย์หลายชนิดที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ เช่น chlorobenzenes, polychlorinated biphenyls (PCBs, พีซีบี) และ dioxins ซึ่งจากรายงานของสื่อต่างๆพบว่าได้มีการปนเปื้อนของ chlorobenzenes ในตะกอนจากคลองห้วยลำภูในจังหวัดสมุทรปราการ (Brigden et al., 2003) และจากปากแม่น้ำบางปะกงในจังหวัดฉะเชิงเทรา (จาก Bangkok Post ฉบับวันที่ 24 พฤศจิกายน 2544) สารมลพิษเหล่านี้สามารถสะสมในสิ่งแวดล้อมและเข้าสู่มนุษย์ได้โดยผ่านทางห่วงโซ่อาหารอันจะนำไปสู่ปัญหาด้านสุขภาพของประชาชนเพราะเป็นสารก่อมะเร็ง ผลกระทบด้านลบต่อสุขภาพของประชาชนอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของสารมลพิษเสี่ยงอันตรายได้เคยเกิดขึ้นมาแล้วหลายครั้งในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของการปนเปื้อนของโลหะหนัก เช่น “ปรอท” ในห้วยคลิตี้ จังหวัดกาญจนบุรี “สารหนู” ในแหล่งน้ำผิวดินและใต้ดินในอำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช และ “แคดเมียม” ในห้วยแม่ตา อำเภอมะขาม จังหวัดตาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการวิจัยศึกษาเพื่อหาแนวทางที่เหมาะสมในการกำจัดสารมลพิษอินทรีย์คลอรีนเหล่านี้ เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนและฟื้นฟูสภาพ (clean-up) แหล่งที่ปนเปื้อนเช่น บริเวณคลองห้วยลำภู และปากแม่น้ำบางปะกง ก่อนที่จะส่งผลกระทบต่อประชาชนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่

สารมลพิษอินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นวง (aromatic compounds) ที่มีจำนวนอะตอมของคลอรีนในโมเลกุลสูงเช่น เฮกซะคลอโรเบนซีน (hexachlorobenzene) และพีซีบีคอนเจนเนอร์ที่มีคลอรีนอะตอมสูงมักจะมีความเป็นพิษและคงทนต่อการย่อยสลายมากกว่าสารที่มีอะตอมคลอรีนต่ำ การบำบัดสามารถกระทำได้หลายวิธีทั้งทางด้านเคมีและชีวภาพ อย่างไรก็ตามสารมลพิษอินทรีย์คลอรีนเหล่านี้มักจะสะสมอยู่ในตะกอนมากกว่าในน้ำเนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำต่ำ ดังนั้นการเลือกใช้กระบวนการทางชีวภาพจึงมีแนวโน้มที่จะประหยัดกว่ากระบวนการทางเคมี กระบวนการชีวภาพแบบใช้อากาศ (aerobic digestion) สามารถย่อยสลายสารมลพิษอินทรีย์ที่มีคลอรีนต่ำๆเท่านั้น ในขณะที่งานวิจัยหลายชิ้นบ่งชี้ว่ากระบวนการแบบไร้อากาศ (anaerobic digestion) สามารถลดคลอรีน (dechlorination) ในสารอินทรีย์คลอรีนที่มีจำนวนคลอรีนสูงได้แต่ต้องใช้เวลาอันนานมาก เป็นผลให้สารมลพิษอินทรีย์คลอรีนในกลุ่มนี้หลายชนิดถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ “สารมลพิษอินทรีย์คงทน (Persistent Organic Pollutants, POPs)” โดยสหประชาชาติ

อย่างไรก็ดีเนื่องจากประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่ค่อนข้างจะแตกต่างจากประเทศพัฒนาแล้วที่ได้ทำการศึกษาค้นคว้าของเฮกซ์คลอโรเบนซีนและพีซีบีเป็นส่วนใหญ่จึงอาจทำให้รูปแบบหรือการตกค้างในธรรมชาติต่างออกไป ประเทศไทยอยู่ในพื้นที่ที่มีภูมิอากาศแบบ tropical climate โดยจังหวัดสมุทรปราการซึ่งคลองหวั่นลำภูที่ตรวจพบการปนเปื้อนของเฮกซ์คลอโรเบนซีนไหลผ่านมีอุณหภูมิเฉลี่ยรายเดือนสำหรับกลางคืนและกลางวันในช่วง 30 ปีเท่ากับ 26.3 และ 30.3 °C ตามลำดับ (ที่มา <http://www.tmd.go.th/EN/>) ในขณะที่ประเทศที่พัฒนาแล้วส่วนใหญ่จะมีสภาพภูมิอากาศแบบ temperate climate (อุณหภูมิเฉลี่ยในเดือนที่หนาวที่สุดอยู่ระหว่าง -3 ถึง 18°C) หรือ continental climate (อุณหภูมิเฉลี่ยในเดือนที่หนาวที่สุดต่ำกว่า -3°C) เป็นผลให้ความหลากหลายทางชีวภาพในดินหรือตะกอนลำนํ้าแตกต่างกันซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการย่อยสลายของเฮกซ์คลอโรเบนซีนและพีซีบีในธรรมชาติ ตัวอย่างเปรียบเทียบที่เด่นชัดที่แสดงให้เห็นถึงผลของสภาพอากาศต่อกระบวนการทางชีวภาพคือการเปลี่ยนรูปแอมโมเนียในน้ำเสียให้เป็นไนเตรทด้วยกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification process) ประเทศที่พัฒนาแล้วซึ่งส่วนใหญ่มีอากาศหนาวเย็นในฤดูหนาวจำเป็นต้องควบคุมให้อายุสลัดจ์ (sludge age) สูงมากกว่า 6 วันจึงจะทำให้ไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (nitrifying bacteria) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์และไนเตรทตามลำดับไม่ถูกไล่ล้าง (wash-out) ออกจากระบบ แต่ในประเทศไทยซึ่งมีอากาศร้อนพบว่าใช้อายุสลัดจ์เพียง 2-3 วันก็สามารถทำให้เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันขึ้นได้แล้ว (ธงชัย 2544) ดังนั้นจึงควรศึกษาลงลึกในรายละเอียดของการลดคลอรีนของสารมลพิษอินทรีย์คลอรีนแบบรีดักชันเพื่อให้ทราบถึงกลไกที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะแวดล้อมของประเทศไทย สารมลพิษอินทรีย์คลอรีนเป้าหมายที่ศึกษาคือเฮกซ์คลอโรเบนซีนและพีซีบี ความรู้ที่ได้สามารถนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียและฟื้นฟูสภาพดินและตะกอนในแหล่งน้ำธรรมชาติต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ของการลดคลอรีนทางชีวภาพภายใต้สภาวะไร้อากาศของเฮกซ์คลอโรเบนซีนและโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิล
- เพื่อศึกษาถึงกลไกและสภาวะที่เหมาะสมต่อการลดคลอรีนทางชีวภาพภายใต้สภาวะไร้อากาศของเฮกซ์คลอโรเบนซีนและโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิล
- เพื่อบ่งชี้กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถลดคลอรีนของเฮกซ์คลอโรเบนซีนและโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิล
- เพื่อศึกษาทางจุลชีววิทยาของการลดคลอรีนของเฮกซ์คลอโรเบนซีนและโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิลทางชีวภาพแบบไร้อากาศ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

-ทำการวิจัยที่ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีภายใต้สภาวะห้อง (ยกเว้นในกรณีศึกษาผลของอุณหภูมิ)

-หน่วยปฏิกรณ์ที่ใช้มีทั้งที่เป็นขนาดห้องปฏิบัติการ (ขวดเซรัม (serum bottle)) และขนาดโต๊ะทดลอง (ตู้ปลาขนาดใหญ่)

-สารมลพิษอินทรีย์คลอรีนเป้าหมายประกอบด้วยเฮกซะคลอโรเบนซีนและพีซีบีบางคอนเจนเนอร์

1.4 ระยะเวลาวิจัย

โครงการนี้มีระยะเวลาดำเนินการทั้งหมด 3 ปีตั้งแต่วันที่ 1 ธันวาคม พ.ศ. 2549 จนถึงวันที่ 30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2552

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงการวิจัยนี้เป็นผลสืบเนื่องมาจากการตรวจพบเฮกซะคลอโรเบนซีนซึ่งถูกจัดให้เป็นสารมลพิษอินทรีย์คงตัวปนเปื้อนในตะกอนลำน้ำและเกิดการย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วในธรรมชาติ ซึ่งแตกต่างจากผลงานวิจัยส่วนใหญ่จากต่างประเทศ จึงนำมาสู่การศึกษาในรายละเอียดของการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนในตะกอนลำน้ำ อย่างไรก็ตามในระหว่างการศึกษาตรวจสอบการปนเปื้อนภูมิหลังของตะกอนของลำน้ำต่างๆ ได้พบโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิลหรือพีซีบีปนเปื้อนร่วมอยู่ด้วย พีซีบีซึ่งถูกจัดให้เป็นสารมลพิษอินทรีย์คงตัวเช่นกันที่มีโครงสร้างเป็นสารอะโรมาติกเหมือนเฮกซะคลอโรเบนซีนแต่มีความซับซ้อนมากกว่าเนื่องจากมีวงเบนซีน 2 วงเชื่อมต่อกัน อย่างไรก็ตามก็สามารถสกัดและตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการและเครื่องมือเดียวกันโดยอาศัยการดัดแปรเล็กน้อย โครงการวิจัยนี้จึงทำการศึกษาถึงการย่อยสลายทางชีวภาพแบบไร้อากาศของสารมลพิษอินทรีย์คลอรีนทั้งสองชนิดนี้

2.1 เฮกซะคลอโรเบนซีน

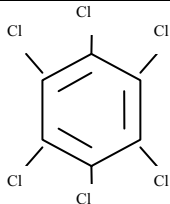
2.1.1 ข้อมูลทั่วไป

เฮกซะคลอโรเบนซีนเป็นสารอินทรีย์สังเคราะห์ที่ไม่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะถูกผลิตขึ้นเพื่อใช้เป็นสารป้องกันเชื้อราหรือเป็นสารปนเปื้อนที่เกิดจากการสังเคราะห์ตัวทำละลายอินทรีย์และสารคลอรีนอินทรีย์ เฮกซะคลอโรเบนซีนยังถูกใช้เป็นส่วนกลางในการผลิตสีย้อมและสารอินทรีย์อื่น ๆ รวมถึงสารรักษาเนื้อไม้อีกด้วย (ATSDR 2000; HSDB 2001) สมบัติทางกายภาพและเคมีที่สำคัญได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.1 เฮกซะคลอโรเบนซีนจะเป็นผลึกคล้ายเข็มที่อุณหภูมิห้อง สามารถระเหยง่าย (volatilization) ได้เล็กน้อย ละลายน้ำได้น้อยแต่ละลายได้ดีมากในน้ำมันหรือไขมัน

2.1.2 ผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต

เฮกซะคลอโรเบนซีนสามารถเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ทั้งทางปาก หายใจ และผ่านทางผิวหนัง เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วเฮกซะคลอโรเบนซีนจะสะสมในไขมันและเนื้อเยื่อ บางส่วนของเฮกซะคลอโรเบนซีนจะถูกขับออกจากร่างกายผ่านทางอุจจาระเป็นส่วนใหญ่ ขณะที่ผ่านทางปัสสาวะเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนที่สะสมอยู่ในร่างกายจะก่อให้เกิดความเป็นพิษขึ้น

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางกายภาพและเคมีของเฮกซะคลอโรเบนซีน

Chemical name	hexachlorobenzene
CASRN (Chemical Abstract Service Registry Number)	118-74-1
Other names	amatin anticarie benzene hexachloride bunt-cure bunt-no-more ceku C.B. co-op hexa esclorobenzene granox nm HCB hexa c.b. hexachlorbenzol 1,2,3,4,5,6- hexachlorobenzene julen's carbon chloride julin's carbon chloride no bunt no bunt 40 no bunt 80 no bunt liquid pentachlorophenyl chloride perchlorobenzene phenyl perchloryl Saatbeizfungizid sanocid Sanocide smut-go Snieciotox
Molecular formula	C ₆ Cl ₆
Structure formula	
Molecular weight	284.78
Melting Point (°C)	231
Boiling Point (°C)	323-326
Flash Point (°C)	242
Density (g/ml)	2.044
Vapor Pressure (mm-Hg @ 20°C)	1.09×10^{-5}
Water Solubility (mg L ⁻¹)	0.005
log K _{ow}	5.5

2.1.2.1 ความเป็นพิษเฉียบพลัน

เฮกซะคลอโรเบนซีนมีความเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน (acute toxicity) ก่อนข้างต่ำเมื่อเข้าสู่ร่างกายทางปาก จากการศึกษาพบว่า LD₅₀ ทางปากสำหรับหนูใหญ่ (rat) หนูเล็ก (mouse) กระต่าย และแมวมีค่าเท่ากับ 3,500, 4,000, 2,600 และ 1,700 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ พิษเฉียบพลันเมื่อสัมผัสผิวหนังไม่ได้มีการรายงานไว้ อย่างไรก็ตามเฮกซะคลอโรเบนซีนเป็นพิษเฉียบพลันปานกลางเมื่อเข้าสู่ร่างกายทางการหายใจโดยมีค่า LD₅₀ สำหรับหนูใหญ่ หนูเล็ก และแมวเท่ากับ 3.6, 4.0 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ผลกระทบเฉียบพลันจะเกิดขึ้นกับระบบประสาทและกล้ามเนื้อ ทำให้ระบบดังกล่าวทำงานผิดปกติและล้มเหลวในที่สุด

2.1.2.2 ความเป็นพิษเรื้อรัง

ผลการวิจัยด้านความเป็นพิษเรื้อรัง (chronic toxicity) ในหนูใหญ่พบว่าการป้อนเฮกซะคลอโรเบนซีนด้วยอัตรา 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักต่อวันสามารถทำให้เกิดการตายร้อยละ 95 และ 30 สำหรับหนูตัวเมียและตัวผู้ตามลำดับภายในระยะเวลา 4 เดือน หากอัตราการป้อนอยู่ระหว่าง 25 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักต่อวันพบว่าจะเกิดผลกระทบต่อระบบประสาท กล่าวคือเกิดอาการตัวสั่น (tremor) ตื่นเต้นผิดปกติ (hyper excitability) ผิวหนังงอก (skin eruption) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำหนักของตับ ไต ม้ามและปอดเพิ่มขึ้นผิดปกติ แต่หากลดปริมาณลงเหลือ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักต่อวันพบว่าหนูส่วนใหญ่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ โดยพบฮีโมโกลบินและเอมไซน์ในเลือดลดลงในเพศเมียและน้ำหนักตับที่เพิ่มขึ้นในเพศผู้ นอกจากนี้ยังพบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนเป็นหนึ่งในสารประกอบที่กระตุ้นให้เกิด porphyria (อาการที่เกิดขึ้นจากการผิดปกติในเอนไซม์จากตับและเลือด) ในมนุษย์และสัตว์ได้เป็นอย่างดี การป้อนเฮกซะคลอโรเบนซีนที่ปริมาณ 15 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักต่อวันเป็นเวลา 90 วันสามารถก่อให้เกิด porphyria ในกระต่ายและหนูซึ่งนำไปสู่การตายได้ ในปี ค.ศ. 1950 ประชากรของประเทศตุรกีได้รับเฮกซะคลอโรเบนซีนในปริมาณ 50 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อวัน ค่อนข้างไม่ตั้งใจผ่านทาง การรับประทานหญ้าที่มีเฮกซะคลอโรเบนซีนตกค้างอยู่ เป็นผลให้ประชาชนหลายพันคนเกิดเป็น porphyria ขึ้นและร้อยละ 10 ของผู้ป่วยได้เสียชีวิตลง

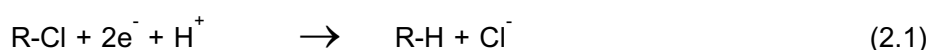
นอกจากนี้ยังพบว่าการได้รับเฮกซะคลอโรเบนซีนอย่างต่อเนื่องส่งผลผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ จากการศึกษาในลิงพบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนที่ปริมาณ 4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักต่อวันสามารถลดระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนในลิงเพศเมีย ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 8 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักต่อวันส่งผลผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของลิง อย่างไรก็ตามไม่พบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนที่ระดับปกติจะส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์ ผลการทดลองในหนูยังพบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) โดยพบการเพิ่มขึ้นของเนื้องอกในหนูที่บริเวณ

ปอด ตับ และม้ามที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักต่อวัน แต่ผลทางด้านการก่อมะเร็งในมนุษย์ยังไม่เป็นที่แน่ชัด

2.1.3 ความคงตัวและการย่อยสลายทางชีวภาพ

งานวิจัยในต่างประเทศพบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนมีความคงตัวสูงจึงมีการพบเฮกซะคลอโรเบนซีนตกค้างและปนเปื้อนในธรรมชาติเป็นเวลานานและสามารถเคลื่อนย้ายไปได้ไกลมาก เกิดการสะสมในไขมันของสิ่งมีชีวิตรวมถึงในนม เลือด และเนื้อเยื่อของมนุษย์ ทำให้เกิดผลกระทบด้านลบขึ้น เป็นผลให้เฮกซะคลอโรเบนซีนถูกกำหนดให้เป็น 1 ใน 12 สารมลพิษอินทรีย์คงทน (Persistent Organic Pollutants, POPs) ในการประชุมของสหประชาชาติที่กรุงสต็อกโฮล์ม ประเทศสวีเดนในปี พ.ศ. 2544 ประเทศไทยได้ยกเลิกการใช้เฮกซะคลอโรเบนซีนมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2523 อย่างไรก็ตามก็ยังมีการพบเฮกซะคลอโรเบนซีนปนเปื้อนในตะกอนจากแหล่งน้ำต่างๆอยู่เสมอ (Brigden และคณะ, 2003; Anotai และคณะ, 2006) ทั้งนี้เนื่องจากการปนเปื้อนของเฮกซะคลอโรเบนซีนในสารเคมีที่ใช้ในอุตสาหกรรมและการเกิดเป็นสารข้างเคียงจากกระบวนการผลิตสารประกอบอินทรีย์คลอรีนอื่นๆเช่น แอทธาซีนและโซมาซีน (Bailey, 2001; ATSDR, 2002) Robert และคณะ (2001) ได้รวบรวมข้อมูลจากแหล่งต่างๆเพื่อให้เห็นภาพรวมของการปลดปล่อยเฮกซะคลอโรเบนซีนในช่วงปีคริสต์ศักราช 1990 โดยพบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนถูกปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมผ่านการใช้เป็นสารกำจัดแมลง สารตั้งต้นในการผลิต และการเผาไหม้เท่ากับ 6,500, 9,500 และ 7,000 กิโลกรัมต่อปี โดยในส่วนที่มาจากการเผาไหม้นั้นรวมถึงการเผาผลาญชีวภาพประมาณ 500 กิโลกรัมต่อปี คิดเป็นอัตราการปลดปล่อยเฉลี่ย 23,000 กิโลกรัมต่อปีโดยมีช่วงการปลดปล่อยอยู่ระหว่าง 12,000 ถึง 92,000 กิโลกรัมต่อปี

เป็นที่ทราบกันดีว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนมีความคงตัวในธรรมชาติสูงมาก การย่อยสลายทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจนไม่ค่อยมีประสิทธิภาพสำหรับสารอินทรีย์คลอรีนที่มีจำนวนคลอรีนในโมเลกุลสูงๆเหมือนเช่นเฮกซะคลอโรเบนซีน อย่างไรก็ตามการย่อยสลายแบบไร้ออกซิเจนสามารถนำไปสู่การลดคลอรีนของสารอินทรีย์คลอรีนได้โดยการแทนที่ของอะตอมไฮโดรเจนและปล่อยอนุมูลคลอรีนออกมาเป็นผลให้อะตอมของคาร์บอนในโมเลกุลถูกลดค่าออกซิเดชันลงดังสมการที่ 2.1



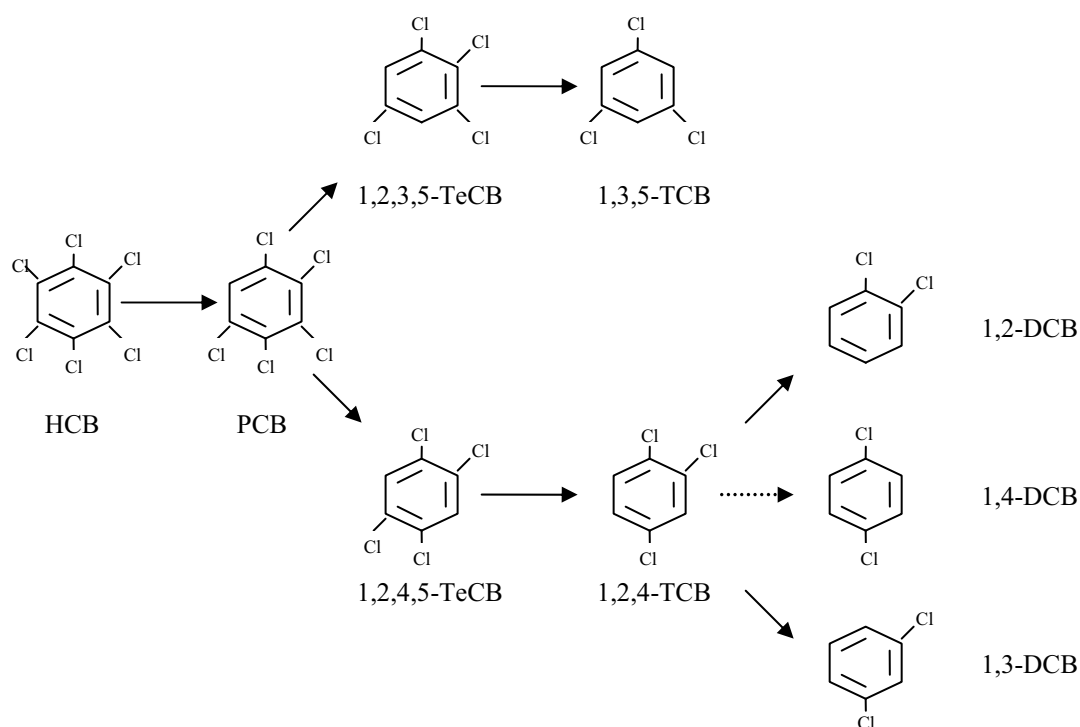
งานวิจัยในหลาย ๆ ประเทศที่พัฒนาแล้วต่างให้ผลที่สนับสนุนว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนมีความเสถียรมาก Beurskens และคณะ (1994) พบว่ามีเพียงร้อยละ 80 ของเฮกซะคลอโรเบนซีนที่ปนเปื้อนในตะกอนก้นทะเลสาบ Ketelmeer ซึ่งเป็นพื้นที่ตกตะกอนของแม่น้ำ Rhine เปลี่ยนรูป

เป็น 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนและ 1,3-ไดคลอโรเบนซีนตามลำดับในช่วงเวลา 20 ปี Chang และคณะ (1997) รายงานค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของเฮกซะคลอโรเบนซีนในดินและน้ำใต้ดินประมาณ 3-6 และ 5.3-11.4 ปีตามลำดับ ในขณะที่ Griffin และ Chou (1981) พบค่าครึ่งชีวิตของเฮกซะคลอโรเบนซีนในดินเท่ากับ 2.7 ถึง 5.8 ปีและส่วนใหญ่จะเคลื่อนย้ายสู่อากาศผ่านการระเหยง่าย (volatilization) Beck และ Hansen (1974) รายงานค่าครึ่งชีวิตในดินของเฮกซะคลอโรเบนซีนเท่ากับ 2.7 ถึง 5.7 ปี ในขณะที่ Howard (1991) รายงานไว้ที่ 10.6 ถึง 22.9 ปี Isensee และคณะ (1976) ไม่พบการลดลงของเฮกซะคลอโรเบนซีนในดินที่เก็บไว้ในภาชนะปิดเพื่อป้องกันการระเหยง่ายภายใต้สภาวะมีอากาศและไร้อากาศตลอดระยะเวลาศึกษา 1 ปี Mackay และคณะ (1992) ใช้ Fugacity Model และค่าคงที่ปฏิกิริยาต่าง ๆ คำนวณหาครึ่งชีวิตของเฮกซะคลอโรเบนซีนในตะกอนได้มากกว่า 6 ปี Zhao และคณะ (2003) ศึกษาการย่อยสลายแบบไร้อากาศของเฮกซะคลอโรเบนซีนในตะกอนพบค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 1.7 และ 0.7 ปีสำหรับตะกอนเดิมและตะกอนที่มีการเติมสารอินทรีย์ตามลำดับ Brahushi และคณะ (2004) ศึกษาการย่อยสลายแบบไร้อากาศของเฮกซะคลอโรเบนซีนโดยจุลชีพในดินธรรมชาติในห้องปฏิบัติการ พบว่าการลดลงของเฮกซะคลอโรเบนซีนเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ในกรณีที่ไม่มีสารอินทรีย์ เฮกซะคลอโรเบนซีนที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 30 ไมโครกรัมต่อกรัมดินถูกย่อยสลายไปร้อยละ 50 ในช่วงเวลา 8 สัปดาห์ และไม่สามารถย่อยสลายได้หมดในช่วง 20 สัปดาห์ที่ทำการทดลอง เมื่อมีการเติมฟางข้าวเพื่อเพิ่มแหล่งคาร์บอนกลับพบว่าอัตราการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าจุลชีพกลุ่มที่สร้างมีเทนไม่ได้มีส่วนร่วมในการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีน ในขณะที่ Prytula และ Pavlostathis (1996) ซึ่งศึกษาการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนในตะกอนที่เก็บจากแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนเฮกซะคลอโรเบนซีนพบว่าเมื่อเลี้ยงร้อยละ 43 ของเฮกซะคลอโรเบนซีนถูกลดคลอรีนในช่วงเวลา 481 วันที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียสในที่มีดโดยไม่มีมีการปรับสภาพคุ้นเคย (acclimation) และให้อาหารเสริม Rosenbrock และคณะ (1997) พบว่ามีเพียงร้อยละ 40 ของคลอไรด์ที่ถูกปล่อยออกมาจากการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนที่เติมลงไป ในดินที่มีสารอินทรีย์สูงใน 140 วัน และพบว่าหากใช้ดินที่มีสารอินทรีย์ต่ำจะไม่เกิดการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนเลย Chen และคณะ (2004) ศึกษาการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนด้วยตะกอนเหลว (sediment slurry) ที่ไม่เคยปนเปื้อนด้วยเฮกซะคลอโรเบนซีนมาก่อนพบว่ามีเพียงตะกอนเหลว 2 ตัวอย่างเท่านั้นที่สามารถลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนได้ โดยมีระยะเวลาพักตัว (lag phase) 90 วัน ข้อมูลเหล่านี้เป็นเครื่องยืนยันว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนเป็นสารมลพิษอินทรีย์ที่มีความคงตัวสูงและตกค้างยาวนานในธรรมชาติได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามก็ตีผลการศึกษาเหล่านี้ขัดแย้งกับผลการศึกษาเบื้องต้นของคณะทำงานนี้ (Anotai และคณะ, 2006) ที่พบว่าตะกอนเหลวจากคลองหัวลำภูและบริเวณปากคลองชายฝั่งทะเลสามารถลดคลอรีนที่ความเข้มข้น 17 มิลลิกรัมต่อกรัมของแข็งแห้งได้อย่างรวดเร็ว เฮกซะคลอโรเบนซีนถูกเปลี่ยนรูปไปหมดภายใน 60 วัน กลไกการลดคลอรีนที่พบคือ เฮกซะคลอโรเบนซีน → เพนตะคลอโรเบนซีน → 1,2,3,5-เตตระคลอโรเบนซีน → 1,3,5-ไตรคลอโรเบน

ขึ้น ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Fathepure และคณะ (1988) ที่พบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนสามารถถูกลดคลอรีนได้ 2 กลไก โดยกลไกหลักเป็นการเปลี่ยนไปเป็น 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนเหมือนเช่นการศึกษาชิ้นนี้ ส่วนกลไกรองเป็นการเปลี่ยนจากเฮกซะคลอโรเบนซีนเป็นเพนตะคลอโรเบนซีน 1,2,4,5-เตตระคลอโรเบนซีน 1,2,4-ไตรคลอโรเบนซีน และ 1,2-, 1,3-, 1,4-ไดคลอโรเบนซีนตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 2.1

2.1.4 ผลของสารให้อิเลคตรอน สารรับอิเลคตรอน และธาตุอาหาร

ตัวแปรต่างๆและสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนได้มีการศึกษากันอย่างต่อเนื่อง Chen และคณะ (2002) พบว่าจุลชีพที่ถูกทำให้คุ้นเคยกับเฮกซะคลอโรเบนซีนและมีการเติมสารสกัดจากยีสต์สามารถลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนได้ การใช้แลคเทตไม่สามารถช่วยให้การลดคลอรีนดีขึ้น ในกรณีที่มีสารรับอิเลคตรอนเช่น ไนเตรตหรือซัลเฟต พบว่าดีไนตริไฟเออร์ (Denitrifiers) และแบคทีเรียลดซัลเฟต (Sulfate-reducing Bacteria) สามารถแย่งสารอาหารจากจุลชีพกลุ่มที่ทำการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนเป็นผลให้ประสิทธิภาพการลดคลอรีนของระบบลดลง ในขณะที่ Pavlostathis และ Prytula (2000) ศึกษาถึงจลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนและคลอโรเบนซีนอื่นๆด้วยจุลชีพไร้อากาศที่ได้รับการปรับสภาพให้คุ้นเคยและเสริมบำรุง (enrichment) ภายใต้สภาวะที่มี



รูปที่ 2.1 การย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนทางชีวภาพภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Fathepure และคณะ (1988))

สารอินทรีย์เหลือเฟือ พบว่าการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซินสอดคล้องกับกลไกที่เสนอโดย Fathepure และคณะ (1998) กล่าวคือเฮกซะคลอโรเบนซินส่วนใหญ่ย่อยสลายไปตามกลไกหลักจนถึง 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซิน และ 1,3-ไดคลอโรเบนซิน มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ผ่านทางกลไกรองเป็น 1,2,4-ไตรคลอโรเบนซิน และ 1,2-ไดคลอโรเบนซิน การเพิ่มสารอินทรีย์และธาตุอาหารจากภายนอกพบว่าสามารถช่วยเร่งอัตราการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซินได้ ตามที่ได้กล่าวถึงมาแล้วว่า Prytula และ Pavlostathis (1996) พบว่าการย่อยสลายของเฮกซะคลอโรเบนซินในตะกอนในแหล่งน้ำธรรมชาติแห่งหนึ่งเกิดขึ้นค่อนข้างช้ากล่าวคือเพียงร้อยละ 43 ของเฮกซะคลอโรเบนซินถูกเปลี่ยนรูปไปในเวลาถึง 481 วัน จึงได้มีการเติมสารอินทรีย์อย่างต่อเนื่องโดยใช้แลกเตทและอะซิเตท พบว่าการย่อยสลายของเฮกซะคลอโรเบนซินเกิดได้เร็วยิ่งขึ้นโดยใช้เวลาเพียง 205 วันสามารถกำจัดเฮกซะคลอโรเบนซินได้ถึงร้อยละ 95 แต่การป้อนธาตุอาหารเสริมไม่ได้ช่วยเร่งอัตราการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซินจึงสรุปว่าในตะกอนมีธาตุอาหารเสริมเพียงพอแล้ว อย่างไรก็ตามในกรณีที่ธาตุอาหารเสริมมีอยู่ไม่เพียงพอในตะกอนจำเป็นต้องมีการเติมธาตุอาหารเพิ่มเติมเพื่อช่วยกระตุ้นการทำงานของจุลชีพที่สามารถลดคลอรีนในเฮกซะคลอโรเบนซินได้ Chen และคณะ (2004) ศึกษาการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซินในตะกอนที่เก็บจากแหล่งน้ำ 4 แห่งในประเทศไต้หวันซึ่งไม่มีพบการปนเปื้อนของเฮกซะคลอโรเบนซินมาก่อนโดยไม่มีการทำให้คุ่นเคย พบว่ามีเพียงตะกอนจาก 2 แหล่งสามารถลดคลอรีนในเฮกซะคลอโรเบนซินได้โดยใช้เวลากว่า 150 วัน แต่หากมีการเติมสารสกัดยีสต์ (yeast extract) ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรลงไปพบว่าตะกอนจากทั้ง 4 แหล่งสามารถย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซินได้โดยมีช่วงเวลาพักตัว 45 ถึง 60 วันและสามารถย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซินได้หมดหลังจากนั้นอีกเพียง 30 วัน ผลจากงานวิจัยที่ผ่านมาทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าสารอินทรีย์ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารให้อิเลคตรอนและธาตุอาหารเป็นสิ่งจำเป็นต่อการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซิน โดยจำเป็นต้องมีอยู่ในระดับที่เหมาะสมและยาวนานเพียงพอเพื่อให้จุลชีพสามารถดำเนินกิจกรรมต่างๆได้อย่างต่อเนื่องเพราะการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซินเกิดขึ้นช้า ส่วนสารรับอิเลคตรอนมักจะรบกวนการกำจัดเฮกซะคลอโรเบนซินเนื่องจากทำให้สภาวะไร้อากาศเปลี่ยนแปลงไปก่อให้เกิดการรบกวนต่อกิจกรรมของจุลชีพที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซิน

2.1.5 ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นตัวแปรอีกตัวหนึ่งที่ส่งผลต่อการทำงานของจุลชีพ งานวิจัยหลายชิ้นพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซินและคลอโรเบนซินทางชีวภาพภายใต้สภาวะไร้อากาศอยู่ในช่วงเมโซฟิลิก (mesophilic range) Middeldorp และคณะ (1997) ศึกษาการย่อยสลายของ 1,2,4-ไตรคลอโรเบนซินพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 37 °C ในขณะที่ 20°C และ 30°C ให้ผลปานกลาง และการลดคลอรีนถูกจำกัดเมื่ออุณหภูมิเท่ากับ 4, 10 และ

55°C Chang และคณะ (1997) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนอยู่ในช่วง 29 ถึง 37°C ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Chen และคณะ (2002) Jacobus และคณะ (1994) ศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่มีต่ออัตราการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนโดยใช้ตะกอนจากทะเลสาบ Ketelmeer และใช้แลคเตทเป็นสารให้คาร์บอน พบว่าอุณหภูมิที่ดีที่สุดคือ 30°C อย่างไรก็ตามก็สามารถพบการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนได้ถึงแม้ว่าอุณหภูมิจะลดต่ำลงจนถึง 3°C ผลงานวิจัยที่ผ่านมาชี้ให้เห็นแนวโน้มว่าจุลชีพที่สามารถลดคลอรีนในเฮกซะคลอโรเบนซีนได้นั้นจะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 ถึง 37°C อันเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิเฉลี่ยของประเทศไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อน (Tropical Zone) ซึ่งมีอุณหภูมิต่ำสุดในเดือนที่หนาวเย็นที่สุดสูงกว่า 18°C และจากข้อมูลตั้งแต่ปี พ.ศ. 2504 ถึง พ.ศ. 2533 ของกรมอุตุนิยมวิทยาพบว่าในพื้นที่กรุงเทพมหานครมีอุณหภูมิเฉลี่ยรายเดือนต่ำสุดและสูงสุดเท่ากับ 24.1°C และ 32.7°C ตามลำดับ ในขณะที่จังหวัดสมุทรปราการซึ่งเป็นพื้นที่ที่คลองหัวลำภูไหลผ่านมีค่าเท่ากับ 26.3°C และ 30.3°C ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศที่พัฒนาแล้วซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในเขตภูมิอากาศแบบอบอุ่น (Temperate Zone) หรือแบบภาคพื้นทวีป (Continental Zone) ที่มีอุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ยในเดือนที่หนาวเย็นที่สุดอยู่ในช่วง -3 ถึง 18°C และ -3°C ตามลำดับ

2.1.6 จลนพลศาสตร์ของการย่อยสลาย

การย่อยสลายของสารอาหารและเฮกซะคลอโรเบนซีนแบบเมตาบอริซึมร่วม (co-metabolization) โดยจุลชีพจะสามารถอธิบายได้ด้วยสมการของ Michaelis-Menten Kinetics ดังแสดงในสมการที่ (2.2) (Pavlostathis และ Prytula, 2000)

$$\frac{d[\text{HCB}]}{dt} = -\left(\frac{k_m X [\text{HCB}]}{K_{\text{HCB}} + [\text{HCB}]}\right)\left(\frac{S}{K_S + S}\right) \quad (2.2)$$

โดย	k_m	=	ค่าคงที่อัตราการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนสูงสุดต่อมวลชีวภาพ
	K_{HCB} และ K_S	=	ค่าคงที่ครึ่งอิ่มตัว (half-saturation constant) สำหรับเฮกซะคลอโรเบนซีนและสารอินทรีย์ตามลำดับ
	X	=	ความเข้มข้นมวลของจุลชีพที่ย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีน
	$[\text{HCB}]$	=	ความเข้มข้นของเฮกซะคลอโรเบนซีน
	S	=	ความเข้มข้นของสารอินทรีย์

ในกรณีของกระบวนการทางชีวภาพแบบไร้อากาศและมีสารอินทรีย์เป็นจำนวนมากดังเช่นที่เกิดขึ้นในตะกอนจากแหล่งน้ำ สมการที่ (2.2) สามารถเปลี่ยนเป็น

$$\frac{d[\text{HCB}]}{dt} = - \left(\frac{k'_m [\text{HCB}]}{K_{\text{HCB}} + [\text{HCB}]} \right) \quad (2.3)$$

โดย k'_m = ค่าคงที่ปรากฏอัตราการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน
สูงสุดต่อมวลชีวภาพ

สมการที่ (2.3) นี้สามารถลดรูปเป็นปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่งถ้าความเข้มข้นของเฮกซะคลอโรเบนซีน ($[\text{HCB}]$) ต่ำกว่าค่า K_{HCB} มาก ในทำนองกลับกันสามารถลดรูปเป็นปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ได้ถ้าความเข้มข้นของเฮกซะคลอโรเบนซีนสูงกว่า K_{HCB} มาก ดังนั้นการจะใช้สมการจลนพลศาสตร์รูปแบบใดย่อมขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีน จากการค้นคว้าในวารสารวิชาการพบว่ามีนักวิจัยอธิบายจลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนทางชีวภาพแบบไร้อากาศโดยใช้ทั้งปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง

(Beurskens และคณะ, 1994; Prytula และ Pavlostathis, 1996) และปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ (Yuan และคณะ, 1999) อย่างไรก็ตาม Pavlostathis และ Prytula (2000) ได้ใช้ปฏิกิริยาการย่อยสลายที่เอนไซม์เกี่ยวข้องด้วยอย่างรูปแบบเต็มดังสมการที่ 2.3 ในการอธิบายทางด้านจลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนในสภาวะที่มีการเพิ่มสารอาหารและธาตุอาหารให้อย่างเพียงพอโดยได้ค่า k'_m และ K_{HCB} เท่ากับ 0.015 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.024 ± 0.003 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.1.7 จุลชีพที่มีส่วนร่วมต่อการลดคลอรีน

นักวิจัยหลายกลุ่มได้พยายามค้นหาจุลินทรีย์หรือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถเฉพาะหรือมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีน กลุ่มจุลินทรีย์ที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนหรือคลอโรเบนซีนอื่นๆ ที่ได้รับความสนใจมากที่สุดคือเมทาโนเจน (methanogens) Middeldorp และคณะ (1997) สร้างสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเมทาโนเจนเพื่อนำไปสู่การย่อยสลาย 1,2,4-ไตรคลอโรเบนซีน พบว่ากลูโคส เอทานอล เมทานอล แลคเตท โปรพิโอเนต อะซิเตท และไฮโดรเจนยกเว้นฟอร์เมทเป็นสารให้อิเลคตรอนที่สามารถก่อให้เกิดการลดคลอรีนของ 1,2,4-ไตรคลอโรเบนซีนได้ โดยกลูโคส แลคเตท และโปรพิโอเนตให้ผลดีที่สุด Chang และคณะ (1997) พบว่าแลคเตทและไพรูเวทสามารถช่วยเร่งอัตราการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนได้ ในขณะที่อะซิเตทไม่มีผล นอกจากนี้ยังพบว่าเมทาโนเจนเป็นจุลินทรีย์หลักที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนเนื่องจากการเติมเอนไซม์หยุดยั้งการทำงานของเมทาโนเจนลงไปจะทำให้การย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนสิ้นสุด ยิ่งไปกว่านั้น Nowak และคณะ (1996) ยังพบว่าการย่อยสลาย

ไตรคลอโรเบนซีนเกิดขึ้นช้าลงเมื่อมีการเติม 2-bromoethane sulfonic acid (BES) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเมทาโนเจนลงไปในตะกอน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนเจนมีความสำคัญต่อการลดคลอรีนของคลอโรเบนซีน อย่างไรก็ตามงานวิจัยหลายชิ้นชี้ให้เห็นในทางตรงกันข้ามว่าการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนไม่ได้เกี่ยวข้องกับโดยตรงกับแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนเจน เช่น Rosenbrock และคณะ (1997) พบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนสามารถเปลี่ยนรูปได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับเมทาโนเจนกล่าวคือมีไนเตรต ซัลเฟต และเฟอร์ริกอยู่ด้วย จึงสรุปว่าเมทาโนเจนไม่ได้เป็นจุลชีพหลักที่ก่อให้เกิดการย่อยสลายของเฮกซะคลอโรเบนซีน ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนเจนยังอาจรบกวนหรือขัดขวางการย่อยสลายคลอโรเบนซีนอีกด้วย Adrian และคณะ (1998) ศึกษาผลของ 2-bromoethanesulfonic acid ที่มีต่อการลดคลอรีนของไตรคลอโรเบนซีนและพบว่า 0.4 มิลลิโมลาร์ของ BES สามารถยับยั้งการทำงานของเมทาโนเจนได้โดยสมบูรณ์ และกลับส่งผลให้การลดคลอรีนของไตรคลอโรเบนซีนเกิดได้ดีขึ้น จึงสรุปว่าเมทาโนเจนรบกวนการทำงานของจุลชีพที่ทำการลดคลอรีน ผลงานวิจัยในส่วนที่ใช้สายพันธุ์ผสมหรือที่ไม่ได้มีการคัดพันธุ์นี้ยังค่อนข้างขัดแย้งกันอยู่โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เห็นว่าเมทาโนเจนมีบทบาทสำคัญต่อการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน และกลุ่มที่พบว่าเมทาโนเจนไม่ได้มีส่วนร่วมในการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนเลย

ในขณะเดียวกันนักวิจัยบางกลุ่มได้ศึกษากับจุลชีพสายพันธุ์บริสุทธิ์ โดยพยายามคัดสายพันธุ์หรือหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน Fennell และคณะ (2004) ใช้ *Dehalococcoides ethenogenes* Strain 195 ในการลดคลอรีนของสารอินทรีย์คลอรีนหลายชนิดในห้องปฏิบัติการและพบว่าจุลชีพสายพันธุ์นี้สามารถลดคลอรีนใน 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin ให้เป็น 1,2,4-trichlorodibenzo-*p*-dioxin และ 1,3-dichlorodibenzo-*p*-dioxin ได้ และสามารถลดคลอรีนใน 2,3,4,5,6-pentachlorobiphenyl ให้เป็น 2,3,4,6- และ/หรือ 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl และ 2,4,6-trichlorobiphenyl ได้นอกจากนี้ยังสามารถลดคลอรีนในเฮกซะคลอโรเบนซีนให้เป็นเพนตะคลอโรเบนซีนและ 1,2,3,5-เตตระคลอโรเบนซีน และ 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนได้ตามลำดับอีกด้วย ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการลดคลอรีนของสารอินทรีย์คลอรีนในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์หรือเกี่ยวข้องกันในแง่ของกระบวนการทางชีวเคมีของจุลชีพ Wu และคณะ (2002) ใช้จุลชีพที่มีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะ (DF-1) ที่คุ้นเคยและมีความสามารถในการลดคลอรีนของโพลีคลอรีเนเต็ดไบฟีนิลมาทำการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนภายใต้สภาวะไร้อากาศและพบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนถูกย่อยสลายเป็นเพนตะคลอโรเบนซีน 1,2,3,5-เตตระคลอโรเบนซีน และ 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนตามลำดับซึ่งเป็นกลไกหลักที่เสนอโดย Fathepure และคณะ (1988) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ DF-1 ที่ผ่านการป้อนด้วยคลอโรเบนซีนแล้วยังมีความสามารถในการลดคลอรีนของโพลีคลอรีเนเต็ดไบฟีนิลได้ดังเดิม ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการย่อยสลายโพลีคลอรีเนเต็ดไบฟีนิลและคลอโรเบนซีนของกลุ่มจุลชีพมีความเชื่อมโยงกัน

2.2 โพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิล

2.2.1 ข้อมูลทั่วไป

โพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิลหรือพีซีบีเป็นกลุ่มของสารอินทรีย์สังเคราะห์ที่ไม่สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยจัดอยู่ในกลุ่มของสารอะโรเมติกไบฟีนิลที่ถูกคลอรีนชัน (Chlorination) พีซีบีถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1929 เพื่อวัตถุประสงค์ทางการค้า พีซีบีมีสภาพเป็นของเหลวหรือของแข็งที่อุณหภูมิห้องและมีสีเหลืองอ่อนถึงไม่มีสี พีซีบีบางคอนเจเนออร์สามารถระเหยง่ายได้แต่ไม่พบว่ามิกลินหรือรอส พีซีบีส่วนใหญ่ละลายน้ำได้น้อย ดังนั้นจึงเป็นกลุ่มที่ชอบไขมัน (lipophilic) พีซีบีถูกผลิตเพื่อการค้าในรูปของสารประกอบพีซีบีหลายๆ คอนเจเนออร์ (congeners) ภายใต้ชื่อทางการค้าต่างๆ กันที่สำคัญได้แก่ Aroclor ของ Monsanto Corporation สัดส่วนของคลอรีนในพีซีบีผสมจะอยู่ระหว่างร้อยละ 18 ถึง 68 โดยน้ำหนัก พีซีบีถูกใช้เป็นสารหล่อลื่นและสารลดความร้อนในหม้อแปลงไฟฟ้า คาปาซิเตอร์ และอุปกรณ์ทางด้านไฟฟ้าอื่นๆ เนื่องจากมีสมบัติที่คงตัวสูง ทนความร้อนได้ดี และเป็นฉนวน ปริมาณการผลิตพีซีบีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 10^6 กิโลกรัมในช่วงปีคริสต์ศักราช 1930 เป็น 2×10^9 กิโลกรัมในปี ค.ศ. 1975 อย่างไรก็ตามหลังจากพีซีบีถูกใช้งานมาประมาณ 4 ทศวรรษ ได้มีการศึกษาพบว่าพีซีบีย่อยสลายทางชีวภาพได้ยากในธรรมชาติ ทำให้มีการตกค้างและแพร่กระจายทั่วไปในสิ่งแวดล้อมผ่านการรั่วไหลจากภาชนะกักเก็บ จากการปนเปื้อนของน้ำชะซึมจากหลุมฝังกลบ จากเตาหลอมของเตาเผา และจากน้ำเสียอุตสาหกรรม การปนเปื้อนของพีซีบีในสิ่งแวดล้อมที่ได้รับความสนใจมากที่สุดกรณีหนึ่งคือที่ Hudson River ในมลรัฐ New York สหรัฐอเมริกา โดยโรงงานของ General Electric Company ผู้ผลิตหม้อแปลงและอุปกรณ์เก็บประจุไฟฟ้ารายใหญ่ของโลกที่ตั้งอยู่ริมแม่น้ำได้ระบายพีซีบีประมาณ 600,000 กิโลกรัมลงสู่ Hudson River ตลอดระยะเวลา 30 ปีก่อนที่จะถูกสั่งห้ามในปี ค.ศ. 1977 เป็นผลให้เกิดการปนเปื้อนและแพร่กระจายของพีซีบีไปทั่วแม่น้ำและไปสะสมในสิ่งมีชีวิตผ่านทางห่วงโซ่อาหาร นำไปสู่ปัญหาสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากสารมลพิษเสี่ยงอันตรายครั้งร้ายแรงที่สุดครั้งหนึ่งในประวัติศาสตร์ของสหรัฐอเมริกา นอกจากจะปนเปื้อนในแหล่งน้ำแล้ว พีซีบีที่ซับบนอนุภาคและส่วนที่ระเหยง่ายสามารถแพร่กระจายไปในบรรยากาศได้อีกด้วย โดยประมาณว่าร้อยละ 98 ของพีซีบีที่พบในมหาสมุทรเป็นผลมาจากพีซีบีที่ปนเปื้อนอนุภาคในบรรยากาศตกตะกอนลงมา เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำที่ต่ำในขณะที่ K_{ow} มีค่าสูง พีซีบีที่ปนเปื้อนในธรรมชาติส่วนใหญ่จึงซับบนของแข็ง เช่น ดิน และตะกอน และสุดท้ายจะเข้าสู่สิ่งมีชีวิตได้ เมื่อเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตแล้ว พีซีบีจะสะสมในไขมันและเนื้อเยื่อซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และระบบนิเวศวิทยาโดยรวม จากผลกระทบดังกล่าวส่งผลให้การผลิตพีซีบีในประเทศสหรัฐอเมริกาได้ยุติลงในเดือนสิงหาคม ค.ศ. 1977 ในปัจจุบันการผลิตและใช้งานของพีซีบีถูกควบคุมอย่างเคร่งครัดเนื่องจากพีซีบีถูกจัดสารมลพิษอินทรีย์คงทนตามอนุสัญญาสต็อกโฮล์ม

(Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants: POPs) เช่นเดียวกับเฮกซะคลอโรเบนซีน

ลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีของพีซีบีได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2 และ 2.3 ลักษณะทางโครงสร้างโมเลกุลของพีซีบีทำให้คลอรีนสามารถแทนที่ในโครงสร้างของไบฟีนิลได้หลากหลายมากจนเกิดเป็นคอนเจนเนอร์ถึง 209 คอนเจนเนอร์ (ดังแสดงในตารางที่ 2.3) การจัดกลุ่มย่อยของพีซีบีสามารถกระทำได้โดยพิจารณาจากจำนวนคลอรีนอะตอมในโครงสร้างไบฟีนิล “Homolog” ใช้สื่อถึงพีซีบีที่มีจำนวนคลอรีนในโมเลกุลเท่ากัน เช่น ไตรคลอโรไบฟีนิล (trichlorobiphenyls) คือเป็น homolog ที่มีคลอรีนอยู่ 3 อะตอม โดยคลอรีนทั้ง 3 อะตอมนี้อาจจับกับไบฟีนิลได้ทั้งหมด 24 รูปแบบหรือเรียกว่า “isomer” พีซีบีสามารถถูกเผาไหม้ได้และก่อให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นพิษมากกว่าพีซีบี เช่น โพลีคลอรีเนเตด ไดเบนโซไดออกซิน (polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs)) และโพลีคลอรีเนเตด ไดเบนโซฟูแรน (polychlorinated dibenzofurans (PDCFs))

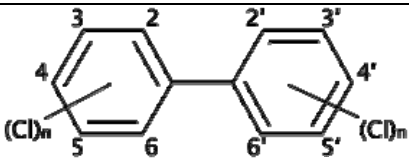
2.2.2 ผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต

พีซีบีสามารถเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้หลายทางทั้งทางปาก ผิวหนัง และหายใจ เมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร พีซีบีจะถูกดูดซึมและกระจายไปทั่วร่างกาย ประสิทธิภาพของการดูดซึมพีซีบีผ่านทางอาหารสูงมากคืออยู่ในช่วงร้อยละ 75 จนถึงมากกว่าร้อยละ 90 เนื่องจากพีซีบีมีสมบัติชอบน้ำมันจึงสะสมอยู่ในอวัยวะที่มีไขมันมาก เช่น ตับ ผิวหนัง และในน้ำนม ร่างกายของสิ่งมีชีวิตสามารถขับพีซีบีออกมาได้บ้างขึ้นอยู่กับคอนเจนเนอร์ของพีซีบีแต่ส่วนใหญ่จะใช้เวลาาน ค่าครึ่งชีวิตของพีซีบีที่มีคลอรีนต่ำจะอยู่ระหว่าง 1 ถึง 6 ปี ในขณะที่คอนเจนเนอร์ที่มีคลอรีนสูงๆจะมีค่าครึ่งชีวิตอยู่ในช่วง 8 ถึง 24 ปี

2.2.2.1 ความเป็นพิษเฉียบพลัน

ผลการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการได้รับพีซีบีที่มีความเข้มข้นสูงๆจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อตับและไต และมีผลกระทบต่อระบบประสาทและการเจริญเติบโต หากได้รับที่มีความเข้มข้นสูงๆอาจทำให้ตายได้ ค่า LD₅₀ สำหรับการได้รับพีซีบีจาก Aroclor อยู่ในช่วง 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ถึงมากกว่า 4,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามก็ดียังไม่มีข้อมูลทางการแพทย์เกี่ยวกับความเป็นพิษเฉียบพลันที่เกิดขึ้นกับมนุษย์ที่ได้รับพีซีบีในปริมาณสูงๆ

ตารางที่ 2.2 รายละเอียดทางเคมีของโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิล

Chemical name	Polychlorinated biphenyls (PCBs)
CASRN (Chemical Abstract Service Registry Number)	01336-36-3
Other names	Aroclor (Monsanto, USA) biphenyl chlorinated Kanechlor (Kanegafuchi, Japan) Clophen (Bayer, Germany) Phenoclor (Prodelec, France) Fenclor (Caffaro, Italy) Fenoclor (S.A. Cros, Spain)
Molecular formula	$C_{12}H_{10-n}Cl_n$ ($n = 1-10$)
Structure formula	

ตารางที่ 2.3 ลักษณะสมบัติทางกายภาพและเคมีของโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิล (Rice และ O'Keefe, 1995)

PCBs	CASRN	No. Of Congener(s)	Molecular Weight	Solubility ($\mu g\ l^{-1}$)	Vapor Pressure (Pa at 20°C)	Log K_{ow}
Mono-	27323-18-8	3	188.7	$1.3 \times 10^{-3} - 7.0 \times 10^{-3}$	$2.2 \times 10^{-3} - 9.2 \times 10^{-2}$	4.6-4.7
Di-	55512-42-9	12	233.1	$0.6 \times 10^{-2} - 7.9 \times 10^{-2}$	$3.7 \times 10^{-2} - 7.5 \times 10^{-1}$	5.2-5.3
Tri-	25323-68-6	24	257.6	$0.1 \times 10^{-2} - 6.4 \times 10^{-2}$	$1.1 \times 10^{-2} - 1.3 \times 10^{-1}$	5.7-6.1
Tetra-	26914-33-0	42	292.0	$0.2 \times 10^{-2} - 1.7 \times 10^{-2}$	1.8-4.0	5.9-6.1
Penta-	25429-29-2	46	326.4	4.2-12	0.88-5.3	6.4-7.6
Hexa-	26601-64-9	42	360.9	0.4-0.9	0.2-1.9	6.4-7.6
Hepta-	28655-71-2	24	395.3	0.5	$0.53 - 4.8 \times 10^{-2}$	7.0-7.7
Octa-	55722-26-4	12	429.8	0.2-0.3	$7.8 \times 10^{-2} - 9.0 \times 10^{-2}$	7.0-7.6
Nona-	53742-07-7	3	464.2	0.1	$3.2 \times 10^{-2} - 1.1 \times 10^{-2}$	7.7-7.9
Deca-	2051-24-3	1	498.7	0.02	5.6×10^{-3}	8.4

2.2.2.2 ความเป็นพิษเรื้อรัง

ผลการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าพีซีบีจะก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในรูปของความเป็นพิษเรื้อรังมากกว่าความเป็นพิษเฉียบพลันเพราะโอกาสที่จะได้รับพีซีบีในปริมาณสูงๆเป็นไปได้

ยาก การศึกษาด้านความเป็นพิษเรื้อรังในสัตว์ทดลองที่กระทำโดยการป้อนพีซีบีผ่านทางปาก ส่วนใหญ่พบว่าพีซีบีเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ ข้อมูลจากการศึกษาในหนูพบว่าเกิดเนื้องอกในตับ ขึ้นเมื่อป้อน Aroclors 1260, 1254, 1242 และ 1016 ให้ทางปาก นอกจากนี้ยังพบว่าสารผสมพีซีบีที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 54 โดยน้ำหนัก (Aroclor 1254) ก่อให้เกิดการสร้างเนื้องอกในตับมากกว่าที่องค์ประกอบอื่นๆ อย่างไรก็ตามก็ตีผลการศึกษาระบาดวิทยาในมนุษย์และคณงานที่ต้องสัมผัสกับพีซีบีเป็นระยะเวลายาวนานไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าพีซีบีเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์โดยตรง แต่พบความเป็นไปได้ที่พีซีบีอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านม รวมถึงเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งที่อวัยวะอื่นๆ เช่น ตับ ตับอ่อน ลำไส้ กระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าสารผสมพีซีบีที่สะสมในสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตซึ่งเป็นห่วงโซ่อาหารของมนุษย์เช่น ปลา และสัตว์น้ำอาจมีการเปลี่ยนองค์ประกอบที่มีความเป็นพิษมากขึ้นได้ เป็นผลให้พีซีบีถูกจัดให้อยู่ใน Group B2 Probable Human Carcinogen โดยองค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (USEPA) องค์กรอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับผลกระทบของพีซีบี เช่น International Agency for Research on Cancer และ US National Institute for Occupational Safety and Health ต่างก็กำหนดให้พีซีบีเป็นสารที่มีความเสี่ยงที่จะก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์

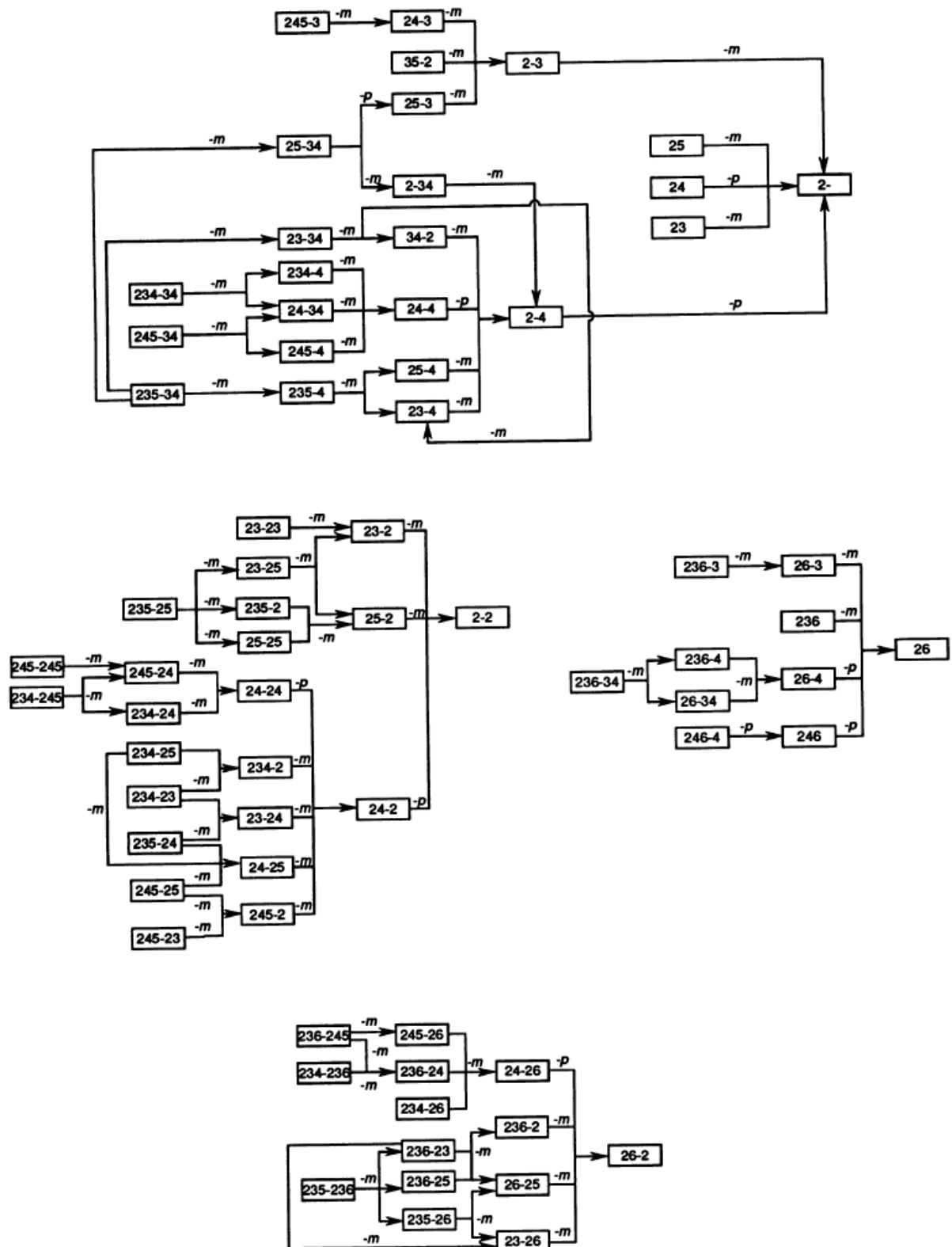
นอกจากการก่อให้เกิดโรคมะเร็งแล้ว ผลการศึกษาในสัตว์ยังพบว่าพีซีบีมีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ระบบสืบพันธุ์ และระบบประสาท การศึกษาในลิงพันธุ์ Rhesus ซึ่งมีระบบภูมิคุ้มกันคล้ายมนุษย์มากพบว่าพีซีบีทำให้ต่อไธ่ของลิงมีขนาดลดลงเป็นผลให้ระบบภูมิคุ้มกันลดลงตามไปด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าพีซีบีทำให้อัตราการรอดระหว่างคลอดของสัตว์ทดลองลดลงและตัวอ่อนที่รอดจะมีน้ำหนักตัวลดลง พร้อมทั้งมีการพัฒนาการทางระบบประสาทและสมองช้าซึ่งรวมถึงการจดจำและการเรียนรู้ ผลการศึกษาในประชากรมนุษย์โดยพิจารณาจากคณงานที่มีอัตราเสี่ยงสูงที่จะได้สัมผัสกับพีซีบีได้ผลเช่นเดียวกับที่ทดลองในสัตว์

2.2.3 ความคงตัวและการย่อยสลายทางชีวภาพ

พีซีบีถูกนำเข้ามาในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2450 ส่วนใหญ่เพื่อใช้เป็นสารฉนวนและหล่อเย็นของหม้อแปลงและตัวเก็บประจุไฟฟ้า อย่างไรก็ตามก็ตีเนื่องจากผลกระทบด้านลบของพีซีบีที่มีต่อสิ่งแวดล้อม ประเทศไทยได้ประกาศห้ามการผลิต การใช้งาน การเคลื่อนย้าย และการส่งออกพีซีบีมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2518 และปฏิบัติตามข้อตกลงในอนุสัญญาสต็อกโฮล์มว่าด้วยสารมลพิษที่ตกค้างยาวนานอย่างเคร่งครัด แต่ถึงกระนั้นก็ได้มีการตรวจพบพีซีบีปนเปื้อนอยู่ในตะกอนของแม่น้ำเจ้าพระยาช่วงที่ไหลผ่านกรุงเทพฯและจังหวัดสมุทรปราการ รวมถึงตอนบนของอ่าวไทยในระดับ 0.01-0.22, 0.02-0.05 และ 0-0.02 นาโนกรัมต่อกรัมตามลำดับ อย่างไรก็ตามก็ตีตรวจไม่พบพีซีบีในตะกอนของแม่น้ำเจ้าพระยาช่วงที่ไหลผ่านจังหวัดอยุธยาและนนทบุรี (Boonyatumanond และคณะ, 2003; Boonyatumanond และคณะ, 2006)

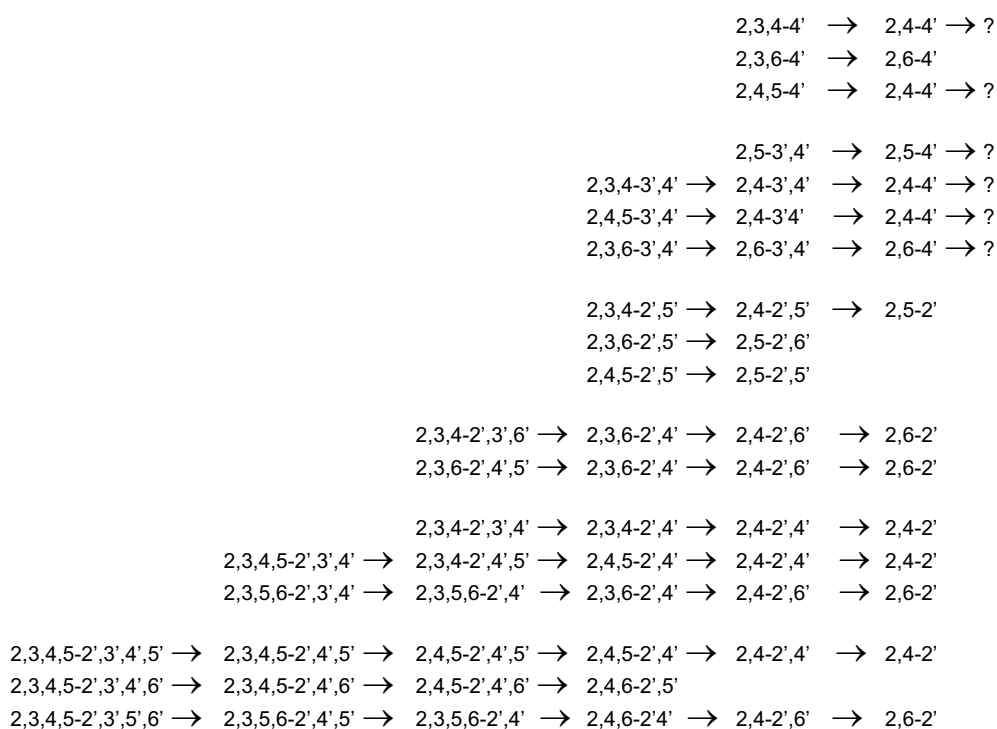
การย่อยสลายพีซีบีทางชีวภาพสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาวะมีอากาศและไร้อากาศ พีซีบีที่มีจำนวนคลอรีนอะตอมต่ำๆสามารถถูกย่อยสลายโดยจุลชีพแบบใช้อากาศได้ทั้งในรูปแบบของการเป็นสารอาหารโดยตรงและผ่านทางเมตาบอลิซึมร่วม อย่างไรก็ตามหากมีอะตอมของคลอรีนมากขึ้นจะไม่สามารถถูกย่อยสลายโดยจุลชีพแบบใช้อากาศได้แต่จะสามารถถูกลดคลอรีนด้วยกระบวนการทางชีวภาพแบบไร้อากาศผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมร่วม

ความสามารถในการละลายน้ำของพีซีบีมีส่วนสำคัญต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ พีซีบีที่มีอะตอมของคลอรีนต่ำมักจะละลายน้ำได้มากกว่าพีซีบีที่มีอะตอมของคลอรีนสูง (แต่โดยรวมถือว่าความสามารถในการละลายน้ำของพีซีบีต่ำมากดังแสดงในตารางที่ 2.3) จึงเป็นผลให้พีซีบีที่มีจำนวนคลอรีนอะตอมไม่มากนักสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่ายกว่ากลุ่มที่มีคลอรีนอะตอมมากเนื่องจากจุลชีพสามารถเข้าถึงได้ง่ายกว่า กลไกที่เกิดขึ้นจะเป็นในลักษณะการลดคลอรีนโดยแทนที่คลอรีนด้วยไฮโดรเจนเหมือนกรณีของเฮกซะคลอโรเบนซีนดังที่ได้กล่าวมาแล้ว (สมการที่ 2.1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Brown และคณะ (1987) ที่ทำการวิเคราะห์ตะกอนของ Hudson River ในมลรัฐ New York และ Silver Lake ในมลรัฐ Massachusetts สหรัฐอเมริกา ซึ่งอยู่ภายใต้สภาวะไร้อากาศและได้รับการปนเปื้อนจากพีซีบี ผลการวิเคราะห์พบว่าพีซีบีที่หลงเหลืออยู่ในตะกอนเป็นคอนเจนเนอร์ที่มีจำนวนคลอรีนอะตอมต่ำมากกว่าที่มีจำนวนคลอรีนอะตอมสูงแตกต่างจากองค์ประกอบของส่วนผสมพีซีบีที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์ ผลการศึกษาตะกอนในห้องปฏิบัติการให้ผลเช่นเดียวกันกล่าวคือพีซีบีคอนเจนเนอร์ที่มีจำนวนคลอรีนสูงๆใน Aroclor 1242 ถูกเปลี่ยนรูปเป็นคอนเจนเนอร์ที่มีคลอรีนต่ำเช่น โมเนคลอโรเบนซีนหรือไดคลอโรไบฟีนิล (Quensen และคณะ, 1990) กลไกการลดคลอรีนของพีซีบีทางชีวภาพแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลชีพ อย่างไรก็ตามพบว่ามีกรณีที่มีคลอรีนสามอะตอมเรียงกันอยู่ในวงฟีนิลเดียวกัน คลอรีนอะตอมที่อยู่ตรงกลางจะถูกกำจัดได้ง่ายที่สุด Williams (1994) ศึกษาการลดคลอรีนของไตรคลอโรไบฟีนิลโดยใช้ตะกอนจาก 3 แหล่งคือ Hudson River ในมลรัฐ New York, Silver Lake และ Woods Pond ในมลรัฐ Massachusetts สหรัฐอเมริกา พบว่าตะกอนจาก Hudson River สามารถลดคลอรีนในตำแหน่งเมตา (meta-position) และพารา (para-position) ได้หมด แต่ไม่สามารถกำจัดคลอรีนที่ตำแหน่งออร์โธ (ortho-position) ได้เลย ในขณะที่ตะกอนจาก Silver Lake และ Woods Pond สามารถลดคลอรีนได้แค่อะตอมเดียวที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งรวมถึงตำแหน่งออร์โธด้วย อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีการพบการลดคลอรีนในตำแหน่งออร์โธบ้าง (Wu และคณะ, 1997; Van Dort และ Bedard, 1991; Kuiper และคณะ, 1999) แต่งานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าคลอรีนในตำแหน่งเมตาและพาราของพีซีบีจะสามารถถูกลดคลอรีนได้ง่ายกว่าในตำแหน่งออร์โธ (Mavoungou และคณะ, 1991; Williams, 1994; Rhee และคณะ, 1993; Natarajan และคณะ, 1996) Fish และ Principe (1994) ศึกษาการย่อยสลายของพีซีบีในรูปของ Aroclor 1242 ที่ปนเปื้อนในตะกอนของ Hudson River ในมลรัฐ New York อย่างละเอียดและได้นำเสนอกลไกการย่อยสลายของพีซีบีคอนเจนเนอร์ต่างๆที่มีอยู่ใน Aroclor 1242 ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งพบว่าการลดคลอรีนส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นกับคลอรีนอะตอม



รูปที่ 2.2 พังการลดคลอรีนของพีซีบีคอนเจนเนอร์ต่างๆที่พบใน Aroclor 1242 ด้วยตะกอนที่ปนเปื้อนพีซีบีจาก Hudson River (Fish และ Principe, 1994)

ที่ตำแหน่งเมตาก่อนแล้วตามด้วยตำแหน่งพารา แต่ไม่พบการลดคลอรีนที่ตำแหน่งออโซเล
Wiegel and Wu (2000) ได้รวบรวมข้อมูลของ Bedard และ Quensen (1995) ซึ่งศึกษาการ
ย่อยสลายของพีซีบีในตะกอนจาก Woods Pond ในมลรัฐ Massachusetts ประเทศ
สหรัฐอเมริกา และแจกแจงกลไกการย่อยสลายพีซีบีซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยต่างๆที่
ได้กล่าวมาแล้ว Van Dort และคณะ (1997) ใช้จุลชีพจากตะกอนของ Woods Pond ซึ่ง
ปนเปื้อนด้วยสารไฮโดรคาร์บอนและ Aroclor ย่อยสลาย 2,3,5,6-เตตระคลอโรไบฟีนิล พบว่า
เกิดเป็น 2,5-ไดคลอโรไบฟีนิล (ร้อยละ 21) 2,6-ไดคลอโรไบฟีนิล (ร้อยละ 63) และ 2,3,6-ไตร
คลอโรไบฟีนิล (ร้อยละ 16) ในระยะเวลา 37 สัปดาห์ จากการรวบรวมข้อมูลของ Wiegel และ
Wu (2000) พบว่าจุลชีพจากหลายๆพื้นที่ที่ปนเปื้อนด้วยพีซีบีทั้งในประเทศแคนาดา
สหรัฐอเมริกา เยอรมัน ญี่ปุ่น และเนเธอร์แลนด์สามารถย่อยสลายพีซีบีภายใต้สภาวะไร้อากาศ
ได้ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าจุลชีพจากบางพื้นที่ในสหรัฐอเมริกาที่ไม่ได้ปนเปื้อนพีซีบีเลยก็สามารถ
ลดคลอรีนได้เช่นกัน เช่น Sandy Creek Nature Center ในมลรัฐ Georgia, Center Pond ใน
มลรัฐ Massachusetts, Red Cedar River และ Saline River ในมลรัฐ Michigan และ Hudson
River (Spiers Falls) ในมลรัฐ New York สหรัฐอเมริกา พร้อมกับเสนอกลไกในการลดคลอรีน
ของพีซีบีคอนเจนเนอร์ต่างๆดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กลไกการลดคลอรีนของพีซีบีในตะกอนจาก Woods Pond ในมลรัฐ Massachusetts
สหรัฐอเมริกาที่พีเอช 6.0-7.5 และอุณหภูมิ 25°C (Wiegel and Wu, 2000)

2.2.4 ผลของสารให้อิเลคตรอน สารรับอิเลคตรอน และธาตุอาหาร

การลดคลอรีนของพีซีบีด้วยกระบวนการชีวภาพแบบไร้อากาศเป็นกลไกแบบเมตาบอลิซึมร่วม (co-metabolism) ดังนั้นการเติมสารอินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งให้อิเลคตรอนหลักแก่จุลชีพจึงสามารถช่วยเร่งให้เกิดการย่อยสลายพีซีบีได้เช่นเดียวกับการนี้ของเฮกซะคลอโรเบนซีน Nies และ Vogel (1990) พบว่าการเติมเมทานอล กลูโคส อะซีโตน และอะซิเตทสามารถช่วยเร่งการลดคลอรีนของ Aroclor 1242 โดยอาศัยจุลชีพจากตะกอนของ Hudson River ในมลรัฐ New York สหรัฐอเมริกาที่มีการปนเปื้อนพีซีบีได้ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการเติมสารอินทรีย์ในการลดคลอรีนยังคงเหมือนกันโดยการลดคลอรีนเกิดขึ้นที่คลอรีนตำแหน่งเมตา (meta-position) และพารา (para-position) ได้ดีกว่าที่ตำแหน่งออร์โธ (ortho-position) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารผสมพีซีบีต่าง ๆ กันคือ Aroclor 1242, 1248, 1254 และ 1260 พบว่า Aroclor 1254 เกิดการลดคลอรีนได้ดีที่สุด หรือในกรณีงานวิจัยของ Alder และคณะ (1993) ที่พบว่าการเพิ่มกรดไขมันเช่น อะซิเตท โพรพิโอเนต บิวทิเรต และกรดเฮกซะโนอิก (hexanoic acid) ลงในตะกอนที่มีสารอินทรีย์คาร์บอนจำกัดอย่างต่อเนื่องสามารถช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดการลดคลอรีนของพีซีบีได้ แต่ในขณะเดียวกันเมื่อทดลองกับตะกอนที่มีสารอินทรีย์สูงอยู่แล้วกลับไม่พบว่าทำให้เกิดการลดคลอรีนของพีซีบีดีขึ้น นอกจากสารอินทรีย์ที่สามารถทำหน้าที่เป็นสารให้อิเลคตรอนได้แล้ว ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ก็สามารถทำหน้าที่เป็นสารให้อิเลคตรอนได้เช่นกัน Sokol และคณะ (1994) พบว่าไฮโดรเจนรบกวนการทำงานของจุลชีพที่สามารถย่อยสลายพีซีบีได้ เป็นผลให้ประสิทธิภาพโดยรวมลดลง อย่างไรก็ตามเนื่องจากจุลชีพในตะกอนจะมีทั้งกลุ่มที่สามารถย่อยสลายพีซีบีได้และย่อยสลายไม่ได้ ดังนั้นหากสารอินทรีย์ที่เพิ่มให้ถูกใช้โดยจุลชีพกลุ่มที่ไม่สามารถย่อยสลายพีซีบีได้เป็นหลักจะทำให้จุลชีพกลุ่มที่ย่อยพีซีบีได้ถูกรบกวนเนื่องจากการแย่งธาตุอาหารอื่นๆ เป็นผลให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายพีซีบีลดลง (Wiegel และ Wu, 2000)

การเติมสารรับอิเลคตรอนลงไปในตะกอนให้ผลที่หลากหลายต่อการลดคลอรีนของพีซีบีทางชีวภาพ Morris และคณะ (1992) ศึกษาถึงผลของสารรับอิเลคตรอนที่มีต่อการลดคลอรีนของพีซีบีพบว่าการเติมสารรับอิเลคตรอนมีผลต่อการย่อยสลายพีซีบีภายใต้สภาวะไร้อากาศ กล่าวคือซัลเฟตจะหยุดยั้งการลดคลอรีนในขณะที่ไนเตรตและคาร์บอนไดออกไซด์ช่วยให้เกิดการลดคลอรีนดีขึ้น ในขณะที่ Morris และคณะ (1992) และ Rhee และคณะ (1993) กลับพบว่าไนเตรตที่ความเข้มข้น 10-16 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลต่อการลดคลอรีนของพีซีบี งานวิจัยของ Chang (1995) พบว่าซัลเฟต ไฮโดรซัลเฟต ซัลไฟต์ หรือไนเตรตที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์รบกวนต่อการลดคลอรีนของ 2,3,4,6-เตตระคลอโรไบฟีนิลและ 2,4,6-ไตรคลอโรไบฟีนิล พร้อมทั้งเสนอสมมุติฐานว่าผลที่ได้มาจากจุลชีพชอบที่จะใช้สารรับอิเลคตรอนเหล่านี้มากกว่าพีซีบี

หรืออาจเป็นเพราะจุลชีพที่ไม่สามารถย่อยสลายพีซีบีได้สามารถดูดซับสารรับอิเล็กตรอนเหล่านี้ และเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นจนแย่งสารให้อิเล็กตรอน (สารอินทรีย์) จากจุลชีพที่ลดคลอรีนได้

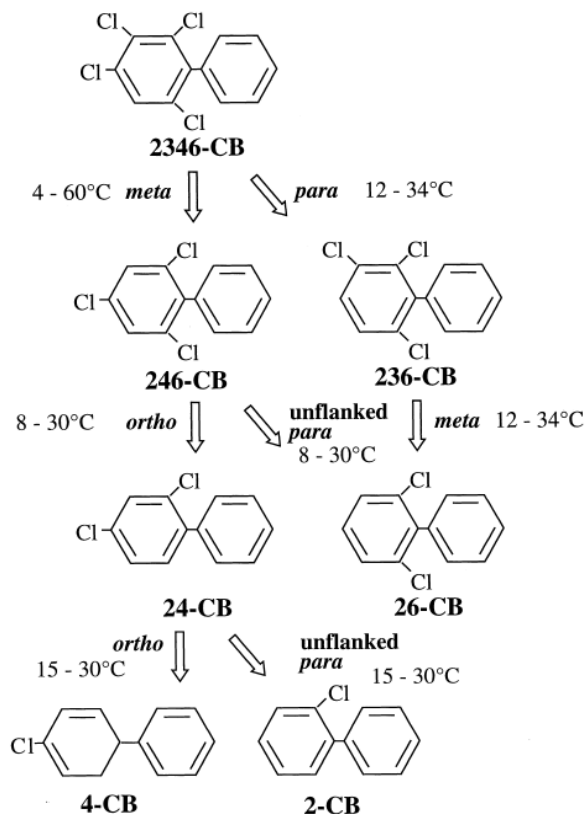
จากผลการศึกษาทั้งหมดที่รวบรวมมาพบว่าการลดคลอรีนของพีซีบีสามารถเกิดขึ้นได้ ภายใต้สภาวะ methanogenic, sulfidogenic และ denitrifying conditions ได้ทั้งสิ้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและความหลากหลายของจุลชีพในตะกอน สภาวะแวดล้อม และธาตุอาหารเสริม

2.2.5 ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นตัวแปรที่สำคัญที่มีผลต่อการลดคลอรีนทางชีวภาพของสารประกอบอินทรีย์คลอรีนรวมถึงเฮกซะคลอโรเบนซีนและพีซีบี โดยส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของจุลชีพ การสร้างเอนไซม์และความไวปฏิกิริยาของเอนไซม์ ถึงแม้ว่าอุณหภูมิจะมีผลต่อการดูดซับของพีซีบีในตะกอนซึ่งนำไปสู่ความเข้าถึงได้ของจุลชีพ แต่งานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าอุณหภูมิมิมีผลสำคัญต่อการสร้างเอนไซม์และความไวปฏิกิริยาของเอนไซม์มากกว่า ซึ่งส่งผลให้เกิดการคัดพันธุ์ประชากรจุลชีพที่รวมถึงกลุ่มที่ย่อยสลายพีซีบีที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน งานวิจัยที่ศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อการลดคลอรีนของพีซีบีที่สำคัญคืองานของ Wu และคณะ (1996, 1997a, 1997b) ซึ่งพบว่า 2,3,4,6-เตตระคลอโรไบฟีนิลและ Aroclor 1260 ที่ปนเปื้อนในตะกอนจาก Woods Pond ในมลรัฐ Massachusetts สหรัฐอเมริกา สามารถถูกย่อยสลายได้ในช่วงอุณหภูมิ 18-30°C และ 50-60°C โดยมีช่วงอุณหภูมิที่ดีที่สุดระหว่าง 18-30°C อุณหภูมิยังมีผลอย่างมากต่ออัตราการลดคลอรีนที่เกิดขึ้น Tiedje และคณะ (1993) ศึกษาการย่อยสลายของ Aroclor 1242 ด้วยตะกอนจาก Hudson River ในช่วงที่ปนเปื้อนพีซีบีที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ 12, 25, 37, 45 และ 60°C พบว่าการลดคลอรีนของ Aroclor 1242 ที่ 12°C มีอัตราประมาณสองเท่าของที่อุณหภูมิ 25°C แต่พบว่า Aroclor 1242 ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้เลยเมื่ออุณหภูมิเท่ากับ 37°C หรือสูงกว่า ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่ากลไกในการลดคลอรีนของพีซีบีขึ้นอยู่กับอุณหภูมิด้วยดังแสดงในรูปที่ 2.4 ซึ่งเป็นผลงานวิจัยของ Wiegel และ Wu (2000)

2.2.6 จลนพลศาสตร์ของการย่อยสลาย

จากการสืบค้นข้อมูลไม่พบว่ามีงานวิจัยถึงจลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายพีซีบีโดยตรงซึ่งต่างจากกรณีของเฮกซะคลอโรเบนซีนที่มีงานวิจัยหลายชิ้นที่ศึกษาถึงอัตราการย่อยสลายและตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ ที่เป็นเช่นนั้นคาดว่าเป็นผลมาจากพีซีบีย่อยสลายช้ากว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนมาก จำเป็นต้องใช้เวลานานมากกว่าจะสามารถหาแนวโน้มการลดลงของพีซีบีได้ จึงทำให้อัตราการย่อยสลายของพีซีบีไม่ได้รับความสนใจเท่าที่ควร อย่างไรก็ตามเนื่องจากนักวิจัยส่วนใหญ่เชื่อว่ากลไกส่วนใหญ่ของการย่อยสลายทางชีวภาพของพีซีบีเป็นกระบวนการ



รูปที่ 2.4 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกลไกการลดคลอรีนของ 2,3,4,6-เตตระคลอโรไบฟีนิลในตะกอนจาก Woods Pond มลรัฐ Massachusetts สหรัฐอเมริกา ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 4 และ 66°C (Wiegel และ Wu, 2000)

เมตาบอลิซึมร่วม (co-metabolism) เหมือนเช่นในกรณีของเฮกซะคลอโรเบนซีน สมการจลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายของ Modified Monod Kinetics Model (สมการที่ 2.2 และ 2.3) จึงน่าจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับกรณีของพีซีบีได้เช่นกัน

2.2.7 จุลชีพที่มีส่วนร่วมต่อการลดคลอรีน

การลดคลอรีนของพีซีบีส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่มีการสร้างก๊าซมีเทน (methanogenic conditions) (Alder และคณะ, 1993; May และคณะ, 1992; Morris และคณะ, 1992; Rhee และคณะ, 1993) งานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าการหยุดกิจกรรมของจุลชีพกลุ่มเมทาโนเจนด้วย bromoethane sulfonic acid (BES) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของกระบวนการเมทาโนเจเนซิส (methanogenesis) มีผลต่อการลดของพีซีบี (Morris และคณะ, 1992; Rhee และคณะ, 1993; Williams, 1994) อย่างไรก็ตามงานวิจัยบางชิ้นให้ผลตรงกันข้าม เช่น Ye และคณะ (1992) พบว่าการเติม BES ไม่มีผลต่อการลดคลอรีนใน Aroclor 1242 ด้วยตะกอนจาก Hudson River ที่ผ่านการสโตไรซ์มาแล้ว ซึ่งให้เห็นเป็นนัยว่าจุลชีพกลุ่มเมทาโนเจนไม่ได้มีส่วน

ร่วมต่อการย่อยสลายพีซีบีในงานวิจัยดังกล่าว ผลดังกล่าวค่อนข้างจะสอดคล้องกับในกรณีของเฮกซะคลอโรเบนซีนที่กล่าวมาแล้ว กล่าวคือผลการวิจัยส่วนหนึ่งระบุว่าเมทาโนเจนมีส่วนเกี่ยวข้องกับการลดคลอรีนของพีซีบี ในขณะที่อีกส่วนหนึ่งพบว่าเมทาโนเจนไม่มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงต่อการย่อยสลายพีซีบี ในทำนองเดียวกันงานวิจัยบางชิ้นพบว่าไนตริฟายอิงแบคทีเรียไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการลดคลอรีนของพีซีบี (Morris และคณะ, 1992; และ Rhee และคณะ, 1993) ซึ่งขัดแย้งกับงานวิทยานิพนธ์ของ Chang (1995) ที่พบว่าไนตริฟายอิงแบคทีเรียอาจรบกวนการทำงานของจุลชีพที่ลดคลอรีนในพีซีบีได้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าจุลชีพกลุ่มที่ใช้ซัลเฟต (เช่น sulfate-reducing bacteria) ไบโอซัลเฟต หรือซัลไฟต์เป็นสารรีดิวซ์ลดคลอรีนรบกวนต่อการลดคลอรีนของ 2,3,4,6-เตตระคลอโรไบฟีนิล และ 2,4,6-ไตรคลอโรไบฟีนิล

งานวิจัยหลายชิ้นพยายามที่จะคัดสายพันธุ์บริสุทธิ์ของจุลชีพที่สามารถย่อยสลายพีซีบีได้ แต่ส่วนใหญ่ไม่ประสบความสำเร็จ (Hartcamp-Commandeur และคณะ, 1996; Williams, 1997; Bedard และคณะ, 1997; Natarajan และคณะ, 1996; Wu และ Wiegel, 1997) Wiegel และคณะ (1999) ใช้ *Desulfitobacterium dehalogenans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก (gram positive) ที่สามารถลดคลอรีนในตำแหน่งออร์โธของคลอโรฟีนอลและสามารถลดคลอรีนในตำแหน่งเมตาของ para-hydroxylated PCBs (3,3',5,5'-tetrachloro-4,4'-dihydroxybiphenyl) ได้มาศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการลดคลอรีนในพีซีบี ผลที่ได้พบว่าจุลชีพสายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถลดคลอรีนของพีซีบีได้

บทที่ 3 วิธีการศึกษาวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างน้ำและตะกอน

คณะทำงานได้ทำการเก็บตัวอย่างตะกอนและน้ำในลำน้ำต่างๆทั้งในพื้นที่ที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนเฮกซะคลอโรเบนซิน/พีซีบีและในพื้นที่ที่คาดว่าจะไม่มีการปนเปื้อนรวมทั้งสิ้น 10 พื้นที่ 21 จุดเก็บตัวอย่างดังแสดงในรูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.1 (ภาพของสภาพสถานที่และการเก็บตัวอย่างได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก) ก่อนเก็บตัวอย่างตะกอนจะทำการปาดหน้าชั้นตะกอนด้านบนออกประมาณ 1-2 เซนติเมตร จากนั้นจึงตักตะกอนชั้นล่างใส่ภาชนะและปิดผนึก ส่วนน้ำตัวอย่างจะตักใส่ภาชนะปิด ตัวอย่างตะกอนและน้ำถูกเก็บรักษาไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4°C

คลองห้วยลำภูเป็นคลองรับน้ำจากชุมชนบริเวณถนนสุขุมวิทและชุมชนวัดห้วยลำภู จังหวัดสมุทรปราการ นอกจากนี้ยังรับน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วจากนิคมอุตสาหกรรมบางปูและโรงงานอุตสาหกรรมในพื้นที่ก่อนไหลออกสู่ทะเลที่อ่าวไทย คลองห้วยลำภูเป็นจุดเริ่มต้นของโครงการนี้เมื่อทาง Green Peace ได้ทำป้ายประกาศเตือนประชาชนในชุมชนบริเวณริมคลองทราบว่าน้ำและตะกอนในคลองได้รับการปนเปื้อนจากสารมลพิษเสี่ยงอันตราย (hazardous pollutants) หลายชนิดรวมถึงเฮกซะคลอโรเบนซิน (รูปที่ 3.2) ทำให้คาดว่าสัตว์น้ำบริเวณชายฝั่งของอ่าวไทยในบริเวณดังกล่าวอาจได้รับสารมลพิษเสี่ยงอันตรายและเกิดการสะสมอยู่ใน



รูปที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง 10 พื้นที่ (รายละเอียดของพื้นที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 จุดเก็บตัวอย่างและตำแหน่งพิกัดทางภูมิศาสตร์

จุด ที่	แหล่งน้ำที่เก็บตัวอย่าง		พิกัดทางภูมิศาสตร์	
			N	E
1	คลองหัวลำภู ถนนสุขุมวิท สมุทรปราการ	Site A1	13°32'39"	100°37'36"
		Site A2	13°32'04"	100°37'34"
		Site A3	13°32'03"	100°37'33"
		Site A4	13°32'01"	100°37'32"
		Site A5	13°31'59"	100°37'31"
		Site A6	13°31'57"	100°37'29"
		Site A7	13°31'54"	100°33'27"
		Site A8	13°31'51"	100°33'26"
		Site A9	13°31'44"	100°33'22"
		Site A10	13°31'43"	100°33'23"
2	คูระบายข้างถนนบางเมฆขาว สมุทรปราการ	Site B1	13°33'40"	100°36'33"
		Site B2	13°33'24"	100°36'22"
		Site B3	13°33'12"	100°36'16"
		Site B4	13°33'06"	100°36'07"
3	คลองใกล้โรงไฟฟ้าพระนครใต้	Site C1	13°32'27"	100°33'31"
4	คลองรับน้ำทิ้งจากนิคมอุตสาหกรรมบางพลี	Site D1	13°32'57"	100°47'25"
		Site D2	13°32'56"	100°47'26"
		Site D3	13°33'49"	100°47'42"
		Site D4	13°33'54"	100°47'43"
5	คลองข้าง ถ. ตำหรุ-บางพลี สมุทรปราการ	Site E1	13°31'44"	100°47'43"
		Site E2	13°45'39"	100°46'52"
6	คลองบางฝ้ายซึ่งรับน้ำทิ้งจากนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง	Site F1	13°45'39"	100°46'52"
7	คลองแพรกษา สมุทรปราการ	Site G1	13°34'42"	100°39'06"
8	คูน้ำข้าง บ. ไทยเซ็นทรัลเคมีคัล จก. (มหาชน) ถ. สุขสวัสดิ์ สมุทรปราการ	Site H1	13°36'35"	100°33'04"
		Site H2	13°36'35"	100°33'04"
9	คูน้ำข้างถนนสุขสวัสดิ์ สมุทรปราการ	Site I1	13°35'39"	100°33'53"
10	คลองบางปลากรด ถนนสุขสวัสดิ์ สมุทรปราการ	Site J1	13°35'57"	100°33'39"
		Site J2	13°35'55"	100°33'38"



(ก) ป้ายเตือนบริเวณต้นคลองไถ่ถนนสุขุมวิท



(ข) ป้ายเตือนบริเวณใกล้ปากคลองก่อนไหลลงสู่ทะเล

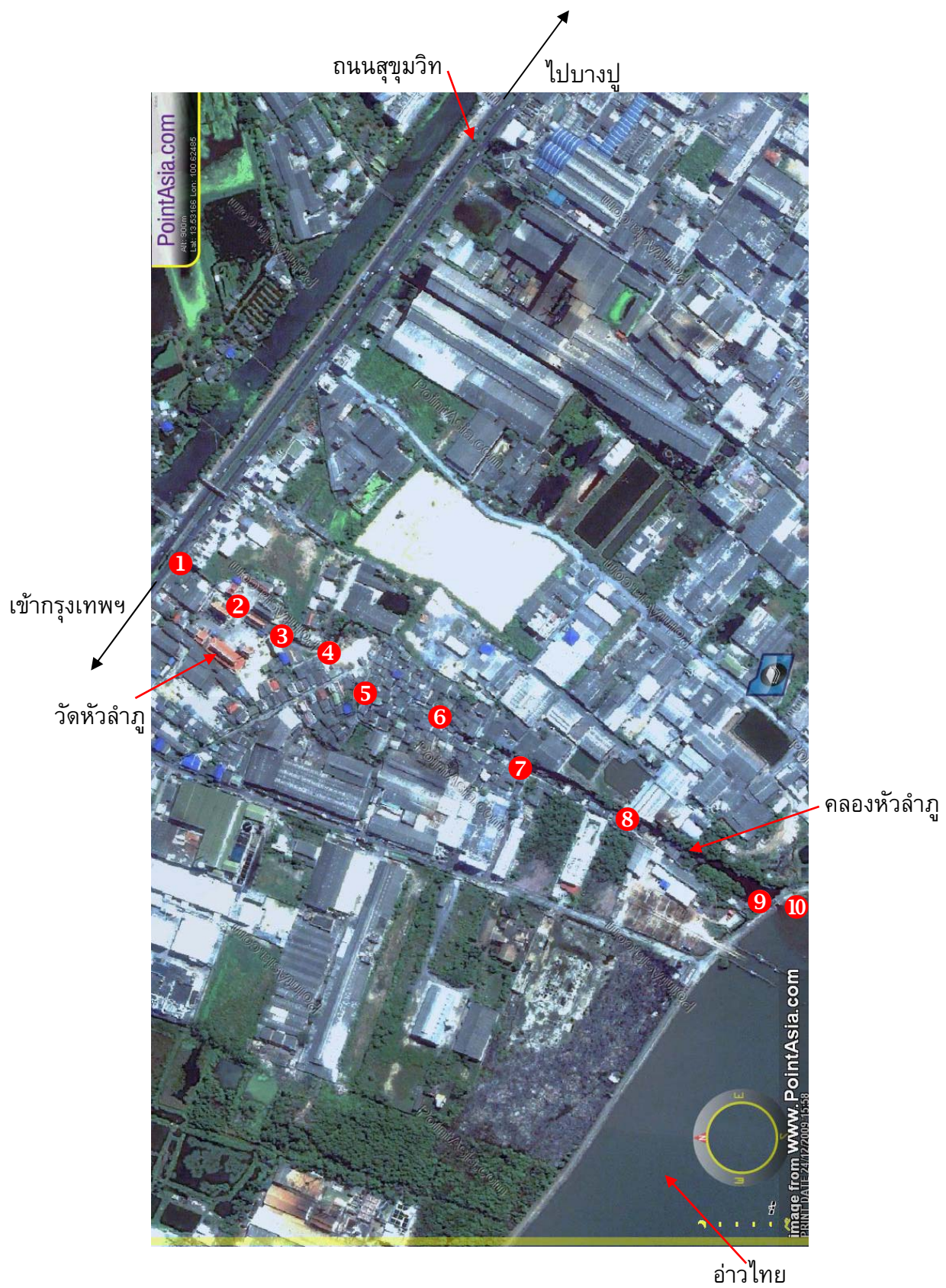
รูปที่ 3.2 ป้ายเตือนการปนเปื้อนของสารมลพิษเสี่ยงอันตรายในน้ำและตะกอนในคลองหัวลำภู
ซึ่งจัดทำโดย Green Peace ในปี พ.ศ. 2537

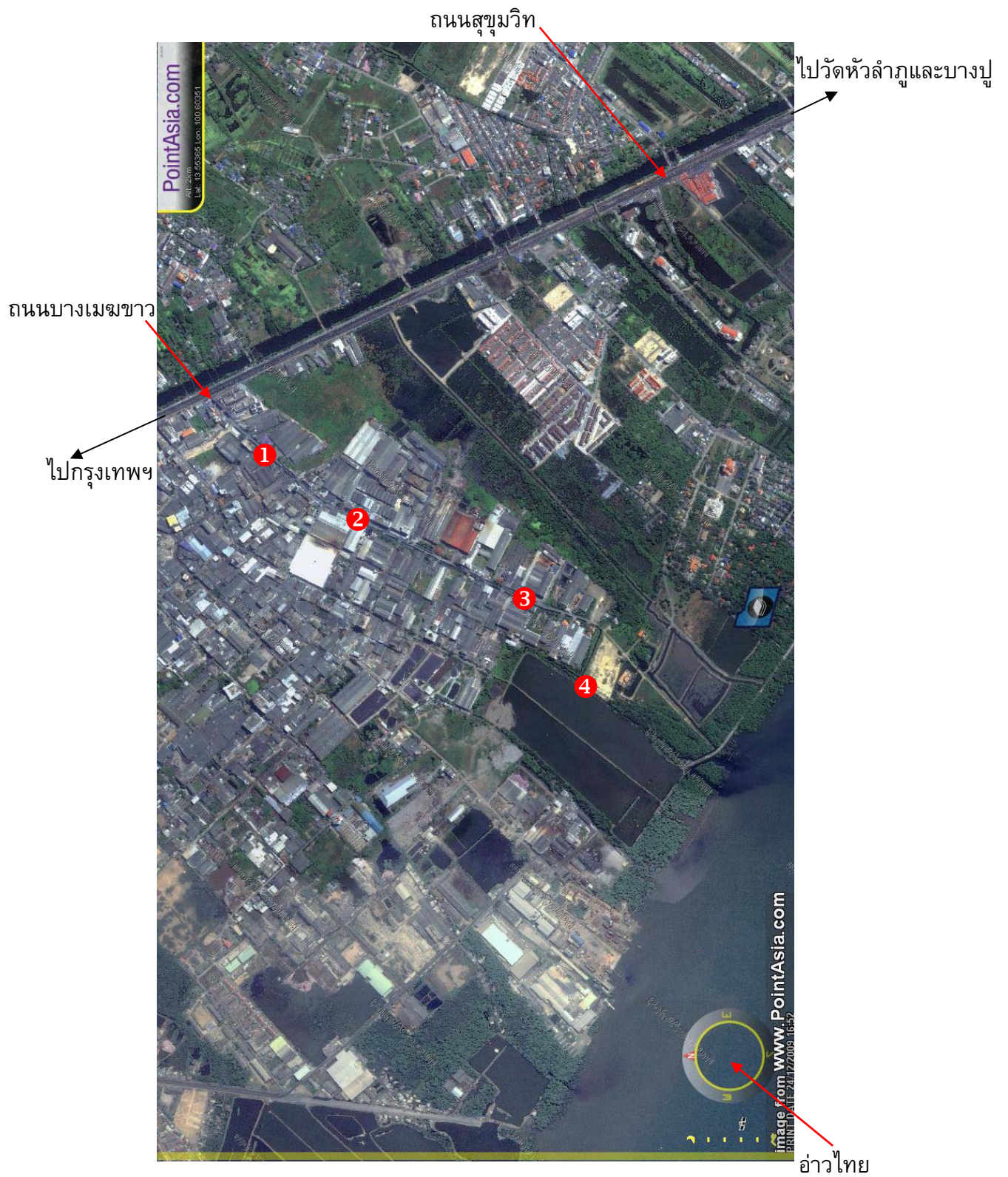
อวัยวะต่างๆ ที่สำคัญกว่านี้คือประชาชนในชุมชนบางส่วนหาเลี้ยงชีพด้วยการทำประมงชายฝั่ง และสัตว์น้ำที่จับได้จะถูกนำมาขายในชุมชน ทำให้ประชาชนในพื้นที่มีโอกาสได้รับสารมลพิษเสี่ยงอันตรายผ่านห่วงโซ่อาหารอันอาจนำไปสู่ผลกระทบต่อสุขภาพในระยะยาวได้ คณะทำงานได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนจากคลองหัวลำภูตลอดทั้งสายรวมถึงบริเวณปากคลองที่ไหลลงสู่อ่าวไทยด้วยรวมทั้งสิ้น 10 จุดเก็บตัวอย่างดังแสดงในรูปที่ 3.3

จุดเก็บตัวอย่างต่อไปคือคุระบายน้ำริมถนนบางเมฆขาว จังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งเป็นที่ตั้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทฟอกย้อมและฟอกหนังอย่างหนาแน่น จากการสำรวจพบว่าคูสายนี้รองรับทั้งน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วและน้ำเสียที่ยังไม่ได้รับการบำบัดอย่างเหมาะสม ทำให้สภาพของคูน้ำเน่าเสีย และท้ายที่สุดน้ำในคูจะระบายลงสู่อ่าวไทย คณะทำงานได้กำหนดจุดเก็บตัวอย่าง 4 จุดตลอดสายของคูน้ำดังแสดงในรูปที่ 3.4

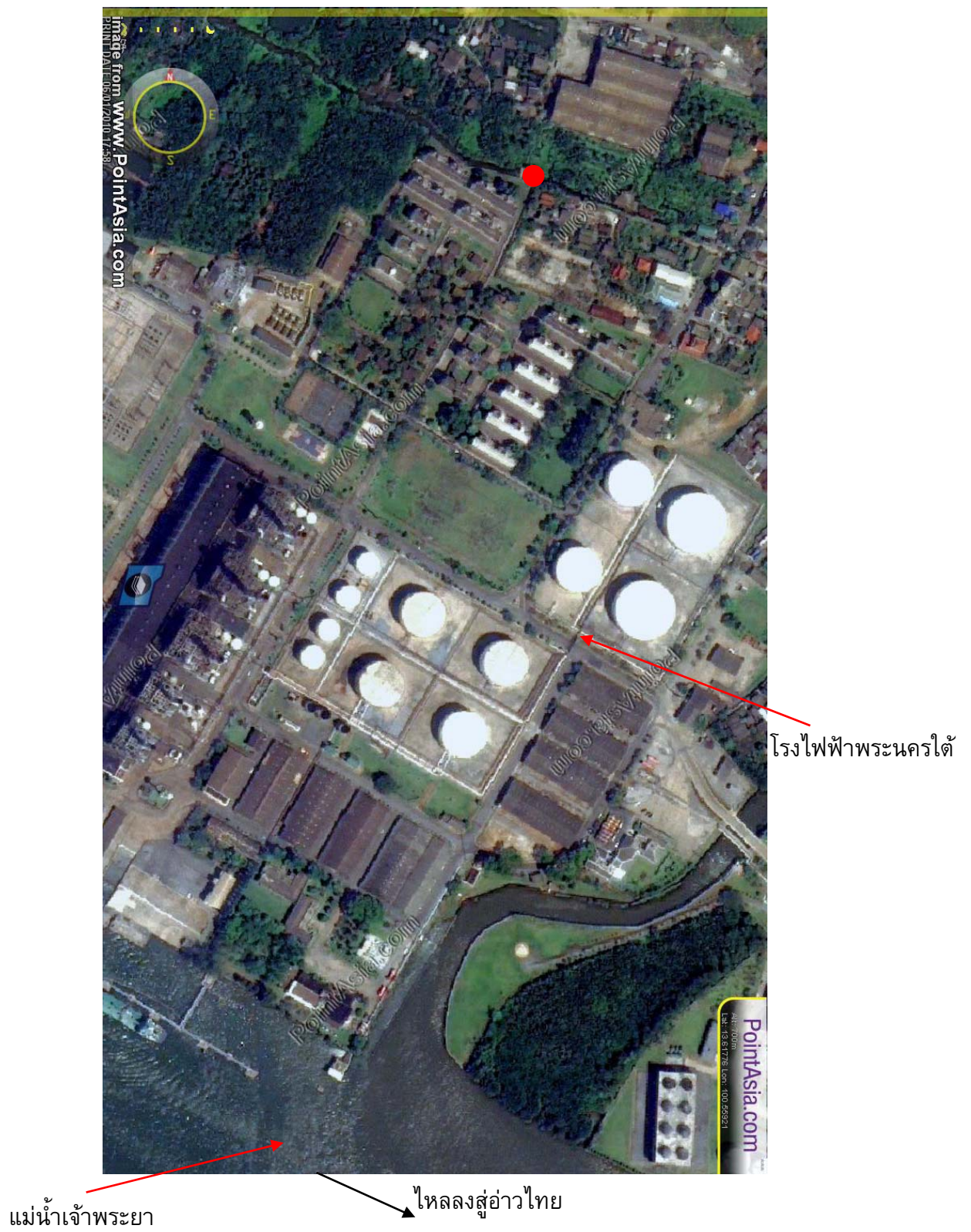
พื้นที่เก็บตัวอย่างในลำดับต่อไปมุ่งเน้นในแหล่งน้ำที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนจากพีซีบี พื้นที่แรกคือบริเวณคลองใกล้กับโรงไฟฟ้าพระนครใต้ จังหวัดสมุทรปราการ (รูปที่ 3.5) เนื่องจากมีเคยมีประวัติการใช้งานหม้อแปลงไฟฟ้าและตัวเก็บประจุรุ่นเก่าที่ยังใช้พีซีบีเป็นสารหล่อเย็นอยู่ โดยคาดว่าในช่วงฤดูฝนเมื่อเกิดน้ำหลากจะทำให้น้ำบางส่วนที่อาจปนเปื้อนจากพีซีบีจากพื้นที่ภายในโรงไฟฟ้าไหลลงสู่คลองสายนี้ได้ คลองสายนี้ได้ไหลลงสู่แม่น้ำเจ้าพระยาใกล้บริเวณปากแม่น้ำในที่สุด พื้นที่ลำดับต่อไปคือคลองรับน้ำทิ้งจากนิคมอุตสาหกรรมบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ จากการสำรวจข้อมูลเบื้องต้นพบว่าโรงงานอุตสาหกรรมในนิคมอุตสาหกรรมแห่งนี้เกี่ยวข้องการผลิตสารเคมี ผลิตภัณฑ์อิเล็กทรอนิกส์ อาหาร นม เพอร์นิเจอร์ พลาสติก พีวีซี ซี กาว เครื่องหนัง ผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับการชุบโลหะ และอื่นๆ จึงคาดว่าโรงงานบางส่วนน่าจะมีแนวโน้มที่จะใช้พีซีบีในอดีตและน้ำเสียที่เกิดขึ้นอาจมีโอกาสนปนเปื้อนสารมลพิษอินทรีย์คงทนอื่นๆ คณะทำงานได้กำหนดจุดเก็บตัวอย่างในคลองสายนี้ทั้งหมด 4 จุดดังแสดงในรูปที่ 3.6

คลองข้างถนนตำรุ-บางพลีถูกเลือกให้เป็นพื้นที่เก็บตัวอย่างเนื่องจากมีร้านขายของเก่าตั้งอยู่ริมคลองเป็นจำนวนมาก จึงคาดว่าจะมีการล้างภาชนะบรรจุสารเคมีต่างๆซึ่งน่าจะรวมถึงของเสียเสี่ยงอันตรายและระบายน้ำทิ้งลงสู่คลอง คณะทำงานได้กำหนดจุดเก็บตัวอย่าง 2 จุดโดยจุดแรกอยู่ในคูน้ำก่อนไหลลงสู่คลองข้างถนนตำรุ-บางพลี และอีกจุดอยู่ในคลองข้างถนนตำรุ-บางพลีตรงข้ามกับร้านขายของเก่า (รูปที่ 3.7) ส่วนคลองบางฝ้ายซึ่งรับน้ำทิ้งจากนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง (รูปที่ 3.8) คลองแพรกษาซึ่งรับน้ำทิ้งจากชุมชนและอุตสาหกรรม (รูปที่ 3.9) คูน้ำข้าง บ. ไทยเซ็นทรัลเคมีคัล จก. (มหาชน) (รูปที่ 3.10) และคูน้ำข้างถนนสุขสวัสดิ์ (รูปที่ 3.11) ซึ่งรับน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมในพื้นที่ใกล้เคียงถูกคัดเลือกเป็นพื้นที่เก็บตัวอย่างเนื่องจากมีโอกาที่จะได้รับการปนเปื้อนจากของเสียเสี่ยงอันตราย พื้นที่เก็บ

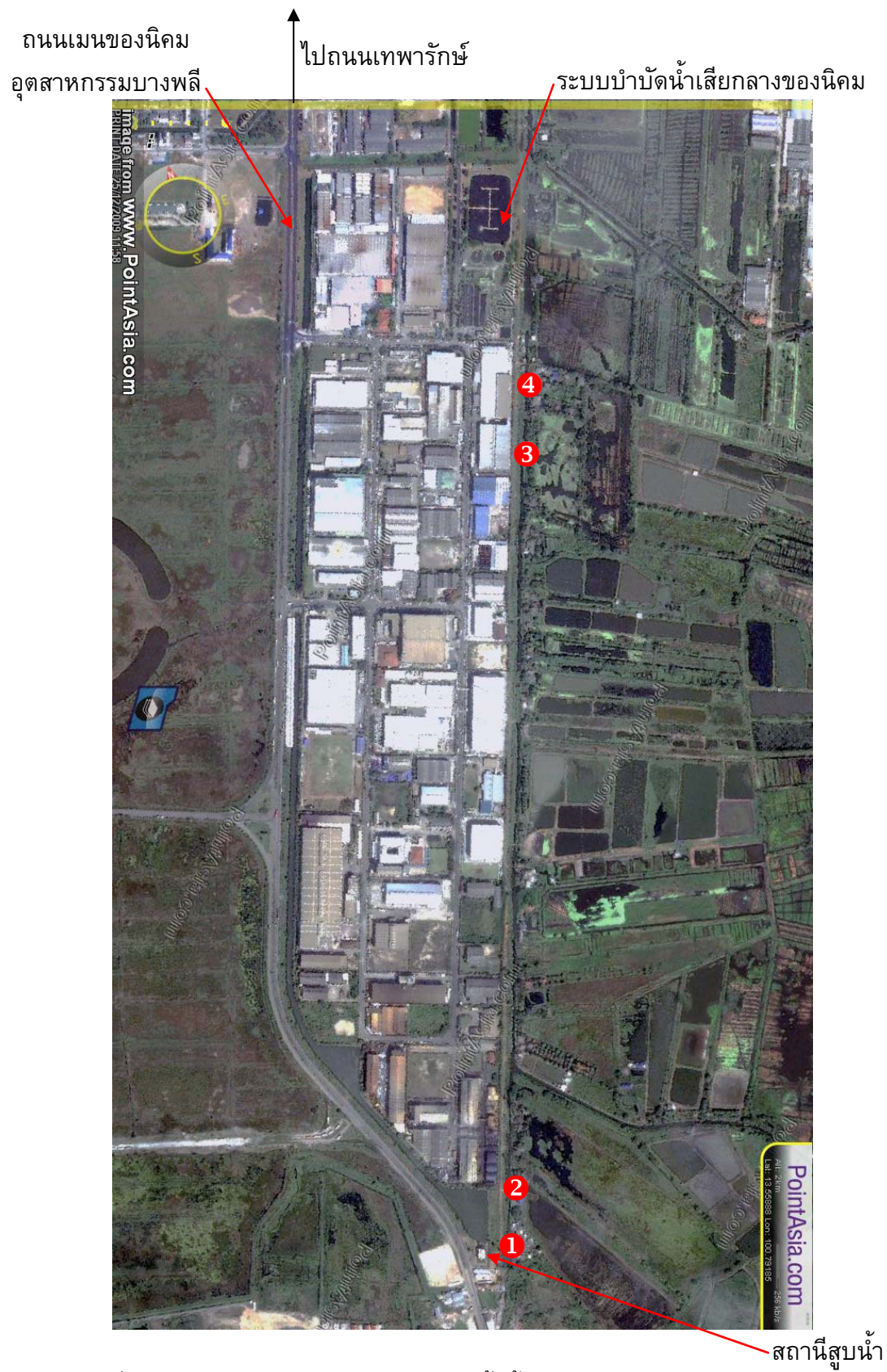




รูปที่ 3.4 จุดเก็บตัวอย่าง 4 จุดในคุระบายน้ำข้างถนนบางเมฆขาว



รูปที่ 3.5 จุดเก็บตัวอย่างในคลองใกล้โรงไฟฟ้าพระนครใต้



รูปที่ 3.6 จุดเก็บตัวอย่าง 4 จุดในคลองรับน้ำทิ้งจากนิคมอุตสาหกรรมบางพลี



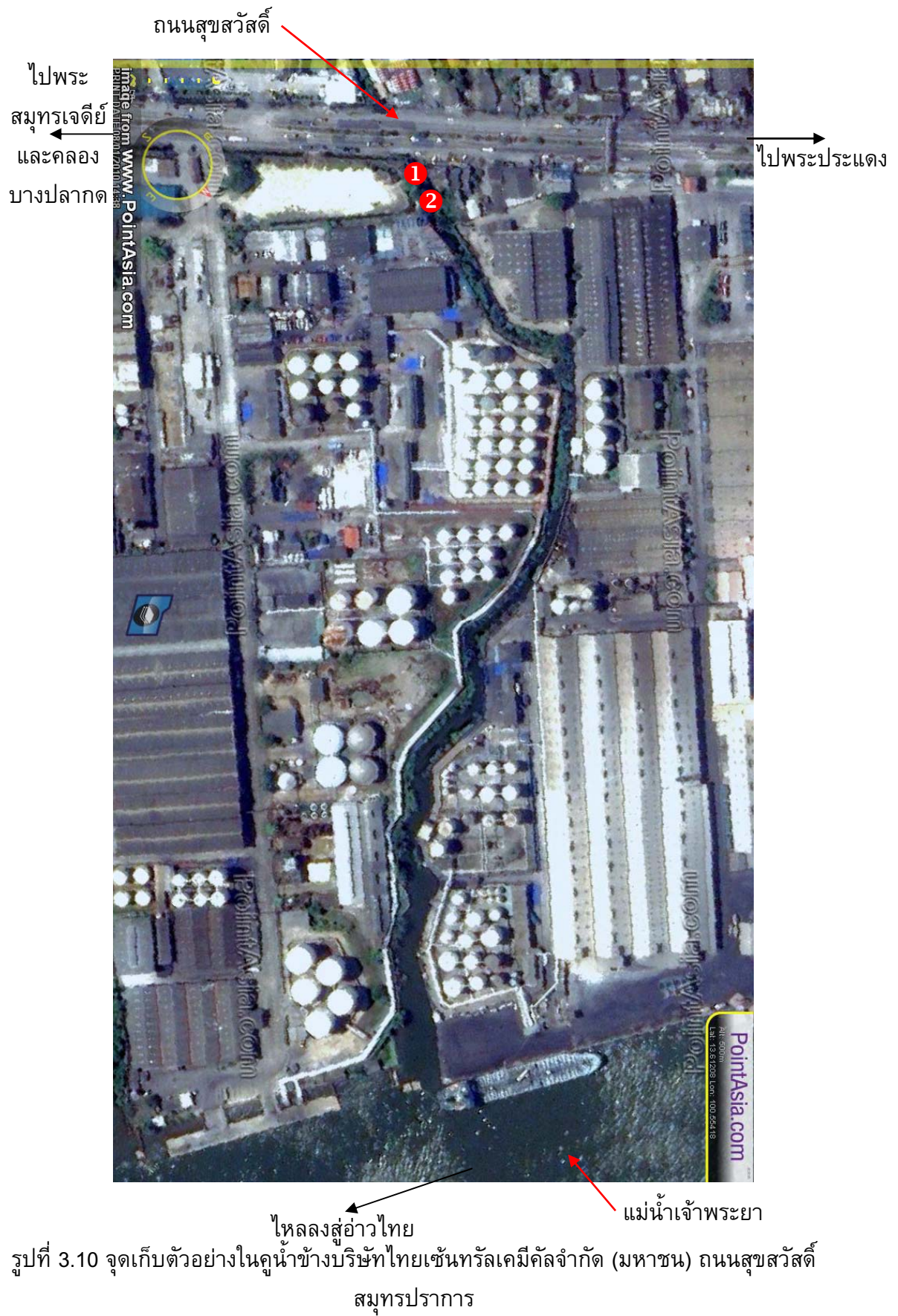
รูปที่ 3.7 จุดเก็บตัวอย่าง 2 จุดในคลองข้างถนนตำหรุ-บางพลี



รูปที่ 3.8 จุดเก็บตัวอย่าง 4 จุดในคลองรับน้ำทิ้งจากนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง



รูปที่ 3.9 จุดเก็บตัวอย่างในคลองแพรงษา





รูปที่ 3.11 จุดเก็บตัวอย่างในคูน้ำข้างถนนสุขสวัสดิ์ สมุทรปราการ

ตัวอย่างสุดท้ายคือคลองบางปลากด ถนนสุขสวัสดิ์ (รูปที่ 3.12) เป็นคลองขนาดใหญ่ถูกคัดเลือกเป็นพื้นที่อ้างอิงเนื่องจากเป็นแหล่งน้ำที่มีคุณภาพดี มีสัตว์น้ำอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก คณะทำงานคาดว่าจะได้รับการปนเปื้อนน้อย

3.1.2 การเตรียมตะกอนและน้ำตะกอนสำหรับทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนและพีซีบีในตะกอน 3 ลักษณะคือ น้ำตะกอน ตะกอนเหลว และชั้นตะกอน โดยแต่ละรูปแบบของตะกอนจะให้ความแตกต่างกันในแง่ของการเข้าถึงของจุลชีพ (bioavailability) กล่าวคือเมื่อปริมาณของแข็งในตะกอนที่ศึกษาเพิ่มขึ้น จะทำให้การดูดซับของสารมลพิษอินทรีย์คลอรีนเกิดมากขึ้น การเข้าถึงของจุลชีพจะยากขึ้น เป็นผลให้การลดคลอรีนแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามในการศึกษาการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนและพีซีบีนี้ไม่ได้ใช้ตะกอนจากจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมดทุกจุด

การเตรียมน้ำตะกอนจะนำตะกอนและน้ำตัวอย่างประมาณ 1:1 โดยปริมาตรใส่ลงในขวดแก้ว เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 2 นาที แล้วปล่อยให้ตกตะกอนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใช้หลอดฉีดยาแก้วที่มีเข็ม 22G×2 hypodermic-needle ซึ่งมีขนาดรูเปิด 0.7 มิลลิเมตรทำการดูดน้ำตะกอนออกจากขวดแก้วแล้วเก็บไว้ในขวดเซรัมขนาด 1,000 มิลลิลิตร การกระทำเช่นนี้เปรียบเสมือนเป็นการกรองอนุภาคของแข็งในน้ำตะกอน ทำให้อนุภาคเหล่านั้นมีขนาดเล็กกว่า 0.7 มิลลิเมตร และเมื่อทำการทดลองและเก็บตัวอย่างด้วยเข็มฉีดยาขนาดเดียวกัน จะทำให้ตัวอย่างที่ดูดออกจากขวดเซรัมเป็นเนื้อเดียวกันและเป็นตัวแทนที่แท้จริงของน้ำตะกอนในขวดทดลอง การทดสอบในลักษณะของน้ำตะกอนนี้จะให้ข้อมูลถึงความสามารถตามธรรมชาติในการย่อยสลายสารมลพิษเป้าหมายโดยไม่มีข้อจำกัดทางด้านการเข้าถึงของจุลชีพและการดูดซับ

ตะกอนเหลวจะเตรียมเหมือนในกรณีของน้ำตะกอน เพียงแต่ไม่มีการใช้เข็มฉีดยาดูดกรองน้ำตะกอนออกจากขวดแก้ว กล่าวคือเมื่อทำการผสมตะกอนกับน้ำแล้วก็ใช้งานทันที ในกรณีนี้ปริมาณของแข็งในน้ำตะกอนจะสูงกว่าเป็นผลให้การดูดซับเกิดขึ้นมากกว่า ตะกอนเหลวในลักษณะนี้เป็นตัวแทนของตะกอนในแหล่งน้ำที่มีการไหลค่อนข้างเชียว ทำให้ตะกอนขนาดต่างๆที่ถูกปนเปื้อนด้วยสารมลพิษอินทรีย์คลอรีนถูกพัดพาไปกับน้ำ การสกัดเพื่อหาปริมาณสารมลพิษอินทรีย์คลอรีนที่เหลืออยู่จะทำการสกัดทั้งขวดโดยไม่ใช้เข็มฉีดยาในการเก็บตัวอย่างเพื่อให้มั่นใจว่าไม่เกิดผลผิดพลาดจากตัวอย่างที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันอันเนื่องมาจากการดูดเก็บตัวอย่างด้วยเข็มฉีดยา

ส่วนในกรณีสุดท้ายเป็นรูปแบบของชั้นตะกอน ในกรณีนี้ตะกอนจะถูกนำไปใส่ภาชนะที่จะทดลอง(เช่น ตู้ปลา)โดยไม่มีการผสมกับน้ำ แต่จะเทน้ำไว้เหนือชั้นตะกอนอีกทีหนึ่ง การ



รูปที่ 3.12 จุดเก็บตัวอย่าง 2 จุดในคลองบางปลากด ถนนสุขสวัสดิ์ สมุทรปราการ

กระทำเช่นนี้เป็นการจำลองสภาพที่เกิดขึ้นจริงในชั้นตะกอนก้นลำน้ำตามธรรมชาติ การหาปริมาณสารมลพิษเป้าหมายที่หลงเหลืออยู่และสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะใช้วิธีผสมตะกอนเข้าด้วยกันแล้วสุ่มเก็บตัวอย่างในปริมาณที่ต้องการไปทำการสกัดดังจะได้กล่าวต่อไป

3.2 การวิเคราะห์

3.2.1 วิธีการสกัด

วิธีการสกัดสารกลุ่มคลอโรเบนซินและพีซีบีจะใช้วิธีของ Chen และคณะ (2000, 2002) และ Chen (2004) เป็นหลัก กล่าวคือเมื่อต้องการสกัดตัวอย่างของน้ำตะกอน จะใช้หลอดฉีดยาแก้วที่มีเข็ม 22G×2 hypodermic needle ดูดตัวอย่างตะกอนออกมาจากขวดซีรัม 2 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดสกัดที่บรรจุ 6 N NaOH และเฮกเซน 0.2 และ 2 มิลลิลิตรตามลำดับ เขย่าขวดสกัดด้วยมือประมาณ 100 ครั้งแล้วตามด้วย sonication เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำขวดสกัดไปเหวี่ยงแยก (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อแยกชั้นตะกอน น้ำ และเฮกเซน ทำการถ่ายเฮกเซนซึ่งอยู่ชั้นบนสุดไปยังขวดวิเคราะห์ด้วย glass dropper ให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ชั้นตะกอนและน้ำที่เหลืออยู่จะถูกสกัดด้วยวิธีการเดิมอีก 2 ครั้ง โดยในครั้งสุดท้ายเฮกเซนจะถูกถ่ายไปยังหลอดวิเคราะห์ให้ได้ปริมาตรรวม 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติม anhydrous Na_2SO_2 เพื่อกำจัดความชื้นก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย gas chromatography เพื่อหาปริมาณสารมลพิษอินทรีย์คลอรีนที่เหลืออยู่และสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

ในกรณีที่เป้นตะกอนเหลวจะทำการแยกน้ำและของแข็งออกจากกัน น้ำตัวอย่างจะถูกสกัดด้วยวิธีการเดียวกันกับน้ำตะกอน ส่วนชั้นตะกอนที่เหลืออยู่จะทำการสกัดโดยเติม 6N H_2SO_4 และสารละลายเฮกเซน-อะซิโตนที่สัดส่วน 9:1 โดยปริมาตรในปริมาณ 1 และ 4 มิลลิลิตรตามลำดับ จากนั้นทำการเขย่าด้วยมือ 200 ครั้งและ sonication เป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกของแข็งและสารสกัดด้วยการเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ชั้นของสารสกัดจะถูกถ่ายไปยังหลอดเก็บให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ จากนั้นทำการสกัดด้วยวิธีการเดิมอีก 2 ครั้ง โดยในการสกัดครั้งสุดท้ายสารสกัดจะถูกถ่ายไปยังหลอดเก็บให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการดูด 7 มิลลิลิตรของสารสกัดจากหลอดเก็บไปใส่ในหลอดล้างที่เติมน้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตรและ 6 N NaOH 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ 100 ครั้งตามด้วย sonication 10 นาที และเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 4000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารสกัด 5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดใหม่เพื่อไล่ความชื้นด้วย anhydrous Na_2SO_4 จากนั้นดูดสารสกัด 2 มิลลิลิตรมากรองผ่าน SPE column พร้อมทั้งไล่ล้าง column ด้วย 2 มิลลิลิตรเฮกเซน ตัวอย่างที่ได้จึงนำไปวิเคราะห์หาสารตั้งต้นและสารผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี gas chromatography ต่อไป

ส่วนการสกัดชั้นตะกอนจะทำการชั่งตัวอย่างตะกอนที่จะทำการสกัดประมาณ 2 กรัม (โดยทราบน้ำหนักที่แน่นอน) จากนั้นทำการสกัดด้วยวิธีการเดียวกับการสกัดของแข็งในกรณีของตะกอนเหลว พร้อมกับหาความชื้นในตะกอนเพื่อคำนวณหามวลแห้งของตะกอน

คณะทำงานได้มีการทดสอบความแม่นยำของวิธีการสกัดคลอโรเบนซินและคลอโรไบฟีนิลด้วยการเติมเฮกซะคลอโรเบนซินลงไป ในตะกอนเหลวที่ผ่านการกรองและให้สัมผัสกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการสกัดด้วยวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วพบว่า มี % recovery อยู่ที่ร้อยละ 88-95 ในขณะที่การทดสอบกับ 2,3,4,2',4',5'- และ 2,3,6,2',4',5'-เพนตะคลอโรไบฟีนิลที่ย่อยสลายทางชีวภาพได้น้อยมากหรือย่อยไม่ได้เลยโดยมีระยะเวลาสัมผัสนาน 18 สัปดาห์พบว่าตลอดระยะเวลาดังกล่าวได้ % recovery อยู่ระหว่างร้อยละ 88 และ 112 สำหรับ 2,3,4,2',4',5'-เพนตะคลอโรไบฟีนิล และร้อยละ 91 และ 110 สำหรับ 2,3,6,2',4',5'-เพนตะคลอโรไบฟีนิล โดยไม่พบสารผลิตภัณฑ์เลย ซึ่งให้เห็นว่าวิธีการสกัดนี้ให้ผลเชื่อถือได้

3.2.2 วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์หาสารประกอบอินทรีย์คลอรีนด้วย Gas Chromatograph จะใช้สภาวะตาม Chen และคณะ (2000, 2002) และ Chen (2004) โดยในการวิเคราะห์หาเฮกซะคลอโรเบนซินและสารผลิตภัณฑ์จะใช้ Gas Chromatograph ที่ติดตั้งด้วย ECD detector (Agilent 6890N) และ capillary column DB-5 โดยอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 80°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 3°C ต่อนาที จนถึง 140°C แล้วเพิ่มต่อขึ้นไปจนถึง 240°C ด้วยอัตรา 10°C ต่อนาที และคงที่อุณหภูมิดังกล่าวอีก 8 นาที อุณหภูมิของ injector และ detector ถูกตั้งไว้ที่ 240 และ 280°C ตามลำดับ แก๊สฮีเลียมและแก๊สไนโตรเจนถูกใช้เป็น carrier และ make-up gases ที่อัตราไหล 20 และ 60 มิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ แต่ถ้าเป็นกรณีของพีซีบีและสารผลิตภัณฑ์จะเปลี่ยนโปรแกรมอุณหภูมิเป็นเริ่มต้นที่ 120°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 225°C ด้วยอัตรา 3°C ต่อนาที และคงไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 5°C ต่อนาทีจนถึง 270°C และคงไว้เป็นเวลา 11 นาที อุณหภูมิของ injector และ detector ถูกตั้งไว้ที่ 280 และ 300°C ตามลำดับและใช้ split ratio เท่ากับ 10:1

การวิเคราะห์แก๊ซมีเทนที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายแบบไร้อากาศจะตรวจวัดด้วย Gas Chromatograph (Shimadzu GC-8A) ที่ติดตั้งด้วย Unibeads C 80/100 MESLT column และ 3% Unisole 30t on Flusin P 30/60 mesh column โดยใช้แก๊ซฮีเลียมเป็น carrier gas อุณหภูมิของ injector และ detector เท่ากับ 160°C ในขณะที่อุณหภูมิของ column ถูกตั้งไว้ที่ 110°C และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 22 นาที

การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของน้ำเช่น บีโอดี ซีโอดี ทีเคเอ็น ฟอสฟอรัส คลอไรด์ เอส เอส และวีเอสเอสดำเนินการตามวิธีการของ Standard Methods (1992)

3.3 การทดลอง

เมื่อเริ่มทดลองจะทำการฉีดสารมลพิษอินทรีย์เป้าหมายและ/หรือสารอื่นๆที่ต้องการศึกษาลงไปในช่วงซีรัมปิดด้วย Rubber Stopper และ Alumina-cap ในกรณีของชุดทดลองน้ำตะกอนและตะกอนเหลว ส่วนในกรณีของชุดทดลองชั้นตะกอนจะผสมกับตะกอนในภาชนะก่อนบรรจุลงในถังปฏิกรณ์ สารกลุ่มคลอโรเบนซินจะถูกเตรียมในเฮกเซน ในขณะที่สารกลุ่มคลอโรไบฟีนิลจะเตรียมในอะซิโตน ในระหว่างการทดลองหากจำเป็นต้องมีการเปิดขวดซีรัมจะกระทำในตู้ไนโตรเจนเพื่อป้องกันการรบกวนจากก๊าซออกซิเจนในบรรยากาศ การทดลองส่วนใหญ่กระทำที่อุณหภูมิห้องในที่มืด ยกเว้นการทดลองที่ศึกษาผลของอุณหภูมิจะใช้ Refrigerator (15 และ 20°C) Air-incubator (35 และ 40°C) และ Water Bath (45°C)

บทที่ 4 ผลการศึกษา

4.1 ลักษณะสมบัติของตะกอนและน้ำตะกอน

ตะกอนที่เก็บตัวอย่างมาบางส่วนมีการปนเปื้อนของเฮกซะคลอโรเบนซีนและพีซีบี โดยเฮกซะคลอโรเบนซีนพบว่าปนเปื้อนอยู่ในตะกอนจากคลองหัวลำภูเท่านั้น และตรวจพบเฉพาะในส่วนต้นคลองคือ Site 1 ถึง Site 4 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.18, 1.25, 0.16 และ 0.11 ไมโครกรัมต่อกรัมตะกอนแห้งตามลำดับ เป็นการยืนยันว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนซึ่งถูกห้ามใช้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2523 ยังคงถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมซึ่งอาจเป็นผลมาจากเป็นสารปนเปื้อนในสารเคมีที่ใช้ในอุตสาหกรรมหรือถูกสร้างขึ้นในระหว่างการผลิต ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Brigden และคณะ (2003) นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังชี้ให้เห็นว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนน่าจะจับอยู่บนอนุภาคของแข็งในน้ำที่ระบายลงสู่คลอง จึงทำให้ตรวจพบเพียงแค่ 4 จุดเก็บตัวอย่างต้นน้ำเนื่องจากอนุภาคเหล่านี้ตกตะกอนหมด ที่สำคัญกว่านั้นคือการตรวจพบ 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนซึ่งไม่มีการผลิตเพื่อการใช้งานทางการค้ามาก่อนเช่นเดียวกับผลของ Brigden และคณะ (2003) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนอาจถูกลดคลอรีนภายใต้สภาวะไร้อากาศในตะกอนกันคลองหัวลำภูแห่งนี้ แต่ตะกอนจากแหล่งอื่นๆไม่พบการปนเปื้อนของเฮกซะคลอโรเบนซีน ในขณะที่พีซีบีพบว่ามีแนวโน้มที่จะปนเปื้อนในตะกอนจากทุกจุดเก็บตัวอย่างยกเว้นตะกอนจากคลองบางปลาตลาด(ตรวจสอบเบื้องต้นด้วย GC/ECD) อย่างไรก็ดีเนื่องจากการพีซีบีมีถึง 209 คอนเจนเนอร์และที่ผลิตในเชิงพาณิชย์สำหรับใช้งานจะอยู่ในรูปของสารประกอบพีซีบีผสมหลายๆคอนเจนเนอร์ เช่น Aroclor จึงเป็นเรื่องยากและเสียเวลามากที่จะวิเคราะห์ยืนยัน (identify) พีซีบีทุกคอนเจนเนอร์ด้วย GC/MS

ลักษณะสมบัติของตะกอนตัวอย่าง น้ำตัวอย่าง และน้ำตะกอนที่เตรียมได้ถูกรวบรวมไว้ในตารางที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างที่มีอยู่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์หาลักษณะสมบัติเหมือนกันทั้งหมด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแผนการวิจัยที่กำหนดไว้ อย่างไรก็ดีพบว่าในตะกอนและน้ำตะกอนที่เตรียมขึ้นมีสารอาหารและธาตุอาหารเพียงพอต่อการย่อยสลายทางชีวภาพแบบไร้อากาศตามที่เสนอแนะโดย Droste (1997) อย่างไรก็ดีการเพิ่มสารอาหารหรือธาตุอาหารบางประเภทอาจช่วยให้เกิดการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีน/พีซีบีดีขึ้นหรือเร็วขึ้นได้ดังจะได้กล่าวต่อไปภายหลัง นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสังเกตว่าสารอาหารและธาตุอาหารส่วนใหญ่ในน้ำตะกอนจะอยู่ในรูปของของแข็งที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ ตัวอย่างน้ำจากคลองหัวลำภูพบว่ามีคลอไรด์ค่อนข้างสูงคือ 3,283-12,100 มิลลิกรัมต่อลิตรอันเป็นผลมาจากการปนเปื้อนของน้ำทะเลจากการขึ้น-ลงของระดับน้ำทะเลในช่วงที่ทำการเก็บตัวอย่าง พีเอชของน้ำตะกอนส่วนใหญ่อยู่ในช่วงที่เป็นกลางซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลชีพ มีเพียงน้ำตะกอนจากคลองรับน้ำทิ้งจากนิคมอุตสาหกรรม

ตารางที่ 4.1 ลักษณะสมบัติของตะกอนตัวอย่าง

Site	COD (mg/kg)	BOD (mg/kg)	TKN (mg/kg)	TP (mg/kg)	VSS:SS (%)	Moisture Content (%)
D1	37,426-48,403 (42,915)	1,305-11,000 (6,153)	913-2,155 (1,534)	361-615 (488)	4.50-17.25 (10.89)	36.23-66.93 (51.58)
D4	29,042-49,731 (39,387)	2,954-11,667 (7311)	935-1,339 (1,137)	143-463 (303)	4.33-8.08 (6.21)	41.12-43.03 (41.08)
E1	38,817-45,176 (41,997)	1,066-12,500 (6,783)	1,019-3,801 (2,410)	296-341 (319)	3.12-7.14 (5.13)	53.69-54.17 (53.93)
E2	41,949-51,401 (46,675)	2,067-10,000 (6,034)	930-1,855 (1,393)	88-567 (328)	3.79-15.09 (9.44)	49.52-61.89 (55.71)
C1	25,815-45,944 (35,880)	2,569-16,667 (9,618)	692-1,170 (931)	252-594 (423)	3.27-9.20 (6.24)	38.87-57.04 (47.96)
J2	35,496-39,094 (37,295)	1,532-8,000 (4,766)	231-930 (581)	520-788 (654)	3.37-7.80 (5.59)	43.98-53.44 (48.69)
F1	43,406	2,465	3,518	740	3.52	35.35
A3	80,000	-	-	-	-	-
A4	60,000	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: -COD คือ chemical oxygen demand
 -BOD คือ biochemical oxygen demand
 -TKN คือ total Kjeldahl nitrogen
 -TP คือ total phosphorus
 -SS คือ suspended solids
 -VSS คือ volatile suspended solids
 -ตัวเลขในวงเล็บคือค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 4.2 ลักษณะสมบัติของน้ำตัวอย่าง

Site	pH	DO	COD	BOD	TKN	TP	SS	VSS
A3	-	-	112	-	-	-	-	-
A4	-	-	128	-	-	-	-	-
C1	7.3	2.3	32	6	21	0.8	320	14
D1	7.6	0.2	40	8	13	1.5	280	14
D4	7.9	1.4	40	4	14	1.1	300	20
E1	7.9	3.0	57	5	28	0.6	120	24
E2	7.7	2.4	57	8	35	0.4	220	42
F1	-	-	293	12	5	2.6	63	19
J2	7.3-7.7	2.3	32	6	21	0.8	320	14

ตารางที่ 4.3 ลักษณะสมบัติของน้ำตะกอน (sediment slurry)

Site	pH	COD (mg/kg)	BOD (mg/kg)	TKN (mg/l)	TP (mg/l)	SS (mg/l)	VSS (mg/l)
A1	7.0	40,400	-	-	-	96,900	10,200
A2	7.0	20,100	-	-	-	141,500	15,600
A3	7.0- 7.7	37,440-80,000 (51,147)	-	-	-	131,000-273,000 (184,300)	18,400-27,400 (21,867)
A4	7.2- 7.7	30,600-60,000 (43,933)	-	-	-	62,100-242,600 (137,767)	14,700-48,000 (26,100)
A5	7.1	19,200	-	-	-	75,900	16,300
A6	7.0	24,300	-	-	-	142,600	17,700
A7	7.2	18,800	-	-	-	135,000	15,400
A8	7.3	30,200	-	-	-	216,250	18,000
A9	7.3	14,900	-	-	-	313,000	13,100
A10	7.4	14,900	-	-	-	367,200	15,200
B1	6.3	26,280	-	-	-	198,300	12,00
B2	6.8	31,680	-	-	-	117,400	20,100
B3	6.8	28,800	-	-	-	186,800	18,000
B4	6.7	22,320	-	-	-	257,000	17,200
C1	-	19,361	2,500	896	176	61,560	15,860
D1	5.3	13,680-22,588 (18,134)	5,000	773	111	93,740-312,400 (203,070)	9,600-21,800 (15,700)
D2	5.9	21,600	-	-	-	293,800	21,600
D3	5.2	16,490	-	-	-	209,700	21,300
D4	5.2	22,750-25,815 (24,283)	4,000	652	18	92,100-251,100 (171,600)	10,800-19,400 (15,100)
E1	-	12,908	1,833	431	100	96,100	8,320
E2	-	14,521	2,167	515	15	83,380	9,720
F1	-	35,870	946	619	72	208,360	13,960
G1	6.6	36,000	-	-	-	249,900	16,000
H1	6.5	5,760	-	-	-	86,500	8,700
H2	6.4	8,640	-	-	-	98,200	7,100
I1	6.6	20,800	-	-	-	246,200	17,500
J1	6.6	20,800	-	-	-	251,600	18,000
J2	6.5	18,000-22,588 (20,294)	2,167	697	86	83,680-222,800 (153,240)	16,100-18,540 (17,320)

บางพื้นที่นั้น (Site D) ที่มีพีเอชเป็นกรดเล็กน้อยอันเนื่องมาจากการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายในน้ำ (เก็บตัวอย่างในช่วงกลางวัน) อย่างไรก็ตามก็ไม่มีผลต่อการทำงานของจุลชีพดังจะได้อธิบายต่อไป

4.2 การลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน

4.2.1 ผลการศึกษาในน้ำตะกอน

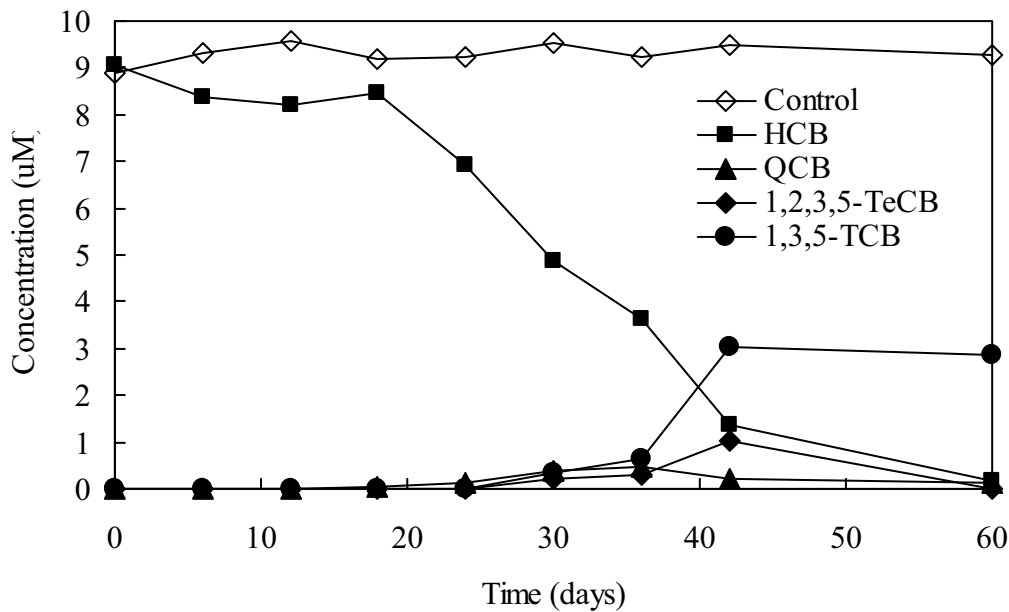
4.2.1.1 ความสามารถในการย่อยสลายของจุลชีพแบบไร้อากาศ

ผลการทดลองในน้ำตะกอนพบว่าทุกตัวอย่างสามารถลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนได้ดังแสดงในตารางที่ 4.4 จากข้อมูลจะพบว่าน้ำตะกอนทุกตัวอย่างที่ทดสอบโดยไม่มีการปรับสภาพและเพิ่มสารอาหาร/ธาตุอาหารเสริมสามารถลดคลอรีนในเฮกซะคลอโรเบนซีนได้เป็นอย่างดีโดยมีระยะเวลาพักตัว (Lag Phase) น้อยกว่า 77 วัน แต่ในชุดทดลองที่มีการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclaved) ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมพบว่าไม่มีการลดของเฮกซะคลอโรเบนซีนเกิดขึ้นและไม่พบสารกลางใดๆทั้งสิ้น ซึ่งให้เห็นว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนที่หายไปเป็นผลมาจากกิจกรรมการย่อยสลายของจุลชีพในน้ำตะกอน รูปที่ 4.1 เป็นกราฟตัวอย่างของการเปลี่ยนแปลงสารคลอโรเบนซีนเทียบกับเวลา กลไกการย่อยสลายส่วนใหญ่เป็นไปตามกลไกหลักตามที่เสนอโดย Fathepure และคณะ (1988) คือ เฮกซะคลอโรเบนซีน → เพนตะคลอโรเบนซีน → 1,2,3,5-เตตระคลอโรเบนซีน → 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีน อย่างไรก็ตามในบางตัวอย่างพบว่าการย่อยสลายผ่านกลไกรองไปพร้อมๆกัน (เฮกซะคลอโรเบนซีน → เพนตะคลอโรเบนซีน → 1,2,4,5-เตตระคลอโรเบนซีน → 1,2,4-ไตรคลอโรเบนซีน → 1,4-ไดคลอโรเบนซีน) โดย 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของเฮกซะคลอโรเบนซีนส่วนใหญ่สามารถถูกย่อยสลายได้หมดภายในเวลาไม่เกิน 80 วันจาก 24 ตัวอย่างน้ำตะกอนโดยไม่จำกัดว่าตะกอนจะมีประวัติการปนเปื้อนเฮกซะคลอโรเบนซีนหรือไม่ ซึ่งเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมาในบทที่ 3 พบว่าค่าครึ่งชีวิตอยู่ในช่วง 8 สัปดาห์ (Brashers และคณะ, 2004) ถึงมากกว่า 1 ปีขึ้นไป ซึ่งให้เห็นว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนไม่น่าจะเป็นสารมลพิษคงตัวในสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย ผลดังกล่าวยังสอดคล้องกับการตรวจพบ 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนในตะกอนจากคลองห้วยลำภูโดยงานวิจัยนี้และของ Brigden และคณะ (2003) อีกด้วย จึงเป็นที่น่าสนใจว่าทำไมจุลชีพในแหล่งน้ำของประเทศไทยจึงมีความสามารถในการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนได้สูงกว่าจุลชีพจากแหล่งอื่นๆ

ตารางที่ 4.4 การลดคลอรีนของ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของเฮกซะคลอโรเบนซีนด้วยน้ำตะกอน

Site	Time to detect intermediates/products (days)					HCB-complete dechlorination (days)
	QCB	1,2,3,5- /1,2,4,5-TeCB	1,3,5-TCB	1,2,4-TCB	1,4-DCB	
A1	18	30	30	ND	ND	60
A2	18	18	42	ND	ND	>60
A3	18	18	42	ND	ND	60
A4	12	18	24	ND	ND	60
A5	12	12	18	ND	ND	42
A6	18	18	30	ND	ND	60
A7	12	18	24	ND	ND	60
A8	18	30	30	ND	ND	>60
A9	18	18	24	ND	ND	>60
A10	18	18	30	ND	ND	>60
B1	ND	ND	28	ND	ND	49
B2	77	ND	77	ND	ND	91
B3	ND	ND	49	ND	ND	49
B4	ND	ND	49	ND	ND	63
C1	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D1	28	49	63	63	ND	77
D2	28	49	49	63	ND	77
D3	49	49	63	63	ND	63
D4	ND	49	49	63	ND	63
E1	NT	NT	NT	NT	NT	NT
E2	NT	NT	NT	NT	NT	NT
F1	NT	NT	NT	NT	NT	NT
G1	28	ND	49	ND	ND	49
H1	ND	ND	28	ND	ND	49
H2	ND	ND	28	ND	ND	49
I1	28	ND	63	ND	ND	63
J1	14	ND	49	ND	ND	49
J2	28	ND	63	ND	ND	63

หมายเหตุ: -ND คือตรวจไม่พบ และ NT คือไม่ได้ทดสอบ



รูปที่ 4.1 โปรไฟล์ของการย่อยสลาย 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของเฮกซะคลอโรเบนซีนและการเกิดสารกลางในชุดทดลองน้ำตะกอนของ Site A1

4.2.1.2 ผลของธาตุอาหารเสริม

งานวิจัยหลายชิ้นพบว่าการเติมธาตุอาหารเสริม (nutrients) ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลชีพสามารถช่วยกระตุ้น และ/หรือ เร่งให้เกิดการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนได้ (Chang และคณะ, 1997; Chen และคณะ, 2004) คณะทำงานจึงได้ทำการเติมธาตุอาหารเสริมโดยเตรียมตัวกลางซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารต่างชนิดกัน จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อที่ผ่านการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนจากชุดการทดลองที่แล้วของ Site A3 หรือ Site A4 ที่ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในตัวกลางต่างๆที่เตรียมขึ้น 45 มิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่าการเติมสารสกัดยีสต์และเกล็ดแร่ไม่ได้มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนเลย (ตารางที่ 4.5) กล่าวคือช่วงเวลาพักรั่ว (Lag Phase) และเวลาในการลดคลอรีนของ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของเฮกซะคลอโรเบนซีนจนหมดยังคง ใกล้เคียงกัน เป็นที่น่าสังเกตว่าการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนในชุดการทดลองควบคุมนี้มีประสิทธิภาพมากกว่าในชุดการทดลองที่ผ่านมาทั้งหมดที่ใช้ น้ำตะกอนจากจุดเก็บตัวอย่างเดียวกัน(จาก Sites A3 และ A4) ที่เป็นเช่นนี้เพราะหัวเชื้อที่ใช้ในชุดการทดลองนี้ นำมาจากน้ำตะกอนชุดก่อนที่ผ่านการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนมาแล้ว 1 ครั้ง จึงทำให้เมื่อทำการเติมเฮกซะคลอโรเบนซีนซ้ำ จุลชีพมีความพร้อมในด้านของเอนไซม์ที่ต้องใช้ จึงทำให้ระยะเวลาพักรั่วและเวลาที่ย่อยสลายทั้งหมดสั้นลงหากพิจารณาในรายละเอียดจะเห็นผลที่น่าสนใจหลายประการ ประการแรกคือในชุดทดลองที่ใช้น้ำคลอง 45 มิลลิลิตรและเติมหัวเชื้อเพียง 5 มิลลิลิตร (CW) ที่พบว่าสามารถย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนได้ดีไม่ต่างจากชุดการทดลองอื่น ซึ่งให้เห็นเป็นนัยว่าสารอาหารและธาตุอาหารที่มีอยู่ในหัวเชื้อ

ตารางที่ 4.5 ผลของธาตุอาหารเสริมที่มีต่อการลดคลอรีนของ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของเฮกซะคลอโรเบนซีนในน้ำตะกอนที่เติมหัวเชื้อที่ผ่านการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนมาแล้ว

Site	Medium	Lag Phase (days)	Complete Dechlorination (days)	Methane _{max} (%)
A3	CW	0, 3	30, 30	6.10
	RW+YE	0, 0	30, 30	21.14
	SS	0, 3	37, 35	19.84
	SS+YE	0, 3	35, 30	34.22
	S+MM	3, 3	35, 30	41.07
	MM	0, 0	30, 30	36.41
A4	CW	0, 3	30, 30	0.72
	RW+YE	0, 0	30, 30	13.86
	SS	3, 3	37, 40	21.66
	SS+YE	3, 3	37, 35	41.54
	S+MM	3, 3	30, 30	43.34
	MM	3, 0	30, 30	36.31

หมายเหตุ: -CW คือ Canal Water ซึ่งเป็นน้ำตัวอย่างที่เก็บจากคลองหัวลำภู
 -YE คือ Yeast Extract โดยทำการเติมลงในตัวกลางที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร
 -SS คือ Sediment Slurry ซึ่งเป็นน้ำตะกอนที่เตรียมตามกรรมวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว
 -MM คือ Mineral Medium ซึ่งเป็นสารละลายเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ เตรียมโดยการละลาย 0.35 กรัม KH_2PO_4 , 0.27 กรัม K_2HPO_4 , 2.7 กรัม NH_4Cl , 0.1 กรัม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 กรัม $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ และ 0.02 กรัม $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
 -S + AM คือการเตรียมน้ำตะกอนโดยใช้ anaerobic medium แทนที่จะใช้น้ำตัวอย่างจากคลอง ส่วนกรรมวิธีอื่นๆเหมือนที่ได้กล่าวมาแล้ว
 -ตัวเลขในตารางแสดงผลจากการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง (duplication) ยกเว้นการวัดมีเทนที่วัดในชุดทดลองเดียว

เพียง 5 มิลลิลิตรนั้นเพียงพอต่อการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ ประการที่สองคือปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในหัวเชื้อ 5 มิลลิลิตร (CW) เพียงพอต่อการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนโดยไม่เป็นตัวจำกัดอัตราการย่อยสลาย เพราะเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองที่มีการเติมตะกอนเพิ่ม (SS, SS+YE และ S+MM) จะได้ผลไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งให้เห็นเป็นนัยว่าอัตราการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนที่พบน่าจะเป็นอัตราเร็วที่สูงที่สุด

โดยไม่ขึ้นอยู่กับมวลของจุลชีพ สารอาหาร และธาตุอาหาร และประการสุดท้ายคือธาตุอาหารเสริมมีผลต่อการสร้างก๊าซมีเทนมาก โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดทดลองที่ใช้ น้ำโคลง (CW) เทียบกับชุดทดลองที่ใช้ น้ำเกลือแร่ (MM) จะพบว่าในกรณีทั้งสองนี้ซึ่งมีปริมาณเชื้อจุลชีพเท่ากัน มีการสร้างก๊าซมีเทนต่างกันมากทั้งที่ Site A3 และ Site A4 อย่างไรก็ตามการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซินไม่ได้มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อปริมาณก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้น ซึ่งให้เห็นเป็นนัยว่า จุลชีพกลุ่มที่ลดคลอรีน (dechlorinators) อาจเป็นกลุ่มอื่นที่ไม่ได้สร้างมีเทนรวมอยู่ด้วย นอกเหนือจากกลุ่มสร้างมีเทนดังที่ระบุไว้ในงานวิจัยอื่นๆ

4.2.1.3 ผลของสารอาหาร

สารอาหาร (substrates) หรือสารอินทรีย์จะทำหน้าที่เป็นสารให้อิเลคตรอนหลักในกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของจุลชีพ คณะทำงานได้ทำการเติมสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อกิจกรรมของจุลชีพในประชากรของน้ำตะกอนซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการลดคลอรีน สารอินทรีย์ที่ศึกษามีดังนี้คือ ก) น้ำตาล (glucose) เป็นสารอาหารซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถใช้ได้; ข) ไพรูเวท (pyruvate) เป็นสารกลางในวัฏจักรของกลไกการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลชีพ สามารถถูกใช้โดยแบคทีเรียกลุ่มที่ก่อให้เกิดการหมัก (fermentors) หรือกลุ่มที่สร้างกรด (acidogens) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นสารอาหารสำหรับจุลชีพกลุ่มอื่นๆ เช่น กลุ่มลดซัลเฟต (sulfate-reducing bacteria) และกลุ่มสร้างมีเทน (methanogens) ต่อไป; ค) แลคเตท (lactate) เป็นสารอาหารสำหรับจุลชีพกลุ่มสร้างกรดและกลุ่มลดซัลเฟต; ง) อะซิเตท (acetate) เป็นสารอาหารสำคัญสำหรับจุลชีพกลุ่มสร้างมีเทน (methanogens) และกลุ่มลดซัลเฟตบางชนิด; และ จ) ฟอร์เมท (formate) เป็นสารอาหารให้กับแบคทีเรียกลุ่มสร้างมีเทนและกลุ่มลดซัลเฟตบางชนิด ความเข้มข้นของสารอาหารที่เติมคือ 5 กรัมต่อลิตร โดยใช้ น้ำตะกอนที่เตรียมโดยใช้ mineral medium (S+MM) จาก Sites A3 และ A4 ผลการทดลองได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.6 ซึ่งพบว่าสารอาหารเกือบทั้งหมดยกเว้นฟอร์เมทไม่มีผลที่ชัดเจนต่อการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซิน เป็นการยืนยันดังที่กล่าวมาแล้วว่าสารอาหารที่มีอยู่ในหัวเชื้อจุลชีพเพียงพอต่อการลดคลอรีนของ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเฮกซะคลอโรเบนซินแล้ว หรือจะกล่าวอีกนัยหนึ่งคือการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซินที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่จำเป็นต้องอาศัยสารอาหารจำนวนมาก อย่างไรก็ตามก็ดีพบว่าฟอร์เมทมีแนวโน้มที่จะทำให้การลดคลอรีนเกิดขึ้นช้าลงเป็นผลให้เวลาในการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซินทั้งหมดนานขึ้นจาก 30-35 วันเป็น 45 วัน คาดว่าฟอร์เมทไปกระตุ้นการทำงานของจุลชีพกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่กลุ่มที่ลดคลอรีน (dechlorinators) ทำให้เกิดการแย่งธาตุอาหารเสริม นำไปสู่การลดกิจกรรมของจุลชีพกลุ่มที่ลดคลอรีนและหน่วงการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซิน เนื่องจากฟอร์เมทเป็นสารอาหารเฉพาะสำหรับจุลชีพกลุ่มสร้างมีเทนและลดซัลเฟตบางกลุ่ม แต่ภายใต้สภาวะทดลองเชื่อว่ากิจกรรมของจุลชีพกลุ่มลดซัลเฟตไม่น่าจะมีมากเนื่องจาก

ตารางที่ 4.6 ผลของสารอาหาร 5 กรัมต่อลิตรที่มีต่อการลดคลอรีนของ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของ เฮกซะคลอโรเบนซีนของหัวเชื้อที่ผ่านการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนมาแล้วในตู้กลาง

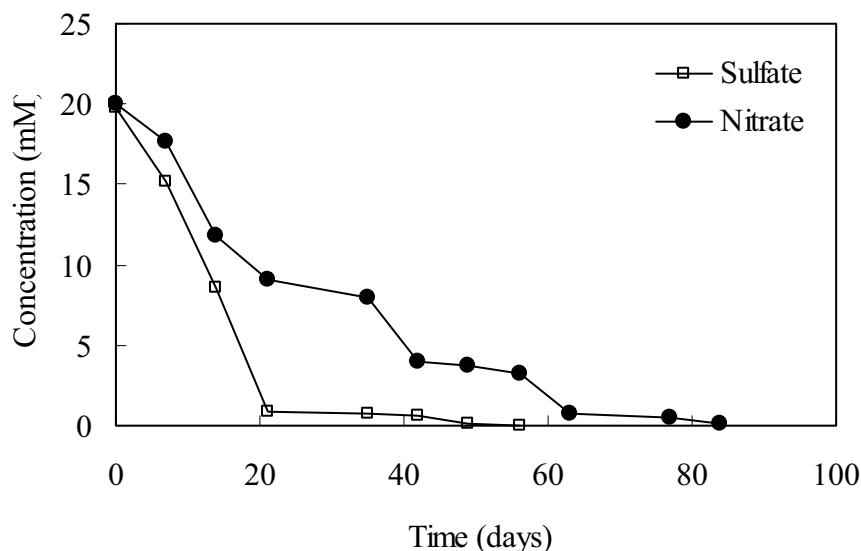
S+MM

Site	Substrate	Lag Phase (days)	Complete Dechlorination (days)
A3	No addition	3, 3	35, 30
	Glucose	6, 6	36, 36
	Pyruvate	0, 0	36, 36
	Lactate	0, 0	30, 30
	Acetate	0, 12	36, 36
	Formate	0, 12	45, 45
A4	No addition	3, 3	30, 30
	Glucose	0, 0	45, 45
	Pyruvate	0, 0	36, 36
	Lactate	0, 0	30, 30
	Acetate	0, 0	36, 36
	Formate	0, 0	45, 45

ซัลเฟตในน้ำตะกอนมีอยู่น้อย จึงชี้ให้เห็นว่าจุลชีพกลุ่มสร้างมีเทนเพียงบางเผ่าพันธุ์ (species) เท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน

4.2.1.4 ผลของสารรับอิเล็กตรอน

การทดลองส่วนนี้มุ่งศึกษาถึงผลของแบคทีเรียกลุ่มลดซัลเฟต (sulfate-reducing bacteria) และกลุ่มดีไนตริฟายเออร์ (denitrifiers) ที่มีต่อการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน โดยการเติมซัลเฟตหรือไนเตรตเข้าไปในน้ำตะกอนจาก Site A4 เพื่อกระตุ้นการทำงานของจุลชีพทั้งสองกลุ่มตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าการลดลงของไนเตรตช้ากว่าซัลเฟตดังแสดงในรูปที่ 4.2 ผลดังกล่าวเป็นที่คาดหวังอยู่แล้วเนื่องจากตะกอนที่เก็บจากกันล่าคลองอยู่ภายใต้สภาวะไร้อากาศมาเป็นเวลานาน ทำให้จุลชีพกลุ่มลดซัลเฟตมีความไวงานมาก (active) เมื่อได้รับซัลเฟตเข้าไปในปริมาณมากจึงเกิดการเจริญเติบโตและจับใช้ซัลเฟตอย่างรวดเร็ว ในทำนองกลับกันจุลชีพกลุ่มดีไนตริฟายเออร์ในตะกอนจะมีปริมาณน้อยเพราะในชั้นตะกอนจะมีไนเตรตน้อยมาก โอกาสที่สภาวะแอน็อกซิกจะเกิดขึ้นมีน้อยมาก การลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนภายใต้สภาวะที่มีซัลเฟตและไนเตรตได้แสดงในตารางที่ 4.7 ซึ่งจะเห็นได้ว่าซัลเฟตและไนเตรตไม่มีผลกระทบทั้งทางด้านบวกและลบต่อการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน เพราะตรวจพบเพนตะคลอโรเบนซีนในวันที่ 14 เช่นเดียวกันโดยมีความเข้มข้นใกล้เคียงกันที่ 0.018



รูปที่ 4.2 การลดของสารรับอิเล็กตรอนของน้ำตะกอนจาก Site A4 ที่เติม 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเฮกซะคลอโรเบนซีน

ตารางที่ 4.7 การลดคลอรีนของ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเฮกซะคลอโรเบนซีนของน้ำตะกอนจาก Site A4 ภายใต้สภาวะแอน็อกซิกและสภาวะการลดซัลเฟต

Electron Acceptor	Appearance Time (days)		
	QCB	1,2,3,5-TeCB	1,3,5-TCB
No addition	14	42	56
20 mM of NaNO ₃	14	56	56
20 mM of Na ₂ SO ₄	14	70	56

และ 0.019 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับกรณีของไนเตรดและซัลเฟตตามลำดับ ระยะเวลาพักตัว (Lag Phase) ที่เกิดขึ้นต่างจากในการทดลองส่วนที่ผ่านๆมาที่ใช้ น้ำตะกอนจาก Site A4 เหมือนกัน ที่เป็นเช่นนี้เพราะมีการเก็บตะกอนหลายครั้งตลอดระยะเวลาศึกษากว่า 3 ปี จึงทำให้ตะกอนตัวอย่างในแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันบ้างเล็กน้อย อย่างไรก็ตามก็ดีเนื่องจากการทดสอบผลของสารที่เติมเป็นการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่กระทำทุกครั้งในแต่ละชุดทดลอง จึงทำให้ผลที่ได้สามารถเชื่อถือได้ ในช่วง 14 วันแรกนั้นแบคทีเรียกลุ่มที่ทำการลดซัลเฟตและกลุ่มดีไนตริฟิเคชันค่อนข้างจะไวงานสูงมาก(พิจารณาจากอัตราการลดที่เป็นเส้นตรงในช่วงแรก หรือเกิดปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ (zero-order reaction)) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มลดซัลเฟตและกลุ่มดีไนตริฟายเออร์ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงต่อการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน นอกจากนี้ยังชี้ให้เห็นว่าสารอาหารและธาตุอาหารที่มีอยู่ในน้ำตะกอนมีอยู่อย่างเหลือเฟือ ถึงแม้ว่าแบคทีเรียกลุ่มลดซัลเฟตและกลุ่มเกิดดีไนตริฟายเออร์จะมีอัตราการเติบโตสูงมากก็ยังคงมีสารอาหารและธาตุอาหารเพียงพอต่อจุลินทรีย์กลุ่มลดคลอรีน ผลดังกล่าวสอดคล้องกับ

งานวิจัยของ Chen และคณะ (2002) ซึ่งพบว่าซัลเฟตที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลต่อการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน อย่างไรก็ตามได้เสนอแนะว่าในกรณีที่สารอาหารมีจำกัดแบคทีเรียกลุ่มลดซัลเฟตอาจแย่งสารอาหารกับจุลชีพกลุ่มลดคลอรีนจนทำให้การลดคลอรีนเกิดขึ้นได้ไม่ดี แต่ถึงกระนั้นพบว่าแบคทีเรียกลุ่มลดซัลเฟตรบกวนต่อการลดคลอรีนของเพนตะคลอโรเบนซีนเป็น 1,2,3,5-เตตระคลอโรเบนซีนและ 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากชุดทดลองที่เติมซัลเฟตตรวจพบ 1,2,3,5-เตตระคลอโรเบนซีนและ 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนช้ากว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งให้เห็นว่าจุลชีพที่ทำการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนอาจเป็นคนละกลุ่มกับจุลชีพที่ลดคลอรีนของเพนตะคลอโรเบนซีนและ 1,2,3,5-เตตระคลอโรเบนซีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ (2000)

4.2.1.5 ผลของอุณหภูมิ

การศึกษาถึงผลของสารอาหารและธาตุอาหารเสริมชี้ให้เห็นว่าไม่มีผลกระทบอย่างชัดเจนต่อการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน ซึ่งให้เห็นว่าการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนทางชีวภาพภายใต้สภาวะไร้อากาศนี้ไม่จำเป็นต้องการสารอาหารหรือธาตุอาหารเสริมเป็นพิเศษเฉพาะ กิจกรรมการลดคลอรีนสามารถเกิดขึ้นได้เองภายใต้ปริมาณสารอาหารและธาตุอาหารที่มีอยู่ในตะกอนตามธรรมชาติ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือประชากรของจุลชีพในตะกอนจากแหล่งน้ำทั้งหมดที่เก็บตัวอย่างมามีกลุ่มจุลชีพที่พร้อมจะทำหน้าที่ลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนอยู่แล้วไม่ว่าตะกอนเหล่านั้นจะเคยถูกปนเปื้อนด้วยเฮกซะคลอโรเบนซีนมาก่อนหรือไม่ ซึ่งนำไปสู่สมมุติฐานที่ว่า การลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนนั้นไม่จำเป็นต้องอาศัยจุลชีพกลุ่มที่ซับซ้อนนอกเหนือจากที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติของประเทศไทย แต่โครงสร้างของจุลชีพที่มีอยู่ในตะกอนลำน้ำของประเทศไทยน่าจะแตกต่างจากที่มีอยู่ตามธรรมชาติในต่างประเทศ จึงส่งผลให้เฮกซะคลอโรเบนซีนถูกย่อยสลายอย่างช้าถึงช้ามากในต่างประเทศ สภาวะแวดล้อมสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เมตริกซ์ (matrix) หรือความหลากหลายของจุลชีพในตะกอนลำน้ำตามธรรมชาติของประเทศไทยแตกต่างจากประเทศอื่น ๆ ที่มีการศึกษาการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนคืออุณหภูมิ ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนส่วนใหญ่กระทำโดยประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ไต้หวัน และกลุ่มประเทศในยุโรปซึ่งตั้งอยู่ในภูมิภาคที่มีภูมิอากาศแบบ “Temperate-Climate” หรือ “Continental-Climate” ซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ยในเดือนที่เยือกเย็นที่สุดอยู่ในช่วง -3 ถึง 18°C และต่ำกว่า -3°C ตามลำดับจากการจัดแบ่งโดย Koppen-Geiger Climate Classification System ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศไทยที่มีภูมิอากาศแบบ “Tropical Climate” ซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ยในเดือนที่เยือกเย็นที่สุดสูงกว่า 18°C จากข้อมูลของกรมอุตุนิยมวิทยาพบว่าอุณหภูมิเฉลี่ยของ 30 ปีในช่วงกลางวันและกลางคืนของจังหวัดสมุทรปราการมีค่าเท่ากับ 26.3 และ 30.3°C ตามลำดับ โดยอุณหภูมิในช่วงกลางวันระหว่างการศึกษานี้อยู่ในช่วง 25 ถึง 31°C จึงเป็นไปได้ว่าประชากรของจุลชีพ

ในตะกอนของประเทศไทยอาจมีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่าในประเทศที่พัฒนาแล้วที่มีอุณหภูมิเฉลี่ยต่ำกว่า

เพื่อทดสอบสมมุติฐานดังกล่าว คณะทำงานจึงได้ทำการทดลองการลดคลอรีนของ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเฮกซะคลอโรเบนซีนในน้ำตะกอนจาก Sites A3 และ A4 ที่อุณหภูมิต่างๆกัน ในช่วง 15 ถึง 45°C ซึ่งผลที่ได้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.8 ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนด้วยน้ำตะกอนจาก Sites A3 และ A4 มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum) อยู่ในช่วง 30-40°C และ 30-35°C ตามลำดับ หากอุณหภูมิสูงกว่าหรือต่ำกว่าช่วงเหมาะสมดังกล่าวแล้วจะทำให้ระยะเวลาพักตัว (Lag Phase) นานขึ้นและการลดคลอรีนเกิดขึ้นช้าลง ผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่าถึงแม้ว่าน้ำตะกอนจะมีจุลชีพกลุ่มที่สามารถลดคลอรีนได้อยู่แล้ว แต่เมื่ออุณหภูมิไม่เหมาะสม จุลชีพกลุ่มดังกล่าวจะมีความไวงาน (activity) ที่เกี่ยวข้องกับการลดคลอรีนน้อยลง หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือจุลชีพกลุ่มลดคลอรีนที่มีอยู่ในตะกอนจาก Sites A3 และ A4 นี้สามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40°C ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องของประเทศไทย จึงเป็นไปได้ว่าในประเทศที่พัฒนาแล้วซึ่งมีช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 30°C ค่อนข้างยาวนาน (โดยเฉพาะในช่วงฤดูหนาว) จะทำให้จุลชีพกลุ่มที่สามารถลดคลอรีนได้นี้เติบโตได้ช้าจนถูกไล่

ตารางที่ 4.8 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการลดคลอรีนของ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเฮกซะคลอโรเบนซีนของน้ำตะกอน

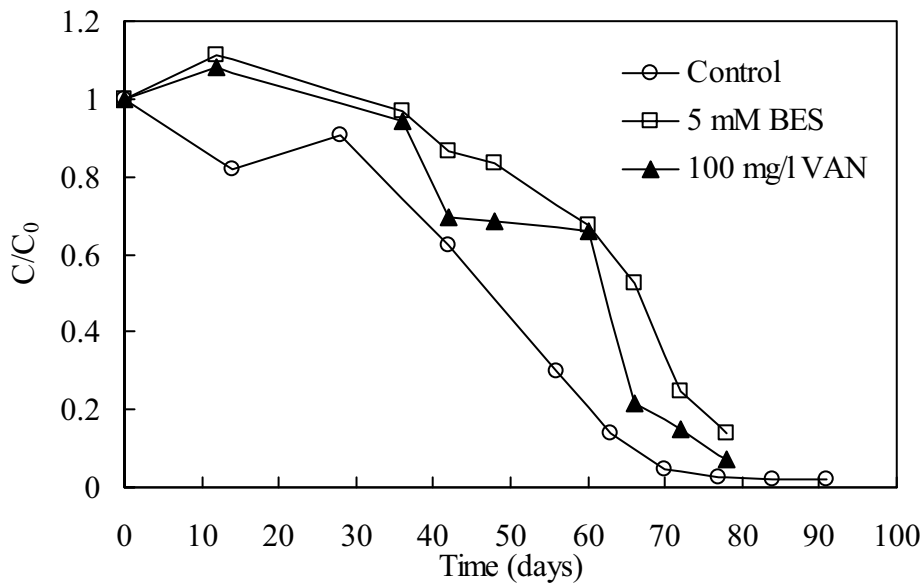
Site	Temperature (°C)	Lag Phase (days)	Complete Dechlorination (days)
A3	15	34, 42	>154, >154
	20	28, 35	126, 126
	30	14, 7	70, 70
	35	7, 7	63, 63
	40	7, 7	63, 70
	45	14, 35	>154, >154
A4	15	70, 35	>154, >154
	20	49, 49	161, 164
	30	14, 14	70, 70
	35	7, 14	70, 70
	40	14, 14	>154, >154
	45	42, 35	>154, >154

หมายเหตุ: เวลาที่แสดงในตารางมาจากการทดลองซ้ำ 2 ชุด (duplication)

ล้าง (wash-out) ออกจากเมตริกซ์ของจุลชีพในตะกอนลำนํ้าตามธรรมชาติ การลดคลอรีนจึงเกิดขึ้นได้ชัดเจนทำให้เฮกซะคลอโรเบนซีนตกค้างอยู่ในธรรมชาติได้นานจนถูกจัดให้เป็นสารมลพิษอินทรีย์คงทน ผลการทดลองในส่วนนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chang และคณะ (1997) ซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนคือระหว่าง 29 ถึง 37°C โดยความสามารถในการลดคลอรีนจะหมดสิ้นไปเมื่ออุณหภูมิเท่ากับ 18 และ 45°C โดยงานวิจัยชิ้นนี้ได้กระทำในประเทศไต้หวันซึ่งมีภูมิอากาศแบบ Temperate Climate และใช้ตะกอนจากแม่น้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี โดยจุลชีพในตะกอนที่เก็บมาไม่มีความสามารถในการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนในทันทีเหมือนเช่นที่พบในโครงการวิจัยนี้ จำเป็นต้องมีการปรับสภาพโดยการเติม 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ และเกลือแร่ และควบคุมที่ 30°C เป็นเวลา 1 เดือนจึงจะสามารถลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนได้ สอดคล้องกับการวิจารณ์ผลที่กล่าวมาแล้วคือ ในตะกอนธรรมชาติในประเทศไต้หวันซึ่งมีภูมิอากาศแบบ Temperate Climate ทำให้จุลชีพที่มีความสามารถในการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนถูกจำกัดการเจริญเติบโตในช่วงฤดูหนาวจนกลายเป็นจุลชีพกลุ่มน้อยในประชากรจุลชีพ เมื่อนำมาปรับสภาพที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 เดือน ทำให้จุลชีพกลุ่มที่ลดคลอรีนเติบโตได้ดีและเพิ่มจำนวนประชากรมากขึ้นจนมีนัยสำคัญเมื่อมีการป้อนเฮกซะคลอโรเบนซีนจึงเป็นผลให้เกิดการลดคลอรีนได้เร็วขึ้น การเติม 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนน่าจะช่วยกระตุ้นให้จุลชีพผลิตเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ลดคลอรีนในสารคลอโรเบนซีน ทำให้การลดคลอรีนเกิดได้ดียิ่งขึ้น

4.2.1.6 กลุ่มจุลชีพที่มีส่วนร่วมต่อการลดคลอรีน

การศึกษาในส่วนนี้มุ่งเน้นที่จะหาจุลชีพที่มีส่วนร่วมต่อการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน จากเนื้อหาในหัวข้อที่ 4.2.1.4 จะพบว่าแบคทีเรียกลุ่มลดซัลเฟตและกลุ่มดีไนตริฟายเออร์ไม่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงต่อการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน งานวิจัยในส่วนนี้จึงมุ่งทดสอบไปที่จุลชีพ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือแบคทีเรียกลุ่มสร้างมีเทนหรือเมทาโนเจน (methanogens) และกลุ่มที่สองคือกลุ่มสร้างกรดหรือแอซิโดเจน (acidogens) ในกรณีการศึกษาถึงแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนเจนจะทำการเติม bromoethanesulfonic acid (BES) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนเจนโดยเฉพาะ (Chang และคณะ (1997)) ลงไปในน้ำตะกอนจาก Site A4 ผลจากการทดสอบพบว่า BES ที่ความเข้มข้นเพียง 5 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนเจนได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณก๊าซมีเทนในขวดเซรัมของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม BES มีค่าเท่ากับร้อยละ 38 ณ วันที่ 78 แต่ในชุดทดลองที่เติม BES 5 มิลลิโมลาร์จะพบก๊าซมีเทนเพียงร้อยละ 1 ที่เวลาเดียวกัน แต่ถึงกระนั้นกลับพบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนถูกย่อยสลายเป็นเพนตะคลอโรเบนซีนได้ถึงแม้ว่าอัตราการลดคลอรีนจะต่ำกว่าดังแสดงในรูปที่ 4.3 ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นเป็นนัยยะว่าไม่เพียงแต่แบคทีเรียกลุ่ม



รูปที่ 4.3 การลดคลอรีนของ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเฮกซะคลอโรเบนซีนในน้ำตะกอนจาก Site A4 ภายใต้สภาวะที่มีการเติมสารยับยั้งการทำงานของจุลชีพ

เมธาโนเจนเท่านั้นที่มีบทบาทในการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน แต่ยังมีจุลชีพกลุ่มอื่นๆที่ไม่ได้รับผลกระทบจาก BES เกี่ยวข้องด้วย ดังนั้นในกรณีของชุดควบคุมจุลชีพทั้งสองกลุ่มนี้ร่วมกันลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน เป็นผลให้อัตราการลดเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อแบคทีเรียกลุ่มเมธาโนเจนถูกยับยั้งด้วย BES แล้ว จึงเหลือจุลชีพเฉพาะส่วนที่ไม่ได้รับผลกระทบจาก BES ทำหน้าที่ลดคลอรีน จึงทำให้อัตราการลดคลอรีนลดลง (ณ วันที่ 78 เฮกซะคลอโรเบนซีนลดลงมากกว่าร้อยละ 90 แต่ปริมาณก๊าซมีเทนในขวดเซรั่มมีเพียงร้อยละ 1 ในชุดทดลองที่เติม BES) เมื่อเพิ่ม BES ขึ้นเป็น 10 และ 50 มิลลิโมลาร์ การลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนยังคงเกิดขึ้น ตราบเมื่อ BES ถูกเพิ่มขึ้นเป็น 250 มิลลิโมลาร์ การลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนจึงจะหยุดอย่างสมบูรณ์ Middeldorp และคณะ (1997) พบว่า BES ที่ความเข้มข้นสูงๆนอกจากจะยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มเมธาโนเจนแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อการทำงานของจุลชีพกลุ่มอื่นๆด้วย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ 250 มิลลิโมลาร์ของ BES ไปยับยั้งการทำงานของจุลชีพที่สามารถลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนกลุ่มอื่นๆนอกเหนือไปจากแบคทีเรียกลุ่มเมธาโนเจน จึงทำให้การลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนสิ้นสุด ผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ช่วยเชื่อมต่อผลของงานวิจัยอื่นๆที่ศึกษาถึงกลุ่มจุลชีพที่มีบทบาทต่อการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนเข้าด้วยกัน กล่าวคือ Pavlostathis และ Prytula (2000) พบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนยังคงถูกย่อยสลายด้วยอัตราเดิมในน้ำตะกอนที่เติม BES ลงไปยับยั้งการทำงานของจุลชีพกลุ่มเมธาโนเจน จึงสรุปว่าจุลชีพกลุ่มเมธาโนเจนไม่มีส่วนร่วมในการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน ในทางตรงกันข้าม Chang และคณะ (1997) และ Chen และคณะ (2002) พบว่าเมื่อยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มเมธาโนเจนด้วย BES แล้ว การลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนก็สิ้นสุดเช่นเดียวกัน จึงสรุปว่าการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน

ขึ้นอยู่กับจุลชีพกลุ่มเมธาโนเจน แต่จากผลงานวิจัยครั้งนี้พบจุลชีพที่ลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนทั้งสองกลุ่มในตะกอนคือทั้งกลุ่มที่เป็นเมธาโนเจนและกลุ่มที่ไม่ใช่เมธาโนเจน ทำให้อธิบายได้ว่าในกรณีของ Pavlostathis และ Prytula (2000) นั้นน้ำตะกอนมีเพียงจุลชีพที่ลดคลอรีนกลุ่มที่ไม่ใช่เมธาโนเจน และในทำนองกลับกันในกรณีของ Chang และคณะ (1997) และ Chen และคณะ (2002) จะมีแต่จุลชีพลดคลอรีนในกลุ่มของเมธาโนเจนเท่านั้น ผลเปรียบเทียบดังกล่าวยังเป็นจุดสนับสนุนที่ว่าลักษณะประชากรของจุลชีพในตะกอนในประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่าในประเทศที่มีสภาพภูมิอากาศหนาวเย็นกว่า

คณะวิจัยได้ศึกษาถึงกลุ่มจุลชีพที่เกี่ยวข้องกับการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนต่อไปโดยใช้ vancomycin (VAN) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก (gram-positive bacteria) ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียกลุ่มแอซิโดเจน (กลุ่มสร้างกรด) ผลการทดลองพบว่า VAN ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรรบกวนการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนเล็กน้อยแต่มีผลน้อยกว่า 5 มิลลิโมลาร์ของ BES คาดว่าเป็นผลมาจากแบคทีเรียกลุ่มแอซิโดเจนทำงานได้ไม่ดีจึงทำให้ไม่มีการสร้างกรดไขมันระเหยง่ายที่เป็นสารอาหารสำหรับแบคทีเรียกลุ่มเมธาโนเจนซึ่งสามารถลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนได้อย่างเพียงพอ แต่จุลชีพที่สามารถลดคลอรีนกลุ่มที่ไม่ใช่เมธาโนเจนก็ยังสามารถทำงานได้ตามปกติหรือใกล้เคียงกับปกติ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ VAN ขึ้นเป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเป็นระดับที่ยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียแกรมบวกเกือบทั้งหมด การลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนก็สิ้นสุดตามไปด้วย ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นว่าจุลชีพกลุ่มที่สามารถลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนได้แต่ไม่ใช่กลุ่มเมธาโนเจนนั้นน่าจะเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสามารถในการทน VAN ได้ในระดับหนึ่ง แต่เมื่อ VAN เข้มข้นเกินค่าจำกัดเทอร์ชโฮลด์ (Threshold Limit) จุลชีพกลุ่มนี้จะถูกยับยั้ง (inactivation) ในทำนองเดียวกันเมื่อจุลชีพสร้างกรดหยุดทำงานก็จะส่งผลต่อเนื่องให้แบคทีเรียกลุ่มเมธาโนเจนไม่สามารถทำงานได้เนื่องจากขาดกรดอะซิติกซึ่งเป็นสารอาหาร ข้อสรุปดังกล่าวมีความเป็นไปได้เนื่องจากในงานวิจัยของ Swenson และคณะ (1990) พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกบางสายพันธุ์ (species) เช่น *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Lactobacillus* มีความทนต่อการยับยั้งของ VAN ได้ในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามก็คิดว่าเมื่อ VAN สูงขึ้นไปถึงระดับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรแล้ว แบคทีเรียกลุ่มนี้อาจถูกยับยั้ง (inactivate) ได้

ผลจากการทดลองในส่วนนี้สามารถสรุปได้ว่าจุลชีพที่มีความสามารถในการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนมีอยู่ 2 กลุ่มคือ แบคทีเรียเมธาโนเจนบางสายพันธุ์ และแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อการยับยั้งของ VAN ซึ่งนับเป็นการเชื่อมต่อผลการศึกษานักวิจัยที่ขัดแย้งกัน 2 กลุ่มเข้าด้วยกันดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

4.2.1.7 จลนพลศาสตร์ของการลดคลอรีน

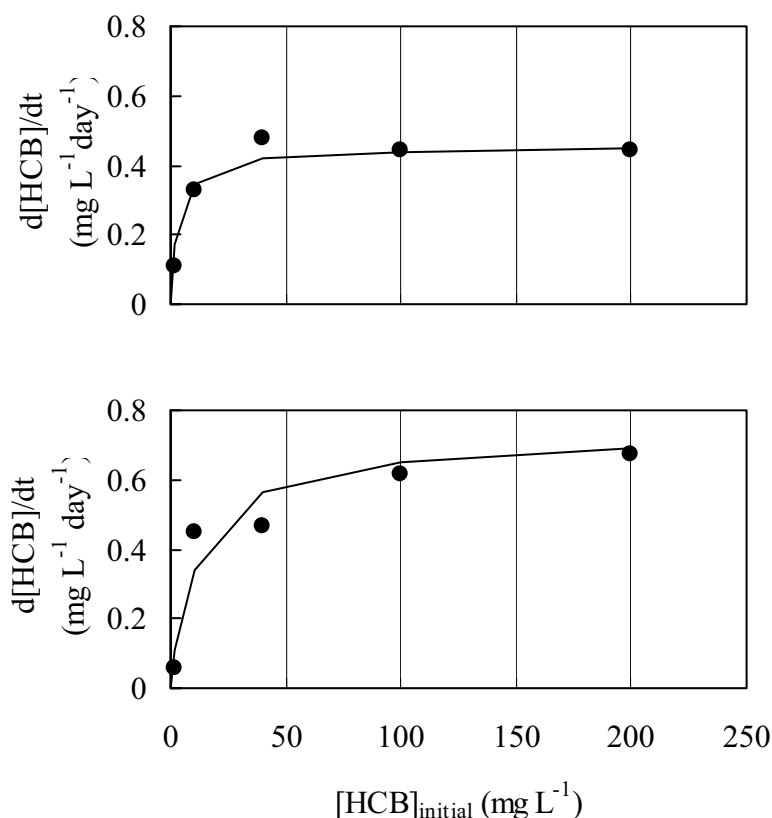
เมื่อได้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนและกลุ่มจุลชีพที่รับผิดชอบแล้ว คณะวิจัยจึงได้ศึกษาหาข้อมูลทางด้านจลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนทางชีวภาพแบบไร้อากาศ โดยทำการเพิ่มความเข้มข้นของเฮกซะคลอโรเบนซีนในน้ำตะกอนจาก Sites A3 และ A4 ขึ้นจาก 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 10, 40, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือหากเทียบต่อมวลตะกอนจะเพิ่มขึ้นจาก 8.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตะกอนแห้งเป็น 43.8, 175.2, 438.0 และ 876.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตะกอนแห้งสำหรับ Site A3 และเพิ่มจาก 12.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตะกอนแห้งเป็น 63.1, 252.4, 630.9 และ 1261.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตะกอนแห้งสำหรับ Site A4 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนยังคงถูกย่อยสลายทั้งๆที่ความเข้มข้นสูงถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยมี Lag Phase และเวลาที่ตรวจพบสารกลางเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน เพียงแต่ระยะเวลาที่กำจัดเฮกซะคลอโรเบนซีนทั้งหมดนานขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นดังแสดงในตารางที่ 4.9 ซึ่งเห็นว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนที่ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือเทียบเป็น 876.0 และ 1261.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตะกอนแห้งสำหรับ Sites A3 และ A4 ยังคงไม่เป็นพิษต่อจุลชีพในตะกอน และเนื่องจากน้ำตะกอนจากทั้งสองจุดนี้มีสารอินทรีย์และธาตุอาหารเสริมค่อนข้างมากจึงไม่จำกัดการย่อยสลายของเฮกซะคลอโรเบนซีนผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมร่วม (co-metabolism) และกลไกการลดคลอรีนยังคงเป็นกลไกหลักที่ได้ 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนเป็นสารผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 4.9 ผลของความเข้มข้นของเฮกซะคลอโรเบนซีนที่มีต่อการลดคลอรีนทางชีวภาพแบบไร้อากาศของน้ำตะกอน

Site	HCB (mg/l)	Appearance Time (days)			Complete Dechlorination Time (days)
		QCB	1,2,3,5-TeCB	1,3,5-TCB	
A3	2	14	14	14	70
	10	14	28	28	175
	40	14	28	35	>175
	100	14	28	42	>175
	200	21	28	49	>175
A4	2	14	21	28	70
	10	14	21	28	175
	40	14	21	28	175
	100	14	28	28	175
	200	14	28	35	>175

ในการหาค่าคงที่จลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนนั้น นักวิจัยบางส่วนนิยมใช้ปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่งเทียม (pseudo-1st-order reaction) เช่น Beurskens และคณะ (1994) และ Prytula และ Pavlostathis (1996) หรือปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์เทียม (pseudo-zeroth-order reaction) เช่น Yuan และคณะ (1999) อย่างไรก็ตามนักวิจัยบางกลุ่มเลือกใช้โมเดลการย่อยสลายทางชีวภาพที่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง (Michaelis-Menten Model) ซึ่งมีความซับซ้อนมากกว่าแต่มีรูปแบบที่ใกล้เคียงกับการย่อยสลายที่เกิดขึ้นจริงมากขึ้น เช่น Pavlostathis และ Prytula (2000) ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อนำอัตราการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนในช่วงเริ่มต้น (initial rate) มาพล็อตกับความเข้มข้นของเฮกซะคลอโรเบนซีนเริ่มต้นจะได้ความสัมพันธ์ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราการลดคลอรีนเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเฮกซะคลอโรเบนซีนเพิ่มขึ้นจะถึงจุดๆหนึ่งที่อัตราการลดคลอรีนมีค่าคงที่ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของเฮกซะคลอโรเบนซีน รูปแบบความสัมพันธ์ในลักษณะนี้เหมือนกับพฤติกรรมของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้องซึ่งนิยมใน Michaelis-Menton Kinetics เป็นสมการในการอธิบายเหมือนในกรณีของ Pavlostathis และ Prytula (2000) ในกรณีนี้เป็นกลไกของกระบวนการเมตาบอลิซึมร่วมซึ่งแสดงความสัมพันธ์ได้ดังสมการที่ 4.1

$$\frac{d[\text{HCB}]}{dt} = -\left(\frac{k_m X [\text{HCB}]}{K_{\text{HCB}} + [\text{HCB}]}\right)\left(\frac{S}{K_s + S}\right) \quad (4.1)$$



รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการลดคลอรีนและความเข้มข้นของเฮกซะคลอโรเบนซีน

โดย	k_m	=	maximum dechlorination rate of HCB per unit biomass
	K_{HCB}	=	half-saturation constant regarding on HCB
	K_S	=	half-saturation constant regarding on organic substrate
	X	=	HCB-dechlorinator intensity
	S	=	organic substrate concentration

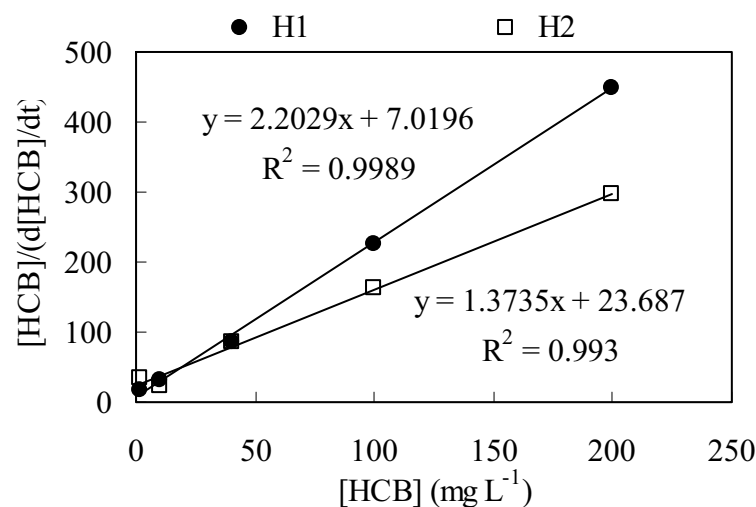
เนื่องจาก “S” มีค่าสูงมากเมื่อเทียบกับ “ K_S ” และความเข้มข้นของเฮกซะคลอโรเบนซีน และ “X” มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากสำหรับการย่อยสลายทางชีวภาพแบบไร้อากาศ สมการที่ 4.1 จึงสามารถดัดแปรได้เป็น

$$\frac{d[HCB]}{dt} = - \left(\frac{k'_m [HCB]}{K_{HCB} + [HCB]} \right) \quad (4.2)$$

โดย k'_m = maximum apparent dechlorination rate of HCB
เมื่อทำการจัดรูปแบบสมการใหม่และใช้ Hanes Linearization Method จะได้สมการที่ 4.3 ซึ่งเมื่อนำไปวาดกราฟจะได้เส้นตรงดังรูปที่ 4.5

$$\frac{[HCB]}{\left(-\frac{d[HCB]}{dt} \right)} = \frac{[HCB]}{k'_m} + \frac{K_{HCB}}{k'_m} \quad (4.3)$$

จากรูปที่ 4.5 จะได้ค่า “ k'_m ”, “ K_{HCB} ” และ “ R^2 ” เท่ากับ 0.45 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน, 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.993 สำหรับ Site A3 และ 0.73 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน, 17.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.999 สำหรับ Site A4 ตามลำดับ ค่าจลนพลศาสตร์ “ k'_m ” และ “ K_{HCB} ” ที่ได้นี้สูง



รูปที่ 4.5 เส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ตามสมการของ Hanes

กว่าของ Pavlostathis และ Prytula (2000) ประมาณ 30-50 และ 178-480 เท่าตามลำดับ ทั้งนี้ คาดว่าเป็นผลมาจากความแตกต่างของเฝ้าพันธุ์จุลชีพที่มีอยู่ในน้ำตะกอนโดยในกรณีของ Pavlostathis และ Prytula (2000) นั้นจะมีจุลชีพที่สามารถลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน ในกลุ่มที่ไม่ได้เป็นเมทาโนเจน แต่ในงานวิจัยครั้งนี้พบจุลชีพที่ลดคลอรีนทั้งกลุ่มที่เป็นเมทาโนเจนและไม่ใช้เมทาโนเจนร่วมกันอยู่

4.2.2 ผลการศึกษาในตะกอนเหลว

ผลการศึกษาที่ผ่านมาในน้ำตะกอนพบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนสามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้เป็นอย่างดี ซึ่งให้เห็นว่าหากจุลชีพในธรรมชาติของประเทศไทยมีโอกาสสัมผัสหรือดูดซึมเฮกซะคลอโรเบนซีนแล้ว จะสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนได้ อย่างไรก็ตามภาวะที่เกิดขึ้นในธรรมชาตินั้น เฮกซะคลอโรเบนซีนจะถูกขับๆไปบนตะกอนของแข็งในน้ำภายใต้สภาวะที่มีปริมาณของแข็งสูงกว่าน้ำตะกอน คณะทำงานจึงได้ทดสอบการลดคลอรีนภายใต้สภาวะที่มีปริมาณของแข็งดูดซับสูงเช่นในตะกอนเหลวเพื่อศึกษาถึง bioavailability ของเฮกซะคลอโรเบนซีนที่มีต่อจุลชีพ ผลการลดคลอรีนได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.10 ซึ่งพบว่าจุลชีพในตะกอนเหลวยังคงลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเวลาที่พบเพนตะคลอโรเบนซีนไม่แตกต่างจากในกรณีของน้ำตะกอน (ตารางที่ 4.4) เท่าใดนัก แต่เวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของเฮกซะคลอโรเบนซีนทั้งหมดมีแนวโน้มสูงขึ้นในกรณีของตะกอนเหลว ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากในตะกอนเหลวมีของแข็งให้ดูดซับมากกว่า การดึงเฮกซะคลอโรเบนซีนของจุลชีพจึงเกิดขึ้นได้ยากกว่าและช้ากว่า ที่น่าสังเกตอีกกรณีหนึ่งคือตรวจพบ 1,2,4-ไตรคลอโรเบนซีนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายรองในเกือบทุกตัวอย่างของตะกอนเหลวซึ่งต่างจากในกรณีของน้ำตะกอนที่ส่วนใหญ่จะพบ 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนเป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนเท่านั้น ซึ่งให้เห็นเป็นนัยว่าจุลชีพกลุ่มที่สามารถย่อยสลายเพนตะคลอโรเบนซีนเป็น 1,2,4,5-เตตระคลอโรเบนซีนและเป็น 1,2,4-ไตรคลอโรเบนซีนตามลำดับน่าจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่ากลุ่มที่ย่อยเพนตะคลอโรเบนซีนเป็น 1,2,3,5-เตตระคลอโรเบนซีนและเป็น 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนตามลำดับ ดังนั้นในกรณีของตะกอนเหลวที่มีพื้นที่ดูดซับมากกว่าน้ำตะกอน เพนตะคลอโรเบนซีนจึงถูกย่อยสลายอย่างจำกัดและเกิดขึ้นอย่างช้าๆจนทำให้จุลชีพกลุ่มที่ย่อยสลายผ่านทางกลไกรองสามารถเจริญเติบโตได้ทันหรือสร้างความไวปฏิกิริยา (activity) จนมีส่วนร่วมในการลดคลอรีนของเพนตะคลอโรเบนซีน

ตารางที่ 4.10 การลดคลอรีนของ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของเฮกซะคลอโรเบนซีนด้วยตะกอนเหลว

Site	Time to detect intermediates/products (days)					HCB-complete dechlorination (days)
	QCB	1,2,3,5- /1,2,4,5-TeCB	1,3,5-TCB	1,2,4-TCB	1,4-DCB	
B1	28	28	28	49	ND	77
B2	ND	ND	49	63	ND	63
B3	28	ND	49	77	ND	77
B4	28	63	63	63	ND	91
D1	49	63	63	77	ND	91
D2	49	ND	63	63	119	91
D3	28	49	49	77	ND	91
D4	49	49	49	ND	ND	63
G1	14	49	49	63	ND	77
H1	14	28	49	ND	ND	77
H2	28	ND	49	77	ND	77
I1	14	49	49	77	ND	119
J1	28	49	49	63	ND	77
J2	14	ND	49	ND	ND	119

หมายเหตุ: -ND คือตรวจไม่พบ

4.2.3 ผลการศึกษาในแบบจำลองลำน้ำ

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนสามารถถูกย่อยสลายได้ทั้งในน้ำ ตะกอนและตะกอนเหลว คณะทำงานจึงได้ศึกษาในเชิงลึกโดยการจำลองสภาพการปนเปื้อนของ เฮกซะคลอโรเบนซีนในตะกอนก้นลำน้ำโดยใช้ตู้ปลาขนาดใหญ่ 2 ชุด ชุดหนึ่งบรรจุตะกอนที่ ผสมกับเฮกซะคลอโรเบนซีนบรรจุในภาชนะเปิดวางไว้ด้านล่างของตู้ปลาโดยมีชั้นตะกอนที่ไม่มี เฮกซะคลอโรเบนซีนปนเปื้อนปิดทับอยู่ 10 เซนติเมตรและมีชั้นน้ำไหลอยู่เหนือชั้นตะกอนอีก 10 เซนติเมตร (จำลองสภาพของลำน้ำ) ส่วนตู้ปลาอีกชุดเป็นที่เก็บน้ำเพื่อใช้ในการหมุนเวียนน้ำ เหนือชั้นตะกอน ปริมาณของเฮกซะคลอโรเบนซีนที่ใช้เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมแห้งของ ตะกอนโดยใช้ตะกอนผสมจาก Sites A3 และ A4 ตะกอนเปียกมีสัดส่วนของแข็งอยู่เท่ากับร้อยละ 34 โดยเป็นของแข็งที่ระเหยง่ายเท่ากับร้อยละ 3.5 ผลการศึกษาพบว่าเฮกซะคลอโรเบนซีน เริ่มถูกย่อยสลายในวันที่ 21 และถูกย่อยหมดสิ้นใน 9 สัปดาห์ และไม่พบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก การย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนในชั้นตะกอนด้านบนที่ไม่มีเฮกซะคลอโรเบนซีนปนเปื้อนและ ชั้นน้ำด้านบนสุดเลย ซึ่งให้เห็นว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนน่าจะสามารถย่อยสลายภายใต้สภาวะไว้

อากาศในตะกอนก้นลำน้ำตามธรรมชาติได้ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ตะกอนที่เก็บจากคลองหัวลำภูซึ่งพบ 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซินร่วมอยู่ด้วย ซึ่งหากเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในที่ (in situ) ของงานวิจัยหลายชิ้นจะพบได้ว่าจุลชีพในตะกอนจากคลองหัวลำภูมีความไวปฏิกิริยาต่อการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซินสูงกว่ามาก เช่น Beurskens และคณะ (1994) ตรวจสอบตะกอนก้นทะเลสาบ Ketelmeer ซึ่งเป็นพื้นที่ตกตะกอนของแม่น้ำ Rhine และพบว่าร้อยละ 80 ของเฮกซะคลอโรเบนซินที่ปนเปื้อนในตะกอนถูกย่อยสลายไปในช่วงเวลา 20 ปี ในขณะที่ Zhao และคณะ (2003) พบค่าครึ่งชีวิตของเฮกซะคลอโรเบนซินในตะกอนเท่ากับ 1.7 ปี

4.3 การลดคลอรีนของโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิล

4.3.1 ผลการศึกษาในน้ำตะกอน

4.3.1.1 ความสามารถในการย่อยสลายของจุลชีพแบบไร้อากาศ

ในงานวิจัยครั้งนี้คณะทำงานเลือกที่จะทดสอบความสามารถในการย่อยสลายของจุลชีพด้วย 2,3,4- และ 3,4,5-ไตรคลอโรไบฟีนิลก่อนเพราะทั้งสองคอนเจนเนอร์นี้ไม่เป็นส่วนผสมของสารประกอบพีซีบีที่มีจำหน่ายทางการค้าเช่น Aroclor 1242, Aroclor 1254 และ Aroclor 1260 การกระทำในลักษณะนี้จะทำให้ไม่เกิดข้อผิดพลาดจากการปนเปื้อนเดิมในตะกอน ผลการลดคลอรีนโดยน้ำตะกอนจากคลองหัวลำภูได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.11 ซึ่งพบว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลสามารถถูกย่อยสลายได้โดยคลอรีนอะตอมที่ถูกดึงออกจากโมเลกุลจะเป็นคลอรีนอะตอมในตำแหน่งกลางเหมือนเช่นในกรณีของ 1,2,3,5-เตตระคลอโรเบนซิน(แต่ใช้เวลาในการย่อยสลายนานกว่าเฮกซะคลอโรเบนซิน) และการศึกษาการลดคลอรีนของไตรคลอโรไบฟีนิลโดย Williams (1994) การทำซ้ำที่ Sites A3 และ A4 ให้ผลใกล้เคียงกัน แต่ถ้าใช้น้ำตะกอนจาก Site E1 และ E2 จะพบว่าต้องใช้เวลาอย่างมากในการย่อยสลาย ซึ่งให้เห็นว่า 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้แต่อาจใช้เวลานาน ในทำนองกลับกันพบว่า 3,4,5-ไตรคลอโรไบฟีนิลย่อยสลายได้ยากมาก มีเพียงน้ำตะกอนจาก Sites A1, A3#1 และ A4#1 เท่านั้นที่สามารถเปลี่ยน 3,4,5-ไตรคลอโรไบฟีนิลให้เป็น 3,5-ไดคลอโรไบฟีนิลได้ และเช่นเดียวกันคลอรีนอะตอมในตำแหน่งกลางจะถูกแยกออกจากโมเลกุลของไบฟีนิลก่อน

จากผลการทดสอบขั้นต้นพบว่า การย่อยสลายพีซีบีทางชีวภาพแบบไร้อากาศมีความเป็นไปได้ คณะทำงานจึงศึกษาการลดคลอรีนกับคอนเจนเนอร์ที่มีอยู่ในพีซีบีที่จำหน่ายทางการค้าโดยทำการเลือกมา 19 คอนเจนเนอร์ที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบตั้งแต่ 2 ถึง 6 อะตอมดังแสดงในตารางที่ 4.12 โดยใช้น้ำตะกอนจาก Sites A3 ผสมกับ Site A4 เพื่อเพิ่มความ

ตารางที่ 4.11 การลดคลอรีนของ 2,3,4- และ 3,4,5-ไตรคลอโรไบฟีนิลในน้ำตะกอน

Congener	Site	Lag Phase (weeks)	Complete Dechlorination (weeks)	Products
2,3,4-CBp	A1	2	12	2,4-CBp
	A2	2	10	2,4-CBp (major) & 2,3-CBp (minor)
	A3#1	4	>8	2,4-CBp
	A3#2	2	12	2,4-CBp (major) & 2,3-CBp (minor)
	A4#1	2	>8	2,4-CBp
	A4#2	4	10	2,4-CBp
	A5	2	10	2,4-CBp
	A6	2	>18	2,4-CBp
	A7	2	12	2,4-CBp
	A8	2	12	2,4-CBp
	A9	2	12	2,4-CBp
	A10	2	12	2,4-CBp
	E1	10	>16	2,4-CBp
	E2	14	>18	2,4-CBp
3,4,5-CBp	A1	56	>12	3,5-CBp
	A2	ND	ND	ND
	A3#1	154	>28	3,5-CBp
	A3#2	ND	ND	ND
	A4#1	126	>28	3,5-CBp
	A4#2	ND	ND	ND
	A5	ND	ND	ND
	A6	ND	ND	ND
	A7	ND	ND	ND
	A8	ND	ND	ND
	A9	ND	ND	ND
	A10	ND	ND	ND

หมายเหตุ: -ND คือตรวจไม่พบ/ไม่เกิดการลดคลอรีน

ตารางที่ 4.12 สัดส่วนของคอนเจนเนอร์ที่ศึกษาใน Aroclor

Congener	% in Aroclor 1242	% in Aroclor 1254	% in Aroclor 1260
2,2'-CBp	3.01	-	-
2,3'-CBp	1.38	-	-
2,4'-CBp	7.65	-	-
4,4'-CBp	1.51	-	-
2,5,2'-CBp	6.28	0.41	-
2,5,4'-CBp	4.59	0.22	0.05
2,4,4'-CBp	6.52	0.25	0.05
3,4,2'-CBp	4.79	0.14	-
2,4,2',5'-CBp	3.60	1.64	-
2,3,2',5'-CBp	3.20	-	-
2,5,3',4'-CBp	3.89	3.21	0.09
2,5,2',5'-CBp	-	-	-
2,3,4,4'-CBp	1.33	0.54	-
2,4,5,3',4'-CBp	1.62	6.39	0.57
2,3,6,3',4'-CBp	1.53	5.85	1.90
2,3,6,2',4',5'-CBp	0.63	2.21	7.83
2,4,5,2',4',5'-CBp	0.68	4.26	10.80
2,3,4,2',3',6'-CBp	0.30	1.98	3.69
2,3,4,2',4',5'-CBp	-	0.77	1.55

หลากหลายทางจุลชีววิทยา ผลการทดลองพบว่ามีเพียง 4 คอนเจนเนอร์คือ 2,4,4'-, 2,4,2',5'-, 2,3,2',5'- และ 2,3,4,4'-CBps เท่านั้นที่สามารถถูกกลดคลอรีนได้โดยมีระยะเวลาพักตัว (Lag Phase) ที่ 18, 18, 8 และ 6 สัปดาห์ และได้ผลิตภัณฑ์คือ 2,4-, 2,4,2'-, 2,3,2'- และ 2,4,4'-CBps ตามลำดับ แต่ทั้ง 4 คอนเจนเนอร์ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่สามารถถูกย่อยสลายได้หมดในช่วงเวลาที่ศึกษาคือ 18 สัปดาห์ดังแสดงในตารางที่ 4.13 เป็นที่น่าสังเกตว่าคลอรีนอะตอมในตำแหน่งเมตาจะถูกดึงออกจากวงไบฟีนิลได้ง่ายกว่าตำแหน่งพาราเหมือนงานวิจัยของ Fish และ Principe (1994) และไม่เกิดการลดคลอรีนในตำแหน่งออโรเลยเหมือนเช่นในงานวิจัยของ William (1994), Mavoungou และคณะ (1991), Rhee และคณะ (1993) และ Natarajan และคณะ (1996) เพื่อเป็นการยืนยันผลความคงทนต่อการย่อยสลายของพีซีบี คณะทำงานได้ทดสอบกับน้ำตะกอนจากคลองข้าง ถ. ท่าหรุ-บางพลี สมุทรปราการ (Sites E1 และ E2) ที่รับน้ำทั้งจากร้านขายของเก่าซึ่งเชื่อว่าการล้างภาชนะที่น่าจะปนเปื้อนพีซีบี ผลพบว่าน้ำตะกอนจากทั้งสองจุดไม่สามารถลดคลอรีนของพีซีบีทั้ง 4 คอนเจนเนอร์ที่ทดสอบได้

ตารางที่ 4.13 การลดคลอรีนของพีซีบีคอนเจนเนอร์ต่างๆด้วยน้ำตะกอน

Site	Congener	Lag Phase (weeks)	Product(s)	Complete Dechlorination (weeks)
A3+A4	2,2'-CBp	ND	ND	ND
	2,3'-CBp	ND	ND	ND
	2,4'-CBp	ND	ND	ND
	4,4'-CBp	ND	ND	ND
	2,5,2'-CBp	ND	ND	ND
	2,5,4'-CBp	ND	ND	ND
	2,4,4'-CBp	18	2,4-CBp	>18
	3,4,2'-CBp	ND	ND	ND
	2,4,2',5'-CBp	18	2,4,2'-CBp	>18
	2,3,2',5'-CBp	8	2,3,2'-CBp	>18
	2,5,3',4'-CBp	ND	ND	ND
	2,5,2',5'-CBp	ND	ND	ND
	2,3,4,4'-CBp	6	2,4,4'-CBp	>18
	2,4,5,3',4'-CBp	ND	ND	ND
	2,3,6,3',4'-CBp	ND	ND	ND
	2,3,6,2',4',5'-CBp	ND	ND	ND
	2,4,5,2',4',5'-CBp	ND	ND	ND
	2,3,4,2',3',6'-CBp	ND	ND	ND
	2,3,4,2',4',5'-CBp	ND	ND	ND
E1	2,5,2'-CBp	ND	ND	ND
	2,5,4'-CBp	ND	ND	ND
	2,3,2',5'-CBp	ND	ND	ND
	2,4,5,3',4'-CBp	ND	ND	ND
E2	2,5,2'-CBp	ND	ND	ND
	2,5,4'-CBp	ND	ND	ND
	2,3,2',5'-CBp	ND	ND	ND
	2,4,5,3',4'-CBp	ND	ND	ND

หมายเหตุ: -ND คือตรวจไม่พบ/ไม่เกิดการลดคลอรีน

4.3.1.2 ผลของสารอาหาร

เนื่องจากพบว่าพีซีบีมีความคงทนสูงกว่าเฮกซะคลอโรเบนซีนมาก คณะทำงานจึงได้ศึกษาหาตัวแปรที่จะช่วยส่งเสริมการลดคลอรีนของพีซีบีโดยใช้ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลเป็นสารเป้าหมายเนื่องจากพบว่าสามารถถูกย่อยสลายได้ในเวลาที่ไม่นานมากนัก น้ำตะกอนที่ใช้ทดสอบมาจาก Sites E1 และ E2 ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.14 ซึ่งพบว่าการเติมสารอาหารทั้งในรูปของแลคเทตและไพรวูเวตมีผลที่เด่นชัดต่อการลดคลอรีนของ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลมากกว่าในกรณีของเฮกซะคลอโรเบนซีน กล่าวคือสามารถช่วยให้ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลย่อยสลายได้เร็วขึ้น ส่วนการเติมอะซิเตทมีแนวโน้มที่จะไปรบกวนการทำงานของจุลชีพกลุ่มที่ลดคลอรีน ส่วนสารสกัดยีสต์ไม่มีผลที่เด่นชัดต่อการลดคลอรีน อย่างไรก็ตามก็ดียิ่งจะมีการป้อนสารอาหารและธาตุอาหารเสริมเพิ่มให้มากขึ้นพอ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้หมดในช่วงระยะเวลาที่ศึกษา ผลของสารอาหารต่อการลดคลอรีนของพีซีบีที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nies และ Vogel (1990) ซึ่งพบว่าเมธานอล กลูโคส อะซิโตน และอะซิเตตตามลำดับช่วยเร่งให้เกิดการลดคลอรีนของ Aroclor 1242 ด้วยจุลชีพจากตะกอนของ Hudson River ที่มีประวัติการปนเปื้อนพีซีบีได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าอะซิเตตเป็นสารให้อิเลคตรอนที่ให้ผลดีต่อการลดคลอรีนของพีซีบีต่ำที่สุดในบรรดาสารอินทรีย์ที่ทดสอบทั้งหมด เหมือนเช่นกรณีที่พบในโครงการวิจัยนี้

4.3.2 ผลการศึกษาในตะกอนเหลว

คณะทำงานได้ศึกษาผลของการดูดซับของของแข็งที่มีต่อ Bioavailability ของพีซีบีต่อจุลชีพที่สามารถลดคลอรีนโดยใช้ตะกอนเหลว สารพีซีบีเป้าหมายคือ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลเนื่องจากพบว่าสามารถถูกย่อยสลายได้ในน้ำตะกอนภายในระยะเวลาที่ไม่นานนัก ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.15 ซึ่งเมื่อเทียบกับกรณีของน้ำตะกอนในตารางที่ 4.11 แล้วจะพบได้ว่าการลดคลอรีนเกิดขึ้นในตะกอนเหลวได้ยากกว่าในน้ำตะกอนเหมือนเช่นในกรณีของเฮกซะคลอโรเบนซีน อันเป็นผลมาจากการดูดซับที่เพิ่มขึ้นจากปริมาณของแข็งที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามก็ดีผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่ได้ยังคงเป็น 2,4-ไดคลอโรไบฟีนิล

4.3.3 ผลการศึกษาในแบบจำลองลำน้ำ

คณะทำงานได้ทดสอบการย่อยสลายของ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลในแบบจำลองลำน้ำภายใต้สภาวะเช่นเดียวกับในกรณีของเฮกซะคลอโรเบนซีน เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการลดคลอรีนในตะกอนตามธรรมชาติ แต่เลือกใช้ความเข้มข้นที่ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของแข็งแทนที่จะเป็น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของแข็งเหมือนในกรณีของเฮกซะคลอโรเบนซีน ทั้งนี้เพื่อลดความเป็นพิษของ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลที่อาจมีต่อจุลชีพในตะกอน ผลการศึกษาพบว่า

ตารางที่ 4.14 ผลของสารอาหารที่มีต่อการลดคลอรีนของ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลในน้ำตะกอน

Site	Substrate	Lag Phase (weeks)	Complete Dechlorination (weeks)	Product
C1	Acetate+YE	6	>16	2,4-CBp
	Pyruvate+YE	6	>16	2,4-CBp
D1	Acetate+YE	10	>16	2,4-CBp
	Pyruvate+YE	6	>16	2,4-CBp
D4	Acetate+YE	10	>16	2,4-CBp
	Pyruvate+YE	6	>16	2,4-CBp
E1	No addition	10	>18	2,4-CBp
	Yeast Extract (YE)	16	>18	2,4-CBp
	Acetate	14	>18	2,4-CBp
	Lactate	4	>10	2,4-CBp
	Pyruvate	6	>18	2,4-CBp
	Acetate+YE	12	>14	2,4-CBp
	Lactate+YE	6	>10	2,4-CBp
	Pyruvate+YE	8	>14	2,4-CBp
E2	No addition	14	>18	2,4-CBp
	Yeast Extract (YE)	10	>18	2,4-CBp2
	Acetate	ND	ND	2,4-CBp
	Lactate	4	>10	2,4-CBp
	Pyruvate	14	>18	2,4-CBp
	Acetate+YE	5	>14	2,4-CBp
	Lactate+YE	4	>10	2,4-CBp
	Pyruvate+YE	6	>14	2,4-CBp
J1	Acetate+YE	4	>16	2,4-CBp
	Pyruvate+YE	6	>16	2,4-CBp

หมายเหตุ: -ND คือตรวจไม่พบ/ไม่เกิดการลดคลอรีน

ตารางที่ 4.15 การลดคลอรีนของ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลในตะกอนเหลว

Site	Lag Phase (weeks)	Complete Dechlorination (weeks)	Products
A1	5	14-22	2,4-CBp (major) & 2,3-CBp (minor)
A2	5	14-22	2,3-CBp
A3	5-8	14-22	2,4-CBp
A4	8	14-22	2,4-CBp
A5	5	14-22	2,4-CBp
A6	5-8	14-22	2,4-CBp
A7	5	14-22	2,4-CBp
A8	5	14-22	2,4-CBp
A9	5	14-22	2,4-CBp
A10	8	14-22	2,4-CBp
C1	9	21-24	2,4-CBp
D1	ND	ND	ND
D4	ND	ND	ND
E1	18-24	>24	2,4-CBp
E2	ND	ND	ND
F1	ND	ND	ND
J1	ND	ND	ND

หมายเหตุ: -ND คือตรวจไม่พบ/ไม่เกิดการลดคลอรีน

2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลที่สามารถถูกลดคลอรีนได้ในน้ำตะกอนและตะกอนเหลวไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ในชั้นตะกอนตลอดระยะเวลาศึกษา 21 สัปดาห์ ซึ่งให้เห็นว่าในสภาวะจริงตามธรรมชาติ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลมีความคงทนต่อการย่อยสลายทางชีวภาพแบบไร้อากาศมากกว่าเฮกซะคลอโรเบนซีน จึงเหมาะสมที่ถูกจัดให้เป็นสารมลพิษอินทรีย์คงทน ซึ่งต่างจากเฮกซะคลอโรเบนซีนที่ไม่สมควรถูกจัดให้เป็นสารมลพิษอินทรีย์คงทนเพราะสามารถย่อยสลายได้ง่ายในสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย

4.4 บทความวิชาการที่เผยแพร่

ผลงานวิจัยที่ได้รับจากโครงการนี้ได้มีการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการนานาชาติ 2 เรื่องและนำเสนอในที่ประชุมทางวิชาการในประเทศ 1 เรื่องดังต่อไปนี้ (manuscript ได้รวบรวมไว้ในภาคผนวก ข)

- 1) Chen I.M., Wanitchapichat W., Jirakittayakorn T., Sanohniti S., Sudjarid W., Wantawin C., Voranisarakul, and **Anotai J.**, Hexachlorobenzene Dechlorination by Indigenous Sediment Microorganisms, *Journal of Hazardous Materials* (in press).
- 2) **Anotai J.**, Chyan J.M., Sudjarid W., Wanitchapichat W., and Chen I.M., Hexachlorobenzene Dechlorination by Enriched Mixed Cultures from Thai Canal, *Fresenius Environmental Bulletin* (in press).
- 3) Puewchote N., Chen I.W., and **Anotai J.**, Effect of Electron Donor on Microbial Dechlorination of 2,3,4-Trichlorobiphenyl, to be presented (oral) at the 9th National Conference on the Environment, March 24-27, 2010.

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา

ตลอดระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา คณะทำงานได้ศึกษาการลดคลอรีนของสารประกอบอินทรีย์คลอรีนเสี่ยงอันตรายสองกลุ่มคือ เฮกซะคลอโรเบนซีนและโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิล โดยในกรณีของเฮกซะคลอโรเบนซีนได้ข้อสรุปที่ชัดเจนแล้ว แต่ในกรณีของโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิลยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจากโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิลย่อยสลายได้ยากและใช้เวลานานมาก ผลการศึกษาและผลงานที่สำคัญสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

5.1 การย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีน

-เฮกซะคลอโรเบนซีนสามารถย่อยสลายทางชีวภาพภายใต้สภาวะไร้อากาศได้เป็นอย่างดีทั้งในน้ำตะกอน ตะกอนเหลว และตะกอนโดยไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารหรือธาตุอาหารเสริม นอกจากนี้ยังตรวจพบการลดคลอรีนขึ้นในตะกอนก้นคลองหัวลำภูที่สภาวะในแหล่งกำเนิด (in situ) ตามธรรมชาติอีกด้วย เฮกซะคลอโรเบนซีนที่ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมแห้งของตะกอนสามารถถูกย่อยสลายจนหมดในตะกอนภายใต้สภาวะจำลองลำน้ำภายในเวลา 9 สัปดาห์ เป็นผลให้เฮกซะคลอโรเบนซีนไม่เป็น “สารมลพิษอินทรีย์คงทน (Persistent Organic Pollutant)” ภายใต้สภาวะแวดล้อมของประเทศไทย

-การย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนเกิดขึ้นตามกลไกหลักเกือบทั้งหมดคือเป็นเพนตะคลอโรเบนซีน 1,2,3,5-เตตระคลอโรเบนซีน และ 1,3,5-ไตรคลอโรเบนซีนตามลำดับ มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ย่อยสลายผ่านกลไกรองคือเป็นเพนตะคลอโรเบนซีน 1,2,4,5-เตตระคลอโรเบนซีน 1,2,4-ไตรคลอโรเบนซีน และ 1,4-ไดคลอโรเบนซีนตามลำดับ

-อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดที่ทำให้จุลชีพในตะกอนจากลำน้ำในประเทศไทยซึ่งมีสภาพภูมิอากาศแบบ Tropical Climate มีความสามารถในการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนสูงกว่าจุลชีพในงานวิจัยอื่นๆที่ดำเนินการในประเทศที่พัฒนาแล้วซึ่งมีภูมิอากาศแบบ Temperate Climate หรือ Continental Climate ผลการศึกษพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนอยู่ในช่วง 30 ถึง 40 °C ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องของประเทศไทย เป็นผลให้จุลชีพกลุ่มที่ย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนได้สามารถเจริญเติบโตได้ดีตามธรรมชาติจนมีจำนวนประชากรมากพออยู่ในตะกอนตามลำน้ำทั่วไป ในขณะที่ประเทศที่พัฒนาแล้วจะมีอุณหภูมิในช่วงฤดูหนาวต่ำมากและเป็นเวลายาวนาน ทำให้จุลชีพกลุ่มดังกล่าวไม่สามารถเจริญเติบโตหรือรักษาความสามารถในการลดคลอรีนไว้ได้

-จุลชีพที่ลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนได้เป็นจุลชีพที่สามารถพบได้ทั่วไปในตะกอนจากแหล่งน้ำในประเทศไทย ผลการศึกษาชี้ว่าจุลชีพกลุ่มดังกล่าวน่าจะเป็นแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนเจนและแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสามารถในการทนต่อการยับยั้งของ vancomycin ได้ดี

-การลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีนทางชีวภาพแบบไร้อากาศเป็นกลไกของเมตาบอลิซึมร่วม (co-metabolism) ซึ่งจลนพลศาสตร์ของการลดเฮกซะคลอโรเบนซีนสามารถอธิบายได้ด้วยสมการของ Michaelis-Menton Kinetics โดยมีค่าคงที่อัตราการผลิตคลอรีนสูงสุดปรากฏ (apparent maximum dechlorination rate constant) และค่าคงที่ครึ่งอิ่มตัว (half-saturation constant) ของเฮกซะคลอโรเบนซีนเท่ากับ 0.45-0.73 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวันและ 3.2-17.2 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

5.2 การย่อยสลายโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิล

-จากโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิล 21 คอนเจนเนอร์ที่ทดสอบมีเพียง 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลคอนเจนเนอร์เดียวที่สามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพแบบไร้อากาศได้ดีในทุกกรณีที่ทดสอบแต่เกิดขึ้นช้ามาก โดยที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำตะกอนต้องใช้เวลาในการย่อยสลายทั้งหมดไม่น้อยกว่า 10 สัปดาห์ขึ้นไป ผลผลิตที่เกิดขึ้นได้คือ 2,4-ไดคลอโรไบฟีนิล ส่วน 3,4,5-ไตรคลอโรเบนซีนย่อยสลายได้เป็นส่วนน้อยเพียงบางชุดทดสอบ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการลดคลอรีนคือ 3,5-ไดคลอโรไบฟีนิล ส่วนคอนเจนเนอร์ที่เหลือมีเพียง 2,4,4'-ไตรคลอโรไบฟีนิล, 2,4,2',5'-, 2,3,2',5'- และ 2,3,4,4'-เตตระคลอโรไบฟีนิลเท่านั้นที่สามารถย่อยสลายได้เป็น 2,4-ไดคลอโรไบฟีนิล, 2,4,2'-, 2,3,2'- และ 2,4,4'-ไตรคลอโรไบฟีนิลตามลำดับ

-ในกรณีที่มีคลอรีน 3 อะตอมเรียงกันในวงไบฟีนิลจะพบว่ากลไกในการลดคลอรีนเกิดขึ้นที่คลอรีนอะตอมที่อยู่กลาง ส่วนในกรณีอื่นๆพบว่าคลอรีนอะตอมในตำแหน่งเมตาจะถูกดึงออกได้ดีกว่าตำแหน่งพารา และไม่พบการลดคลอรีนในตำแหน่งออโธเลย

-การจัดให้โพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิลเป็นสารมลพิษอันตรายถึงคงทนในประเทศไทยมีความเหมาะสมแล้ว ถึงแม้ว่าผลการทดสอบพบว่าบางคอนเจนเนอร์จะสามารถถูกย่อยสลายได้บ้าง แต่คอนเจนเนอร์ส่วนใหญ่ย่อยสลายทางชีวภาพภายใต้สภาวะไร้อากาศได้ช้ามากหรือไม่ได้เลย ดังนั้นเมื่อรูปแบบของสารประกอบโพลีคลอรีเนเตดไบฟีนิลที่ผลิตทางการค้าเป็นของผสมของหลายๆคอนเจนเนอร์เข้าด้วยกัน จึงมีโอกาสตกค้างอยู่ในธรรมชาติได้เป็นเวลานานจนอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตได้

5.3 ผลลัพธ์จากโครงการวิจัย

-ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ 2 เรื่องที่เกี่ยวข้องกับการลดคลอรีนของเฮกซะคลอโรเบนซีน

-ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ 1 เรื่องที่เกี่ยวข้องกับการลดคลอรีนของโพลีคลอริเนเตดไบฟีนิล

5.4 งานวิจัยในอนาคต

เนื่องจากการย่อยสลายทางชีวภาพแบบไร้อากาศของโพลีคลอริเนเตดไบฟีนิลเกิดขึ้นช้ามาก คณะวิจัยยังคงตามผลการลดคลอรีนที่เกิดขึ้นจากการทดสอบภายใต้สภาวะต่างๆ ยิ่งไปกว่านั้นก่อนสิ้นสุดโครงการได้มีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่สารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโพลีคลอริเนเตดไบฟีนิลจะสามารถกระตุ้นให้จุลชีพสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายโพลีคลอริเนเตดไบฟีนิลขึ้น ผลทดสอบในเบื้องต้นพบว่าเป็นที่น่าพอใจและมีความเป็นไปได้สูง นอกจากนี้คณะทำงานยังได้ทำการเพิ่มจำนวนจุลชีพที่สามารถย่อยสลายเฮกซะคลอโรเบนซีนและโพลีคลอริเนเตดไบฟีนิลได้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาเผ่าพันธุ์ (species) จุลชีพที่เกี่ยวข้องในรายละเอียดโดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาที่เรียกว่า “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)” โดยมีนักศึกษาในระดับปริญญาโทและเอกทำการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ธงชัย พรณสวัสดิ์ “การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ” สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย 2544.

Adrian L., Manz W., Szewzyk U. and Gorisch H., “Physiological Characterization of a Bacterial Consortium Reductively Dechlorinating 1,2,3- and 1,2,4-Trichlorobenzene,” *Applied Environmental Microbiology*, 64, 496-503, 1998.

Alder A.C., Haggblom M.M., Oppenheimer S. and Young L.Y., “Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls in an Aerobic Sediments,” *Environmental Science & Technology*, 27, 530-538, 1993.

Anotai J., Voranisarakul W., Wanitchapichat W. and Chen I.M., “Hexachlorobenzene Dechlorination Ability of Microbes from Canal and Estuary Sediments,” *Journal of Korean Wetland Society*, 9, 107-114, 2006.

APHA, “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater,” 18th Ed., American Public Health Association, Washington DC., 1992.

Bailey R.E., “Global Hexachlorobenzene Emissions,” *Chemosphere*, 43, 167-182, 2001.

Beck J. and Hansen K.E., The Degradation of Quintozene, Pentachlorobenzene, Hexachlorobenzene and Pentachloroaniline in Soil,” *Pesticide Science*, 5, 41-48, 1974.

Bedard D.L. and Quensen J.F., III, “Microbial Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls,” In : Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals,” Young L.Y. and Cerniglia C., Eds., John Wiley and Sons, New York, 127-216, 1995.

Bedard D.L., Van Dort H.M., May R.J. and Smullen L.A., “Enrichment of Microorganisms that Sequentially meta, para-Dechlorinate the Residue of Aroclor 1260 in Housatonic River Sediment,” *Environmental Science & Technology*, 31, 3308-3313, 1997.

Bestteti G., Galli E., Leoni B., Pelizzoni F. and Sello G., “Regioselective Hydroxylation of Chlorobenzenes and Chlorophenols by *Pseudomonas putida*,” *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 260-263, 1992.

Beurskens J.E.M., Dekker C.G.C., van den Heuvel H., Swart M. and der Wolf Dolfing J., “Dechlorination of Chlorinated Benzenes by an Anaerobic Microbial Consortium that Selectively Mediates the Thermodynamic Most Favorable Reactions,” *Environmental Science and Technology*, 28, 701-706, 1994.

Boonyatumanond R., Takada H. and Toko A., "The Concentration of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in Surface Sediment from Canal, River, and Coastal Area in Thailand," Asian Pacific International Conference on Pollutants Analysis and Control, 2003.

Boonyatumanond R., Thongklieng S., Takada H. and Wattayakorn G., "Study on Contamination of Polychlorinated Biphenyl and Linear Alkylbenzene in Sediment Cores from the Upper Gulf of Thailand," Proceedings of the 5th National Environmental Conference, March 10-13, Bangkok, Thailand, 2006.

Brahushi F., Dorfler, U., Schroll R. and Munch J.C., "Stimulation of Reductive Dechlorination of Hexachlorobenzene in Soil by Inducing the Native Microbial Activity," *Chemosphere*, 55, 1477-1484, 2004.

Brigden K., Labunska I. And Stringer R., "Bangpoo Industrial Estate, Samut Prakarn, Thailand: An Investigation of Environmental Pollutants," Greenpeace Research Laboratories, Department of Biological Sciences, University of Exeter, Exeter, UK, Technical Note: 03/2003, October 2003.

Brown J., Bedard D.L., Brennan M.J., Carnahan J.C., Feng H. and Wagner R.E., "Polychlorinated Biphenyls Dechlorination in Aquatic Sediments," *Science*, 236, 709-712, 1987.

Chang K.S., M.S. Thesis, University of Georgia, Athens, GA, USA, 1995.

Chang B.V., Chen Y.M., Yuan S.Y. and Wang Y.S., "Reductive Dechlorination of Hexachlorobenzene by an Anaerobic Mixed Culture," *Water, Air, and Soil Pollution*, 100, 25-32, 1997.

Chen I.M., "Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls by Indigenous Anaerobic Microorganisms in Taiwan," Ph.D. Thesis, National Taiwan University, Taiwan, 2004.

Chen I.M., Chang B.V., Yuan S.Y. and Wang Y.S., "Reductive Dechlorination of Hexachlorobenzene under Various Additions," *Water, Air, and Soil Pollution*, 139, 61-74, 2002.

Chen I.M., Chang F.C., Chang B.V. and Wang Y.S., "Specificity of Microbial Activities in the Reductive Dechlorination of Chlorinated Benzenes," *Water Environment Research*, 72(6), 675-679, 2000.

Chen I.M., Chang Y.F. and Lin H., "Microbial Dechlorination of Hexachlorobenzene by Untamed Sediment Microorganisms in Taiwan," *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 8(2), 1-6, 2004.

Droste R.L., "Theory and Practice of Water and Wastewater Treatment," John-Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.

Fennell D.E., Nijenhuis I., Wilson S.F., Zinder S.H. and Haggblom M.M., "Dehalococcoides ethenogenes Strain 195 Reductively Dechlorinates Diverse Chlorinated Aromatic Pollutants," *Environmental Science & Technology*, 38, 2075-2081, 2004.

Fish M.K. and Principe J.M., "Biotransformations of Aroclor 1242 in Hudson River Test Tube Microcosms," *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4289-4296, 1994.

Griffin R.A. and Chou S.F.J., "Movement of PCBs and Other Persistent Organic Compounds through Soil," *Water Science and Technology*, 13, 1153-1163, 1981.

Haigler, B.E., Pettigrew C.A. and Spain J.C., "Biodegradation of Mixtures of Substituted Benzenes by *Pseudomonas* sp. Strain JS150," *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 348-353, 1992.

Hartkamp-Commandeur L.C.M., Gerritse J., Govers H.A.J. and Parsons J.R., "Reductive Dehalogenation of Polychlorinated Biphenyls by Anaerobic Microorganisms Enriched from Dutch Sediments," *Chemosphere*, 32(7), 1275-1286, 1996.

Howard P.H., "Large Production and Priority Pollutants: Hexachlorobenzene," in *Handbook of Environmental Fate and Exposure for Organic Chemicals*, Vol. 1, 351-359, 1991.

Isensee A.R., Holden E.R., Woolson E.A. and Jones G.E., "Soil Persistence and Aquatic Bioaccumulation Potential of Hexachlorobenzene (HCB)," *Agricultural and Food Chemistry*, 24, 1210-1214, 1976.

Kuipers B., Cullen W.R. and Mohn W.W., "Reductive Dechlorination of Nonachlorobiphenyls and selected octachlorobiphenyls by Microbial Enrichment Cultures," *Environmental Science & Technology*, 33, 3577-3583, 1999.

Mackay D., Shiu W.Y. and Ma K.C., "Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals, Lewis Publisher, Florida, 1992.

Mavougou R., Masse T. and Sylvestre M., "Microbial Dehalogenation of 4,4'-dechlorobiphenyl under Anaerobic Conditions," *Science of The Total Environment*, 101-263-268, 1991.

Middledorp P.J.M., John D.W., Alexander J.B.Z. and Schraa G., "Enrichment and Properties of a 1,2,4-Trichlorobenzene Dechlorinating Methanogenic Microbial Consortium," *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1225-1229, 1997.

May H.D., Boyle A.W., Price II W.A. and Balke C.K., "Subculturing of a Polychlorinated Biphenyl-dechlorinating Anaerobic Enrichment on Solid Media," *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 4051-4054, 1992.

Morris P.J., Mohn W.W., Quensen III J.F., Tiedje J.M. and Boyd, S.A., "Establishment of a Polychlorinated Biphenyl-degrading Enrichment Culture with Predominantly *meta* Dechlorination," *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3088-3094, 1992.

Natarajan M.R., Wu W.M., Nye L., Wang H., Bhatnagar L. and Jain M.K., "Dechlorination of Polychlorinated Biphenyl Congeners by an Anaerobic Microbial Consortium," *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 673-677, 1996.

Nies L. and Vogel T.M., "Effects of Organic Substrates on Dechlorination of Aroclor 1242 in anaerobic Sediments," *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2612-2617, 1990.

Nowak J., Kirseh N.H., Hegemana W. and Stan H.J., "Total Reductive Dechlorination of Chlorobenzene to Benzene by a Methanogenic Mixed Culture Enriched from Saale River Sediment," *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 700-709, 1996.

Pavlostathis S.G. and Prytula M.T., "Kinetics of the Sequential Microbial Reductive Dechlorination of Hexachlorobenzene," *Environmental Science and Technology*, 34(18), 4001-4008, 2000.

Prytula M.T. and Pavlostathis S.G., "Effect of Contaminant and Organic Matter Bioavailability on the Microbial Dehalogenation of Sediment-bound Chlorobenzene," *Water Research*, 30(11), 2669-2680, 1996.

Quensen J.F. III, Boyd S.A. and Tiedje J.M., "Dechlorination of Four Commercial Polychlorinated Biphenyl Mixtures (Aroclors) by Anaerobic Microorganisms from Sediments," *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2360-2369, 1990.

Rhee G.Y., Sokol R.C., Bethoney C.M. and Bush B., "Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls by Hudson River Sediment Organisms: Specificity to the Chlorination Pattern of Congeners," *Environmental Science & Technology*, 27, 1190-1192, 1993.

Rhee G.Y., Bush B., Bethoney C.M., DeNucci A., Oh H.M. and Sokol R.C., "Anaerobic Dechlorination of Aroclor 1242 as Effected by Some Environmental Conditions," *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 1033-1039, 1993.

Rice C.P. and O'Keefe P., "Source, Pathways, and Effect of PCBs, Dioxins and Dibenzofurans," In Hoffman D.J., Rattner B., Burton C.A. and Cairn J. (Eds), *Handbook of Ecotoxicology*, CRC Press Inc., USA.

Robert E.B., "Global Hexachlorobenzene Emission," *Chemosphere*, 43(2), 167-182, 2001.

Rosenbrock P., Martens R., Buscot F., Munch J.C., "Initiation of [³⁶Cl] Hexachlorobenzene Dechlorination in Three Different Soils under Artificially Induced Anaerobic Conditions," *Applied Microbiology Biotechnology*, 48, 115-120, 1997.

Van Dort, H.M. and Bedard, D.L., "Reductive ortho and meta Dechlorination of a Polychlorinated Biphenyl Congener by Anaerobic Microorganisms," *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1576-1578, 1991.

Van Dort, H.M., Smullen L.A., May R.I. and Bedard D.L., "Priming Microbial meta-Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls That Have Persisted in Housatonic River Sediment for Decades," *Environmental Science & Technology*, 31, 3300-3307, 1997.

Wiegel J. and Wu Q., "Microbial Reductive Dehalogenation of Polychlorinated Biphenyls," *FEMS Microbiology Ecology*, 32,1-15, 2000.

Williams W.A., "Microbial Reductive Dechlorination of Trichlorobiphenyls in Anaerobic Sediment Slurries," *Environmental Science & Technology*, 28, 630-635, 1994.

Williams, W.A., "Stimulation and Enrichment of Two Microbial Polychlorinated Biphenyl Reductive Dechlorination Activities," *Chemosphere*, 34, 665-669, 1997.

Wu Q. and Wiegel J., "Two Anaerobic Polychlorinated Biphenyl-dehalogenating Enrichments that Exhibit Different para-Dechlorination Specificities," *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4826-4832, 1997.

Wu Q., Bedard D.L. and Wiegel J., "Influence of Incubation Temperature on the Microbial Reductive Dechlorination of 2,3,4,6-Tetrachlorobiphenyl in Two Freshwater Sediments," *Applied and Environmenetal Microbiology*, 62, 4174-4179, 1996.

Wu Q., Bedard D.L. and Wiegel J., "Effect of Incubation Temperature on the Route of Microbial Reductive Dechlorination of 2,3,4,6-Tetrachlorobiphenyl in Polychlorinated biphenyl (PCB)-Contaminated and PCB-Free Freshwater Sediments," *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2836-2843, 1997a.

Wu Q., Bedard D.L. and Wiegel J., "Temperature Determines the Pattern of Anaerobic Microbial Dechlorination of Aroclor 1260 Primed by 2,3,4,6-Tetrachlorobiphenyl in Woods Pond Sediment," *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4818-4825, 1997b.

Wu Q., Milliken C.E., Meier G.P., Watts I.E.M., Sowers K.R. and May H.D., "Dechlorination of Chlorobenzenes by a Culture Containing Bacterium DF-1, a PCB Dechlorinating Microorganism," *Environmental Science & Technology*, 36, 3290-3294, 2002.

Ye D., Quensen III J.F., Tiedje J.M. and Boyd S.A., "Anaerobic Dechlorination of Polychlorobiphenyls (Aroclor 1242) by Pasteurized and Ethanol-treated Microorganisms from Sediment," *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1110-1114, 1992.

Yuan S.Y., Su C.J. and Chang B.V., "Microbial Dechlorination of Hexachlorobenzene in Anaerobic Sewage Sludge," *Chemosphere*, 38(5), 1015-1023, 1999.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ภาพสถานที่และการเก็บตัวอย่างตะกอนและน้ำ

ก.1 คลองหัวลำภูซึ่งรับน้ำทั้งจากนิคมอุตสาหกรรมบางปู ถนนสุขุมวิท สมุทรปราการ



รูปที่ ก.1.1 บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site A1ริมถนนสุขุมวิทจะเห็นได้ถึงความแตกต่างของน้ำในคลองซึ่งขึ้นอยู่กับการระบายน้ำทั้งของนิคมอุตสาหกรรมบางปู



รูปที่ ก.1.2 บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site A2 จะเห็นได้ถึงความแตกต่างของน้ำในคลองซึ่งขึ้นอยู่กับ
การระบายน้ำทั้งของนิคมอุตสาหกรรมบางปู



รูปที่ ก.1.3 บริเวณจุดเก็บตัวอย่างและการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนของ Site A3



รูปที่ ก.1.4 บริเวณจุดเก็บตัวอย่างและการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนของ Site A4 รวมถึงการ
ปาดชั้นหน้าตะกอนทิ้งก่อนเก็บตัวอย่าง



รูปที่ ก.1.5 การเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนของ Site A5



รูปที่ ก.1.6 การเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนของ Site A6



รูปที่ ก.1.7 การเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนของ Site A7



รูปที่ ก.1.8 การเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนของ Site A8



รูปที่ ก.1.9 การเก็บตัวอย่างตะกอนและปลาตีนที่พบที่ Site A9



รูปที่ ก.1.10 สภาพพื้นที่ของจุดเก็บตัวอย่าง Site A10 ในช่วงน้ำลงและน้ำขึ้น

ก.2 คูระบายน้ำข้างถนนบางเมฆขาว สมุทรปราการ



รูปที่ ก.2.1 สภาพโดยทั่วไปของคูน้ำ



รูปที่ ก.2.2 บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site B1



รูปที่ ก.2.3 บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site B2



รูปที่ ก.2.4 บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site B3



รูปที่ ก.2.5 บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site B4

ก.3 คลองใกล้โรงไฟฟ้าพระนครใต้



รูปที่ ก.3.1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างในคลองใกล้โรงไฟฟ้าพระนครใต้ (Site C1) ในช่วงที่มีการสร้างสะพาน



รูปที่ ก.3.2 บริเวณที่เก็บตัวอย่างในคลองใกล้โรงไฟฟ้าพระนครใต้ (Site C2) ในช่วงที่สร้างสะพานแล้วเสร็จ

ก.4 คลองรับน้ำทั้งจากนิคมอุตสาหกรรมบางพลี



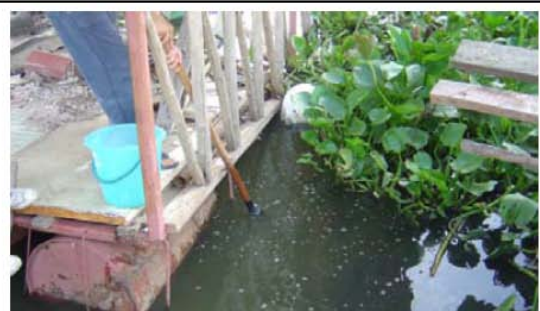
รูปที่ ก.4.1 จุดระบายน้ำทั้งของนิคมอุตสาหกรรมบางพลีลงสู่คลอง



รูปที่ ก.4.2 สภาพทั่วไปของคลองและจุดเก็บตัวอย่าง Site D1



รูปที่ ก.4.3 สภาพทั่วไปของคลองบริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site D2



รูปที่ ก.4.4 บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site D3



รูปที่ ก.4.5 สภาพโดยทั่วไปของคลองบริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site D4



รูปที่ ก.4.6 ลักษณะตะกอนที่เก็บตัวอย่าง

ก.5 คลองข้างถนนตำรุ-บางพลี สมุทรปราการ



รูปที่ ก.5.1 สภาพโดยทั่วไปของคูน้ำในบริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site E1



รูปที่ ก.5.2 สภาพโดยทั่วไปของคลองข้างถนนตำหุ-บางพลีบริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site E2

ก.6 คลองบางฝ้ายซึ่งรับน้ำทั้งจากนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง



รูปที่ ก.6.1 สภาพโดยทั่วไปของคลองบางฝ้ายบริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site F1



รูปที่ ก.6.2 การวัดออกซิเจนละลายในน้ำ

ก.7 คลองแพรक्षा สมุทรปราการ



รูปที่ ก.7.1 สภาพโดยทั่วไปของคลองแพรक्षाบริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site G1

ก.8 คูน้ำข้างบริษัท ไทยเซ็นทรัลเคมีคัล จำกัด (มหาชน) ถนนสุขสวัสดิ์ สมุทรปราการ



รูปที่ ก.8.1 สภาพของคูน้ำ



รูปที่ ก.8.2 บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site H1



รูปที่ ก.8.3 บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site H2



รูปที่ ก.8.4 ลักษณะตะกอนตัวอย่าง

ก.9 คูน้ำข้างถนนสุขสวัสดิ์ สมุทรปราการ



รูปที่ ก.9.1 สภาพของคูน้ำและบริเวณที่เก็บตัวอย่าง Site I1

ก.10 คลองบางปลากด ถนนสุขสวัสดิ์ สมุทรปราการ



รูปที่ ก.10.1 สภาพทั่วไปของคลองบางปลากด



รูปที่ ก.10.2 สภาพพื้นที่บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site J1



รูปที่ ก.10.3 สภาพพื้นที่บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง Site J2



รูปที่ ก.10.4 ฟองก๊าซจากการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้อากาศที่ผุดขึ้นในระหว่างเก็บตะกอน



รูปที่ ก.10.5 ลักษณะของตะกอนตัวอย่าง

ภาคผนวก ข
ผลงานตีพิมพ์

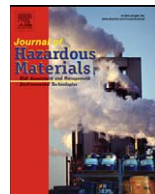
Journal of Hazardous Materials
(in press)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhazmat



Hexachlorobenzene dechlorination by indigenous sediment microorganisms

I-Ming Chen^a, Wanit Wanitchapichat^b, Teeranuch Jirakittayakorn^b, Sukanda Sanohniti^b,
Wichidtra Sudjarid^b, Chalermraj Wantawin^b, Jarurat Voranisarakul^b, Jin Anotai^{b,*}

^a Department of Environmental Resources and Management, Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan 71710, Taiwan, ROC

^b National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management, Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Pracha-u-tid Road, Bangmod, Thungkru, Bangkok 10140, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2009
Received in revised form 2 December 2009
Accepted 4 December 2009
Available online xxx

Keywords:

Bioremediation
Chlorobenzene
Dechlorination
Methanogen
Sulfate-reducing bacteria

ABSTRACT

Indigenous microbes from the sediments, whether contaminated with hexachlorobenzene (HCB) or not, could dechlorinate HCB effectively without any acclimation and supplemental nourishment. Temperature seriously affected the HCB-dechlorination: within the measured 15–45 °C span, the optimum range was between 30 and 35 °C. Sulfate-reducing bacteria (SRB), denitrifiers, and acetogens might not be directly involved in the HCB dechlorination. However, the SRB retarded subsequent dechlorination of pentachlorobenzene to tetra- and trichlorobenzenes. Some vancomycin-resistant gram-positive bacteria and methanogens were most likely to be the HCB-dechlorinators. The dechlorination followed the Michaelis–Menten behavior with the k_m and K_{HCB} between 0.45–0.73 mg L⁻¹ day⁻¹ and 3.2–17.2 mg L⁻¹, respectively. These findings suggest a potential HCB treatment and cleanup for wastewater and contaminated site.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hexachlorobenzene (HCB) was produced and used globally as a fungicide and an industrial synthetic material before production was banned several decades ago. Because of its bioaccumulation and persistence properties, as well as its toxicity, HCB was classified as one of the 12 persistent organic pollutants (POPs) by the United Nations Stockholm Convention. HCB has been found to contaminate in many places worldwide including Thailand as a result of uncontrolled release. HCB was sporadically detected in the sediment of the Hua Lum Poo Canal in Samuth Prakarn Province, Thailand, which receives treated effluent from nearby industrial estate and factories, even though the direct use of HCB in Thailand has been prohibited since 1980 [1,2]. This finding is comprehensible since HCB is also unintentionally generated as a byproduct from the manufacture of the chlorinated pesticides such as atrazine and simazin [3,4]. Of more concern is that this canal eventually empties into the Gulf of Thailand, posing a threat of HCB contamination and bioaccumulation in the coastal bivalves that are consumed by local people.

Environmental degradation of HCB under anaerobic conditions in soil and sediment is possible but considerably slow. Beurskens et al. [5] found an 80% loss of HCB with an increase in the by-products of 1,3,5-trichlorobenzene (1,3,5-TCB) and 1,3-dichlorobenzene

(1,3-DCB) during a 20-year period of in situ degradation in Lake Ketelmeer, a sedimentation area of the Rhine River. The half lives of HCB in soil and groundwater were reported to be 3–6 and 5.3–11.4 years, respectively [6]. Prytula and Pavlostathis [7] evaluated the HCB-dechlorination ability of the sediment slurry collected from an HCB-contaminated tributary without any acclimation or enrichment and found that only 43% of HCB was dechlorinated in 481 days at 23 °C in the dark. Rosenbrock et al. [8] could obtain only 40% chloride release in the rich-organic soil slurry spiked with HCB in 140 days, whereas no dechlorination activity was observed in the low-organic soil slurry. Chen et al. [9] worked with four non-HCB contaminated sediment slurries and found only two slurries could initiate HCB-dechlorination with a lag phase of 90 days. These data, however, show different results from our previous study in which 17 mg kg⁻¹ dry solids of HCB could be rapidly and completely degraded within 60 days by the indigenous microbial consortium in the sediment slurries collected along the Hua Lum Poo Canal and its mouth without any supplementation of organics or nutrients [1]. The degradation followed the major pathway proposed by Fathepure et al. [10], i.e., HCB → pentachlorobenzene (QCB) → 1,2,3,5-tetrachlorobenzene (TeCB) → 1,3,5-TCB. This finding corresponded very well with the field data in which 1,3,5-TCB was found together with HCB in the upstream sediments of this canal [1].

The objective of this work was to investigate into more details on the factor causing the microbes in the sediment of the Hua Lum Poo Canal to be more powerful in HCB-dechlorination than others. Microbial groups involving in the HCB-dechlorination and

* Corresponding author. Tel.: +66 2 470 9166; fax: +66 2 470 9165.
E-mail address: jin.ano@kmutt.ac.th (J. Anotai).

the dechlorination kinetics were also determined. The information reported here provides a better understanding regarding the reductive dechlorination of HCB, which can lead to a promising treatment or cleanup technique in the future.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Chlorinated benzene congeners (CBs) including monochlorobenzene (MCB), 1,2-, 1,3-, and 1,4-DCBs, 1,2,3-, 1,2,4-, and 1,3,5-TCBs, 1,2,3,4-, 1,2,3,5-, and 1,2,4,5-TeCBs, QCB, and HCB were purchased from Seelze, Germany. The microbial inhibitors including bromoethanesulfonic acid (BES) and vancomycin (VAN) were obtained from Sigma Chemical Co., USA. The 99.5% acetone and n-hexane (Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand) were used for preparing an HCB solution and CBs standards/extraction liquid, respectively. All other chemicals were analytical grade and supplied by Merck KGaA, Germany.

2.2. Sediment and canal water sampling

Sediment and canal water samples from two sites (H1 and H2) along the Hua-Lam-Poo Canal that possessed the highest HCB-dechlorination activity according to Anotai et al. [1] were used in this study. The top few centimeters of the sediment surface were carefully removed, and the lower layer was scraped and packed in a plastic bag. Canal waters were sampled and stored in the containers. Both sediment and water samples were stored in the 4 °C cold storage until use.

2.3. Microbial preparation

Sediment slurry of each site was prepared by thoroughly mixing the sediment and canal water at the ratio of 1:1 (v/v) by hand for 2 min and was allowed to settle for 30 min. The upper supernatant was withdrawn by a 100-mL glass syringe with a 22G × 2 hypodermic needle (0.7 mm opening), injected into a 1000-mL serum bottle, and purged with nitrogen gas before use. For dechlorination experiments, 50 mL of sediment slurry were transferred to several 100-mL serum bottles in a nitrogen glove box to prevent oxygen interference and sealed with butyl rubber stoppers and alumina-caps. One bottle from each experiment set was sterilized three times in an autoclave and used as the control.

2.4. Dechlorination experiments

To initiate the experiment, an appropriate amount of stock HCB solution, along with a specific amount of the individual chemical to be studied, was injected into the serum bottles. All serum bottles were kept in the dark at room temperature (28–31 °C with an average of 30 °C). To study temperature effects, refrigerators (at 15 and 20 °C), air-incubators (at 35 and 40 °C), and water baths at 45 °C were used to control the temperature. All bottles were shaken by hand on a daily basis. The experiments were conducted in duplicate with a sterilized control.

2.5. Sampling and analysis

To determine HCB and its dechlorination by-products, HCB from the sediment slurry was extracted according to the method described by Chen et al. [11] which provided the recovery between 89 and 98% for all 12 chlorobenzenes. An extraction test has been performed with 1-h HCB spiked sediment slurry in order to confirm the reliability of this method. The HCB recovery was between 88 and 95%. In addition, another test was also conducted

using non-biodegradable and highly hydrophobic 2,3,4,2',4',5'- and 2,3,6,2',4',5'-chlorobiphenyls to verify the consistency of this extraction method over an adsorption period of 18 weeks. The recover was between 88 and 112% for 2,3,4,2',4',5'-chlorobiphenyl and 91 and 110% for 2,3,6,2',4',5'-chlorobiphenyl with no less-chlorinated intermediate detected. Hence, this extraction method is proven to be reliable. At a predetermined time, 2 mL of the sediment slurry was taken by a glass syringe with a 22G × 2 hypodermic needle (using the same needle size used to withdraw the sediment slurry from the sediment-water mixture in order to ensure a homogeneous sample) and injected into an extraction tube containing 0.2 mL of 6N NaOH and 2 mL of n-hexane. The tube was then shaken by hand 100 times, followed by 10 min of sonication, and then centrifuged at 4000 rpm for 5 min. The upper-layer of n-hexane was withdrawn as much as possible into a 5-mL analyzing tube. The remaining mixture in the extraction tube was then re-extracted twice more following the same procedure. At the third extraction, the upper-layer of n-hexane was pulled out and filled the analyzing tube up to the 5-mL mark. A small amount of anhydrous Na₂SO₄ was added to remove moisture before being analyzed by gas chromatography. The 6890N Network GC system (Agilent Technologies, USA) was equipped with an electron capture detector (ECD) and a capillary column DB-5 fused silica with 0.25 mm diameter and 30 m length (Agilent Technologies, USA). The oven temperature was initially maintained at 80 °C for 5 min, raised to 140 °C at the rate of 3 °C min⁻¹ and sequentially to 240 °C at the rate of 10 °C min⁻¹, and hold for 8 min. The temperature for the injector and detector were set at 240 and 280 °C, respectively. The carrier and make up gases were helium and nitrogen at the average linear flow rates of 20 and 60 mL min⁻¹, respectively. All qualifications and quantifications were performed with an external standard. Methane in the headspace gas was determined by the Gas Chromatograph GC-8A (Shimadzu Corporation, Japan). Sediment slurry characteristics were analyzed according to Standard Methods [12].

3. Results and discussion

3.1. Background contamination and sediment slurry characteristics

Trace amounts of HCB were found in the sediments of both sites at 0.26 and 0.15 mg kg⁻¹ dry solids for H1 and H2, respectively. In addition, 0.16 mg kg⁻¹ dry solids of 1,3,5-TCB, which has never been produced or used in a commercial scale, was also found in the sediment from H1. This implies that the microbes at both sites should be acclimated to HCB to some degree and be able to dechlorinate HCB in situ. The characteristics of raw sediment slurries were shown in Table 1 illustrating that most organics were in the solid phase. Volatile organics, part of which representing the microbial mass, were only accounted for at 9% and 13% at H1 and H2, respectively. Nitrogen and phosphorus in the sediment slurries were sufficient for anaerobic digestion according to the acceptable COD:N:P ratio of 250:5:1–700:5:1 [13]. Chloride was quite high due to the intrusion of seawater at the sampling time. The pH of the mixtures was in the neutral range appropriate for microbial activities. Pre-tests with nutrient and organic supplements of either yeast extract, glucose, pyruvate, lactate, acetate, formate, or essential minerals revealed no significant improvement in the dechlorination process. Hence, the existing composition of sediment slurries was already suitable for the reductive dechlorination of HCB.

3.2. Reductive dechlorination of HCB

Sediment slurries from both H1 and H2 could dechlorinate 2 mg L⁻¹ HCB completely in 70 days at the average room temper-

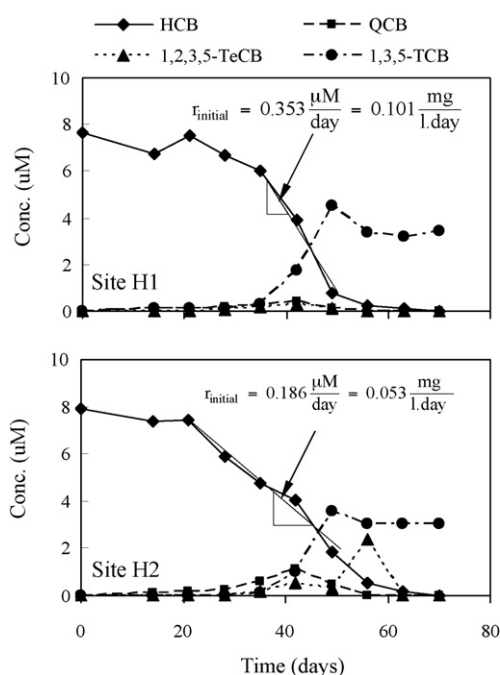
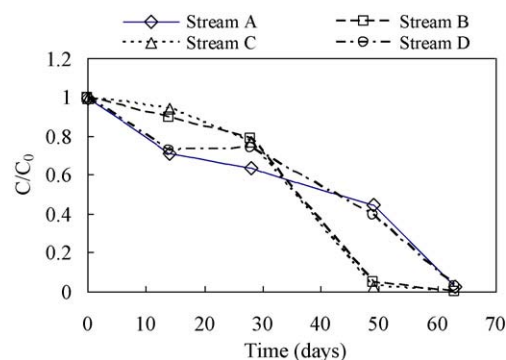
Table 1
Characteristics of raw sediment slurries.

Site	pH	Cl ⁻ soluble (mg L ⁻¹)	SS (mg L ⁻¹)	VSS (mg L ⁻¹)	COD (mg L ⁻¹)		Nitrogen (mg L ⁻¹)		Phosphorus (mg L ⁻¹)	
					Soluble	Total	Soluble	Total	Soluble	Total
H1	7.0	8938	228,300	19,600	584	42,985	13	896	2	66
H2	7.2	4080	158,500	21,200	215	50,149	12	1,036	1	77

ature of 30 °C as shown in Fig. 1. In contrast, no dechlorination occurred in the sterilized control bottles, i.e., steady HCB concentration and no intermediates detected, implying that the reduction of HCB in the experimental sets should derive from microbial activities. This performance was more impressive than other studies working with the sediment slurries from both HCB-contaminated and non-contaminated sites [7–9]. The degradation pathway followed the major pathway from HCB to QCB, 1,2,3,5-TeCB and 1,3,5-TCB as suggested by Fathepure et al. [10]. No 1,2,4-TCB and DCBs which are the products from the minor dechlorination pathway were detected. Certain loss of chlorobenzenes from the aqueous phase was also detected which mainly due to the transfer of volatile 1,3,5-TCB to the headspace of serum bottle similar to the observation of other studies [6,9,11,14]. The dechlorination performance obtained in this study was consistent with our preliminary work [1] implying that the microbes in the sediments of this canal could efficiently maintain their dechlorination ability.

3.3. Effect of temperature on HCB-dechlorination

It is interesting to determine the key factor enhancing the HCB-dechlorination ability of the microbes in this canal. One possible factor causing the differences in HCB-dechlorination between this study and others was the temperature. Most of Thailand has a tropical climate in which the coldest month temperature is higher than 18 °C. According to Thai Meteorological Department, the 30-year monthly averages for night-time and day-time in Samuth Prakarn Province are 26.3 and 30.3 °C, respectively (day-time temperatures during the experimental period of this study were between 28 and 31 °C with an average of 30 °C). On the other hand, most devel-

**Fig. 1.** Profiles of HCB and its intermediates with an initial HCB concentration of 2 mg L⁻¹.**Fig. 2.** HCB-dechlorination in non-contaminated sediment.

oped countries in which the HCB-dechlorination has been studied are in the temperate-climate (the coldest month average between –3 and 18 °C) or continental-climate (the coldest month average below –3 °C) zones according to the Köppen–Geiger climate classification system. As a result, the native microbial consortium in the sediment of the Hua Lum Poo Canal as well as other streams in Thailand should be diverse from those of developed countries and might possibly lead to an explanation for the differences in HCB-dechlorination. To test whether the temperature was one of the major factors controlling the HCB-dechlorination activity, the sediment slurries without any supplements were spiked with 2 mg L⁻¹ of HCB and incubated at various temperatures from 15 to 45 °C. The outcomes showed that the optimum temperatures were between 30 and 40 °C for H1 and 30 and 35 °C for H2 (Table 2). The dechlorination performance drastically deteriorated as the temperature became lower or higher. The lag phase and complete dechlorination period extended approximately two times or more as the temperatures rose above or dropped below the optimum range. This finding serves as solid evidence that temperature plays a major role in classifying and characterizing microbial consortium and activity regarding on HCB-dechlorination in natural stream sediment. Further investigation was conducted to verify the effect of temperature by using the sediments collected from four other streams which were not contaminated with HCB. The results shown in Fig. 2 indicate that the indigenous microbial consortiums in these stream

Table 2
HCB-dechlorination under various temperatures.

Site	Temperature (°C)	Lag phase (days)	Complete dechlorination (days)
H1	15	35 (42)	>154 (>154)
	20	28 (35)	126 (126)
	30	14 (7)	70 (70)
	35	7 (7)	63 (63)
	40	7 (7)	63 (70)
	45	14 (35)	>154 (>154)
H2	15	70 (35)	>154 (>154)
	20	49 (49)	161 (161)
	30	14 (14)	70 (70)
	35	7 (14)	70 (70)
	40	14 (14)	>154 (>154)
	45	42 (35)	>154 (>154)

Note: Numbers in the parenthesis are duplication.

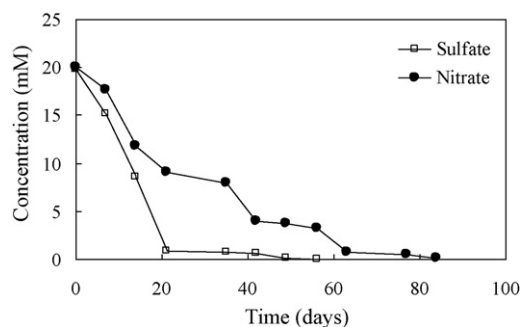


Fig. 3. Consumption profile of added electron acceptors.

sediments could readily dechlorinate 2 mg L^{-1} HCB with no acclimation or supplemental nourishment at room temperature similar to those from H1 and H2. These results suggest that temperature plays an important role on the dechlorination of HCB which is similar to the study of Chang et al. [6] who found the optimum temperatures for HCB-dechlorination to be between 29 and 37°C and the dechlorination ability ceased at 18 and 45°C .

From these results, it implies that HCB in the tropical-climate environment with moderate ambient temperatures might not be as persistent as in the temperate-climate and continental-climate regions due to the differences in native microbial matrix and activities. Biologically anaerobic processes, which typically have a long sludge detention time, such as an anaerobic filter or upflow anaerobic sludge blanket followed by an aerobic process might be a feasible alternative to purify HCB-contaminated wastewater. Remediation of HCB-contaminated sites is also promisingly possible if suitable conditions are provided. The identified end product was 1,3,5-TCB for all studied temperatures, neither 1,2,4-TCB nor DCBs was detected. Hence, the dechlorination mechanism still followed the major pathway. Nevertheless, substantial dissimilarity in the complete dechlorination period at 40°C between the sediments from H1 and H2 suggested that the microbial consortium existing in these two sites were different, which was in agreement with the results from the kinetic studies in later section.

3.4. Characterization of dechlorinating microorganisms

This section attempted to determine the principal microbes responsible for HCB-dechlorination. Only the sediment slurry from H2 was used for characterization purpose. The first experimental scenario in this section aimed to determine the involvement of sulfate-reducing bacteria (SRB) and denitrifiers (DN) in the dechlorination of HCB to its less-chlorinated products. Sediment slurry with 2 mg L^{-1} of HCB was added with 20 mM of either NaNO_3 or Na_2SO_4 to stimulate the activities of DN or SRB, respectively. Nitrate reduction during the incubation period was slower than sulfate, as shown in Fig. 3, which implied that the SRB in this sediment were more active than the DN. This is plausible since the collected bottom sediment was under anaerobic conditions for a very long period of time. An anoxic state, which uses nitrite or nitrate as an electron acceptor, is unlikely to occur intensively in this rich organic sediment deposited a few centimeters below the sediment–water interface. No significant difference in HCB-dechlorination between these two supplement and control sets was observed, i.e., QCB appeared at the same time on day 14 (Table 3) with comparable apparent concentration between 0.018 and 0.019 mg L^{-1} . During this initial period, the SRB and DN were very active, interpreting from the zero-order disappearance rates of sulfate and nitrate (Fig. 3). This result suggested that neither SRB nor DN directly engaged in or seriously interfered with the HCB-dechlorination since the addition of sulfate or nitrate to promote their activities neither

Table 3

Effects of electron donors on HCB-dechlorination of the sediment slurry from Site H2.

Electron acceptor	Appearance time (days)		
	QCB	1,2,3,5-TeCB	1,3,5-TCB
No addition	14	42	56
20 mM of NaNO_3	14	56	56
20 mM of Na_2SO_4	14	70	98

enhanced nor retarded the transformation of HCB to QCB. Working with HCB-adapting sediment, Chen et al. [14] also found that 30 mM sulfate did not interfere with HCB-dechlorination; however, they suggested that under limiting electron donors SRB might compete with HCB-dechlorinators for substrate, thus hampering the HCB-dechlorination. The impact of nitrate seemed to be unclear on QCB transformation to 1,2,3,5-TeCB and 1,3,5-TCB. The appearance time for 1,2,3,5-TeCB in the presence of nitrate was 14 days longer than the control without nitrate, but was the same for 1,3,5-TCB. It is important to note that the sample on day 56 was the first sampling after day 42; hence, they could not be definitely differentiated. The presence of sulfate, however, significantly prolonged the transformation of QCB to 1,2,3,5-TeCB and subsequently to 1,3,5-TCB. The occurrence times for 1,2,3,5-TeCB and 1,3,5-TCB shifted from 42 to 70 days and from 56 to 98 days, respectively. This implies that the activity of SRB noticeably interfered with QCB- and 1,2,3,5-TeCB dechlorinators. As a result, it indicates that the population responsible for chlorobenzene dechlorination differed at least in some species from the QCB- and 1,2,3,5-dechlorinators. This result is in agreement with the study of Chen et al. [11].

To evaluate the role of methanogens on HCB-dechlorination, the selective methanogenic inhibitor, bromoethanesulfonic acid (BES) [6], was inoculated into the serum bottle at various concentrations. It was found that only 5 mM of BES could notably suppress the methanogenic activity. Accumulated methane in the headspace of the serum bottle on day 78 in the control set without BES was 38% which was much higher than those in the BES amended set of less than 1%. Nevertheless, more than 90% of the HCB was still dechlorinated, though at a lower rate, as shown in Fig. 4. This suggests two possibilities: first, the dechlorinating step was directly executed by methanogenic bacteria only, but maybe a variety of different species of methanogens can play this role. Therefore, whenever one or some methanogenic bacteria regained their activity and began to produce methane even slightly, these methanogens could be able to trigger the dechlorination of HCB. Second, while the methanogens played a major role in HCB-dechlorination (reduction rate was steeper in the control set), other microorganisms in the sediment slurry might also be involved. As the BES was increased to 10 and 50 mM , HCB was still dechlorinated. Only when 250 mM was applied did the dechlorination stop completely. Middeldorp

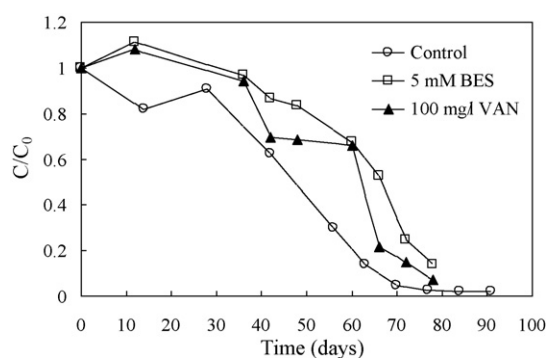


Fig. 4. Dechlorination profile for HCB with and without inhibitors.

et al. [15] found that BES at high concentration also affected the microbial species other than methanogens, possibly suppressing the non-methanogenic HCB-dechlorinators in the sediment slurry. The results from this study filled the gap between two totally different observations from other research groups. Pavlostathis and Prytula [16] reported that methane production was inhibited in a BES-amended culture, but sequential reductive dechlorination of HCB still occurred at a comparable rate as in the non-amended culture, indicating that methanogens were not involved in the dechlorination process. On the other hand, the data from the BES-amended studies of Chang et al. [6] and Chen et al. [14] strongly suggested that methanogens were the sole HCB-dechlorinators in their acclimated cultures. Combining these facts together with the results from this study, it can be concluded that HCB-dechlorinators should consist of methanogens as well as other microbial groups. In the studies of Chang et al. [6] and Chen et al. [14], methanogens served as the sole HCB-dechlorinators in their cultures. As a result, once the methanogens were inactivated by BES, the dechlorination of HCB was also terminated. In the study of Pavlostathis and Prytula [16], however, the dechlorination occurred via the activities of the microbial species other than methanogens. Hence, the inhibition of methanogenic activities did not completely block HCB-dechlorination. In this study, the sediment slurry contained both methanogens and other HCB dechlorinating species; thus, even though the methanogens were almost completely inactivated by the BES, the remaining dechlorinators that were not susceptible to BES still transformed HCB to QCB; however, at the lower rate as compared to when both microbial groups were active.

Further investigation on HCB-dechlorinators was conducted by using vancomycin (VAN), a strong bactericide on gram-positive bacteria including most acetogens. The results revealed that 100 mg L⁻¹ of VAN moderately retarded the dechlorination performance shown in Fig. 4. Partial pressure of methane in the headspace also reduced from 38% to 16% in the presence of VAN during the same incubation period. This implies that acetogenic activities that transformed volatile fatty acids to acetic acid for methanogenic uptake were partially affected and consequently retarded methane formation. Once the methanogenic activities subsided, the dechlorination process was also decelerated. As the VAN was increased to 200 mg L⁻¹, a level that should inhibit most gram-positive bacteria, the HCB-dechlorination completely stopped. The reason could be that the gram-positive bacteria usually play the role of supplementing substrate to methanogenic bacteria, and once this supplementation is terminated, the methanogenic HCB-dechlorinator could no longer dechlorinate HCB. In addition, apart from methanogenic HCB-dechlorinators, it is possible that there were other naturally existing dechlorinators in the sediment of the Hua Lum Poo Canal, and they were most likely the gram-positive microbes that were able to tolerate VAN to some certain degree. Swenson et al. [17] reported that some gram-positive bacteria, such as the *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species, were

essentially resistant to vancomycin; however, they might be inactivated by the high VAN dose of 200 mg L⁻¹.

3.5. Kinetics of HCB-dechlorination

To evaluate the microbial dechlorination ability and HCB toxicity, the HCB dose was increased from 2 to 10, 40, 100, and 200 mg L⁻¹, which were equivalent to 43.8, 175.2, 438.0, 876.0 mg kg⁻¹ dry solids for H1, and 63.1, 252.4, 630.9, 1261.8 mg kg⁻¹ dry solids for H2, respectively. Surprisingly, it was found that HCB was still dechlorinated at the very high concentration of 200 mg L⁻¹ with a minor retardation as illustrated in Table 4. The lag phase and appearance time for dechlorination intermediates including QCB, 1,2,3,5-TeCB, and 1,3,5-TCB were almost similar for all HCB dosages. The only difference was the time required to completely remove HCB, which became longer as the HCB increased. It is important to mention that the appearance times of 1,2,3,5-TeCB, and 1,3,5-TCB in the experiment with 2 mg L⁻¹ HCB using the sediment slurry from H2 were different from those of the control set (no addition) in Table 3 even though they were tested under similar conditions with the same sediment sample. This was possibly due to the effect of the storage time at 4 °C in the cold storage. The sediment used in this part was kept for one week after sampling whereas those used in Table 3 was kept for two months. It implies that the QCB and 1,2,3,5-TeCB dechlorinators might be somehow affected during the storage at 4 °C for a long period of time. The degradation pathway of all HCB dosages still followed the major pathway to 1,3,5-TCB. The initial dechlorination rate was determined during the most active dechlorination period, i.e., HCB decreased sharply, as shown in Fig. 1. The relationship between the initial dechlorination rate and the HCB concentration is shown in Fig. 5. The dechlorination rate increased exponentially as the HCB concentration increased and finally reached a plateau where a further increase in HCB did not promote the rate. This pattern was similar to the enzymatic catalytic behavior that could be quantitatively explained by Michaelis–Menten kinetics. With sufficient nutrients and no inhibition effect as in this study, the dechlorination rate of HCB via a co-metabolization could be described under the influence of HCB and organic substrate concentrations as shown in Eq. (1) [16]:

$$\frac{d[\text{HCB}]}{dt} = - \left(\frac{k_m X [\text{HCB}]}{K_{\text{HCB}} + [\text{HCB}]} \right) \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \quad (1)$$

where k_m is the maximum dechlorination rate of HCB per unit biomass; K_{HCB} and K_S are the half-saturation constants regarding on HCB and organic substrate, respectively; X is the HCB-dechlorinator intensity; and S is the organic substrate concentration. Since the organic substrates (S) available for biodegradation as represented by the COD values were much higher than HCB concentration and the biomass (X) growth under anaerobic condition was considerably very slow, these two parameters can be considered constant

Table 4
HCB-dechlorination under various HCB concentrations.

Site	HCB (mg L ⁻¹)	Appearance time (days)			
		QCB	1,2,3,5-TeCB	1,3,5-TCB	Complete HCB-dechlorination time (days)
H1	2	14	14	14	70
	10	14	28	28	175
	40	14	28	35	>175
	100	14	28	42	>175
	200	21	28	49	>175
H2	2	14	21	28	70
	10	14	21	28	175
	40	14	21	28	175
	100	14	28	28	175
	200	14	28	35	>175

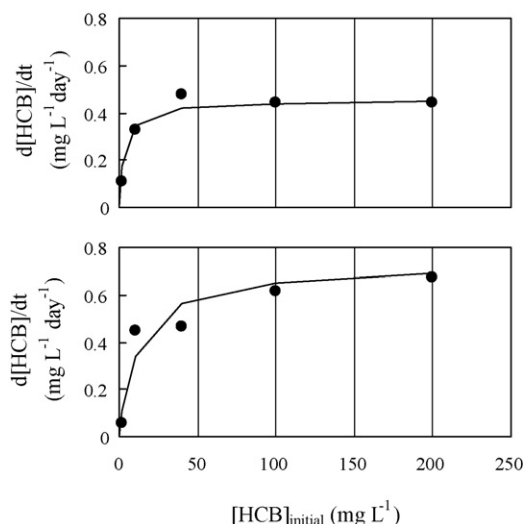


Fig. 5. Effect of HCB concentration on dechlorination rate (lines are model predictions based on the Michaelis–Menten kinetics).

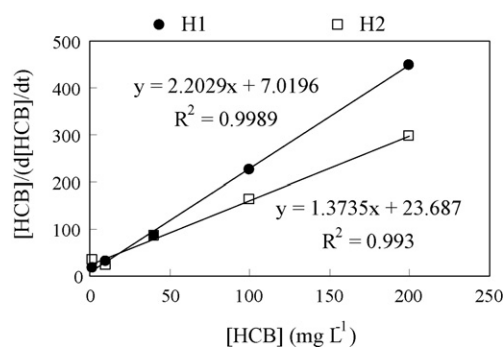


Fig. 6. Hanes linearization for Fig. 5.

during the initial stage; then, Eq. (1) can be simplified to:

$$\frac{d[HCB]}{dt} = - \left(\frac{k'_m [HCB]}{K_{HCB} + [HCB]} \right) \quad (2)$$

where k'_m is an apparent maximum dechlorination rate of HCB. The dechlorination rate then becomes first order with respect to HCB at low concentration and zero order at high concentration. Although many researchers working with HCB-dechlorination have successfully described their kinetic data by using either the first-order reaction [5,7] or the zero-order reaction [18], others decided to use a more realistic Michaelis–Menten model. Pavlostathis and Prytula [16] dechlorinated HCB by using enriched cultures supplementing with essential minerals, vitamins, yeast extract, and glucose, and found the dechlorination to follow the Michaelis–Menten model with the k'_m and K_{HCB} of $0.015 \pm 0.001 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and $0.024 \pm 0.003 \text{ mg L}^{-1}$, respectively. Further analysis using the Hanes linearization method [19] as illustrated in Eq. (3) and Fig. 6 found the k'_m , K_{HCB} , and R^2 to be $0.45 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$, 3.2 mg L^{-1} , and 0.993 for H1 and $0.73 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$, 17.2 mg L^{-1} , and 0.999 for H2, respectively.

$$\frac{[HCB]}{(d[HCB]/dt)} = \frac{[HCB]}{k'_m} + \frac{K_{HCB}}{k'_m} \quad (3)$$

The k'_m and K_{HCB} obtained from this study were 30–50 and 178–480 times, respectively, higher than the values reported by Pavlostathis and Prytula [16]. The differences might be due to several factors such as HCB contamination and acclimation level, complexity of microbial consortium, and environmental factors

particularly temperature as discussed previously. In addition, it is surprising to obtain significant differences in k'_m and K_{HCB} between H1 and H2 since H2 is only approximately 50 m downstream from H1. From field survey, it was found that H1 was mainly contaminated with industrial wastewater, whereas H2 was located in the congested low-income community; hence, it was also polluted with improperly treated domestic wastewater. Organic matter and nutrients from domestic wastewater might promote microbial activity in the direction of enhancing HCB-dechlorination.

4. Conclusions

The reductive dechlorination of HCB by indigenous sediment microbes under anaerobic condition was intensively investigated in this study. The indigenous microbes in the sediments collected from the Hua Lum Poo Canal could dechlorinate HCB effectively without acclimation and extra nourishment. Temperature significantly affected the HCB-dechlorination with the optimum range between 30 and 35 °C. Hence, HCB might not be a persistent organic pollutant in the moderate temperature environment like those in the tropical zone. The SRB, DN, and acetogens did not directly engage in the dechlorination of HCB; however, the SRB interfered with the dechlorination of QCB to 1,2,3,5-TeCB and 1,2,3,5-TeCB to 1,3,5-TCB. Methanogens and some VAN-resistant species of gram-positive bacteria were most likely the candidates for HCB-dechlorination. The HCB-dechlorination behavior could be sufficiently explained by the Michaelis–Menten kinetics with the k'_m and K_{HCB} between $0.45\text{--}0.73 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and $3.2\text{--}17.2 \text{ mg L}^{-1}$, respectively.

Acknowledgements

This research was co-supported by the Thailand Research Fund and the Commission on Higher Education, Ministry of Education, Royal Thai Government, through Grant No. RMU-5080012. The authors would also like to thank the National Science Council of the Republic of China for their support through project No. NSC 91-2313-B-041-010.

References

- [1] J. Anotai, J. Voranisaraku, W. Wantichapichat, I.M. Chen, Hexachlorobenzene dechlorination ability of microbes from canal and estuary sediments, *J. Korean Wetland Soc.* 9 (2006) 107–114.
- [2] K. Brigden, I. Labunska, R. Stringer, Bangpoo Industrial Estate, Samut Prakarn, Thailand: An Investigation of Environmental Pollutants, Greenpeace Research Laboratories, Department of Biological Sciences, University of Exeter, UK, 2003.
- [3] R.E. Bailey, Global hexachlorobenzene emissions, *Chemosphere* 43 (2001) 167–182.
- [4] ATSDR, Toxicology Profile for Hexachlorobenzene, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 2002.
- [5] J.E.M. Beurskens, C.G.C. Dekker, H. van den Heuvel, M. Swart, J. der Wolf, J. Dolfig, Dechlorination of chlorinated benzenes by an anaerobic microbial consortium that selectively mediates the thermodynamic most favorable reactions, *Environ. Sci. Technol.* 28 (1994) 701–706.
- [6] B.V. Chang, Y.M. Chen, S.Y. Yuan, Y.S. Wang, Reductive dechlorination of hexachlorobenzene by an anaerobic mixed culture, *Water Air Soil Pollut.* 100 (1997) 25–32.
- [7] M.T. Prytula, S.G. Pavlostathis, Effect of contaminant and organic matter bioavailability on the microbial dehalogenation of sediment-bound chlorobenzenes, *Water Res.* 30 (1996) 2669–2680.
- [8] P. Rosenbrock, R. Martens, F. Buscot, J.C. Munch, Initiation of [^{36}Cl] hexachlorobenzene dechlorination in three different soils under artificially induced anaerobic conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 (1997) 115–120.
- [9] I.M. Chen, Y.F. Chang, H. Lin, Microbial dechlorination of hexachlorobenzene by untamed sediment microorganisms in Taiwan, *Pract. Peri. Hazard. Toxic Radiol. Waste Manage.* 8 (2) (2004) 1–6.
- [10] B.Z. Fathepure, J.M. Tiedje, S.A. Boyd, Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to tri- and dichlorobenzene in anaerobic sewage sludge, *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 327–330.
- [11] I.M. Chen, F.C. Chang, B.V. Chang, Y.S. Wang, Specificity of microbial activities in the reductive dechlorination of chlorinated benzenes, *Water Environ. Res.* 72 (2000) 675–679.

- [12] APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed., American Public Health Association, Washington, DC, 1992.
- [13] R.L. Droste, Theory and Practice of Water and Wastewater Treatment, John-Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.
- [14] I.M. Chen, B.V. Chang, S.Y. Yuan, Y.S. Wang, Reductive dechlorination of hexachlorobenzene under various additions, *Water Air Soil Pollut.* 139 (2002) 61–74.
- [15] P.J.M. Middelorp, D.W. John, J.B.Z. Alexander, G. Schraa, Enrichment and properties of a 1,2,4-trichlorobenzene dechlorinating methanogenic microbial consortium, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 1225–1229.
- [16] S.G. Pavlostathis, M.T. Prytula, Kinetics of the sequential microbial reductive dechlorination of hexachlorobenzene, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 4001–4009.
- [17] J.M. Swenson, R.R. Facklam, C. Thornsberry, Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* species, *Antimicrob. Agents Chemother.* 34 (1990) 543–549.
- [18] S.Y. Yuan, C.J. Su, B.V. Chang, Microbial dechlorination of hexachlorobenzene in anaerobic sewage sludge, *Chemosphere* 38 (5) (1999) 1015–1023.
- [19] C.P.L. Grady Jr., G.T. Daigger, H.C. Kim, *Biological Wastewater Treatment*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1999.

Fresenius Environmental Bulletin
(in press)

HEXACHLOROBENZENE DECHLORINATION BY ENRICHED MIXED CULTURES FROM THAI CANAL

Jin Anotai¹, Jih-Ming Chyan², Wichidtra Sudjarid^{3,4}, Wanit Wanitchapichat¹, and I-Ming Chen^{2*}

¹ National Research Center for Environmental and Hazardous Waste Management (NCE-EHWM), Department of Environmental Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand 10140

² Department of Environmental Resources Management, Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 717

³ National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

⁴ International Postgraduate Programs in Environmental Management, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330
(* e-mail: imchen@mail.chna.edu.tw)

SUMMARY

After collecting and analyzing the sediments from 10 sites along the Hua-Lum-Poo Canal located in Samut Prakarn, a province of Thailand, hexachlorobenzene (HCB) and 1,3,5-trichlorobenzene (1,3,5-TCB) were found in four sediment samples. Due to 1,3,5-TCB has never been made commercially for industrial and agricultural usage, most of it was transformed from highly chlorinated benzenes. Therefore, it suggested that HCB has been dechlorinated to 1,3,5-TCB in the natural sediment of Hua-Lum-Poo Canal. This study was devoted to investigate the reductive dechlorination of HCB by the anaerobic microorganisms in canal sediments. Indigenous microorganisms from 10 canal sediments were collected and applied to dechlorination experiments. By using anaerobic microbes from yeast extract pre-enriched natural sediment-water slurries, every set of microorganisms initiated HCB dechlorination after 14 days of incubation and completed the process in a period of 28 ~ 42 days. In the sets without yeast extract pre-enrichment, the microorganisms also showed dechlorination activity after 14 ~ 28 days of cultivation. Combining the results, it showed that after 7-days of pre-anoxic and enriched treatment, canal microbes were able to develop the HCB dechlorination activity and completely dechlorinate HCB within 6 weeks. This indicates that the HCB dechlorinating microorganisms were prevalent in the sediments along the Hua-Lum-Poo Canal and possibly to remove HCB contamination without any additional nutrient.

KEYWORDS

Dechlorination, Hexachlorobenzene, Natural Sediment, anaerobic microorganisms

INTRODUCTION

After decades of uncontrolled releases, hexachlorobenzene (HCB) has been detected in air, water and sediment around industrial sites and farming area [1, 2]. It was produced and used as fungicide as well as an industrial synthetic material and generated as a byproduct of solvents and chlorinated chemical manufactures [3, 4]. Nowadays, HCB is well known as a priority pollutant in critical environment because of their specific properties such as carcinogenicity, recalcitrance and bioaccumulation. Thus, the removal of HCB from contaminated environments has become more significant. Clean-up methods such as chemical processes had been investigated [5, 6]. However, in consideration of lesser expense and environmental impact, biological treatment was necessarily advocated. The biodegradation of chlorinated benzenes by aerobic microbes could only deal with less-chlorinated ones, including monochlorobenzene (MCB), dichlorobenzenes (DCBs) and trichlorobenzenes (TCBs) [7, 8]. For highly chlorinated compounds, with the bulky chlorine atoms surrounding the benzene ring like pentachlorobenzene (QCB) and HCB, the aerobic biodegradation was seemingly completely inhibited.

The removal of chlorines from HCB and other highly chlorinated aromatics was considered as the first step to decompose these compounds and it was indeed effective through anaerobic dechlorination by using acclimated or enriched microorganisms [8, 9, 10]. This study was therefore dedicated to assess the dechlorination of HCB by the indigenous microbes collected from Hua-Lum-Poo Canal sediments, where some of the sediments were contaminated by HCB. In order to evaluate the dechlorination possibility, sediment microbes were collected from 10 sites along the entire canal, enriched and introduced to HCB dechlorination experiments. The degradation of HCB was studied by measuring the transformation of HCB to less-chlorinated compounds under reductive dechlorination.

MATERIALS AND METHODS

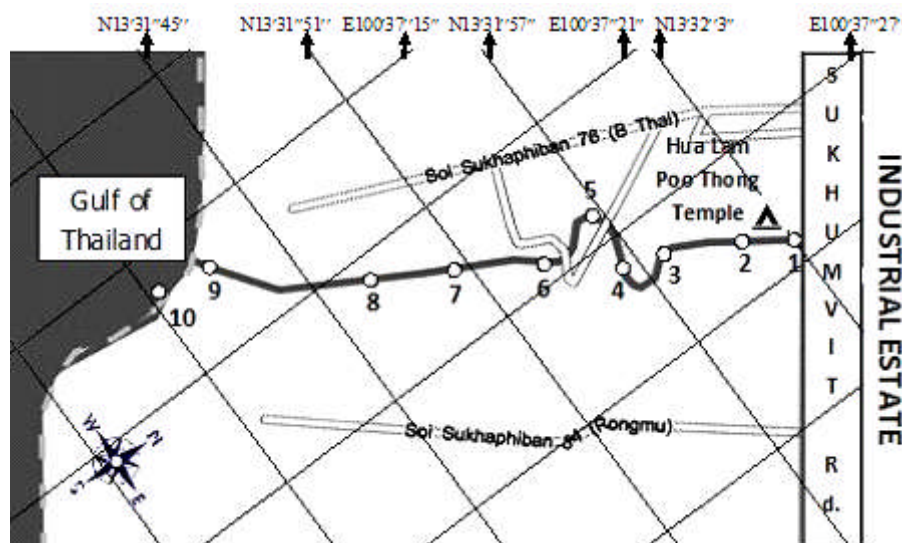


FIGURE 1 - Sediment and river water sampling sites along Hua Lam Poo Canal and seashore as marked from 1 to 10.

SEDIMENTS AND CHEMICALS

Sediments and river waters were collected from 10 sites (S1 to S10, from wastewater discharging site to estuarine) along Hua-Lum-Poo Canal, Bangpoo, Thailand as shown in Fig 1. After the sediment dug up, the upper 5 cm of sediments were carefully removed, and the remains were packed in plastic bags and kept in 4°C.

Chlorinated benzene congeners (CBs) including MCB, 1,2-, 1,3- and 1,4-DCB, 1,2,3-, 1,2,4- and 1,3,5-TCB, 1,2,3,4-, 1,2,3,5- and 1,2,4,5-Tetrachlorobenzene (TeCB), PCB and HCB were purchased from Riedel-de Haen Chemical Co. (Seelze, Germany).

MEDIA

Sediment slurry preparation

400 ml of sediment slurry and 400 ml of river water were placed in a screw-capped serum bottle (1L), and vigorously shaken by hand for 2 minutes. After the solid part settled down, 50 ml of the liquid part was withdrawn. And this sediment slurry (SS) was then transferred into an alumina-capped serum bottle.

Synthetic mineral medium

A synthetic mineral medium (MM) was also established, consisting of NH_4Cl , 2.7 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/L; K_2HPO_4 , 0.27 g/L; KH_2PO_4 , 0.35 g/L, according to a previous study [9]. In some experimental sets, yeast extract (YE) was used as nutrient supplement with a concentration of 5 g/L in mineral medium or sediment slurry.

PREPARATION OF INOCULUM

Yeast extract (YE) enriched mixed cultures were used as inoculum. For the preparation of inoculums, the collected sediment was mixed with river water (50ml:50ml) and 1 g of YE, then placed into a serum bottle, shaken by hand for 1 minute and sealed. Samples were stored for 1 week in the dark at room temperature.

DECHLORINATION EXPERIMENT

After shaking the YE-enriched bottles, 5ml of YE enriched mixed cultures were withdrawn and injected into serum bottles which contained 45 mL of the medium and 2 mg/L of HCB, and then incubated at room temperature. The dechlorination procedures were described in detail from previous researches [11, 12]. At designated intervals, 2 ml of the incubated culture sample was taken from the serum bottle by a syringe.

ANALYSIS

The culture sample was extracted three times by *n*-hexane, and analyzed by a gas chromatography equipped with an ECD (Hewlett Packard 4890, Rockville, MD) and a capillary column of DB-5 fused silica. The oven

temperature was maintained at 80°C for 5 min, raised to 120°C at 5°C /min, maintained for 2 min, and then raised again at 5°C/min to the final temperature of 200°C, which was held for 5 min. The temperatures of the injector and the detector were set at 280°C and 300°C, respectively. Nitrogen and Helium gas were employed as the make-up and the carrier gas, respectively. The linear velocity was 16 cm/s and the split ratio was kept at 10:1.

RESULTS AND DISCUSSION

CBs IN CANAL SEDIMENTS

All ten sediments were first extracted to investigate the chlorinated benzenes contamination of the canal. The results showed that the first four sites close to the discharging location (S2 to S5) were contaminated by HCB in a range of 0.182 to 1.250 ppm (Table 1). Surprisingly, 1,3,5-TCB was found in two of these HCB-contaminated sediments. Unlike HCB, 1,3,5-TCB was out of any industrial and farming usage and no published research suggested this compound could be an intermediate or an impurity during chemical processes [13]. However, many studies reported that 1,3,5-TCB was a very important final product in HCB dechlorination following the major pathway as described by Fathepure et al.; Holliger et al. and Chang et al. [14, 15, 16]. This finding provided a piece of evidence that HCB could be dechlorinated in natural sediment environment of Hua-Lum-Poo Canal.

TABLE 1 - The concentration of HCB and 1,3,5-TCB in Hua-Lum-Poo Canal sediments.

Sampling site	HCB (ppm)	1,3,5-TCB (ppm)
S2	0.182	ND
S3	1.250	0.238
S4	0.261	0.160
S5	0.153	ND

HCB DECHLORINATION IN NATURAL SEDIMENT SLURRIES

After 1 week of YE pre-enrichment, anaerobic mixed cultures from all ten sites has showed HCB-dechlorination ability in sediment slurry without yeast extract (Table 2). Eight of them dechlorinated HCB after 14 days of incubation and the other two have a lag phase of 28 days. However, HCB dechlorination was completed before 42 days of incubation. Within the findings of the HCB-dechlorination by river sediment microorganisms from southern Taiwan [17], only one from Erh-Jen River sets and one from Ho-Tsin River sets were able to dechlorinate HCB in a natural sediment water media, and the dechlorination was never completed (Table 2). It showed the superior dechlorination ability of Hua-Lum-Poo Canal microbes. Under similar conditions with Taiwan studies, using Hua-Lum-Poo SS media, all enriched cultures initiated and completed the dechlorination within a much shorter period.

The dechlorinating intermediates found in HCB-dechlorination processes were QCBs, 1,2,3,5-/1,2,4,5-TeCB (co-eluting congeners) and 1,3,5-TCB, nevertheless the last was the only product remained. As shown in Figure 2, HCB dechlorination by Site 4 microbes produced QCB and 1,2,3,5-/1,2,4,5-TeCB on day 24, and successively to 1,3,5-CB. The dechlorination pattern by Hua-Lum-Poo Canal microbes followed the major pathway: HCB → PCB → 1,2,3,5-/1,2,4,5-TeCB → 1,3,5-TCB, as described from previous studies [11, 17]. As Chen et al. suggested, the untamed microbes in Taiwan favorably dechlorinated HCB through the dechlorination reactions with larger amount of energy released and also with greater difference in chromatographic properties [17]. Therefore, microorganisms from mild contaminated sites also dechlorinated HCB by following the energy releasing favorable pathway.

HCB DECHLORINATION IN SEDIMENT SLURRIES SUPPLEMENTED WITH YEAST EXTRACT

With the supplement of yeast extract, organic contents from the cultural media increased and helped the YE-enriched microbes to be more vigorous, quickly turning the serum bottle condition into strictly anaerobic. Table 3 showed that all ten canal anaerobic mixed cultures could dechlorinate HCB with a lag phase of 14 days, two of them has a shorter lag phase than the set without YE (Table 2). This is similar to the finding of Chen et al., in the investigation of the HCB dechlorination ability of untamed sediment anaerobic microbes in Erh-Jen River and Ho-Tsin River [17]. All microbial consortia from Erh-Jen River, Ho-Tsin River and Hua-Lum-Poo Canal sediments showed the enhancement of HCB-dechlorinating activity by YE supplement (Table 3). It suggested that HCB-dechlorination microorganisms is widespread over Taiwan rivers and Thai canal sediments. And the

environmental remediation of HCB pollution is possible with the potential of anaerobic microorganisms that originated in the contaminated sites. However, a noble HCB-dechlorination happened in the mixed cultures from Hua-Lum-Poo Canal. With YE (Table 3) or without YE (Table 2), both sets of microbes dechlorinated HCB faster than the sets from Taiwan rivers. The lag phase and dechlorination period (from the beginning up to the end of dechlorination) of Thai canal were 2 to 4 times shorter than Taiwan river sets.

TABLE 2 - HCB Dechlorination by sediment microorganisms from Hua-Lum-Poo Canal sediments (S1 ~ S10), Erh-Jen River sediments (E1,E2) and Ho-Tsin River sediments (H1, H2) by using sediment slurry (SS) without yeast extract as media.

Inoculum source ^a	Medium	Yeast extract amendment (g/L)	Lag phase (day)	Dechlorination completing day	HCB degradation ratio (%)	Final Product
S1	SS ^b	0	14	28	100	1,3,5-TCB
S2	SS	0	14	42	100	1,3,5-TCB
S3	SS	0	28	42	100	1,3,5-TCB
S4	SS	0	14	28	100	1,3,5-TCB
S5	SS	0	14	42	100	1,3,5-TCB
S6	SS	0	14	42	100	1,3,5-TCB
S7	SS	0	28	42	100	1,3,5-TCB
S8	SS	0	14	42	100	1,3,5-TCB
S9	SS	0	14	42	100	1,3,5-TCB
S10	SS	0	14	42	100	1,3,5-TCB
E1 ^c	SS	0	ND ^d	ND	0	ND
E2	SS	0	90	NC ^e	59	1,3,5-TCB
H1	SS	0	ND	ND	0	ND
H2	SS	0	75	NC	62	1,3,5-TCB

^aInoculum of S1 ~ S10 from Hua-Lum-Poo Canal enriched with yeast extract for 1 week; inoculum of E1 ~ H2 from Erh-Jen River and Ho-Tsin River pre-cultured under anaerobic condition for 2 weeks without yeast extract.

^bSS: Sediment slurry, mixed sediment and river water (1:1), then withdrawing the supernatant.

^cData of E1 ~ H2 taken from "Microbial dechlorination of hexachlorobenzene by untamed sediment microorganisms in Taiwan. Chen et al., Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management" [17].

^dND: No dechlorination after 150 days of incubation period.

^eNC: Dechlorination was not completed after 150 days of incubation period.

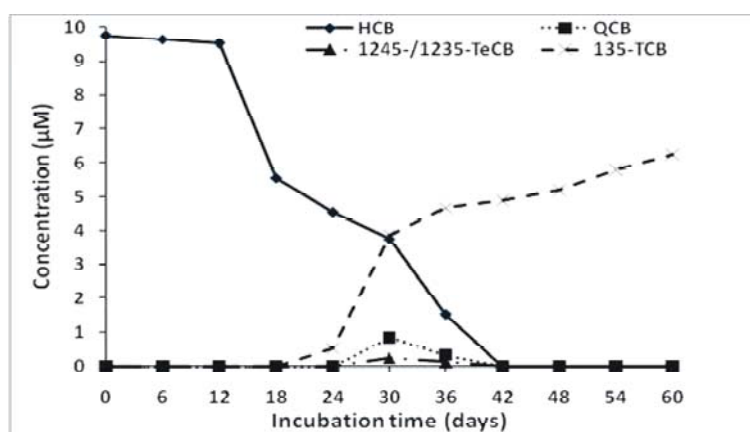


FIGURE 2 - HCB dechlorination by site 4 (S4) indigenous microorganisms from canal sediments with sediment slurry (SS) as media.

TABLE 3 - HCB dechlorination by sediment microorganisms from Hua-Lum-Poo Canal sediments (S1 ~ S10), Erh-Jen River sediments (E1, E2) and Ho-Tsin River sediments (H1, H2) by using sediment slurry (SS) with yeast extract as media.

Inoculum source ^a	Medium	Yeast extract amendment (g/L)	Lag phase (day)	Dechlorination completing day	Final Product
S1	SS ^b	5	14	28	1,3,5-TCB
S2	SS	5	14	28	1,3,5-TCB
S3	SS	5	14	42	1,3,5-TCB
S4	SS	5	14	42	1,3,5-TCB
S5	SS	5	14	42	1,3,5-TCB
S6	SS	5	14	42	1,3,5-TCB
S7	SS	5	14	28	1,3,5-TCB
S8	SS	5	14	28	1,3,5-TCB
S9	SS	5	14	42	1,3,5-TCB
S10	SS	5	14	42	1,3,5-TCB
E1 ^c	SS	5	60	110	1,3,5-TCB
E2	SS	5	30	90	1,3,5-TCB
H1	SS	5	60	110	1,3,5-TCB
H2	SS	5	30	90	1,3,5-TCB

^aInoculum of S1 ~ S10 from Hua-Lum-Poo Canal enriched with yeast extract for 1 week; inoculum of E1 ~ H2 from Erh-Jen River and Ho-Tsin River pre-cultured under anaerobic condition for 2 weeks without yeast extract.

^bSS: Sediment slurry, mixed sediment and river water (1:1), then withdrawing the supernatant.

^cData of E1 ~ H2 taken from "Microbial dechlorination of hexachlorobenzene by untamed sediment microorganisms in Taiwan. Chen et al., Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management" [17].

HCB DECHLORINATION IN SYNTHETIC MINERAL MEDIA SUPPLEMENTED WITH YEAST EXTRACT

Using synthetic mineral medium (MM) amended with 5 g/L of yeast extract as media, HCB dechlorination (Table 4) looked no significant difference from the sets using sediment slurry added with YE (Table 3). Almost every bottle showed the same lag phase and dechlorination period, with only one exception of site 9 (S9). The dechlorination period of MM-YE bottles was 28 days shorter than SS-YE bottles. The efficiency of HCB-dechlorination in MM-YE by Thai canal microbes was also higher than Taiwan river microbes. This result revealed that HCB dechlorination in Thai canal is effective not only because the canal sediment slurry was more nutritious, but also from the powerful dechlorination ability of canal indigenous microorganisms.

CONCLUSIONS

For the removal of chlorinated aromatic compounds like hexachlorobenzene, pentachlorophenol, polychlorinated biphenyls and dioxins in contaminated environments, the strategy of mineralization by aerobic microorganisms is not available. Because of the concentration of these compounds in natural environment was always too low to initiate the aerobic microbial degradation. Furthermore, the chlorine atoms on the benzene ring will block the attack on the ring. Microbial reductive dechlorination was a kind of co-metabolism, dechlorinating anaerobic consortia degraded the chlorinated compounds only for energy harvesting. This kind of reaction can be activated under very low concentration of the target compound. Therefore, nowadays dechlorination was thought to be the only one way in the remediation of chlorinated aromatics pollution. In this study, the dechlorination ability and dechlorinating activity of anaerobic microorganisms in Thai canal were well evaluated. YE pre-enriched microbes from all 10 sites along whole Hau-Lum-Poo Canal could dechlorinate HCB within 42 days of

incubation. The results strongly suggested that the HCB degradation in natural Thai Canal was possible, and this kind of biodegradation was valuable for the remediation of chlorinated aromatic contamination in Thailand.

TABLE 4 - HCB Dechlorination by sediment microorganisms from Hua-Lum-Poo Canal sediments (S1 ~ S10), Erh-Jen River sediments (E1,E2) and Ho-Tsin River sediments (H1, H2) by using synthetic mineral medium (MM) with yeast extract amendment as media.

Inoculum source ^a	Medium	Yeast extract amendment (g/L)	Lag phase (day)	Dechlorination completing day	Final Product
S1	MM ^b	5	14	28	1,3,5-TCB
S2	MM	5	14	28	1,3,5-TCB
S3	MM	5	14	42	1,3,5-TCB
S4	MM	5	14	42	1,3,5-TCB
S5	MM	5	14	42	1,3,5-TCB
S6	MM	5	14	42	1,3,5-TCB
S7	MM	5	14	28	1,3,5-TCB
S8	MM	5	14	28	1,3,5-TCB
S9	MM	5	14	28	1,3,5-TCB
S10	MM	5	14	42	1,3,5-TCB
E1 ^c	MM	5	45	90	1,3,5-TCB
E2	MM	5	30	60	1,3,5-TCB
H1	MM	5	45	90	1,3,5-TCB
H2	MM	5	30	75	1,3,5-TCB

^a Inoculum of S1 ~ S10 from Hua-Lum-Poo Canal enriched with yeast extract for 1 week; inoculum of E1 ~ H2 from Erh-Jen River and Ho-Tsin River pre-cultured under anaerobic condition for 2 weeks without yeast extract.

^bSS: Sediment slurry, mixed sediment and river water (1:1), then withdrawing the supernatant.

^cData of E1 ~ H2 taken from "Microbial dechlorination of hexachlorobenzene by untamed sediment microorganisms in Taiwan. Chen et al., Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management" [17].

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Thailand Research Fund and the Commission on Higher Education, Ministry of Education, Royal Thai Government, through Grant No. RMU-5080012. And co-supported by National Science Council of the Republic of China (Taiwan, NSC 95-2313-B-041-004), Commission on Higher Education under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Ph.D. Program Thai Doctoral degree (Bangkok, Thailand), International Postgraduate Programs in Environmental Management, Graduate School, Chulalongkorn University (Bangkok, Thailand), National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management (NCE-EHWM), Chulalongkorn University (Bangkok, Thailand), Department of Environmental Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi (Bangkok, Thailand), and Department of Environmental Resources Management, Chia Nan University of Pharmacy and Science (Tainan, Taiwan).

REFERENCES

- [1] Zell, M., and Ballschmiter, K. (1980). Baseline studies of the global pollution. II. Global occurrence of hexachlorobenzene (HCB) and polychlorocamphenes (toxaphene) (PCC) in biological samples. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 300, 387-402.

- [2] Fellin, P., Barrie, L. A., Dougherty, D., Toom, D., Muir, D., Grift, N., Lockhart, L., and Billeck, B. (1996) Air monitoring in the arctic: results for selected persistent organic pollutants for 1992. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 253-261.
- [3] Schaeffer, D. J., Kapila, S., Meadows, J. E., Hinderberger, E., and Wentsel, R. (1988). Chemical characterization of residues from military HC smokepots. *J. Hazardous Mater.* 17, 315-328.
- [4] Wu, W. Z., Schramm, K. W., Henklemann, B., Xu, Y., Yediler, A., and Kettrup, A. (1997). PCDD/Fs, PCBs, HCHs, and HCB in sediments and soils of Ya-Er Lake area in China: results on residual levels and correlation to the organic carbon and the particle size. *Chemosphere* 34, 191-202.
- [5] Ma, X.D., Zhang, Liu, W.B., M.H., Qian, Y., Zhang, B., and Liu, W.X. (2005). Dechlorination of hexachlorobenzene using ultrafine Ca-Fe composite oxides. *J. Hazardous Mater.* 127(1-3), 156-162.
- [6] Ma, X.D., Sun, H.W., Liu, W.B., Liu, W.X. and Zhang, M.H., (2007). Dechlorination of hexachlorobenzene over Mg-Fe composite oxides. *Fresen. Environ. Bull.* 16(7), 745-748.
- [7] De Bont, J. A. M., Vorage, M. J. A. W., Hartmans, S., and Van Den Tweel, W. T. J. (1986). Microbial degradation of 1,3-dichlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 677-680.
- [8] Bestteti, G., Galli, E., Leoni, B., Pelizzoni, F., and Sello, G. (1992). Regioselective hydroxylation of chlorobenzenes and chlorophenols by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 260-263.
- [9] Chen, I. M., Chang, F. C., and Wang, Y. S. (1997). Reductive dechlorination of hexachlorobenzene and polychlorinated biphenyls in anaerobic sediments from tropical rivers with enrichment. *Proceeding, 17th Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds*. Aug. 25-29, 1997, Indianapolis, Indiana, USA.
- [10] Bedard, D. L., Van Slyke Jerzak, G., Bailey, J. J. (2003) Strategies for the selective enrichment of microorganisms carrying out reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls in freshwater sediments. *Fresen. Environ. Bull.* 12(3), 276-285.
- [11] Chen, I. M., Chang, F. C., Chang, B. V., and Wang, Y. S. (2000). Specificity of the microbial activities in the reductive dechlorination of chlorinated benzenes. *Water Environ. Res.* 72(6), 675-679.
- [12] Chen, I.M., Chang, B. V., Yuan, S. Y., and Wang, Y. S. (2002). Reductive dechlorination of hexachlorobenzene under various additions. *Water, Air, and Soil Poll.* 139, 61-74.
- [13] Bailey, R. E. (1999). Global hexachlorobenzene emissions. *Chemosphere* 43, 167-182.
- [14] Chang, B.V., Chen, I. M., Yuan, S.Y., and Wang Y. S. (1997). Reductive dechlorination of hexachlorobenzene by an anaerobic mixed culture. *Water Air Soil poll.* 100, 25-32.
- [15] Fathepure, B. Z., Tiedje, J. M., and Boyd, S. A. (1988). Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to tri- and dichlorobenzenes in anaerobic sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 327-330.
- [16] Holliger C., Schraa, G., Stams, A. J. M., and Zehnder, A.J.B. (1992). Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dechlorinating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1636-1644.
- [17] Chen, I. M., Chang, Y. F., and Lin, H. (2004). Microbial Dechlorination of hexachlorobenzene by untamed sediment microorganisms in Taiwan. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* 8(2), 73-78.

CORRESPONDING AUTHOR

I-Ming Chen

Department of Environmental Resources Management, Chia-Nan University of Pharmacy and Science

60, Erh-Jen Road, Sec 1, Pao-An, Jen-Te Hsiang, Tainan, Taiwan 717

Phone: +886-6-2664911 ext: 6401

Fax: +886-6-2660606

E-mail: imchen@mail.chna.edu.tw

Proceedings of the 9th National Conference on the Environment
(to be presented on March 24-27, 2010)

ผลของสารให้อิเลคตรอนต่อกระบวนการลดคลอรีนของ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลโดยจุลชีพ

Effect of Electron Donor on Microbial Dechlorination of 2,3,4-Trichlorobiphenyl

นิตยา พิวโชติ¹ ไอ-มิง เซน² และจินต์ อโนทัย^{1*}

Nittaya Puewchote¹ I-Ming Chen² and Jin Anotai^{1*}

¹National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Management, Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10140, Thailand

²Department of Environmental Resources Management, Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan 717, Taiwan

*Tel: 024709166; Fax: 024709165; e-mail: jin.ano@kmutt.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยชิ้นนี้ศึกษาถึงการย่อยสลาย 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลโดยกลุ่มจุลชีพแบบไร้อากาศในตะกอนลำน้ำจากแม่น้ำเออร์เจินทางตอนใต้ของประเทศไทยได้ห้วยและจากคลองข้างถนนตำหฺรุ-บางพลีในจังหวัดสมุทรปราการ ประเทศไทย โดยทำการเติมสารสํักยีสต์และ/หรือสารให้อิเลคตรอนคือ ไพรูเวท อะซิเทท หรือแลคเทท ผลการศึกษาในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารให้อิเลคตรอนและสารสํักยีสต์พบว่าจุลชีพในน้ำตะกอนจากคลองข้างถนนตำหฺรุ-บางพลีมีความสามารถในการลดคลอรีนของ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลได้โดยมีช่วงหน่วง 10 สัปดาห์ ในขณะที่น้ำตะกอนจากแม่น้ำเออร์เจินไม่สามารถทำได้ คาดว่าเป็นผลมาจากความแตกต่างในด้านความหลากหลายของจุลชีพที่มีอยู่ในตะกอนตามธรรมชาติจากแหล่งน้ำทั้งสองซึ่งอยู่ในพื้นที่ที่มีภูมิอากาศแตกต่างกัน การเติมไพรูเวทและแลคเททลงในน้ำตะกอนจากคลองข้างถนนตำหฺรุ-บางพลีช่วยเร่งการย่อยสลายของ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลได้โดยช่วงหน่วงลดลงจาก 10 สัปดาห์เป็น 4-6 สัปดาห์ ในขณะที่อะซิเททไม่มีผลที่เด่นชัดต่อการลดคลอรีน ซึ่งให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดที่ใช้ไพรูเวทและแลคเททเป็นสารอาหารน่าจะมีส่วนร่วมโดยตรงในการลดคลอรีนของ 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิล ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มสร้างมีเทนซึ่งใช้อะซิเททไม่ได้เป็นจุลชีพหลักที่จำกัดการลดคลอรีนในน้ำตะกอนจากคลองข้างถนนตำหฺรุ-บางพลี ในทำนองกลับกันการเติมสารสํักยีสต์และสารให้อิเลคตรอนไม่สามารถช่วยให้เกิดการย่อยสลาย 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลในน้ำตะกอนจากแม่น้ำเออร์เจินได้เลยถึงแม้ว่าจะมีการเติมซ้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ก็ตาม แสดงว่าจุลชีพที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย 2,3,4-ไตรคลอโรไบฟีนิลจำเป็นต้องใช้เวลานานในการเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง

คำสำคัญ: พีซีบี; สารให้อิเลคตรอน; ตะกอนดินเหลว; การลดคลอรีน

Abstract

This research studied the dechlorination of 2,3,4-trichlorobiphenyl by anaerobic sediment microbes from Erh-Jen River in southern of Taiwan and from a canal along the Tumhru-Bangplee Road in Samuth Prakarn Province of Thailand by amending the sediment slurries with yeast extract and/or electron donor either pyruvate, lactate or acetate. In the control experiment in which neither yeast extract nor electron donor was added, the sediment slurry from the Tumhur-Bangplee Road could dechlorinate 2,3,4-trichlorobiphenyl with the lag phase of 10 weeks whereas those from Erh-Jen River could not. This should be due to the difference in the microbial diversity/consortium of the natural sediments between these two streams which are located in different climate zones. Pyruvate and lactate could enhance the dechlorination of 2,3,4-trichlorobiphenyl in the canal sediment slurry, i.e., the lag phase was reduced from 10 weeks to 4-6 weeks whereas acetate did not have any significant impact on the dechlorination process. This indicates that the acid-forming bacteria which can use pyruvate and lactate as their substrate might directly involve in the dechlorination of 2,3,4-trichlorobiphenyl. On the other hand, the methane-forming bacteria which use acetate as their substrate might not be the principal microorganisms controlling the dechlorination process in this canal sediment. There was no dechlorination happened in the sediment slurry of Erh-Jen River even with multiple supplements every 2 weeks indicating that the 2,3,4-trichlorobiphenyl dechlorinators required long period of time to growth and produce related enzymes.

Keywords: PCB; electron donor; sediment slurry; dechlorination

1. Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are stable organic compounds which consist of 1-10 chlorine atoms in biphenyl rings and have the chemical formula of $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ as shown in Figure 1. PCBs were first produced commercially in the United States around 1929, and since that time they have had a wide range of applications including uses as dielectrics in capacitors and transformers, as a petroleum additive, plasticizer, lubricant, and in carbonless copy paper. This extensive use has also led to widespread contamination of PCBs in the environment, causing great concern due to their extreme persistence, bioaccumulation, and potential adverse health effects. The use of PCBs in Thailand has been banned since 1975; however, PCBs are still detected in Thailand after 1975 due to improper handling and storage of used transformers and condensers and accidental leakage of PCBs [1]. Bacteria in soils and sediments under anaerobic condition can selectively remove chlorines from meta- and para-positions of the biphenyl ring, appearing to reduce the toxicity and bioaccumulation potential of residues. These chlorinations were limited by PCB concentration [2], position of chlorine atom, group of microorganism, electron donor and electron acceptor, and microbial inhibitor [3]. Therefore, this study aims to investigate the influence of electron donors on the PCBs dechlorination ability in order to understand the dechlorination mechanisms and activity of the microbial dechlorinating consortium.

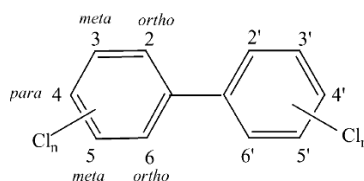


Figure 1. Structural formula of PCBs.

2. Materials and Methods

2.1 Sediment and Stream Water Samples

Sediments and stream waters were collected from the Erh-Jen River along Tainan and Kaohsiung Counties in Southern of Taiwan and from a canal along the Tunhru-Bangplee road which receiving discharge from small material recovery facilities in Samuth Prakarn Province in Thailand. The media (sediment slurry) were freshly prepared prior to each experiment by mixing sediment and stream water at the ratio of 1:1 (v/v), sieved to remove the particles larger than 0.7 mm, and kept in an alumina capped serum bottle.

2.2 Experimental Setup

2.2.1 Characterization of 2,3,4-CBp Dechlorination by Amendment with Nutrient and Electron Donor.

In this scenario, 50 ml of sediment slurry was transferred to a 100 ml serum bottle and capped with the alumina-cap. Each serum bottle was then added with yeast extract at the concentration of 5 g/l. Either pyruvate, acetate, or lactate was used as an electron donor source. Each organic compound was injected into the serum bottles to make the final concentration of 20 mM. 2,3,4-CBp was injected into all serum bottles to make the initial concentration of 2 ppm. All serum bottles were kept in the dark under local room temperature (either of Taiwan or Thailand). Residual PCBs, its intermediates and methane production were analyzed every 2 weeks.

2.2.2 Characterization of 2,3,4-CBp Dechlorination by Extended Nutrient Feeding.

In this scenario, only sediment slurries from the Erh-Jen River were used. Fifty ml of sediment slurry in the 100 ml serum bottle was inoculated with 2 g/l yeast extract and/or 1 g/l of electron donors. The nutrients were; however, added in two manners, i.e., as a single dose at the beginning and multi-dose every 2 weeks. Sediment slurry without external supplement was also prepared and served as the control. After that, 2,3,4-CBp was added into the serum bottles to make the initial concentration of 2 ppm then incubated in the dark under room conditions.

2.3 Extraction Methods

At predetermined time, 2 ml of liquid mixture was withdrawn from the serum bottle by a needle and injected into an extraction tube. Two ml of hexane and 0.2 ml of 6 N NaOH were added. The mixture was then shaken by hand for 100 times followed by ultra-sonicating for 10 minutes. The vial was centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes. The upper layer of extracting solvent was withdrawn as much as possible afterward and injected into a new tube. The remaining mixture was re-extracted for another two times following the similar procedures. At the third extraction, the upper layer

liquid was pulled out and filled the tube up to the 5-ml mark. A small amount of anhydrous Na_2SO_4 was added to remove moisture before GC analysis.

2.4 Sample Analysis

For PCBs analysis, a gas chromatograph equipped with an ECD (Agilent 6890N, USA) and a capillary column of DB-5 fused silica was used to analyze PCBs and their by-products. The oven temperature was maintained at 120°C for 2 min, raised to 225°C at 3°C/min, maintained for 3 min, and then raised again at 5°C/min to the final temperature of 270 °C, which was held for 11 min. The temperature of the injector and the detector was set at 280°C and 300°C, respectively. Nitrogen gas was employed as the carrier and the make-up gases, at the flow rate of 4 ml/min and the split ratio was kept at 10:1. Water characteristics were analyzed according to the procedures described in the Standard Methods [4].

3. Results and Discussion

3.1 Characteristics of Stream Water and Sediment Slurry

The pH and COD of the stream water and prepared sediment slurry from the canal in Thailand were 7.2 and 50 mg/l and 6.9 and 13,100 mg/l, respectively. It could be seen that the sediment slurry contained high organic content indicating a sufficient carbon source and suitable pH for microbial activity under anaerobic condition although most of the organics were in the solid form. The SS and VSS of the sediment slurry were 95,800 and 8,150 mg/l, respectively. Low VSS:SS ratio of 0.09 indicated that most of the solids were inert materials. Nonetheless, there were enough viable microorganisms in the sediment slurry to perform the anaerobic degradation activity since methane gas was produced rapidly and enormously. The characteristics of water and sediment slurry from Erh-Jen River in Taiwan in terms of pH and COD were not determined; however, enormous biogas was observed during the sediment sampling as well. Chen et al. [5] using the same sediment slurry from this site determined the soluble COD of the sediment slurry to be between 65 and 163 mg/l. Therefore, it is believed that the sediment slurries prepared from these two sites had sufficient and suitable nutrients and substrates for anaerobic degradation.

3.2 Effect of Nutrient and Electron Donor Supplement on 2,3,4-CBp Dechlorination

Even though the microorganisms in both sediment slurries were very active in term of anaerobic digestion, only the sediment slurry from the canal could dechlorinate 2,3,4-CBp as shown in Table 1. It is interesting to observe that the sediment slurry from the canal receiving discharge from material recovery facilities could dechlorinate 2,3,4-CBp even without any external supplements implying that the existing substrates and nutrients were already enough to support the dechlorination activity. As a result, the addition of yeast extract did not have any positive effects on the 2,3,4-CBp dechlorination. Pyruvate and lactate could notably improve the dechlorination ability by shortening the lag phase. Since both pyruvate and lactate are primary substrates to acidogenic bacteria, it implies that some acidogens might involve in the CBp-dechlorination process. On the other hand, acetate which promotes that methanogenic activity did not provide

Table 1. Effect of electron donor and nutrient supplement on 2,3,4-CBp dechlorination.

Site	Additive	Dechlorination	Product	Lag Phase (weeks)	Dechlorination completing week
Canal	Control	Yes	2,4-CBp	10	>16
	Yeast Extract	Yes	2,4-CBp	14	>16
	Pyruvate	Yes	2,4-CBp	6	>16
	Pyruvate+Yeast Extract	Yes	2,4-CBp	8	>16
	Acetate	Yes	2,4-CBp	14	>16
	Acetate+Yeast Extract	Yes	2,4-CBp	12	>16
	Lactate	Yes	2,4-CBp	6	>16
	Lactate+Yeast Extract	Yes	2,4-CBp	4	>16
Erh-Jen	Control	No	-	-	-
	Yeast Extract	No	-	-	-
	Pyruvate	No	-	-	-
	Pyruvate+Yeast Extract	No	-	-	-
	Acetate	No	-	-	-
	Acetate+Yeast Extract	No	-	-	-
	Lactate	No	-	-	-
	Lactate+Yeast Extract	No	-	-	-

any improvement in the dechlorination process. It indicated that the methanogenic bacteria might not directly involve in the dechlorination of 2,3,4-CBp. Only 2,4-CBp was detected as a product from 2,3,4-CBp dechlorination. This result indicated that the middle chlorine atom in the biphenyl ring was more susceptible to be removed than other positions similar to the study of Chen et al. [3]. Despite the rapid emerging capability in CBp dechlorination as illustrated by the short lag phase, 2 ppm of 2,3,4-CBp could not be completely degraded in 16 weeks. In contrast to the canal sediment slurry, the sediment slurry prepared from the Erh-Jen River could not dechlorinate 2,3,4-CBp in all scenarios even with the supplement of electron donor and nutrient. This led to an initial hypothesis that there was possibly no CBp-dechlorinator in the microbial matrix of this sediment or the room conditions in Taiwan were not suitable for CBp-dechlorinators. It is important to note that these two streams are in the areas with the difference climate classifications i.e., Thailand is in the tropical climate zone with steady temperature whereas Taiwan is in the temperate climate zone with low temperature during the winter. Hence the native microbes in the sediment of the canal in Thailand should be more diverse than those in the Erh-Jen River in Taiwan due to the effect of temperature. In addition, it was also found that this canal was more polluted than the Erh-Jen River in Taiwan. The abundant substrate and nutrient in the sediment of this canal might intensify the diversity and activity of the microbes to be further superior than those in the Erh-Jen River sediment.

Cho and Oh [6] indicated that microbiological populations were different from location to location and, hence, they may show different dechlorination ability. Chen et al. [7] found that the HCB-dechlorinators' activity was utmost between 30 and 40°C (typical temperature in Thailand) and became deteriorated as the temperature rose or dropped below this range. Furthermore, Chen et al. [5] were able to use mineral medium and yeast extract to stimulate the 2,3,4-CBp dechlorination ability of the sediment slurry of the Erh-Jen River. They found that the dechlorination could happen within 8 weeks of the incubation at 30°C and the only one intermediate product found was 2,4-CBp similar to this study in the case of sediment slurry from the canal. On the other hand, they found no dechlorination happen within 24 weeks in the control set without mineral medium and yeast extract supplement. This suggests that the 2,3,4-CBp-dechlorinating microorganisms actually existed in the sediment of Erh-Jen River; however, they required the right environments to promote their dechlorination activities.

3.3 Effect of Supplement Rate on 2,3,4-CBp Dechlorination

To verify whether the incompetent in substrate and nutrient uptake of the CBp-dechlorinators was actually the cause of no dechlorination activity observed in the sediment slurry prepared from the Erh-Jen River, the electron donor and nutrient was supplied continuously every two weeks. This supplement pattern ensured that the electron donor and nutrient would be present ceaselessly in the medium and, thus, sufficiently available for CBp-dechlorinators to take up and perform the dechlorination activities. However, the results still showed that 2,3,4-CBp could not be dechlorinated within 8 weeks of continuous supplement. As a result, it implies that the microbial consortiums in the sediment from Erh-Jen River might indeed contain no CBp-dechlorinator.

4. Conclusions

2,3,4-CBp could be dechlorinated to 2,4-CBp in the sediment slurry prepared from the sediment and water collected from the canal receiving the discharge from small material recovery facilities in Thailand without any supplement of electron donor or yeast extract. However, the sediment slurry of Erh-Jen River in Taiwan could not dechlorinate even with continuous supplement of substrate and nutrient suggesting different microbial diversity and activity between these two sediments. Temperature and substrate availability were most possible factors controlling the dechlorination process. Pyruvate and lactate could promote the dechlorination process in the canal sediment slurry implying that some species of acidogenic bacteria might involve in the 2,3,4-CBp dechlorination process whereas the methanogenic bacteria which use acetate as their substrate might not be the primary dechlorinator controlling the 2,3,4-CBp degradation. The result from the sediment slurry from Erh-Jen River also indicated that the development of the dechlorinator population and its activity took a long period of time.

5. Acknowledgments

This research was supported by the Thailand Research Fund and the Commission on Higher Education, Ministry of Education (Grant No. RMU-5080012). This study was also co-supported by the National Center of Excellence for

Environmental and Hazardous Waste Management, Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thailand, the National Science Council of the Republic of China (NSC 95-2313-B-041-004), and Department of Environmental Resources Management, Chia Nan University of Pharmacy and Science, Taiwan.

6. References

- [1] Watanabe, S., Laovakul, W., Boonyathumanondh, R., Tabucanon, M. S. and Ohgaki, S., 1996. Concentrations and composition of PCB congeners in the air around stored used capacitors containing PCB insulator oil in a suburb of Bangkok, Thailand. *Environmental Pollution*, 92: 289-297.
- [2] Abramowicz, D.A., 1990. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs. *Biotechnology*, 10 (3): 241-251.
- [3] Chen, I.M., 2002. Reductive Dechlorination of Hexachlorobenzene under Various Additions. *Water, Air, and Soil Pollution*, 139: 61-74.
- [4] APHA, 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th-Edition, APHA, AWWA, WEF.
- [5] Chen, I.M., Huang, H.W., Wang, J.C. and Chyan, J.M., 2004. PCB-Dechlorination capability of sediment microbes in Erh-Jen River. Asian Regional Workshop on Environmental Pollution Control Technology. August 16, Tainan, Taiwan.
- [6] Cho, C.Y. and Oh, H.Y., 2005. Effect of sulfate concentration on the anaerobic dechlorination of polychlorinated biphenyls in Estuarine Sediments. *Journal of Microbiology*, 43 (2):166-171.
- [7] Chen, I.M., Wanitchapichat, W., Jirakittayakorn, T., Sanohniti, S., Sudjarid, W., Wantawin, C., Voranisarakul, J. and Anotai, J., 2010. Hexachlorobenzene Dechlorination by Indigenous Sediment Microorganisms. *Journal of Hazardous Materials* (in press).