



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเพิ่มพูนและการจำแนกจุลินทรีย์เพื่อลดคลอรีนโพลีคลอรีเนตเต็ตไบฟีนิลโดย
ตะกอนดินลำคลอง

โดย นางสาววิจิตรา สุจริต และคณะ

พฤษภาคม พ.ศ.2561

สัญญาเลขที่ TRF5780121

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเพิ่มพูนและการจำแนกจุลินทรีย์เพื่อลดคลอรีนโพลีคลอรีเนตต์ไปฟีนอลโดยตะกอนดิน
ลำคลอง

คณะผู้วิจัย

สังกัด

นางสาววิจิตรา สุจริต

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

รองศาสตราจารย์ ดร.จันท อโณทัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปผู้บริหาร

การเพิ่มพูนและจำแนกกลุ่มจุลินทรีย์ลดคลอรีนโพลีคลอรีเนตเตไบ์ฟีนิลในตะกอนดินลำคลอง มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) เพื่อประเมินความยั่งยืนของประสิทธิภาพการลดคลอรีนของจุลินทรีย์หลังการเก็บกักภายใต้อุณหภูมิต่ำ (4 °C) และ 2) เพื่อกระตุ้นและจำแนกกลุ่มจุลินทรีย์ลดคลอรีนที่ถูกเพิ่มพูนโดยใช้กลุ่มฮาโลจิเนตเต็ด ตะกอนดินเหลวถูกเก็บจาก 7 พื้นที่ในเขตพื้นที่จังหวัดสมุทรปราการ ประกอบไปด้วย 1) คลองห้วยลำภูทอง 2) เขตอุตสาหกรรมบางพลี จำนวน 2 พื้นที่ 3) โรงไฟฟ้าพระนครใต้ 4) โรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า จำนวน 2 พื้นที่ และ 5) คลองบางปลากด (พื้นที่ปนเปื้อนมลพิษต่ำ) ตะกอนดินใหม่และตะกอนดินเก่าถูกนำมาทดสอบเพื่อประเมินความสามารถในการลดคลอรีนอย่างต่อเนื่อง ซึ่งกลุ่มฮาโลจิเนตเต็ดประกอบไปด้วย methyl 4-bromobenzene, 14-dibromobezene, 4-bromobenzonitrile และ 4-bromobezoic hydrazide เลือกมากระตุ้นการเพิ่มประสิทธิภาพการลดคลอรีน ผลการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มการลดคลอรีนใน 234-และ 2345-CBps อย่างชัดเจนในตะกอนดินเหลวที่เก็บมาจากทุกพื้นที่ การทดลองนี้ยังแสดงถึงสาเหตุของการเจือยของจุลินทรีย์กลุ่มลดคลอรีนอาจเกิดเนื่องจากการไม่ได้รับสารมลพิษอย่างต่อเนื่องและการรบกวนจากข้อจำกัดทางสภาพแวดล้อมเมื่อผ่านการจำลองการเก็บกักภายใต้อุณหภูมิต่ำ (4 °C) นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ 16S rRNA DGGE พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่มีส่วนในการลดคลอรีนในพีซีบีคือกลุ่ม *Firmicutes* และ *Proteobacteria* การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพการฟื้นฟูพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนด้วยสารมลพิษในประเทศไทยได้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRF5780121

ชื่อโครงการ: การเพิ่มพูนและการจำแนกจุลินทรีย์เพื่อลดคลอรีนโพลีคลอรีเนตเต็ดไปฟีนิลโดยตะกอนดินลำคลอง

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: นางสาววิจิตรา สุจริต มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

อีเมล: wichidtra.s@snru.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 มิถุนายน 2557 – 30 เมษายน 2561

บทคัดย่อ:

โพลีคลอรีเนตเต็ด (พีซีบี) คงค้างและปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) เพื่อประเมินความยั่งยืนของประสิทธิภาพการลดคลอรีนของจุลินทรีย์หลังการเก็บกักภายใต้อุณหภูมิต่ำ และ 2) เพื่อกระตุ้นและจำแนกกลุ่มจุลินทรีย์ลดคลอรีนที่ถูกเพิ่มพูนโดยใช้กลุ่มฮาโลจิเนตเต็ด ตะกอนดินเหลวถูกเก็บมาจาก 7 พื้นที่ในเขตพื้นที่จังหวัดสมุทรปราการ ประเทศไทย ตะกอนดินใหม่และตะกอนดินเก่าถูกนำมาทดสอบเพื่อประเมินความสามารถในการลดคลอรีนอย่างต่อเนื่อง คอนเจนเนอร์วเดียวและอย่างง่ายถูกนำมาทดสอบ ผลการศึกษาพบว่าตะกอนดินใหม่มีประสิทธิภาพในการลดคลอรีนซึ่งตะกอนดินเก่าแสดงถึงความเฉื่อยของจุลินทรีย์ กลุ่มฮาโลจิเนตเต็ดประกอบไปด้วย methyl 4-bromobenzene, 14-dibromobezene, 4-bromobenzonitrile และ 4-bromobezoic hydrazide สามารถเพิ่มการลดคลอรีนใน 234-และ 2345-CBps อย่างชัดเจนในตะกอนดินเหลวที่เก็บมาจากพื้นที่ปนเปื้อนมลพิษมากหรือน้อย จากการวิเคราะห์ 16S rRNA DGGE พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่มีส่วนในการลดคลอรีนในพีซีบีคือกลุ่ม *Firmicutes* และ *Proteobacteria* ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพการฟื้นฟูพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนด้วยสารมลพิษในประเทศไทยได้

คำหลัก : กลุ่มฮาโลจิเนตเต็ด, การฟื้นฟูสภาพพื้นที่, รีดักทีฟ ดีคลอรีเนชัน

Abstract

Project Code : TRF5780121

Project Title : Enhancing and Characterization of Microorganisms to
Dechlorinate Polychlorinated Biphenyls (PCBs) by Canal
Sediment

Investigator : MS.Wichidtra Sudjarid, Sakon Nakhon Rajabhat University

E-mail Address : wichidtra.s@snru.ac.th

Project Period : 2 June 2014 – 30 April 2018

Abstract:

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are very persistent and contaminated in the environment. The aims of this research are: 1) to determine the sustainability of dechlorination ability of the microbes after a long-term storage; and 2) to activate and characterize the enrichment of PCBs dechlorinating microbes by using priming congeners. Sediment slurries were collected from several streams around Samuth Prakan Province of Thailand. Fresh and storage sediment slurries were tested and compared to evaluate the dechlorination ability and microbial sustainability. Single and simple PCB congeners were applied individually. Fresh slurries could effectively dechlorinate the PCBs; whereas storage slurry was somehow less-active. Halogenated priming congeners including methyl 4-bromobenzene, 1,4-dibromobenzene, 4-bromobenzonitrile, 4-bromobenzoic hydrazide could significantly enhance the dechlorination of 234- and 2345-CBPs in the sediments collected from both low and heavily contaminated areas. From the 16S rRNA DGGE analysis, the bacteria responsible for PCB dechlorination were *Firmicutes* and *Proteobacteria*. The results from this study showed a potential in-situ cleanup for PCB contaminated areas in Thailand.

Keywords: Halogenated Primers; Remediation; Reductive Dechlorination

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

การวิจัยครั้งนี้จะเป็นการทำงานต่อเนื่องจากการลดคลอรีนโพลีคลอรีเนตเตตไบฟีนิล (PCBs) และเฮกซะคลอโรเบนซีน (HCB) ซึ่งมีการเผยแพร่โดย Anotai, J และคณะ, 2010; Chen, I-M. และคณะ, 2010; Sudjarid, และคณะ, 2012 ถึงแม้ว่าพีซีบีและเอชซีบีถูกยกเลิกการใช้ในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 2001 และ 1980 ตามลำดับ แต่ยังตรวจพบจากแม่น้ำเจ้าพระยาและปากแม่น้ำในประเทศไทย (Boonyatumanond, R และคณะ 2007) ซึ่งสิ่งเหล่านี้บ่งชี้ถึงการแหล่งปนเปื้อนของ PCBs หรือ HCB ในความเข้มข้นสูงก่อนการยกเลิกใช้ ตลอดจนอุบัติเหตุการรั่วไหลจากทรานเฟอร์เมอร์และคาร์บาซิเตอร์ที่ไม่ใช่แล้ว และการลักลอบใช้สารเคมีเหล่านี้ อาจยังเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง

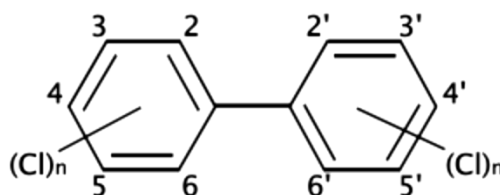
อย่างไรก็ตามผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า HCB และกลุ่มพีซีบีอย่างง่าย เช่น 234-ซีบีพี และ 2345-ซีบีพี เป็นต้น สามารถลดคลอรีนด้วยกลุ่มจุลชีพดั้งเดิม และการลดคลอรีนของ PCBs และ HCB สามารถเริ่มต้นลดคลอรีนโดยไม่มีการเติมสารอาหารเสริมจากภายนอก หรือการปรับปรุงประสิทธิภาพการลดคลอรีน PCBs โดยใช้จุลชีพตะกอนดินเหลวที่มีประสิทธิภาพได้โดยไม่ต้องผ่านการปรับปรุงกลุ่มจุลชีพด้วยการใช้เทคนิค Bioaugmentation (Anotai, J และคณะ, 2010; Chen, I-M. และคณะ, 2010; Sudjarid, และคณะ, 2012) ข้อค้นพบนี้แตกต่างจากการศึกษาในเมืองเกาสง ประเทศไต้หวันที่ไม่พบการลดคลอรีนเกิดขึ้นใน HCB โดยกลุ่มจุลชีพดั้งเดิมที่มีผ่านกระบวนการปรับปรุงใดๆ (Chen และคณะ, 2004) และในตะกอนดินจาก Woods Pond เมือง Pittsfield, MA, United States (Wu, Q และคณะ 1997) ซึ่งจัดอยู่ในเขต Continental climate ดังนั้นภายใต้สภาวะอากาศเย็นอาจเกิดผลกระทบทางลบต่อการลดคลอรีน ซึ่งอาจสามารถอ้างถึงพื้นที่ในประเทศที่สภาพภูมิอากาศแตกต่างกันมาก ๆ เช่น สภาพภูมิอากาศที่มีความแตกต่างอย่างมากในช่วงฤดูร้อนและฤดูหนาว ซึ่งโดยส่วนมากอยู่ในเขตในประเทศที่พัฒนาแล้ว อาทิ อเมริกา ญี่ปุ่น เป็นต้น ซึ่งประเทศเหล่านี้จัดสารประกอบดังกล่าวเป็นมลพิษสารอินทรีย์คงค้างยาวนานในสิ่งแวดล้อม (Winchell, L.J. and Novak, P.J., 2008; Nollet, H. and Verstraete, W., 2003)

ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จะดำเนินการต่อเนื่องเพื่อศึกษาความสามารถการลดคลอรีนกลุ่มจุลชีพในสภาวะอากาศเย็น (4 °C) การฟื้นฟูและจำแนกกลุ่มจุลชีพลดคลอรีนกลุ่มหลักในตะกอนดิน สุดท้ายนี้การศึกษาค้นคว้านี้จะสามารถนำสู่ความเข้าใจมากยิ่งขึ้นในการลดคลอรีนของพีซีบีที่ปนเปื้อนในดินซึ่งสามารถก่อให้เกิดเทคนิคมลพิษชีวบำบัดในพื้นที่ได้

2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โพลีคลอรีเนตเตตไบฟีนิล (พีซีบี) จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบกลุ่ม aromatic biphenyls ที่คลอรีนสามารถแทนที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโครงสร้างตั้งแต่ 1 ถึง 10 อะตอม ส่งผลให้เกิดโครงสร้างที่เปลี่ยนไปทั้งสิ้น 209 คอนเจนเนอร์ (Congeners) ซึ่งลักษณะรูปร่างโดยทั่วไป ดังแสดงในภาพที่ 1 เนื่องจากลักษณะโครงสร้างดังกล่าวส่งผลให้พีซีบีจัดอยู่ในกลุ่มของ Hydrophobic compounds ที่สามารถละลายน้ำได้น้อยมากหรือแทบจะไม่ละลายเลย มีความ

ด้านการออกซิไดซ์และถูกรีดิวซ์ เป็นต้น จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นส่งผลให้ พีซีบี คงค้างในสิ่งแวดล้อม และถูกจัดอยู่ในหนึ่งของสารเคมีคงค้างยาวนานในสิ่งแวดล้อม (Persistent Organic Pollutants: POPs)



ภาพที่ 1 ภาพลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของ โพลีคลอริเนตเตตไบฟีนิล (พีซีบี)

(<http://www.hvatoday.org/>)

ปริมาณของพีซีบีมากกว่า 1.5 ล้านตันถูกผลิตและใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลกในช่วงปี 1930 ถึง กลางปี 1980 (MacDonals, D.D. และคณะ, 2000) เนื่องจากคุณสมบัติหลักของพีซีบี ที่ไม่ละลายน้ำส่งผลให้พีซีบีเมื่อปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะสามารถดูดซับ (Adsorption) ได้ดีใน สารอินทรีย์ในอนุภาคดิน เกิดการสะสมสารพิษในสิ่งแวดล้อม (Bioaccumulation) และมี ศักยภาพในการถ่ายทอดสารพิษผ่านห่วงโซ่อาหาร (Biomagnification) อาจส่งผลต่อสุขภาพ มนุษย์เมื่อได้รับสารพีซีบีสะสมเป็นระยะเวลายาวนานอาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ (Carcinogenic substrate) พีซีบี สามารถลดคลอรีน ทั้งในสภาวะใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ ซึ่งโครงสร้างของ พีซีบีที่มีคลอรีนเป็นส่วนประกอบสูง (มากกว่า 3 อะตอม) จะสามารถลดคลอรีนได้ในสภาวะไร้ อากาศแต่ไม่สามารถย่อยสลายได้เลยหรือน้อยมากภายใต้สภาวะใช้อากาศ โดยอัตราการลด คลอรีนภายใต้สภาวะไร้อากาศจะต่ำกว่าสภาวะใช้อากาศ (Abramowicz, D.A. 1994)

ประเทศไทย ได้ทำการศึกษาการลดคลอรีนของเอชซีบีสามารถเกิดขึ้นได้ดีภายใต้ สภาวะไร้อากาศในตะกอนดินแม่น้ำธรรมชาติด้วยจุลชีพดั้งเดิมโดยไม่มีการเติมสารอินทรีย์หรือ สารอาหารจากภายนอกหรือการเพิ่มพูนจำนวนจุลินทรีย์ (Anotai, J และคณะ, 2010; Chen, I-M. และคณะ, 2010; Sudjarid, และคณะ, 2012) และนอกจากนี้ยังพบว่าพื้นที่เหล่านี้ยังสามารถ ลดคลอรีนของโครงสร้างพีซีบีพื้นฐานได้อีกด้วย โครงสร้างของ 234-Trichlorobiphenyls (234-CBPs) และ 2345-Tetrachlorobiphenyls (2345-CBPs) เป็นโครงสร้างที่มีคลอรีนเป็น ส่วนประกอบในวงแหวนอะโรมาติกเพียงวงเดียวซึ่งมีความอ่อนไหวที่จะใช้ในการทดสอบ ประสิทธิภาพในการลดคลอรีนเบื้องต้นของจุลชีพ

อัตราการลดคลอรีนสามารถปรับปรุงได้จาก 1) การเติมตัวให้อิเล็กตรอน เช่น สารอินทรีย์ระเหยง่าย และ ตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นต้น (Bedard D. L., Quensen, J.F.III. 1995.; Nies, L. and Vogel, T. M. 1990) และ 2) การเติมตัวรับอิเล็กตรอน เช่น ฮาโลจีเนต เตตราฟลูออไรด์ ซัลเฟต หรือ ไนเตรต เป็นต้น (Wiegel, J. and Wu, Q. 2000; Krumins, V., 2009) การใช้ไบโรมิเนตไบฟีนิลเพื่อกระตุ้นการลดคลอรีนของกลุ่ม Aroclor 1260 ในดินแม่น้ำ

Housatonic พบว่ากระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญสำคัญ (Bedard, D.L. และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังพบฮาโลจิเนตเบนโซเอต (Halogenated benzoate) และ สารประกอบกลุ่มฮาโลจิเนตเต็ดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการลดคลอรีนในพีชีบีได้ (Kim, A.D. and Bedard, D.L. 1999) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ใช้ในเทอมของ “พาร์เมอร์” ในการศึกษาการกระตุ้นการลดคลอรีนของจุลินทรีย์

การลดคลอรีนสามารถเกิดขึ้นได้ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน เช่น methanogenic, sulfate reductive, and denitrifying (Chang, B. V. และคณะ 1999) ด้วยรูปแบบการลดคลอรีนที่แตกต่างกัน (Bedard D. L., Quensen, J.F.III. 1995) การจำแนกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถลดคลอรีนได้ถูกจำแนกภายใต้สภาวะสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน ทั้งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ความเครียด หรือจากเพิ่มพูนจำนวนจุลชีพ ซึ่งพบว่า กลุ่มจุลชีพที่จำแนกจาก St. Lawrence River พบ Eubacteria including *Escherichia coli*, *Lactoshaera pasteurii*, *Clostridium thermocellum*, and *Dehalobacter restrictus*) and Archaeal such as *Methanosarcina barkeri* (Oh, K.-H., และคณะ, 2008) และยังพบกลุ่ม *Dehalococcoides spp.* (Fennell D.E. และคณะ, 2004; Bedard, D. L. และคณะ 2007) *Chloroflexi phylums* (Cutter L.A. และคณะ 2001) and *Dehalococcoides mccartyi* (Orphan V.J. และคณะ 2001) มีบทบาทหน้าที่สำคัญในการลดคลอรีนของพีชีบี

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่างานวิจัย พบว่าการลดคลอรีนสามารถเกิดขึ้นได้ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน กลุ่มจุลชีพที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกกลุ่มจุลชีพที่สามารถลดคลอรีนโดยใช้สารประกอบกลุ่มฮาโลจิเนตเต็ดพาร์เมอร์ และศึกษาความสามารถในการลดคลอรีนของจุลชีพภายใต้สภาวะจำลองอุณหภูมิต่ำ (4 °C) เป็นระยะเวลา 1 ปี

3. วัตถุประสงค์

การศึกษานี้ประกอบไปด้วยวัตถุประสงค์หลักจำนวน 2 ข้อดังนี้

1. เพื่อปรับปรุงความสามารถในการลดคลอรีนของกลุ่มจุลชีพลดคลอรีนพีชีบีโดยใช้สารประกอบกลุ่มฮาโลจิเนตเต็ดพาร์เมอร์ (Halogenated Primers)
2. เพื่อจำแนกกลุ่มจุลชีพลดคลอรีนพีชีบีโดยใช้เทคนิค PCR-DGGE

4. วิธีทดลอง

4.1 พื้นที่ที่ใช้ในการศึกษา

ดินและน้ำตัวอย่างทำการเก็บตัวอย่างมาจากพื้นที่โดยรอบเขตอุตสาหกรรมบางปู จังหวัดสมุทรปราการ ประเทศไทย ประกอบไปด้วย 5 พื้นที่หลัก (ภาพที่ 2) ดังนี้ 1) พื้นที่คลองหัวลำภูทอง (HLP) ซึ่งได้รับน้ำทั้งที่ผ่านการบำบัดและไม่ผ่านกระบวนการบำบัดน้ำทั้งจากเขตอุตสาหกรรมบางปูและโรงงานในพื้นที่ใกล้เคียง และยังพบว่ามียุทียภาพในการลดคลอรีนในเอชซีบีได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Chen, I-M. และคณะ, 2010); 2) พื้นที่คลองรับน้ำทั้งจากระบบบำบัดน้ำเสียกลางจากเขตโรงงานอุตสาหกรรมบางพลี (BP1, BP2) ซึ่งทั้ง 2 จุดเก็บตัวอย่างได้รับน้ำเสียจากเขตโรงงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตชิ้นส่วนอิเล็กทรอนิกส์; 3) พื้นที่คลองรับน้ำเสียจากโรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า (MF1, MF2) ซึ่งอาจมีการรั่วไหลของพีซีบีการการแยกชิ้นส่วนขยะอิเล็กทรอนิกส์; 4) พื้นที่คลองข้างโรงงานไฟฟ้าพระนครใต้ ที่ยังมีการเก็บรักษา transformers and capacitors ที่เลิกใช้แล้วอยู่ และ 5) พื้นที่คลองบางปลากด (BPK) ที่มีคุณภาพค่อนข้างดี โดยใช้เป็นพื้นที่อ้างอิงในการปนเปื้อนมลพิษน้อย

ดินที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการลดคลอรีนใช้ทั้ง ตัวอย่างดินใหม่และดินเก่า ด้วยการรวบรวมเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกันดังนี้ ตัวอย่างดินใหม่ นำมาทำการทดสอบโดยทันที แต่ตัวอย่างดินเก่าทำการเก็บรักษาตัวอย่างดินเป็นระยะเวลา 1 ปี ภายใต้อุณหภูมิ (4 °C) เพื่อจำลองสภาพอากาศเย็น



ภาพที่ 2 พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างดินและน้ำเพื่อใช้ในการศึกษา หมายเหตุ: (1) คลองหัวลำภูทอง (HLP) (2) เขตโรงงานอุตสาหกรรมบางพลี (BP1,2) (3) โรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า (MF1,2) (4) โรงงานไฟฟ้าพระนครใต้ (PWP) (5) คลองบางปลากด (BPK) (<https://www.google.map>)

4.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็น reagent grade สารเคมีมาตรฐาน 234-CBp and 2345-CBp สั่งจาก AccuStandard, Inc. (USA) Methyl 4-bromobenzene (4-MBZ), 14-Dibromobezene (14-DBZ), 4-Bromobenzonitrile (4-BN), 4-Bromobezoic hydrazide (4-BH) สั่งจาก Sigma Aldrich, Inc. (USA) สต็อกสารมาตรฐานถูกเตรียมใน Acetone เก็บในตู้เย็น (4 °C) ตัวทำละลายที่ใช้เลือกใช้ในมาตรฐานเครื่องมือก๊าซโครมาโทกราฟี

4.3 การเตรียมตะกอนดินเหลวและการจำลองตะกอนดินเหลว

ตะกอนดินเหลวเตรียมใน 2 ลักษณะดังนี้ ตะกอนดินเหลวใหม่ วิธีการเตรียมคือ นำตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บมาใหม่ทำการผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (โดยปริมาตร) หลังจากนั้นกรองเพื่อแยกขนาดอนุภาคที่ใหญ่กว่า 0.7 มิลลิเมตรออก แล้วนำตัวอย่างที่เตรียมเก็บในขวดยางปิดด้วยจุกยาง และฟอลลูมิเนียมเพื่อใช้ในการจำลองสภาวะไร้อากาศ สำหรับตัวอย่างดินจำลองสภาพอากาศหนาว มีวิธีการเตรียมตัวอย่างเหมือนกันกับตะกอนดินใหม่ และนำดินที่จำลองสภาพอากาศเย็นเป็นระยะเวลา 12 เดือน ผสมกับน้ำตัวอย่างใหม่แทน

เมื่อทำการเตรียมตะกอนดินบรรจุในขวดยางปิดแล้ว หลังจากนั้นเติม 0.1 มล. ของสารฟิซีบีเป้าหมายลงไปเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2 มก./ล. ฮาโลจิเน็ตเตดพาร์เมอร์ทำการเตรียมที่ความเข้มข้นสต็อกที่ 50,000 มก./ล. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 75 มก./ล. อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเติมอัตราส่วนของ acetone ลงไปน้อยกว่า 0.5% (โดยปริมาตร) เพื่อป้องกันผลของการส่งเสริมหรือยับยั้ง acetone ต่อการทดลองนี้

ชุดการทดลองถูกเก็บไว้ในขวดยางปิดสนิทเก็บไว้ในที่มืด ภายใต้อุณหภูมิห้อง ชุดการทดลองที่ควบคุมใช้ชุดที่ไม่มีการเติมฮาโลจิเน็ตเตดพาร์เมอร์ ในการประเมินประสิทธิภาพการลดคลอรีนด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้นใดๆ

4.4 การสกัดฟิซีบีและการวิเคราะห์

การสกัดตัวอย่างโดยปรับปรุงจากวิธี Solvent and Ultrasonic Extraction (EPA 3550) ตัวอย่างตะกอนดินถูกดึงออกมาจากขวดยางปิดด้วยเข็มฉีดยาภายนอกขนาด 22G×2 และฉีดลงในหลอดสกัดที่เติม 6N NaOH ปริมาณ 0.2 มล. เติมน้ำละลาย Hexane ปริมาณ 2.0 มล. จากนั้นเขย่าให้ตะกอนดินเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย เข้าเครื่อง Ultrasonic เป็นเวลา 10 นาที เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกชั้นตะกอนดินและสารละลาย จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสขึ้นมาใส่ในหลอดใหม่ ทำซ้ำในกระบวนการเติมน้ำละลายอีก 1 ครั้ง จนปริมาณสารสกัดสุดท้ายได้ 5 มล. เติมน้ำ NaSO_4 เล็กน้อยเพื่อกำจัดความชื้นส่วนที่เหลือในสารสกัด ซึ่งสารสกัดถูกนำไปวิเคราะห์โดยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟีต่อไป การคำนวณปริมาณความเข้มข้นของฟิซีบีคงเหลือด้วยสารมาตรฐานภายนอก ประสิทธิภาพในการสกัดด้วยวิธีการนี้มากกว่าร้อยละ 75 ขึ้นไป

4.5 การวิเคราะห์พีซีบีด้วยก๊าซโครมาโตกราฟี

วิธีวิเคราะห์พีซีบีเป้าหมายและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ปรับปรุงจากวิธีมาตรฐาน US EPA 8082A method for GC/ μ ECD (quantification) และวิธี EPA 680 method for GC/MS (qualification) คุณสมบัติของ Gas chromatograph capillary column (6890N from Agilent Technologies (USA)) equipped with a μ ECD (J & W Scientific of Agilent Technologies (USA)) and 30-m $\times$ 0.25-mm ID fused-silica capillary column chemically bonded with SE-54 (HP-5) with 0.25- μ m film thickness

การยืนยันโดยใช้เครื่องมือ GC/MS (5730 Network from Agilent Technologies (USA)) Electron impact ionization as ion sources and quadrupole mass analyzer and 30-m $\times$ 0.25-mm ID fused-silica capillary column chemically bonded with SE-54 (DB-5MS, J & W Scientific from Agilent Technologies (USA)) with 0.25- μ m film thickness

เงื่อนไขในการวิเคราะห์ของก๊าซโครมาโตกราฟทั้ง 2 เครื่อง มีดังนี้ 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 were set at 280°C and 300°C, respectively. Nitrogen and helium gases were used as the makeup (20 ml/min) and carrier (1 ml/min) gases, respectively. The split ratio was kept at 10:1.

4.6 การบ่มเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการจำแนกกลุ่มจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ลดคลอรีนในตะกอนดินเหลวถูกนำมาเพิ่มพูนและเพิ่มจำนวนโดยใช้เทคนิค serial-transfer technique และเติม medium 0.5% of yeast extract (20%, v/v) หลังจากสิ้นสุดการลดคลอรีนในชุดการทดลอง 234- and 2345-CBPs ที่มีการเติมฮาโลจิเนตเต็ดพาร์เมอร์ ถูกเลือกเพื่อนำมาบ่มเชื้อจุลินทรีย์ประกอบไปด้วย พื้นที่ BP1, BP2, PWP, BPK ที่มีการเติม 4-MBZ และ 4-BN

4.7 การหาลำดับชั้น DNA และ PCR-DGGE

เพื่อวิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์ ตะกอนดินเหลวปริมาตร 1 มล.ถูกนำมาใช้ในการสกัด DNA ตะกอนดินเหลวถูกนำมาปั่นเหวี่ยงก่อนทำการสกัดโดยใช้ UltraClean[®] Soil DNA kit (MOBIO Laboratories, Inc. (USA)). The genomics DNA were further processed to increase the sensitivity using nested PCR technique. The DNA was diluted 10 times with sterile PCR-quality water, and 2 ng of the templates were used with 50 μ L reaction mixture for PCR amplification with Universal Eubacteria primers EUB_{8f} (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and U_{1492r} (5'-GGTTACCTTGTTACGA-3')¹⁹. Within 50 μ L were contained 0.1 μ M of each primer and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Qiagen

(Germany)). The PCR amplification program was 5 min at 95°C and then 25 cycles of 0.5 min at 95°C, 0.3 min at 55°C, 2 min at 72°C, followed by a final extension at 72 °C for 7 min and a final hold at 4°C.

Reamplified PCR products for DGGE analysis were used primers 338_{GC-f} (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') and 518_r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')¹⁹. The amplification program was 5 min at 95°C and then 30 cycles of 0.5 min at 95°C, 0.3 min at 60°C, 0.5 min at 72°C, followed by a final extension at 72 °C for 7 min and a final hold at 4°C. PCR products were analyzed on 1.2% Agarose gel to collect molecular size.

4.8 การวิเคราะห์ Denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing

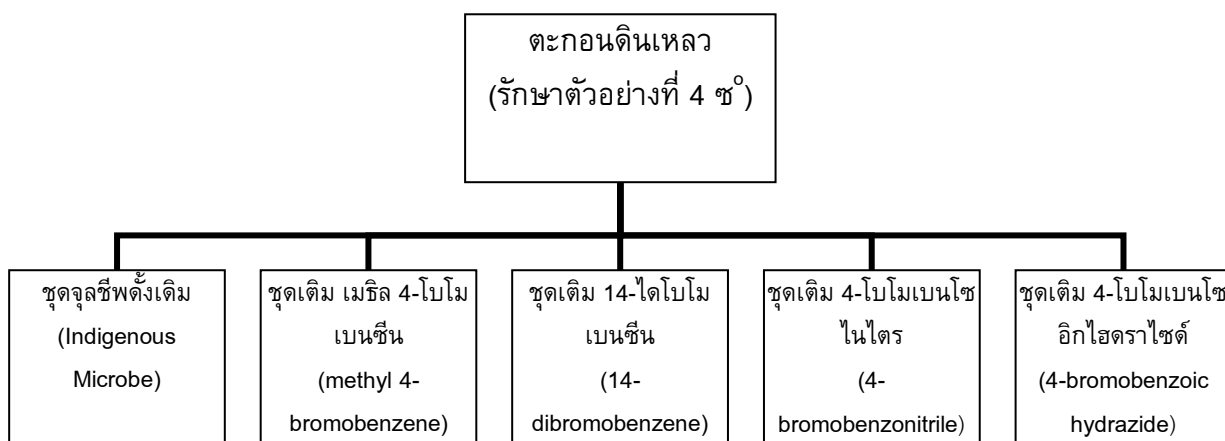
สารสกัด DNA ปริมาตร 18 µL of reamplified PCR products with 338GC-f ถูกใส่ลงไปใน 7.5% acrylamide gels in 1xTris-acetate-EDTA (1xTAE). เพลอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่าง 40 to 50, ซึ่ง 100% denaturant ประกอบไปด้วย 5.6 M urea and 40% (v/v) formamide in 1xTAE. The DGGE ได้นำวิธีของ Moyer et al. (1993) มาปรับปรุงโดยใช้เครื่องมือ DGGE-2000 system instrument (CBS Scientific Company, Del Mar, CA (USA)). เจล electrophoresis ถูกแยกที่อุณหภูมิ 60°C เวลา 5 ชั่วโมง ใน 0.5xTAE buffer ที่ 200 V. The gel was stained with STBR Green nucleic acid stain (Molecular Probes, Eugene, OR (USA)) for 30 min and DNA fragments were visualized on an UV transilluminator (Biovision CN 1,000/26M, Vilber Lourmat (France)). The individual intensity DGGE bands were collected; each band was resuspended into 20 µL Milli-Q water and stored at 4°C overnight. The DNA were eluted from acrylamide gel, elution was used as a template to reamplify by using the primer set without GC-clamp. The PCR products were purified by using Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech, Ltd., (USA)). Sequences were initially compared to know 16S rRNA gene sequences in the GenBank database using the BLASTn to locate nearly exact matches in the GenBank database

5. การทดลองครั้งนี้สามารถแบ่งออกเป็น 3 แผนการทดลองดังต่อไปนี้

5.1 แผนการทดลองที่ 1 ผลของการใช้ฮาโลจิเนตเต็ตพาร์มเมอร์ในการลดคลอรีนพีซีบี

แผนงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับปรุงประสิทธิภาพการลดคลอรีนของ 234-ซีบีพี และ 2345-ซีบีพี โดยใช้ฮาโลจิเนตเต็ตพาร์มเมอร์ (priming congeners) เป็นตัวกระตุ้น (inducer) กลุ่มพาร์เมอร์ที่ถูกเลือกประกอบด้วย เมธิล 4-โบโมเบนซีน (methyl 4-bromobenzene) 14-ไดโบโมเบนซีน (14-dibromobenzene) 4-โบโมเบนโซไนไตร (4-bromobenzonitrile) และ 4-โบโมเบนโซอิกไฮไดรไซด์ (4-bromobenzoic hydrazide) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้เคยพบว่าสามารถกระตุ้นจุลชีพลดคลอรีนในกระบวนการลดคลอรีน ซึ่งตะกอนดินที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิเย็น (4 °C) เป็นระยะเวลา 6 เดือน จะนำไปใช้ในการศึกษาในแผนภูมิการทดลองแสดงในภาพที่ 1

สต็อกสารละลายกลุ่มพีซีบีจะเตรียมที่ความเข้มข้น 1,000 มก./ล. และสารตั้งต้นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะแยกเติมลงไปในช่วงยาฉีดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อให้ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 2 มก./ล. สารกลุ่มฮาโลจิเนตเต็ตพาร์มเมอร์จะแยกเติมจากสต็อกสารละลายที่ 50,000 มก./ล. เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 75 มก./ล. การลดคลอรีนของพีซีบีโดยกลุ่มจุลชีพดั้งเดิมเตรียมเพื่อการเปรียบเทียบศักยภาพการลดคลอรีน ช่วงยาฉีดตัวอย่างทั้งหมดจะเก็บไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง สภาพไร้อากาศ ตัวอย่างจะดูดด้วยเข็มฉีดยาปลายเปิดขนาด 0.70 มิลลิเมตร (22Gx2) ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์ทั้งพีซีบีคงเหลือและกลุ่มฮาโลจิเนตเต็ตพาร์มเมอร์



ภาพที่ 1 แผนการทดลองผลของการใช้ฮาโลจิเนตเต็ตพาร์มเมอร์ในการลดคลอรีนพีซีบี

5.2 แผนการทดลองที่ 2 การเพิ่มพูนจุลชีพลดคลอรีนพีซีบี

การทดลองนี้จะต่อเนื่องจากการทดลองชุดที่ 1 ชุดการทดลองที่มีศักยภาพในการลดคลอรีนสูงจะถูกเลือกเพื่อนำมาเพิ่มพูนกลุ่มจุลชีพลดคลอรีนด้วยเทคนิคการแบ่งเป็นชุด โดยทำการตั้งกลุ่มจุลชีพที่เลือกแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเติมลงใน 40 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงจุล

ซีฟสภาพไร้อากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในขวดยางฉีดปริมาตร 100 มิลลิลิตร และสกัดส่วนอาหารสำหรับสภาพไร้อากาศดังแสดงในตารางที่ 1 โดยขวดยางฉีดตัวอย่างทั้งหมดจะเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิห้อง สภาพไร้อากาศ ตัวอย่างจะดูดด้วยเข็มฉีดยาปลายเปิดขนาด 0.70 มิลลิเมตร (22Gx2) ทุก ๆ 1 สัปดาห์ เพื่อทดสอบศักยภาพในการลดคลอรีน โดยการทดลองนี้จะดำเนินการทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง ด้วยเทคนิคการแบ่งชุดเพื่อเพิ่มพูนกลุ่มจุลชีพลดคลอรีน ซึ่งเชื้อตั้งต้นนี้จะใช้เป็นจุลชีพเริ่มต้นเพื่อหาเผ่าพันธุ์กลุ่มจุลชีพลดคลอรีนในการทดลองที่ 3

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของอาหารสำหรับสภาพไร้อากาศที่จะใช้ในการศึกษา

สารเคมี	ความเข้มข้น (มก./ล.)
NH_4Cl	2.7
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.02
K_2HPO_4	0.27
KH_2HPO_4	0.35
Yeast Extract	5.00

5.3 แผนการทดลองที่ 3 การจำแนกจุลชีพลดคลอรีนโพลีคลอรีเนตเต็ดไบฟีนิล

กลุ่มจุลชีพที่ทำการเพิ่มพูนแล้วจากแผนการทดลองที่ 2 จะนำมาคัดแยกกลุ่มจุลชีพโดยใช้เทคนิค PCR-DGGE และลำดับดีเอ็นเอ

6. วิเคราะห์และวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถจำแนกผลการทดลองออกเป็น 3 ส่วนหลัก ๆ ดังนี้ 1) การลดคลอรีนของจุลชีพท้องถิ่น 2) การลดคลอรีนด้วยการเติมฮาโลจีเนตเต็ดพาร์เมอร์ และ 3) การจำแนกกลุ่มจุลินทรีย์ลดคลอรีนในตะกอนดิน

6.1 ความสามารถในการลดคลอรีนของจุลชีพท้องถิ่น

การทดสอบประสิทธิภาพการลดคลอรีนของตะกอนดินเหลวในพื้นที่ที่ทำการศึกษาทดสอบโดยการแยกเดิม 234- และ 2345-CBps การทดสอบประสิทธิภาพของจุลชีพในตะกอนดินใหม่ และตะกอนดินเก่าใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการลดคลอรีนหลังจากที่มีการเก็บตัวอย่างดินเป็นระยะเวลานาน โดยไม่มีการเติมอาหารและสารตั้งต้นใด ๆ เมื่อทำการทดสอบคุณลักษณะของตะกอนดินเหลวที่นำมาทำการทดสอบ พบว่า ค่าซีโอดีสูงซึ่งสามารถเป็นแหล่งคาร์บอนให้จุลชีพใช้ในการเจริญเติบโตได้ อัตราส่วน COD:N:P อยู่ในช่วง 100:4:1 และ 100:5:3 ทั้งในตะกอนดินใหม่และตะกอนดินเก่า โดยอัตราส่วนดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกัน และอยู่ในช่วงที่เพียงพอต่อการในการทำงานของจุลชีพ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 (Metcalf and Eddy, 1991)

จากการศึกษาประสิทธิภาพการลดคลอรีนของ 234-CBp โดยใช้ตะกอนดินใหม่จากพื้นที่ตะกอนดินตัวอย่าง 7 พื้นที่ พบว่าการลดคลอรีนเกิดขึ้นเป็นสารผลิตภัณฑ์กลาง (24-CBp) หลังจาก 8 สัปดาห์ และหลังจากนั้นการลดคลอรีนจะสมบูรณ์ภายใน 2-14 สัปดาห์ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 จากการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าจุลชีพดั้งเดิมในคลองหัวลำภูทองแสดงถึงประสิทธิภาพการลดคลอรีนดีที่สุด ในช่วงเวลาการเริ่มต้นการลดคลอรีน (Lag phase) และการลดคลอรีนอย่างสมบูรณ์ จาก 234-CBp → 24-CBp โดยผลิตภัณฑ์กลางสุดท้ายที่พบคือ 24-CBp เท่านั้น (ลดคลอรีนในตำแหน่ง *meta*-) ซึ่งจำนวนคลอรีนที่น้อย (1 – 2 อะตอม) ย่อยต่อการระเหยขึ้นสู่อากาศและสามารถย่อยสลายได้ง่ายภายใต้สภาวะใช้อากาศ

นอกจากนี้ข้อค้นพบจากงานวิจัยนี้ยังมีข้อแตกต่างจาก Chen และคณะ (2000) ซึ่งไม่พบการลดคลอรีนในจุลชีพดั้งเดิมของตะกอนดินใหม่ในการใช้สาร 234- และ 2345-CBp เพื่อทดสอบความสามารถในการลดคลอรีนในตะกอนดินจากแม่น้ำโฮชิน เมืองเกาสง ประเทศไต้หวัน ในระยะเวลา 20 สัปดาห์ของการทดสอบ แสดงให้เห็นถึงจุลชีพประจำถิ่นในพื้นที่ไม่สามารถกระตุ้นการลดคลอรีนได้หรือไม่ก็มีกลุ่มจุลชีพที่สามารถลดคลอรีนได้

ซึ่งในทางกลับกันเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพการลดคลอรีนในตะกอนดินเหลวจำลองระยะเวลาการปนเปื้อนยาวนาน (ตะกอนดินเก่า) กลับพบว่าตะกอนดินเหลวจากคลองหัวลำภูทองไม่สามารถลดคลอรีนได้ภายใน 20 สัปดาห์ที่ทำการทดสอบ แต่กลับพบว่าจุลชีพในตะกอนดินคลองบางปลากด (พื้นที่ปนเปื้อนด้วยมลพิษน้อยใช้เป็นพื้นที่อ้างอิง) กลับยังสามารถลดคลอรีนได้ภายใน 12 สัปดาห์ (ตารางที่ 3) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุลชีพที่สามารถลดคลอรีนได้มีอยู่ในทุก ๆ พื้นที่ ไม่ว่าจะเป็นพื้นที่ปนเปื้อนด้วยพีซีบีหรืออาจไม่ปนเปื้อนเลย เมื่อพิจารณา

2345-CBp กลับพบว่าทุกพื้นที่ยังสามารถลดคลอรีนได้ในสภาวะจำลองอากาศเย็น ยกเว้นจุลชีพในพื้นที่คลองหัวลำภูทองที่ยังไม่สามารถลดคลอรีนได้ด้วยกลุ่มจุลชีพดั้งเดิม (ตารางที่ 4)

จากข้อค้นพบครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าจุลชีพในพื้นที่คลองหัวลำภูทอง สูญเสียความสามารถในการลดคลอรีนหลังจากถูกเก็บจุลชีพภายใต้สภาวะจำลองไร่อากาศ นอกจากนี้ยังแสดงถึงความสามารถในลดคลอรีนของจุลชีพในพื้นที่อื่นที่ยังมีศักยภาพในการลดคลอรีน ถึงแม้ว่าคุณสมบัติเบื้องต้นจากการศึกษาพารามิเตอร์เบื้องต้นที่เพียงพอต่อการสนับสนุนการเจริญเติบโตของจุลชีพกลุ่ม heterotrophic และอาจชี้ให้เห็นถึงพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนสารมลพิษอย่างสูงและต่อเนื่องเป็นระยะเวลาหนึ่ง เมื่อถูกทิ้งร้างโดยไม่ได้รับสารมลพิษจากภายนอก สารอาหาร หรือแหล่งคาร์บอนจากภายนอก เป็นระยะเวลาหนึ่งจะส่งผลให้กลุ่มจุลชีพไม่สามารถลดคลอรีนได้อีกต่อไป

ตารางที่ 1 คุณลักษณะของตะกอนดินเหลวที่ใช้ในการศึกษา

พื้นที่		COD	Phosphorus	TKN	SS	VSS
เขตโรงงาน อุตสาหกรรม บางพลี (BP)	Site 1	9,350 (11,034)	50 (305)	520 (933)	152,630 (740,760)	10,800 (17,400)
	Site 2	12,750 (19,862)	100 (540)	780 (1,053)	125,750 (751,210)	11,650 (18,765)
โรงงานแยก ชิ้นส่วนของเก่า (MF)	Site 1	15,130 (19,310)	90 (241)	1,020 (547)	100,770 (800,680)	8,650 (14,760)
	Site 2	36,160 (24,828)	90 (179)	400 (1,107)	144,320 (858,910)	8,560 (12,985)
คลองหัวลำภูทอง (HLP)		23,040 (25,379)	320 (270)	930 (827)	94,950 (894,425)	14,700 (14,735)
โรงงานไฟฟ้าพระนครใต้ (PWP)		13,480 (13,241)	200 (229)	1,580 (747)	205,990 (858,910)	12,100 (13,620)
คลองบางปลากด (BPK)		12,480 (11,030)	40 (72)	640 (427)	188,050 (741,450)	19,850 (17,350)

หมายเหตุ : หน่วยที่ใช้คือ มก./ล. และในวงเล็บคือคุณลักษณะของดินที่ทำการจำลองภายใต้อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 1 ปี

ตารางที่ 2 การลดคลอรีนของ 234-CBp ด้วยตะกอนดินเหนียวใหม่

พื้นที่เก็บตัวอย่าง		เวลาเกิดสารกลาง ผลิตภัณฑ์ (สัปดาห์)	เวลาลดคลอรีน สมบูรณ์ (สัปดาห์)
เขตโรงงานอุตสาหกรรมบางพลี (BP)	Site 1	18	20
	Site 2	20	24
โรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า (MF)	Site 1	12	18
	Site 2	14	24
พื้นที่คลองหัวลำภูทอง (HLP)		8	10
โรงงานไฟฟ้าพระนครใต้ (PWP)		14	20
คลองบางปลาจืด (BPK)		10	24

หมายเหตุ: เกิดสารผลิตภัณฑ์กลางเพียง 24-CBp อย่างเดียว

เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติเบื้องต้นของ 234- และ 2345-CBps ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของพีซีบีที่มีความอ่อนไหวต่อการลดคลอรีน ซึ่งเหมาะสมในการทดสอบศักยภาพหรือประสิทธิภาพเบื้องต้นของการลดคลอรีนในจุลชีพท้องถิ่น เพื่อการอธิบายถึงสาเหตุของ 2345-CBps สามารถลดคลอรีนได้ดีกว่า 234-CBp อาจเนื่องมาจากพลังงานความร้อนที่เกิดขึ้น ในการลดคลอรีนของ 2345-CBp อาจเกิดจากค่าพลังงานความร้อน (ΔH°_f) และ $\Delta \ln RRT$ ในการลดคลอรีนของ 2345-CBp $\rightarrow$ 235- and 245-CBp (-14.746, -14.821/ 0.557, 0.525) ซึ่งมีค่าสูงกว่า 234-CBp $\rightarrow$ 24-CBp (-14.118/ 0.514) ซึ่งมีการอธิบายในการศึกษาของ Chen และคณะ, 2000

ข้อบ่งชี้ที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างในประสิทธิภาพการลดคลอรีนของจุลชีพของทั้ง 2 พื้นที่นั้น อาจเนื่องมาจากลักษณะภูมิอากาศเขตร้อนและลักษณะกลุ่มจุลชีพในท้องถิ่น ที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มจุลชีพและสภาพภูมิอากาศในประเทศไทยสามารถลดคลอรีนได้ทั้งพีซีบีและเฮกซะคลอโรเบนซีนอีกด้วย (Chen และคณะ 2010, Sudjarid และคณะ 2012)

6.2 การลดคลอรีนด้วยการเติมฮาโลเจนเตตพาร์เมออร์

จากการทดสอบประสิทธิภาพการลดคลอรีนในตะกอนดินจำลองสภาพพื้นที่ที่ทิ้งร้างจากการปนเปื้อนและตะกอนดินใหม่ พบว่าตะกอนดินจำลองการเก็บไม่มีประสิทธิภาพในการลดคลอรีนหลังจากจำลองสภาพพื้นที่ที่ทิ้งร้างภายใต้สภาวะอากาศเย็น (4 °C) เป็นระยะเวลาประมาณ 1 ปี ยกเว้นตะกอนดินคลองบางปลาจืดที่พบศักยภาพในการลดคลอรีนอยู่ ดังนั้นการกระตุ้นจุลชีพกลุ่มลดคลอรีนและการสร้างเอ็นไซม์ที่สามารถลดหมู่ฮาโลเจนด้วยกระบวนการเหนี่ยวนำกลุ่มธาตุฮาโลเจนเป็นตัวรับอิเล็กทรอนิกส์หรือสารตั้งต้นร่วมเพื่อกระตุ้นการลดคลอรีนเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่เป็นไปได้ในการฟื้นฟู เนื่องจากการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการบ่มเพาะมาประยุกต์ใช้เชิงพื้นที่โดยมากจะประสบความสำเร็จในการทดลองในห้องปฏิบัติการที่มีการ

ควบคุมทางสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างดี และมีเพียงบางงานวิจัยที่สามารถประยุกต์สู่พื้นที่จริงที่มีการปนเปื้อนด้วย PCBs ดังนั้นการประยุกต์ใช้สารเคมีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการกระตุ้นการลดคลอรีนจึงนำมาใช้ในการทดสอบครั้งนี้

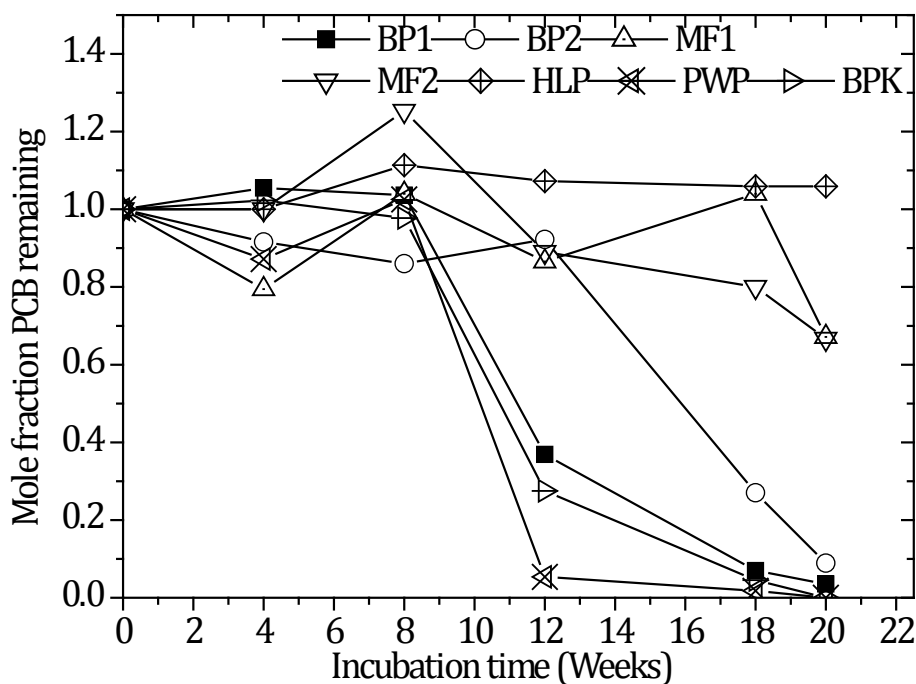
สารกระตุ้นกลุ่มฮาโลเจน (halogenated priming congeners) สามารถวิเคราะห์ด้วยกระบวนการทดสอบเดียวกันกับการวิเคราะห์ PCBs ซึ่งสารตั้งต้นหรือสารกลางของสารกระตุ้นกลุ่มฮาโลเจนไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพของ PCBs ตารางที่ 3 แสดงศักยภาพการลดคลอรีนของ 234-CBps dechlorinations ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มี การเติมสารกระตุ้นกลุ่มฮาโลเจน ซึ่งสารกระตุ้นนี้ประกอบไปด้วย 4 สารเคมีหลัก คือ 1) methyl 4-bromobenzene (4-MBZ) 2) 14-dibromobenzene (14-DBZ) 3) 4-bromobenzonitrile (4-BN) และ 4) 4-bromobezoic hydrazide (4BH)

การลดคลอรีนใน 234-CBp ด้วยการเติม methyl 4-bromobenzene ดังแสดงในภาพที่ 2 ลักษณะการลดคลอรีนแบ่งออกเป็น 2 ช่วงหลัก ๆ คือ ช่วงที่ 1 การลดคลอรีนเกิดขึ้นหลังจาก 6 สัปดาห์ และการลดคลอรีนเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใน 8 สัปดาห์ ในตะกอนดินพื้นที่เขตอุตสาหกรรมบางพลี 2 คลองห้วยลำภูทอง และ โรงไฟฟ้าพระนครใต้ และในระยะที่ 2 พบว่าการลดคลอรีนเกิดขึ้นภายใน 14 สัปดาห์ ส่วนการเติม 14-dibromobenzene พบว่าการลดคลอรีนเกิดขึ้นในช่วง 8 ถึง 14 สัปดาห์ และสามารถลดคลอรีนอย่างสมบูรณ์ภายใน 20 สัปดาห์ ในตะกอนดินพื้นที่ เขตโรงงานอุตสาหกรรมบางพลี 1 และ 2 คลองห้วยลำภูทอง และ โรงไฟฟ้าพระนครใต้ แต่สำหรับตะกอนดินในพื้นที่อื่น ๆ ยังคงลดคลอรีนอย่างไม่สมบูรณ์ (ภาพที่ 3) การเติม 4-bromobenzonitrile สามารถกระตุ้นการลดคลอรีนได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งเกิดลดคลอรีนเกิดขึ้นหลังจาก 10 สัปดาห์ และลดคลอรีนอย่างสมบูรณ์ภายใน 20 สัปดาห์ ยกเว้น ตะกอนดินจากเขตโรงงานอุตสาหกรรมบางพลี 1 และบางปลากรด (ภาพที่ 4) อย่างไรก็ตามการเติม 4-bromobezoic hydrazide สามารถกระตุ้นการลดคลอรีนได้ในทุกพื้นที่ยกเว้น เขตโรงงานอุตสาหกรรมบางพลี 1 และคลองห้วยลำภูทอง (ภาพที่ 5) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงกลุ่มจุลชีพในคลองห้วยลำภูทองสามารถถูกกระตุ้นให้มีศักยภาพอีกครั้งได้หลังจากสูญเสียประสิทธิภาพการลดคลอรีนจากการจำลองในพื้นที่อุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลา 1 ปี ยกเว้นในการทดลองที่เติม 4-bromobezoic hydrazide ซึ่งเป็นข้อสังเกตหนึ่งแสดงให้เห็นถึงจุลชีพสูญเสียความสามารถหลังจากไม่ได้รับสารมลพิษอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการกระตุ้นการลดคลอรีนจึงมีส่วนสำคัญและจำเป็น นอกจากนี้ยังพบว่าการเติม 4-bromobenzonitrile ยังสามารถกระตุ้นศักยภาพในการลดคลอรีนในทุกพื้นที่

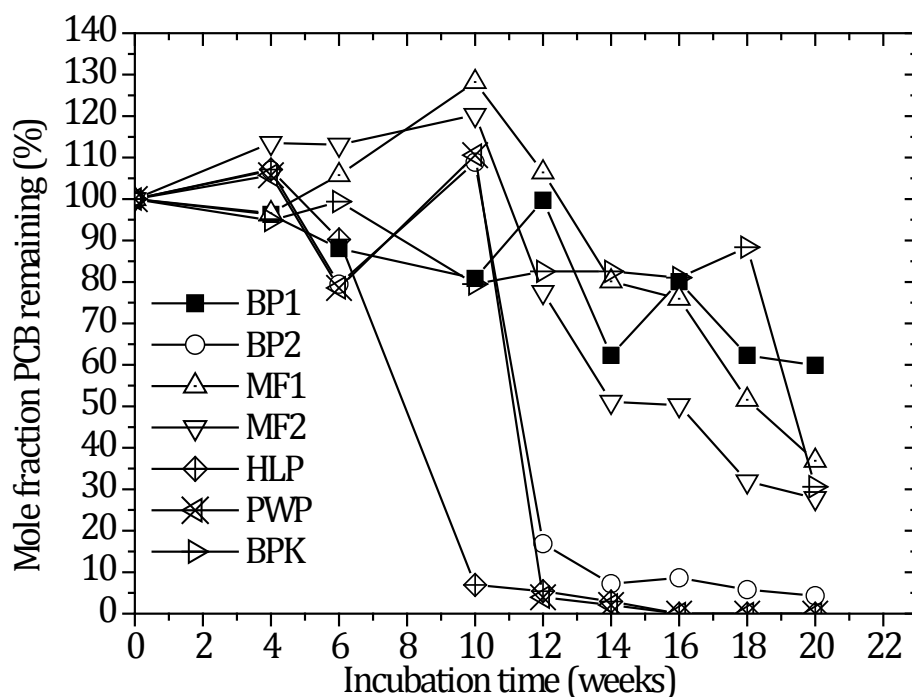
จากตารางที่ 3 พบว่าการลดคลอรีนใน 234-CBp ถูกกระตุ้นการลดคลอรีนอย่างมีนัยสำคัญในทุกพื้นที่ที่ทำการศึกษา เนื่องจากในพื้นที่ที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้นกลุ่มฮาโลเจนไม่พบการลดคลอรีนเกิดขึ้น ยกเว้นพื้นที่คลองบางปลากรด

จากการศึกษาครั้งเป็นข้อบ่งชี้แสดงถึงพื้นที่ที่ถูกทิ้งร้างหลังจากมีปนเปื้อนสารมลพิษซึ่งไม่ได้รับสารมลพิษจากภายนอกหลังจากยกเลิกการใช้งานเป็นระยะเวลานาน การกระตุ้นการลดคลอรีนถือเป็นสิ่งสำคัญในการฟื้นฟูสภาพพื้นที่ การลดคลอรีนในการศึกษาครั้งนี้อาจเกิดขึ้น

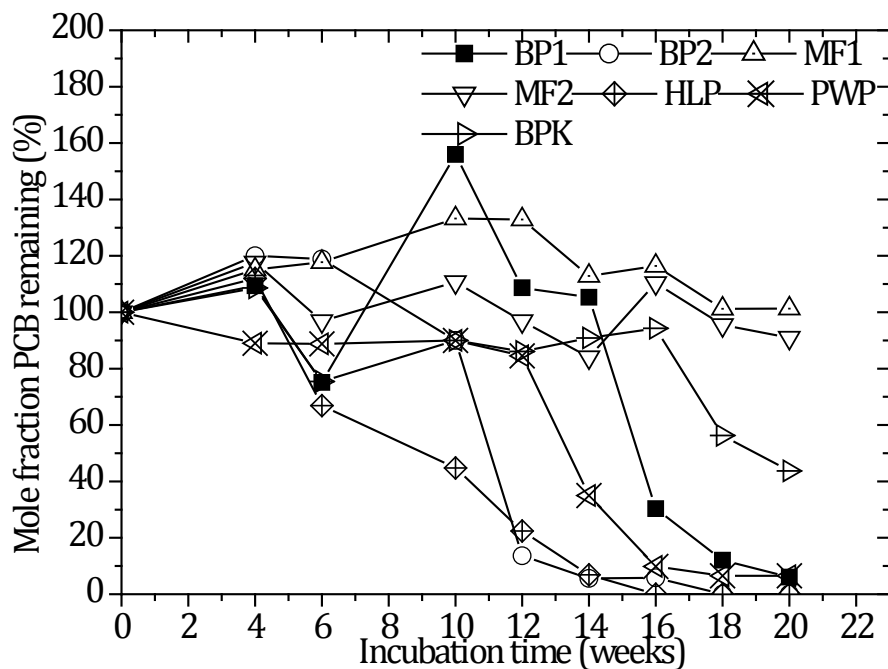
เนื่องจากการมีจำนวนน้อยของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ลดคลอรีนหรือการไร้ประสิทธิภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ลดคลอรีน ทั้งกลุ่มที่ลดคลอรีนหลัก (dechlorinators) และกลุ่มที่ลดคลอรีนร่วม (supporting dechlorinating groups)



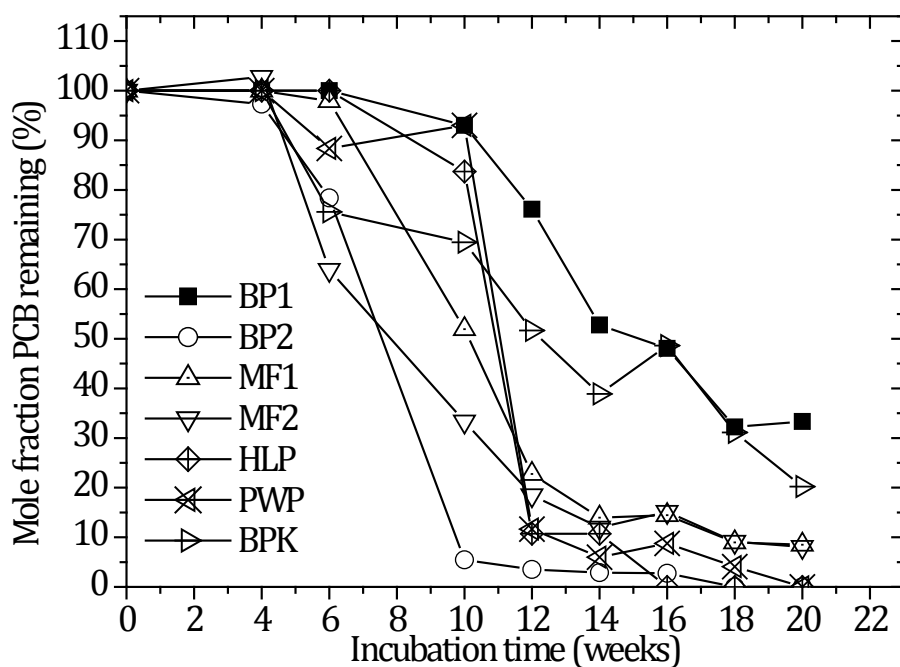
ภาพที่ 1. การลดคลอรีน 2345-CBp โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่เติมในตัวอย่างจำลองสภาพแวดล้อม 4 ช^๐, หมายถึง: คลองหัวลำภูทอง (HCB), เขตอุตสาหกรรมบางพลี 1 และ 2 (BP1, BP2), โรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า 1 และ 2 (MF1, MF2), โรงไฟฟ้าพระนครใต้ (PWP), คลองบางปลาเกิด (BPK)



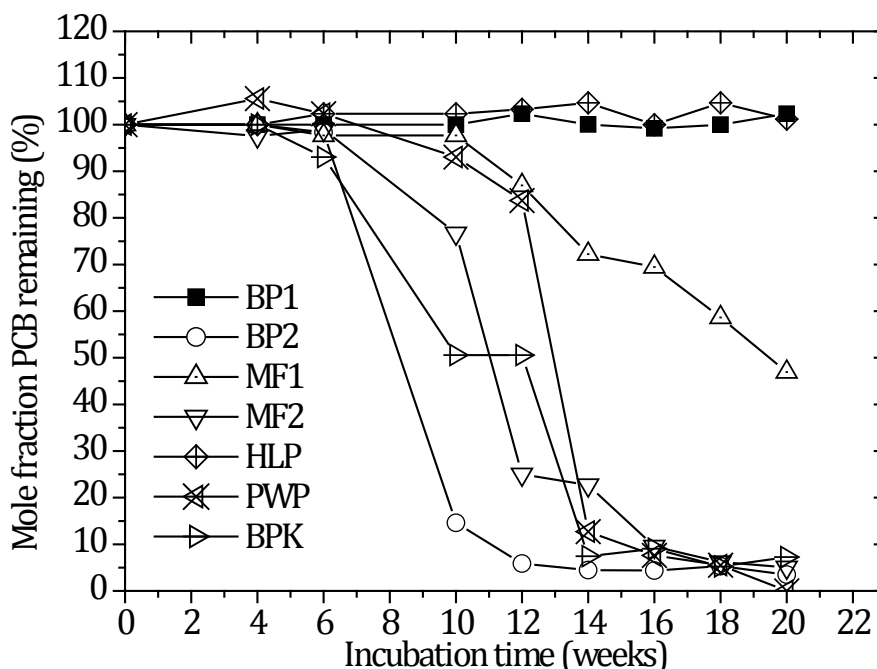
ภาพที่ 2. การลดคลอรีนของ 234-CBp ในตะกอนดินในตัวอย่างจำลองสภาพแวดล้อม 4 ช^๐ โดยการเติม methyl 4-bromobenzene



ภาพที่ 3. การลดคลอรีนของ 234-CBP ในตะกอนดินในตัวอย่างจำลองสภาพแวดล้อม 4 ช^๐ โดยการเติม 14-dibromobenzene หมายถึง: คลองหัวลำภูทอง (HCB), เขตอุตสาหกรรมบางพลี 1 และ 2 (BP1, BP2), โรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า 1 และ 2 (MF1, MF2), โรงไฟฟ้าพระนครใต้ (PWP), คลองบางปลากด (BPK)



ภาพที่ 4. การลดคลอรีนของ 234-CBP ในตะกอนดินในตัวอย่างจำลองสภาพแวดล้อม 4 ช^๐ โดยการเติม 4-bromobenzonitrile หมายถึง: คลองหัวลำภูทอง (HCB), เขตอุตสาหกรรมบางพลี 1 และ 2 (BP1, BP2), โรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า 1 และ 2 (MF1, MF2), โรงไฟฟ้าพระนครใต้ (PWP), คลองบางปลากด (BPK)



ภาพที่ 5. การลดคลอรีนของ 234-CBP ในตะกอนดินในตัวอย่างจำลองสภาพแวดล้อม 4 ช่อ โดยการเติม 4-bromobenzoic hydrazide หมายถึง: คลองหัวลำภูทอง (HCB), เขตอุตสาหกรรมบางพลี 1 และ 2 (BP1, BP2), โรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า 1 และ 2 (MF1, MF2), โรงไฟฟ้าพระนครใต้ (PWP), คลองบางปลากด (BPK)

นอกเหนือจากการลดคลอรีนของ 234-CBP การลดคลอรีนของ 2345-CBP การลดคลอรีนถูกกระตุ้นด้วยกลุ่มจุลชีพดั้งเดิม ยกเว้น พื้นที่คลองหัวลำภูทอง (ตารางที่ 4) การเติม methyl 4-bromobenzene (ภาพที่ 6), 14-dibromobezene (ภาพที่ 7), 4-bromobenzonitrile (ภาพที่ 8), และ 4-bromobenzoic hydrazide (ภาพที่ 9) พบว่าปรับปรุงประสิทธิภาพการลดคลอรีนของจุลชีพในพื้นที่ โรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า 1 และ 2 และคลองหัวลำภูทอง แต่การเติม 4-bromobenzoic hydrazide ซึ่งไม่สามารถกระตุ้นการลดคลอรีนของกลุ่มจุลชีพจากพื้นที่คลองหัวลำภูทอง ซึ่งผลการวิจัยนี้จะมีความคล้ายคลึงกับการเติม 4-bromoacetophenone and 4-bromosulfonated ที่ไม่ประสบความสำเร็จในการกระตุ้นการลด PCBs ถึงแม้ว่าสารกระตุ้นเหล่านี้จะให้ bromide ได้เช่นกัน (Kim, A.D. and Bedard, D.L., 1999) ซึ่งข้อค้นพบนี้แสดงให้เห็นถึงกลุ่มจุลชีพในตะกอนดินที่เคยปนเปื้อนด้วยมลพิษอย่างสูงและมีการได้รับมลพิษอย่างต่อเนื่อง อาจเกิดการลดความสามารถในการลดคลอรีนหากถูกทิ้งร้างและสามารถฟื้นฟูหรือกระตุ้นประสิทธิภาพหลังจากเติมฮาโลจิเนตเต็ดพาร์เมอเรได้

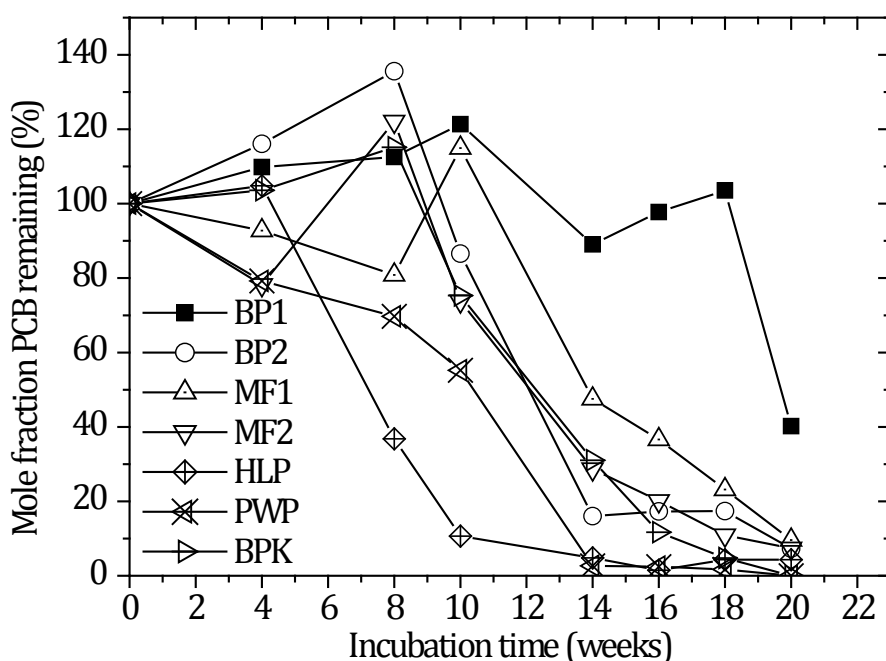
ตารางที่ 3 ความสามารถในการลดคลอรีน 234-CBp ภายใต้การเติมฮาโลจิเนตเต็ดพาร์มเมอร์
แต่ละชนิด

ฮาโลจิเนตเต็ดพาร์มเมอร์	พื้นที่	ระยะเวลาการเกิด ผลิตภัณฑ์กลาง (สัปดาห์)	ระยะเวลาการลดคลอรีนอย่าง สมบูรณ์ (สัปดาห์)
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide Un-amended primers*	เขตพื้นที่อุตสาหกรรมบาง พลี 1	14 14 12 14 ×	>20 20 >20 >20 ×
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide Un-amended primers*	เขตพื้นที่อุตสาหกรรมบาง พลี 2	8 8 10 10 ×	18 18 18 20 ×
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide Un-amended primers*	โรงงานแยกชิ้นส่วนของ เก่า 1	12 14 10 10 ×	>20 >20 20 >20 ×
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide Un-amended primers*	โรงงานแยกชิ้นส่วนของ เก่า 2	8 8 10 10 ×	>20 >20 20 20 ×
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide Un-amended primers*	โรงงานไฟฟ้าพระนครใต้	8 8 12 14 ×	14 20 20 20 ×
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide Un-amended primers*	คลองบางปลากด	14 14 12 10 12	>20 >20 20 20 >20
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide Un-amended primers*	คลองหัวลำภูทอง	8 8 10 ×	14 14 14 ×
		×	×

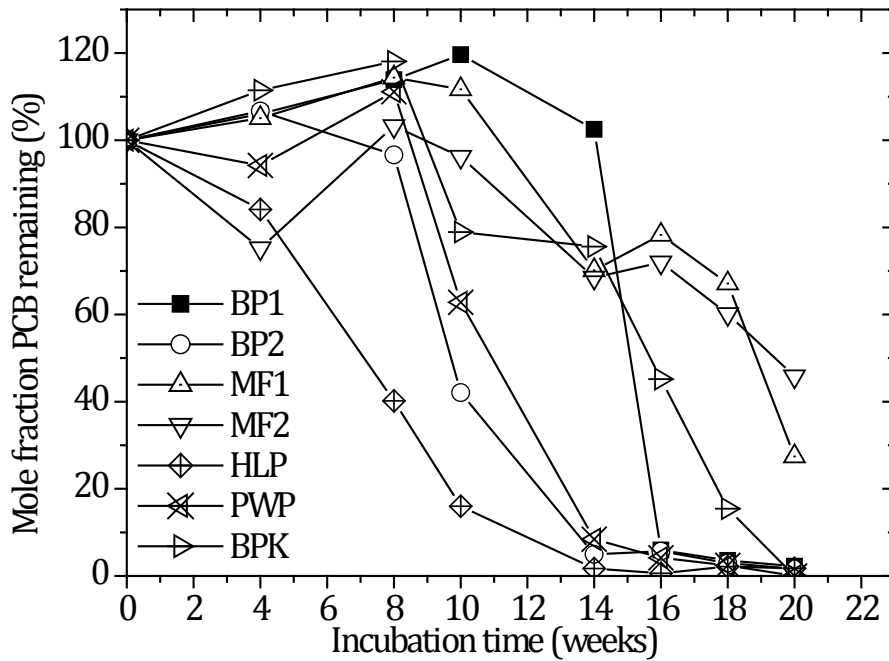
หมายเหตุ เกิดผลิตภัณฑ์กลางคือ 24-CBp อย่างเดียว, × ไม่เกิดการลดคลอรีนในระยะเวลา 20 สัปดาห์

สารประกอบฮาโลจิเนตเต็ดฟาร์มเมอร์สามารถถูกรีดิวส์เป็น bromine และไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการลดคลอรีนของ PCBs ในตะกอนดินที่ถูกเก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิต่ำ ยกเว้นกลุ่มจุลชีพจากพื้นที่ โรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า 1 และ 2 และคลองหัวลำภูทอง ซึ่งสารประกอบฮาโลจิเนตเต็ดฟาร์มเมอร์สามารถเพิ่มพูนกลุ่มจุลชีพที่ใช้ halobiphenyls เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Kim, A.D. and Bedard, D.L., 1999) ซึ่งการไม่เกิดการลดคลอรีนในจุลชีพบางพื้นที่ของการศึกษานี้อาจเกิดจากเชื้อของจุลชีพ ไม่ว่าจะเป็นจุลชีพกลุ่มหลักในการลดคลอรีนหรือกลุ่มสนับสนุนการลดคลอรีน การเนื่อยซาของจุลชีพกลุ่มลดคลอรีนถูกกระตุ้นแทนที่การเติมจุลชีพที่ผ่านการเพิ่มพูนในพื้นที่

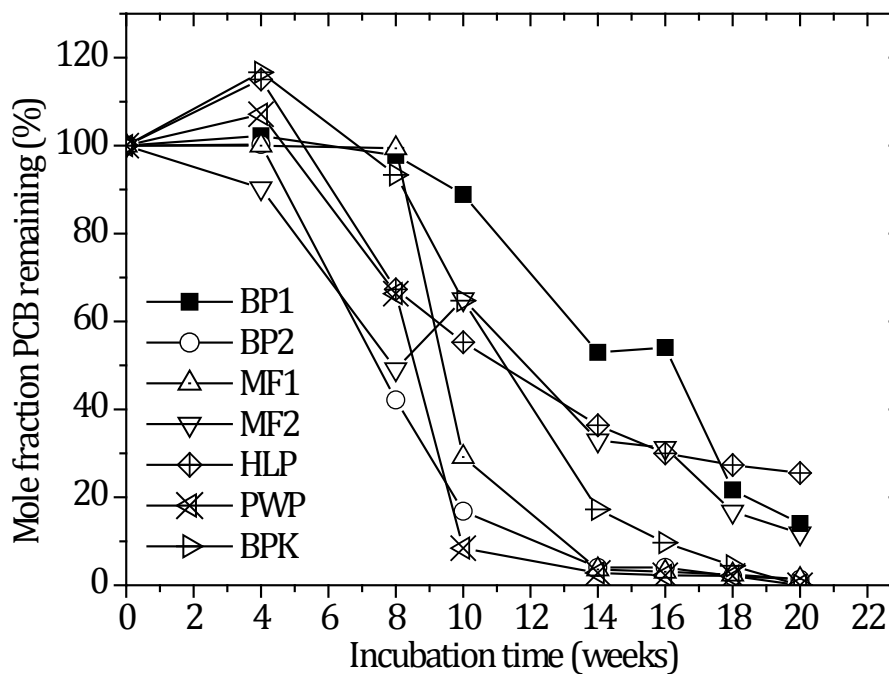
ผลิตภัณฑ์สารกลางที่เกิดขึ้นนั้นจะมีความสอดคล้องกับความชุกของกลุ่มจุลชีพที่อยู่ในพื้นที่ในสภาพแวดล้อม ซึ่งเส้นทางการลดคลอรีนพบว่า 2345-CBps → 235-and/or 245-CBps → 24- and/or 25-CBps (co-eluting peaks) และ 235-CBps เป็นผลิตภัณฑ์สารกลางหลักที่เกิดขึ้นจากการทดลองนี้



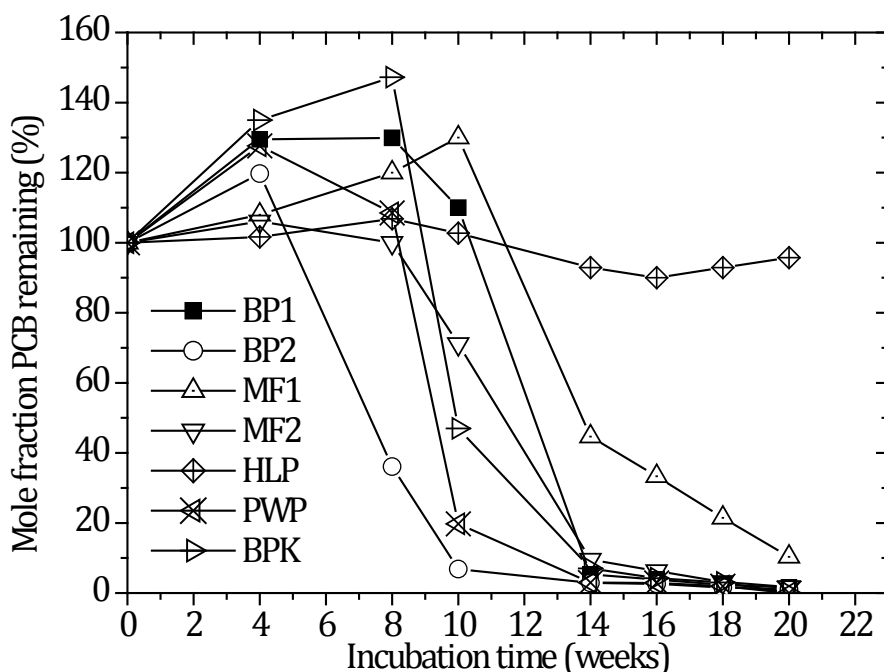
ภาพที่ 6. การลดคลอรีนของ 2345-CBp ในตะกอนดินในตัวอย่างจำลองสภาพแวดล้อม 4 ช^๐ โดยการเติม methyl 4-bromobenzene หมายถึง: คลองหัวลำภูทอง (HCB), เขตอุตสาหกรรมบางพลี 1 และ 2 (BP1, BP2), โรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า 1 และ 2 (MF1, MF2), โรงไฟฟ้าพระนครใต้ (PWP), คลองบางปลากด (BPK)



ภาพที่ 7. การลดคลอรีนของ 2345-CBP ในตะกอนดินในตัวอย่างจำลองสภาพแวดล้อม 4 ช^๐ โดยการเติม 14-dibromobenzene หมายถึง: คลองหัวลำภูทอง (HCB), เขตอุตสาหกรรมบางพลี 1 และ 2 (BP1, BP2), โรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า 1 และ 2 (MF1, MF2), โรงไฟฟ้าพระนครใต้ (PWP), คลองบางปลากด (BPK)



ภาพที่ 8. การลดคลอรีนของ 2345-CBP ในตะกอนดินในตัวอย่างจำลองสภาพแวดล้อม 4 ช^๐ โดยการเติม 4-bromobenzonitrile หมายถึง: คลองหัวลำภูทอง (HCB), เขตอุตสาหกรรมบางพลี 1 และ 2 (BP1, BP2), โรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า 1 และ 2 (MF1, MF2), โรงไฟฟ้าพระนครใต้ (PWP), คลองบางปลากด (BPK)



ภาพที่ 9. การลดคลอรีนของ 2345-CBp ในตะกอนดินในตัวอย่างจำลองสภาพแวดล้อม 4 ชั้ โดยการเติม 4-bromobenzoic hydrazide หมายถึง: คลองหัวลำภูทอง (HCB), เขตอุตสาหกรรมบางพลี 1 และ 2 (BP1, BP2), โรงงานแยกชิ้นส่วนของเก่า 1 และ 2 (MF1, MF2), โรงไฟฟ้าพระนครใต้ (PWP), คลองบางปลากด (BPK)

ตารางที่ 4 ความสามารถในการลดคลอรีน 2345-CBp ด้วยฮาโลจิเน็ตเตตพาร์เมอร์

ฮาโลจิเน็ตเตตพาร์เมอร์	พื้นที่	เวลาเกิดสารกลาง ผลิตภัณฑ์ (สัปดาห์)	เวลาลดคลอรีน สมบูรณ์ (สัปดาห์)	ผลิตภัณฑ์กลางที่เกิดขึ้น
Methyl 4-bromobenzene	เขตโรงงาน	10	>20	2,3,5-**, 2,4,5-*
14-dibromobenzene	อุตสาหกรรม	10	20	2,3,5-*, 2,4,5-**, 2,4-/2,5-
4-bromobenzonitrile	บางพลี site 1	8	>20	2,3,5-**, 2,4,5-*
4-bromobenzoic hydrazide		8	20	2,3,5-
Un-amended primers		8	20	2,3,5-
Methyl 4-bromobenzene	เขตโรงงาน	8	20	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
14-dibromobenzene	อุตสาหกรรม	8	20	2,3,5-*, 2,4,5-**, 2,4-/2,5-
4-bromobenzonitrile	บางพลี site 2	6	20	2,3,5-, 2,4,5-
4-bromobenzoic hydrazide		6	18	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
Un-amended primers		8	20	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
Methyl 4-bromobenzene	โรงงานแยก	8	20	2,3,5-, 2,4,5-, 2,4-/2,5-
14-dibromobenzene	ชิ้นส่วนของ	8	>20	2,3,5-*, 2,4,5-**, 2,4-/2,5-
4-bromobenzonitrile	เก่า site 1	8	20	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
4-bromobenzoic hydrazide		8	20	2,3,5-, 2,4,5-, 2,4-/2,5-
Un-amended primers		8	>20	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
Methyl 4-bromobenzene	โรงงานแยก	8	20	2,3,5-, 2,4,5-, 2,4-/2,5-

ฮาโลจิเนตเตตพาร์เมอร์	พื้นที่	เวลาเกิดสารกลาง ผลิตภัณฑ์ (สัปดาห์)	เวลาลดคลอรีน สมบูรณ์ (สัปดาห์)	ผลิตภัณฑ์กลางที่เกิดขึ้น
14-dibromobenzene 4-bromobenzonitrile 4-bromobenzoic hydrazide Un-amended primers	ชิ้นส่วนของ เก่า site 2	8 6 8 8	>20 20 18 >20	2,3,5-*, 2,4,5-**, 2,4-/2,5- 2,3,5-, 2,4,5-, 2,4-/2,5- 2,3,5-, 2,4,5-, 2,4-/2,5- 2,3,5-*, 2,4,5-**, 2,4-/2,5-
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobenzene 4-bromobenzonitrile 4-bromobenzoic hydrazide Un-amended primers	โรงงานไฟฟ้า พระนครใต้	8 8 8 8 8	18 18 18 18 18	2,3,5-, 2,4-/2,5- 2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5- 2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5- 2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5- 2,3,5-**, 2,4,5-*
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobenzene 4-bromobenzonitrile 4-bromobenzoic hydrazide Un-amended primers	คลองบาง ปลากด	8 8 8 8 8	18 18 18 18 18	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5- 2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5- 2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5- 2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5- 2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobenzene 4-bromobenzonitrile 4-bromobenzoic hydrazide Un-amended primers	พื้นที่คลองหัว ลำภูทอง	6 6 6 × ×	20 14 >20 × ×	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5- 2,4,5-, 2,4-/2,5- 2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5- - -

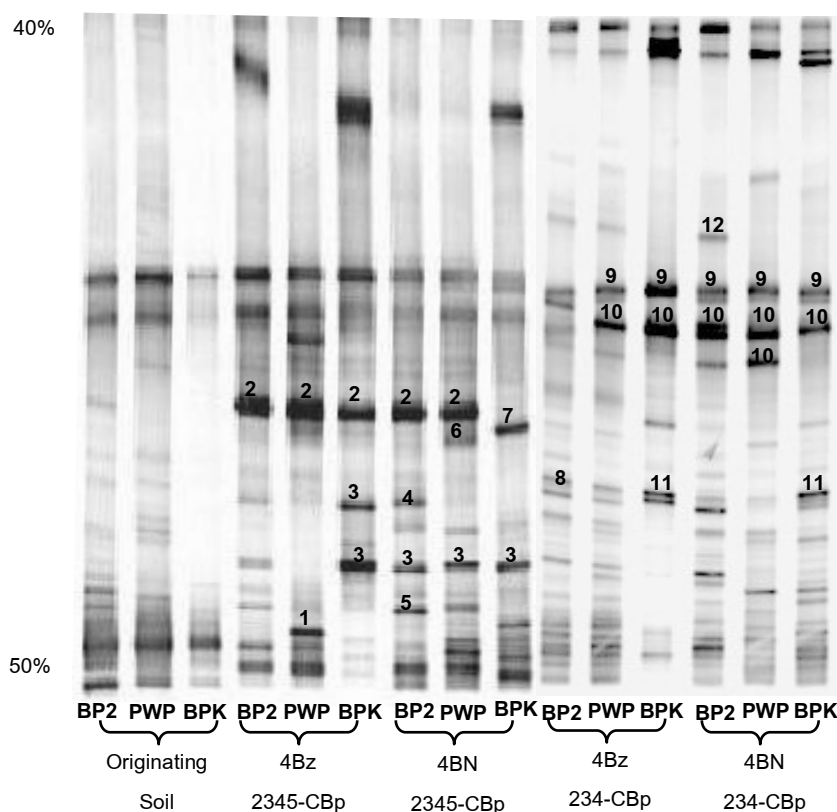
หมายเหตุ: ** หมายถึง ผลิตภัณฑ์สารกลางหลัก * หมายถึง ผลิตภัณฑ์สารกลางรอง 2,4-/2,5 คือพีค (peak) ที่เกิดขึ้นในเวลาเดียวกัน × หมายถึง การลดคลอรีนไม่เกิดขึ้นในระยะเวลาที่ทำการบ่ม (20 สัปดาห์)

6.3 การจำแนกกลุ่มจุลินทรีย์ลดคลอรีนในตะกอนดิน

การศึกษาในขั้นตอนนี้ได้ดำเนินการหลังจากกระบวนการลดคลอรีนเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์และเพิ่มพูนจำนวนกลุ่มชีพด้วยเทคนิคการคัดแยกเชื้อเพื่อจำแนกคุณลักษณะของจุชีพ และการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มจุชีพที่มีบทบาทหน้าที่หลักในการลดคลอรีนในการศึกษารั้งนี้ ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ถึงกลุ่มจุชีพที่สามารถลดคลอรีนในการศึกษานี้ หัวเชื้อจุชีพจำนวน 15 ตัวอย่างถูกเลือกเพื่อนำมาวิเคราะห์และจำแนกกลุ่มจุชีพ ตัวอย่างที่ถูกเลือกประกอบไปด้วย ตะกอนดินจากพื้นที่อุตสาหกรรมบางพลี 2 โรงไฟฟ้าพระนครใต้ และคลองบางปลากด ที่ถูกเติมด้วย 4-bromobenzoic hydrazide และ 4-bromobenzonitrile กลุ่มจุชีพถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี DNA fragment by PCR-DGGE-16S rRNA ภาพที่ 10 แสดงส่วนของรูปแบบแถบ DGGE ของจุชีพที่สามารถลดคลอรีนได้อย่างสมบูรณ์และผ่านการเพิ่มพูนจำนวนจุชีพแล้ว การวิเคราะห์วิวัฒนาการของแถบ DGGE ซึ่งแถบแบนด์แสดงถึงกลุ่มจุชีพที่สามารถลดคลอรีนและแถบแบนด์ในตำแหน่งเดียวกันแสดงถึงกลุ่มจุชีพที่ลดคลอรีนกลุ่มเดียวกัน ผลการทดลองพบว่าจุชีพกลุ่ม *Firmicutes* และ *Proteobacteria* เป็นกลุ่มจุชีพกลุ่มหลักที่สามารถลดคลอรีนได้และ

การศึกษานี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Katayama and Fujie, 2000 ที่ทำการจำแนกกลุ่มจุลินทรีย์จากดิน แอบัติเอนเอของจุลินทรีย์กลุ่มลดคลอรีนไม่พบในดินดั้งเดิมซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มพูนกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถลดคลอรีนได้หลังจากมีการเติม PCBs หรือพาร์เมอร์ลงไป ดังนั้นแอบัติเอนเอของกลุ่มจุลินทรีย์ลดคลอรีนจะหนาแน่นหลังจากเพิ่มพูนหรือมีความคุ้นเคยโดยจุลินทรีย์ในตะกอนดิน

เมื่อทำการเปรียบเทียบการทดลองการเติม 234- and 2345-CBps แอบัติของจุลินทรีย์ที่ลดคลอรีนมีความคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ยังพบว่าตะกอนดินจากพื้นที่โรงไฟฟ้าพระนครใต้เติม 2345-CBps พบจุลินทรีย์กลุ่ม *Pseudomonas putida* ซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนด้วยสารประกอบกลุ่มอโรมาติกคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบข้อสังเกตว่ายังพบจุลินทรีย์ที่สามารถลดคลอรีนในพื้นที่คลองบางปลากด ซึ่งเป็นพื้นที่อ้างอิงแสดงถึงพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนต่ำ ยังพบจุลินทรีย์กลุ่มที่ลดคลอรีนได้เช่นกัน ซึ่งแสดงถึงสาเหตุของการมีประสิทธิภาพของการลดคลอรีนของจุลินทรีย์ในพื้นที่นี้ อย่างไรก็ตาม *Chloroflexi phylum* ซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์หลักในการลดคลอรีนของ PCBs ในบางพื้นที่กลับไม่พบในการศึกษาครั้งนี้ (Bedard และคณะ, 2007) ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุของการเลือกสารเคมีในการกระตุ้นความอ่อนไหวของ PCR และการ cloning ตัวอย่างมีความจำเป็นต้องเลือกให้เหมาะสม การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงกลุ่มจุลินทรีย์หมู่ฮาโลเจนสามารถปรับปรุงการลดคลอรีนใน PCBs ได้เช่นกัน



ภาพที่ 10 โปรไฟล์กลุ่มจุลินทรีย์ลดคลอรีนโดยใช้วิธี PCR-DGGE

Note: Methyl 4-Bromobenzene (4-MBZ); 4-Bromobenzonitrile (4-BN) Bangplee Industrial Estate Site 2 (BP2); South-Bangkok Power Plant (PWP); Bangplakod Canal (BPK)

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ Phylogenic analysis of DGGE bands

Band ^a	Closest relative	Accession number	% Identity	Phylum/ Class
1	Uncultured Anaerobranca sp. clone SRB2	DQ069229	94	<i>Firmicutes</i>
2	Uncultured gamma proteobacterium clone Aerocomp_NB39 16S ribosomal	FJ754851	90	<i>Proteobacteria</i>
3	Uncultured bacterium clone AR018 16S ribosomal RNA gene, PCB dechlorinating bacterial communities in river sediment	GQ860186	98	<i>Proteobacteria</i>
4	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene	AJ621948	94	<i>Fimicutes</i>
5	Uncultured Firmicutes bacterium clone Z273MB13 16S ribosomal RNA gene	FJ484645	100	<i>Firmicutes</i>
6	Pseudomonas putida strain c204 16S ribosomal RNA gene	FJ950581	83	<i>Proteobacteria</i>
7	Uncultured bacterium clone 3-2 16S ribosomal RNA gene	GQ324229	94	<i>Proteobacteria</i>
8	Uncultured bacterium clone Er-MS-11 16S ribosomal RNA gene, Effects of chemical structure and concentration on the pathways and microbial communities during dechlorination of coplanar PCBs in sediment slurries	EU542432	84	<i>Fimicutes</i>
9	Uncultured gamma proteobacterium clone Aerocomp_NB39 16S ribosomal RNA gene	FJ754851	94	<i>Proteobacteria</i>
10	Uncultured bacterium clone Z552 16S ribosomal RNA gene	AY979304	92	<i>Fimicutes</i>
11	Uncultured bacterium clone AR062 16S ribosomal RNA gene, PCB dechlorinating bacterial communities in river sediment	GQ860277	96	<i>Proteobacteria</i>
12	uncultured Clostridium sp.	FJ609997	88	<i>Firmicutes</i>

หมายเหตุ^a: The DNA bands ที่ถูกแยกมาจากภาพที่ 10

7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เพื่อส่งเสริมและจำแนกกลุ่มจุลชีพที่สามารถลดคลอรีนใน PCBs ตะกอนดิน ถูกเก็บภายใต้อุณหภูมิต่ำ (4 °C) สามารถต้านทานการลดคลอรีนของ 234-CBp ยกเว้นจุลชีพในพื้นที่คลองบางปลากด อย่างไรก็ตามการลดคลอรีนใน 2345-CBp ยังสามารถเกิดขึ้นได้ ยกเว้นตะกอนดินจากคลองหัวลำภูทอง สารประกอบฮาโลจิเนตเต็ดพาร์มเมอร์ สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการลดคลอรีนใน 234-CBp ยกเว้น ตะกอนดินในพื้นที่คลองหัวลำภูทองเติมด้วย 4-bromobenzoic hydrazide ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างกันของกลุ่มจุลชีพในพื้นที่นั้น ๆ และการเลือกใช้สารประกอบกลุ่มฮาโลจิเนตเต็ดพาร์มเมอร์เพื่อกระตุ้นการเกิด การลดคลอรีนมีความจำเพาะต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมในการกระตุ้นการลดคลอรีน ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่าในตะกอนดินใหม่มีประสิทธิภาพในการลดคลอรีนได้เป็นอย่างดีใน 234-CBp การศึกษาครั้งนี้พบว่าจุลชีพที่สามารถลดคลอรีนกระจายอยู่ทั่วไปในพื้นที่ที่ทำการศึกษา และกลุ่ม *Firmicutes* และ *Proteobacteria* เป็นจุลชีพกลุ่มหลักในการลดคลอรีน อีกทั้งการทดลองนี้ยังแสดงถึงสาเหตุของการเจือยของจุลชีพกลุ่มลดคลอรีนอาจเกิดเนื่องจากการไม่ได้รับ สารมลพิษอย่างต่อเนื่องและการรบกวนจากข้อจำกัดทางสภาพแวดล้อม

8. ผลลัพธ์จากโครงการ

ผลลัพธ์เชิงวิชาการ

1. ศักยภาพการลดคลอรีนพีซีบีของกลุ่มจุลชีพในท้องถื่น และสภาวะยังยั้ง
2. ศักยภาพการกระตุ้นการลดคลอรีนในพื้นที่ที่มีประสิทธิภาพในการลดคลอรีนด้วยสารประกอบฮาโลจิเนตเต็ดพาร์เมอ์
3. กลุ่มจุลชีพที่มีบทบาทหลักในการลดคลอรีนพีซีบีในตะกอนดิน
4. การประยุกต์ใช้เพื่อการฟื้นฟูสภาพพื้นที่ที่ปนเปื้อนด้วยสารประกอบพีซีบีหรือสารประกอบคุณสมบัติใกล้เคียงกัน

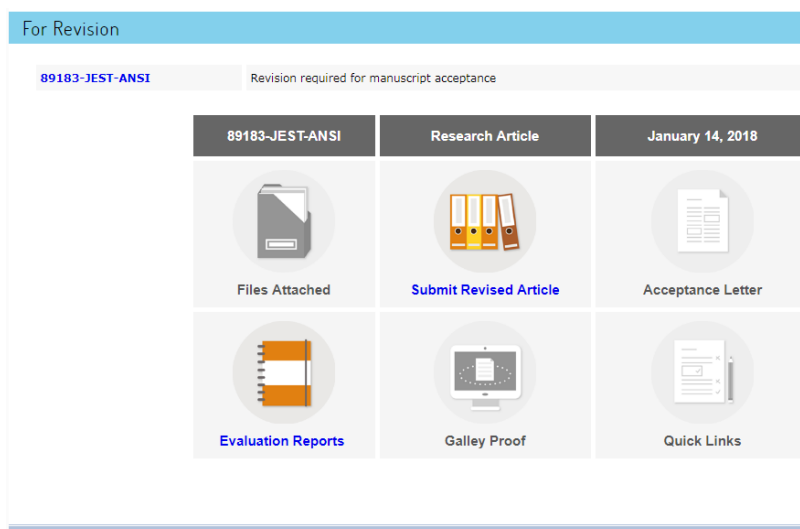
เอกสารอ้างอิง

- [1] Anotai, J., Chyan, J. M., Sudjarid, W., Wanitchapichat, W., and Chen, I. M. 2010. Hexachlorobenzene Dechlorination by Enriched Mixed Cultures from Thai Canal. *Fres. Environ. Bull.* 19, 469-473.;
- [2] Chen I.M., Wanitchapichat W., Jirakittayakorn T., Sonohniti S., Sudjarid W., Wantawin C., Voranisarakul J., and Anotai J. 2010. Hexachlorobenzene dechlorination by indigenous sediment microorganisms. *J. Hazard. Mat.* 177, 244-250. [DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.12.024](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.024);
- [3] Sudjarid W, Chen I-M, Monkong W, Anotai J. 2012. Reductive dechlorination of 2, 3, 4-chlorobiphenyl by biostimulation and bioaugmentation. *Environ. Eng. Sci.* 29, 255-261. DOI: [10.1089/ees.2011.0228](https://doi.org/10.1089/ees.2011.0228);
- [4] Boonyatumanond R, Wattayakorn G, Amano A, Inouchi Y. 2007. Reconstruction of pollution history of organic contaminants in the upper Gulf of Thailand by using sediment cores: First report from Tropical Asia Core (TACO) project. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 554–565. [DOI:10.1016/j.marpolbul.2006.12.007](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.12.007).
- [5] Winchell, L.J., Novak, P.J., 2008. Enhancing polychlorinated biphenyl dechlorination in fresh water sediment with biostimulation an bioaugmentation. *Chemosphere* 71, 176-182. DOI:[org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.021](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.021).
- [6] Nollet, H., Verstraete, W., 2003. Development of microbial granules for PCB dechlorination. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 68, 185–189. PMID: 15296159.
- [7] Chen I.M., Chang Y.F. and Lin, H. 2004. Microbial Dechlorination of Hexachlorobenzene by Untamed Sediment Microorganisms in Taiwan. *Pract. period. hazard., toxic, radioact. waste manag.* 8. 1-6. DOI: [10.1061/\(ASCE\)1090-025X\(2004\)8:2\(73\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)1090-025X(2004)8:2(73));
- [8] Wu, Q, Bedard, D.L. AND Wiejel, J. 1997. Temperature Determines the Pattern of Anaerobic Microbial Dechlorination of Aroclor 1260 Primed by 2,3,4,6-Tetrachlorobiphenyl in Woods Pond Sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4818–4825.
- [9] Vainberg, S., Condee, C.W., Steffan, R.J., 2009. Large-scale production of bacterial consortia for remediaton of chlorinated solvent-contaminated groundwater. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1189–1197. DOI:[10.1007/s10295-009-0600-5](https://doi.org/10.1007/s10295-009-0600-5); PMID:19521729.

- [10]MacDonald, D.D., Ingersoll, C.G. and Berger, T.A. 2000. Development and evaluation of consensusbased sediment quality guildlines. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 39, 20-31. DOI: 10.1007/sOM440010075;
- [11]Abramowicz, D. A., 1994. Aerobic PCB Biodegradation and Anaerobic PCB Dechlorination in the Environment. Res. Microbiol. 145, 42-46. PMCID: PMC1519294;
- [12]Bedard D. L., Quensen, J.F.III. 1995. Microbial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. In: Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, Lily Y. Y. and Carl E. C. Wiley-Liss Inc., New York, pp. 127-137.;
- [13]Nies, L. and Vogel, T. M. 1990. Effects of Organic Substrate on Dechlorination of Aroclor 1242 in Anaerobic Sediments. App. Environ. Microbiol. 56, 2612-2617. PMCID 184808;
- [14]Wiegel, J. and Wu, Q. 2000. Microbial Reductive Dehalogenation of Polychlorinated Biphenyls. FEMS Microbiol. Ecol. 32, 1-15. PMID 10779614;
- [15]Krumins, V., Park, J.W., Son, E.K., Rodenburg, L.A., Kerkhof, L.J., Häggblom, M.M. and Fennell, D.E. 2009. PCB Dechlorination Enhancement in Anacostia River Sediment Microcosms. Water Res. 43, 4549-4558. DOI:[10.1016/j.watres.2009.08.003](https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.003); PMID 19744693;
- [16]Bedard D. L., Heidi, M. V. D., and Kim, A. D. 1998. Brominated Biphenyls Prime Extensive Microbial Dechlorination of Aroclor 1260 in Housatonic River Sediment. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1786-1795. Available from: <http://aem.asm.org/content/64/5/1786.full> [Accessed May 1998]
- [17]Kim, A.D. and Bedard, D.L. 1999. Use of halogenated benzoates and other halogenated aromatic compounds to stimulate the microbial dechlorination of PCBs. Environ. Sci. Technol. 33, 2057-2063. DOI: [10.1021/es9812498](https://doi.org/10.1021/es9812498);
- [18]Chang, B. V., Chou, S. W. and Yuan, S. Y. 1999. Microbial Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls in Anaerobic Sewage Sludge. Chemosphere. 39, 45-54. DOI: [10.1016/S0045-6535\(98\)00587-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00587-6);
- [19]Oh, K.-H., Ostrofsky, E. and Cho, Y.-C. 2008. Molecular Characterization of Polychlorinated Biphenyl-Dechlorinating Populations in Contaminated Sediments. J. Microbiol. 46, 165-173. DOI: [10.1007/s12275-007-0214-4](https://doi.org/10.1007/s12275-007-0214-4); PMID: 18545966;
- [20]Fennell D.E., Nijenhuis I., Wilson S.F., Häggblom M.M. 2004. Dehalococcoides ethenogenes strain 195 reductively dechlorinates diverse chlorinated aromatic pollutants. Environ. Sci. Technol. 38, 2075-2081. DOI: [10.1021/es034989b](https://doi.org/10.1021/es034989b);

- [21]Bedard, D. L., Ritalahti, K. M., and Loffler, F. E. 2007. The Dehalococcoides Population in Sediment-Free Mixed Cultures Metabolically Dechlorinates the Commercial Polychlorinated Biphenyls Mixture Aroclor 1260. *App. Environ. Microbiol.* 73, 2513-2521. DOI: [10.1128/AEM.02909-06](https://doi.org/10.1128/AEM.02909-06); PMID: 17308182;
- [22]Cutter L.A., Watt J.E.M., Sower K.R., May H.D. 2001. Identification of a microorganism that links its growth to the reductive dechlorination of 2345-chlorobiphenyl. *Environ. Microbiol.* 3, 699-709. DOI: [10.1046/j.1462-2920.2001.00246.x](https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00246.x);
- [23]Orphan V.J., Hinrichs K.U., Ussler, W., Paull C.K., Taylor L.T., Sylva S.P., Hayes J.M., Delong E.F. 2001. Comparative analysis of methane-oxidizing *archaea* and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Applied. Environ. Microbiol.* 67, 1922-1934. DOI:[10.1128/AEM.67.4.1922-1934.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1922-1934.2001); PMCID: [PMC92814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC92814/);
- [24]Muyzer G., De Waal E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695–700. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202176/> [Accessed March 1993]
- [25]Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215: 403-10. DOI:[10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2) ;PMID: 2231712;
- [26]Metcalf and Eddy, 1991. Wastewater engineering treatment disposal reuse. New York: McGraw-Hill Book Company.
- [27]Chen I.M., Chang F.C. and Wang, Y.S. 2000. Correlation of gas chromatographic properties of chlorobenzenes and polychlorinated biphenyls with the occurrence of reductive dechlorination by untamed microorganisms. *Chemosphere.* 45, 223-229. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11572614> [Accessed Oct 2001]
- [28]Katayama A., Fujie K. 2000. Charaterization of soil microbiota with quinone profile. In: *Soil. Biochem*, Bollag J.M. and Stotzky G., Marcel Ceker, Inc., pp. 303-347.
- [29]hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). *Front. Microbiol.* 13, 1053. DOI: [10.3389/fmicb.2015.01053](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01053); PMID 26528247;

ภาคผนวก



89183-JEST-ANSI / Research Article

Final Decision: Accepted After Major/Extensive Revision

Reference your article entitled "Enhancement of Polychlorinated Biphenyls Dechlorination Efficiency in Sediments." submitted for publication to Journal of Environmental Science and Technology.

Before final publication I will suggest you to incorporate the following suggested modifications in your paper and resubmit for further evaluation. My decision is based on the following reason(s):

MAJOR comments in support of the decision

Enhancement of Polychlorinated Biphenyls Dechlorination Efficiency in Sediments

Wichidtra. Sudjarid¹

¹Department of Environmental Science, Sakon Nakhon Rajabhat University, Sakon Nakhon, Thailand

wichidtra.s@snru.ac.th LiveDNA: 66.23009

(corresponding author)

I-Ming. Chen²

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

Tainan, Taiwan

lmchen@mail.cnu.edu.tw

Jin. Anotai³

³Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi,

Bangkok, Thailand

Jin.ano@kmutt.ac.th

Abstract

Background: Polychlorinated biphenyls (PCBs) are very persistent and contaminated in the environment. The aims of this research were: 1) to determine the sustainability of dechlorination ability of the microbes after a long-term storage; and 2) to activate and characterize the enrichment of PCBs dechlorinating microbes by using priming congeners. **Methodology:** Sediment slurries (SS) were collected from several streams around Samuth Prakarn Province of Thailand. Fresh and storage SS were tested and compared to evaluate the dechlorination ability and microbial sustainability. 234- and 2345-CBps were applied individually. **Conclusions:** Fresh SS could effectively dechlorinate 234-CBp; whereas storage SS was somehow less-active. Halogenated priming congeners including methyl 4-bromobenzene, 14-dibromobezene, 4-bromobenzonitrile, 4-bromobezoic hydrazide could significantly enhance the dechlorination of 234-CBp but did not accelerated dechlorination in 2345-CBp. From the 16S rRNA DGGE analysis, the bacteria responsible for PCB dechlorination were *Firmicutes* and *Proteobacteria*. The results from this study showed a potential in-situ cleanup for PCB contaminated areas in Thailand.

Keywords: Remediation; Reductive Dechlorination Polychlorinated Biphenyls, Halogenated priming

Introduction

Bioremediation technique has long been investigated and experimented to clean up Polychlorinated biphenyls (PCBs) contaminated sites. There are two major bioremediation techniques: 1) biostimulation (adding the limiting nutrient or external carbon sources to support growth of microorganisms); and 2) bioaugmentation (adding microorganisms to initiate the dechlorination). Nevertheless, these techniques alone are still insufficient to remediate PCBs contaminated sites. To illustrate this point, the bioaugmentation in actual contaminated site is ineffective when the environment is not suitable, e.g., temperature, moisture, pH, etc. There are some cases where a large quantity of dechlorinating microbes for support microorganisms growth are required^{1,2,3}. In the meantime, the biostimulation technique cannot be accomplished when there is no existence or inactive of dechlorinators in that site. As such, it is essential to study an alternative technique to initiate the dechlorination by adding environmental friendly chemicals such as halogenated primers.

PCBs are a class of compounds in which the aromatic biphenyls carbon skeleton carries between 1 to 10 chlorine atoms. These PCBs are very persistent in the environment. As a result, they are classified as one of the 12 persistent organic pollutants (POPs). It continuing released into an environment as primarily enters through water, soil, air and aquatic lives for several decades. PCBs are difficult to be oxidized and reduced. Two major properties of PCBs including of low water solubility and highly lipophilicity make PCBs easy to adsorb onto sediments. The lipophilic and persistent nature of PCBs also contribute to high bioaccumulation potential and biomagnifications of

PCBs in higher trophic levels of the food chain^{4,5}. PCBs could be dechlorinated both in aerobic and anaerobic conditions; highly chlorinated congeners could be reductively dechlorinated under anaerobic; whereas, less chlorinated congeners could be oxidatively degraded. Dechlorination rates under anaerobic environment are commonly slower than aerobic condition⁶. In Thailand, hexachlorobenzene could be effectively dechlorinated in the sediments of several natural streams without any culture enrichment or nutrient supplement⁷⁻⁸. In this case, these stream sediments could be effective for simple PCBs congeners degradation as well⁹.

From their molecular structures, 234- and 2345-CBPs seem to be susceptible to dechlorination since both of them have chlorine atoms in only one phenyl ring⁹. Dechlorination rates of PCBs could be enhanced by adding two electron properties: 1) electron donors, e.g., volatile fatty acids and organic solvents^{10,11} and 2) electron acceptors, e.g., haloprimers, sulfate and nitrate^{12,13}. The use of brominated biphenyls to initiate the reductive dechlorination of Aroclor 1260 in Housatonic River sediments has been significantly evidenced¹⁴. In addition, halogenated benzoates and other halogenated aromatic compounds could also extend the efficiency of PCBs dechlorination¹⁵. Hence, these compounds were used in terms of "priming congeners" in several studies to support the dechlorination of microcosms. These compounds could initiate biphenyls catabolic enzyme as cometabolism of PCBs degradation.

The occurrence of PCBs dechlorination has been demonstrated under various conditions, e.g., methanogenic, sulfate reductive, and denitrifying¹⁶. Complex patterns of dechlorination among various CBP congeners have also been verified¹⁷. A number of PCB dechlorinators have been identified under different conditions, environmental factors, stressors as well as enrichment cultures. PCB dechlorinators identified from St. Lawrence River comprised both Eubacteria including *Escherichia coli*, *Lactoshaera pasteurii*, *Clostridium thermocellum*, and *Dehalobacter restrictus* and Archaeal such as *Methanosarcina barkeri*¹⁸. Besides, there are some experimental results that the *Dehalococcoides* spp.^{19,20}, *Chloroflexi* phylums²¹ and *Dehalococcoides mccartyi*²² also play an important role in PCB dechlorination.

Based on the review of several studies conducted under various conditions, significant differences in PCBs dechlorinators were found under different conditions and microbial sources. The aims of this research are: 1) to determine the sustainability of dechlorination ability of the microbes after cold-climate simulated condition; and 2) to activate and characterize the enrichment of PCBs dechlorinating microbes by using priming congeners.

Materials and Methods

Characterization of sampling sites

Sediments and stream waters were collected from several natural water resources around industrial areas and their vicinity in Samutprakarn Province of Thailand. Five PCBs contaminated areas were investigated including: 1) Hum Lum Poo Canal (HCB) which receives treated and untreated discharge from the Bangpoo Industrial Estate and nearby factories its indigenous sediment microbes could effectively dechlorinate 234-CBPs in fresh sediment⁹; 2) a canal receiving effluent

discharge from the center wastewater treatment plant of the Bangplee Industrial Estate (BP1, BP2) where several electronic-related factories which possibly using dielectric fluids are located; 3) a canal receiving discharge from small material recovery facilities (MF1, MF2) which possibly received PCBs leakage during waste separation and cleaning; 4) a canal nearby the South-Bangkok Power Plant (PWP) where certain amount of used transformers and capacitors were stored; and 5) the Bangpakod Canal (BPK) which has high water quality and is a habitat for many aquatic lives; hence, served as a control for less-PCBs contaminated site. Sediments used to determine the dechlorination activity in this study were based on fresh and stored processes. The fresh sediments were instantly experimented after they had been collected. The stored sediments were kept in plastic bag under 4 °C to simulate the cold tempered climate approximately a year.

Chemicals

All chemicals used in this research were reagent grade. They were ordered from different locations. For example, 234-CBp and 2345-CBp were purchased from AccuStandard, Inc. (USA). Methyl 4-Bromobenzene (4-MBZ), 14-Dibromobezene (14-DBZ), 4-Bromobenzonitrile (4-BN), 4-Bromobezoic Hydrazide (4-BH) were purchased from Sigma Aldrich, Inc. (USA). Stock and standard solutions were prepared in acetone. The solutions were transferred into several 1.5 ml-vials, and sealed with butyl rubber stoppers and alumina-caps, and kept refrigerated until being used. All solvents used were GC grade.

Sediment Slurry preparation and incubation

Sediment slurry (SS) was prepared in two sets; fresh sediment was prepared by following Sudjarid *et al.*⁹; whereas stored sediment was prepared by mixing fresh canal water to stored sediment at the ratio of 1:1(v/v). Then, the mixed stored sediment was sieved to remove the particles larger than 0.7 mm using a 100-mL glass syringe with a 22G×2 hypodermic needle (0.7 mm opening). The sieved sediment was required to be kept in a 100-ml alumina-capped serum bottle as recommended by Chen *et al.*⁸.

Then, 0.1 ml of each target PCB congener stock-solution at 1,000 mg/l was spiked into the serum bottle to make an initial concentration of 2 mg/l. Halogenated priming congeners were separately amended from the stock solution prepared at 50,000 mg/l to provide the final concentration of 75 mg/l. Total final acetone portion in the prepared sediment slurry was lower than 0.5 % (v/v) to prevent any toxicity or potential impact on dechlorination by the solvent amended. The serum bottles were incubated in the dark at room temperature. Non-primer and sterile control sets were also prepared and monitored for comparison.

PCBs extraction and analytical procedures

All samples were extracted by the solvent and ultrasonic extraction (EPA 3550). Two ml of aliquot sample was withdrawn from the serum bottle by a glass syringe with a 22G×2 hypodermic needle and injected into an extraction tube containing 0.2 ml of 6 N NaOH. The aliquot was extracted three times by *n*-hexane as described in Chen *et al.*⁸ A small amount of anhydrous sodium sulfate was added into the extract for moisture removal before GC analysis. The concentrations were calculated by using an internal standard as mg/l weight on volume basis (v/v).

Gas chromatography analysis

Application of GC analysis followed the US EPA 8082A method for GC/ μ ECD (quantification) and the EPA 680 method for GC/MS (qualification). Gas chromatograph capillary column (6890N from Agilent Technologies (USA)) equipped with a μ ECD (J & W Scientific of Agilent Technologies (USA)) and 30-m×0.25-mm ID fused-silica capillary column chemically bonded with SE-54 (HP-5) with 0.25- μ m film thickness was used to analyze PCBs and their intermediates. All intermediate products were confirmed by the GC/MS (5730 Network from Agilent Technologies (USA)). Electron impact ionization as ion sources and quadrupole mass analyzer and 30-m×0.25-mm ID fused-silica capillary column chemically bonded with SE-54 (DB-5MS, J & W Scientific from Agilent Technologies (USA)) with 0.25- μ m film thickness. Both GCs were operated under the following conditions: 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 were set at 280°C and 300°C, respectively. Nitrogen and helium gases were used as the makeup (20 ml/min) and carrier (1 ml/min) gases, respectively. The split ratio was kept at 10:1.

Inoculating cultures for microbial characteristic

To verify dominating microorganisms, dechlorinating microcosms in sediment slurries were enriched and enumerated using a serial-transfer technique with proper medium with 0.5% of yeast extract (20%, v/v). At the end of the dechlorination sessions of 234- and 2345-CBPs by amending halogenated primers, those sediment slurries with prominent degradation capability, including Bangplee Industrial Estate site number 2 (BP2) and South-Bangkok Power Plant (PWP) and Bangpakod Canal (BPK), with separately amended with Methyl 4-bromobenzene and 4-Bromobenzonitrile were chosen.

PCR-DGGE and DNA Sequencing

To study the microbial communities, one gram of SS was used for DNA extraction. The SS was prepared by centrifugation method prior to DNA extraction. They were used UltraClean[®] Soil DNA kit (MOBIO Laboratories, Inc. (USA)), and followed the manufacture's protocols. The genomics DNA were further processed to increase the sensitivity using nested PCR technique. The DNA was

Reamplified PCR products for DGGE analysis were used primers 338_{Gc-f} (5'-CGCCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') and 518_r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')²³. The amplification program was 5 min at 95°C and then 30 cycles of 0.5 min at 95°C, 0.3 min at 60°C, 0.5 min at 72°C, followed by a final extension at 72 °C for 7 min and a final hold at 4°C. PCR products were analyzed on 1.2% Agarose gel to collect molecular size.

Eighteen μ l of reamplified PCR products with 338GC-f were loaded onto 7.5% acrylamide gels in 1xTris-acetate-EDTA (1xTAE). The percent denaturant were ranged from 40 to 50, which 100% denaturant contains 5.6 M urea and 40% (v/v) formamide in 1xTAE. The DGGE was performed with some modifications from the protocol of Moyer *et al.* (1993)²³ by using a DGGE-2000 system instrument (CBS Scientific Company, Del Mar, CA (USA)). The electrophoresis was carried out at 60°C for 5 hours in 0.5xTAE buffer at a constant voltage of 200 V. The gel was stained with STBR Green nucleic acid stain (Molecular Probes, Eugene, OR (USA)) for 30 min and DNA fragments were visualized on an UV transilluminator (Biovision CN 1,000/26M, Vilber Lourmat (France)). The individual intensity DGGE bands were collected; each band was resuspended into 20 μ L Milli-Q water and stored at 4°C overnight. The DNA were eluted from acrylamide gel, elution was used as a template to reamplify by using the primer set without GC-clamp. The PCR products were purified by using Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech, Ltd., (USA)). Sequences were initially compared to know 16S rRNA gene sequences in the GenBank database using the BLASTn to locate nearly exact matches in the GenBank database²⁴.

Dechlorination ability by indigenous microbes

Dechlorination ability of the sediment slurries from all sites have been tested by separately spiked with 234- and 2345-CBPs. The microbial capabilities of both fresh and stored sediment slurries were investigated if their dechlorination abilities could be sustained after long-time storage (one year) without any substrate or nutrient supplement. Physical and chemical properties of sediment slurries were assessed and shown in Table 1. The COD:N:P ratios were 100:4:1 and 100:5:3 for fresh and stored slurries, respectively. The results showed insignificant differences

between fresh and stored sediment slurries implying that existing nutrients were sufficient for microbial activities²⁵. Based on the investigation of 234-CBp dechlorination by using fresh SS along Hua Lam Poo Canal, the initiative dechlorination occurred after 8 weeks. When intermediate products began the dechlorination could be completed within 2 -14th week (Table 2). The experimental result also showed that HLP appeared to provide the best performance. Only 24-CBps was found as a reductive product which is less chlorinated PCB congeners. These less chlorination components are widely perceived as less toxic but persistent in the anaerobic condition. They are likely to be volatile and aerobically degradable. Unfortunately, 234-CBp dechlorination cannot initiate under stored SS by untamed microbes but indigenous microbes from Bangplakod site are still active (Table 3). This would be implied to the consequence of simulated temperate climate in sediment could retard the degradation of 234-CBp; even though, fresh canal water could not be revived. These results represented that the dechlorinating microbes were prevalent no matter high or low polluted sites. Moreover, some noticeable that the indigenous microbes from HLP site after long-term period of receiving xenobiotic pollutants totally lost their degradation abilities. This indicates that the dechlorination ability in the fresh SS was more effective than that of the stored SS despite insignificant differences of the basic parameters. The results also implied that the dechlorination activity of PCB-dechlorinating might be less if they did not receive external xenobiotic compounds, carbon or nutrient sources continuously.

In terms of 2345-CBps, all sites other than HLP sediment slurry sets are still feasible to be dechlorinated (Figure 1). The dechlorination could occur after 8 – 20th weeks but it could be monitored initiative dechlorination postponed in sediment from small material recovery facilities site. The initiative dechlorination was the key success of dechlorination. The results showed that 2345-CBp was easily to be degraded than 234-CBp. It might be due to the reaction heat (ΔH_r°) and/or $\Delta \ln RRT$ of 2345-CBp to 235- and 245-CBp (-14.746, -14.821/ 0.557, 0.525) were higher than 234-CBp to 24-CBp (-14.118/ 0.514)²⁶. The results were significantly different from those in Chen, *et al.*²⁷, who found 234- and 2345-CBps did not dechlorinate by indigenous microbes of Ho-Tsin River, Kaohsiung, Taiwan within 20 weeks inoculation. The tropical climate and native microbes were hypothesized as two key factors causing the different results.

This study also evidences that the environmental conditions and/or native microorganisms in Thailand were potentially to be degraded HCB^{7,8} or simple PCB congeners by using fresh sediments⁹ and compound has sufficiently energy release.

PCBs dechlorination by amending halogenated primers

The PCBs dechlorination ability could not be sustained after long-term stored sediment from previously scenario. However, there are some plausible applications to stimulate PCB dechlorinating microbes and therefore accelerate the production of dehalogenating enzymes. This might be preceded by introducing alternative halogenated electron acceptors/co-substrates to the dechlorination test. While the application of isolated microorganisms was mostly accomplished in laboratory scale, only few cases reached contaminated sites. Therefore, a chemical was applied to

promote the dechlorination and initiative of dechlorination ability in this study. The degradation of halogenated priming congeners can easily be measured. During the extraction of PCB congeners, the halogenated priming congeners were also extracted. As such, qualification primings were not interfered with any PCB congeners.

Methane gas production was also observed; whereas, reductive dechlorination of PCBs could occur by direct (sulfate reducing and methanogenesis bacteria) and indirect (acidogenesis, iron reducing bacteria) dechlorinators in ecosystem metabolism. The results suggested that PCB dechlorination was not related to the production of methane gas. Hence, the occurrence of methane could be detected before the intermediates have been discovered. In this sense, methanogenesis was not the main dechlorinator in this experiment. However, it was noticeable that halogenated primers might degrade under methanogenesis condition, since methanogenesis plays a vital role in HCB dechlorination⁸.

Four kinds of priming congeners were separately applied, including methyl 4-bromobenzene (4-MBZ), 14-dibromobezene (14-DBZ), 4-bromobenzonitrile (4-BN), and 4-bromobenzoic hydrazide (4BH). Dechlorination of 234-CBP by amending methyl 4-bromobenzene as shown in Figure 2. The dechlorination could begin in the first stage after 6th week and dechlorination could complete within the 8th week in BP2, HLP and PWP sites and a second stage after the 14th week. The dechlorination of application of 14-dibromobezene has also found from 8 to 14 weeks and could be completed within the 20th week in BP1 and 2, HLP, and PWP but other sites still remained (Figure 3). Amendment of 4-bromobenzonitrile could effectively enhance dechlorination begin after the 10th week and completed within the 20th week, excluding BP1 and BPK sediments (Figure 4). However, the amending of 4-bromobenzoic hydrazide could be activated at all sites of SS, except BP1 and HLP sites (Figure 5). These results revealed that the consortium from HLP site could be effectively initiated and dechlorinated again after lost their capability, except amendment with 4-bromobenzoic hydrazide. This confirms that the microbes lost ability after non-receiving pollutants and selected the initiative congeners is required. This study suggests that the amendment of 4-bromobenzonitrile was favourable in all investigation sites.

The results implied that the dechlorination could significantly improve by the application of priming congeners regardless of sample site areas. In contrast, the dechlorination initiation was not observable in non-priming amended set (Table 3), excluding Bangplakod site. This finding of this study suggested that the abandon contaminated area which did not continuously receive aromatic and/or xenobiotic compounds after have been banned for long period of time; the initiation dechlorination might be required. It makes information of supporting and dechlorinating bacteria were involved and important of keys to initiate PCBs dechlorination. Another remarkable point was established in site of Bangplakod Canal refers as less-contaminating area but the dechlorination efficacy was not less and seems powerfulness in comparable rates to other sites. This result represented that the initiative of microorganism capability is an alternative and plausible technique to clean up a long-term PCBs contaminated site with low energy released compounds.

In contrast to 234-CBP dechlorination, the degradation of 2345-CBP could be activated by using indigenous microbes, excluding HLP (Table 4). The amendment of methyl 4-bromobenzene

(Figure 6), 14-dibromobezene (Figure 7), 4-bromobenzonitrile (Figure 8), and 4-bromobenzoic hydrazide (Figure 9) significantly improved the dechlorination of MF1 and 2 and HLP sites, but not 4-bromobenzoic hydrazide, which was not favorable to HLP sediments. It seems likely to results of used 4-bromoacetophenone and 4-bromosulfonated were failed to stimulate PCBs dechlorination even though it could give the bromide substituent as well¹⁵. This finding suggest that the sediment which has been heavily and continuously receiving the pollutants might lose their degradation capability after took off and it could be recovered by using chemical stimulation. The priming compounds could reductively to bromine substituent and could not accelerate the dechlorination of PCBs in the storage sediments, except MF1, MF2 and HLP site. While priming could enrich microorganisms utilizing halobiphenyls as electron acceptors¹⁵, the absence of dechlorination discovered in this article might be driven by inactive microorganisms, i.e., dechlorinators or, supporting groups. Inactive PCBs dechlorinators were initiated instead of adding enrich microorganism in these sites.

The dechlorination intermediate products were varies which depending to the prevalence of co-existing consortia under natural condition. The dechlorination pathway was found as 2345-CBps→235-and/or 245-CBps→24- and/or 25-CBps (co-eluting peaks) and 235-CBps was a majority intermediate.

Abundance of PCB dechlorinators and its characterization

This session began after the dechlorination process had completed and enrichment cultures by using serially transfer technique to characterize and identify the dynamic PCBs dechlorinators in these study sites. It could be evidenced the PCBs dechlorinating microbes in this study.

Fifteen effective inoculating cultures were selected and identified the PCBs dechlorinating microbes. The sampling sites and priming congeners were selected including sites from Bangplee Industrial Estate Site 2, South-Bangkok Power Plant and Bangplakod Canal separately amended with 4-bromobenzoic hydrazide and 4-bromobenzonitrile from PCBs dechlorination by amending halogenated primers session. The microbial community was analyzed the DNA fragment by PCR-DGGE analysis of partial 16S rRNA genes of bacteria. Fig. 10 shows the fragment DGGE bands pattern of the PCB-dechlorinating microbes after dechlorination completed and enrichment cultures. The phylogenic analysis of DGGE bands, the intensity bands were indicated the PCB-dechlorinating microbes and the same lines of the band were indicated the same dechlorinating groups. The results suggested that *Firmicutes* and *Proteobacteria* were mainly reductively dechlorinating microbes and this finding was supported by Katayama and Fujie²⁸. DNA bands of dechlorinating microbes were not detected in the originating sediments; it revealed that the dechlorinators were increased after enriched cultures by spiked the PCBs and/or amended primers. So DNA bands of dechlorinating microbes were bulk after enriched or acclimatized sediment cultures. Comparing between treatments of 234- and 2345-CBps, band of dechlorinators were trended to be similarly as same group of PCB congeners spiking rather than sampling sites or priming congeners. Moreover, South Bangkok Power plant sediment treated with 2345-CBps could be found the *Pseudomonas putida* which diverse metabolism exploited for bioremediation of aromatic compounds in contaminated soil. The notice point has been finding of PCBs dechlorinating microbes in Bangplakod Canal, which represented as

less-contaminating sediment could observe PCBs dechlorinating microbes. It might be reasonable of effectiveness dechlorination. However, the *Chloroflexi* phylum, which well known to contain PCB-dechlorinating strain, were not detected in this study²⁰. It is imply that the specificity-primers to increase the sensitivity of PCR and cloning samples were required. Finally, it suggested that the halogenating consortiums could improve dechlorination of polychlorinated biphenyls as well.

Conclusions

This article was enhanced and characterized the PCBs dechlorinating bacteria. The stored sediment under cold climate tempered criteria could retard the dechlorination of 234-CBp excluding of Bangplakod site; while 2345-CBp still could be active, except HLP site. The priming congeners could significantly improve the dechlorination capability of 234-CBps in stored sediment; except HLP amended with 4-bromobenzoic hydrazide. It refers to suitable halogenated primers were evaluated have to be selected. In contrast 234-CBp could effectively dechlorinate in fresh sediment. Finally, this study was firmly that the dechlorinators were widespread and *Firmicutes* and *Proteobacteria* were mainly dechlorinators. These results were implied a promising effects to inactive consortia which might be re-activated again after non-receiving pollutants, disturbance in order to limitation of natural resources.

Acknowledgments

This research was supported by grant from under The Thailand Research Fund (TRF 5780121) and fully thanks Prof.Somkiet Techkarnjanaruk and Ms.Nimaradee Boonapatcharoen, Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand and Sakon Nakhon Rajabhat University, Sakon Nakhon, Thailand.

References

- Nollet, H., Verstraete, W., 2003. Development of microbial granules for PCB dechlorination. Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 68, 185–189. PMID: 15296159.
- Vainberg, S., Condee, C.W., Steffan, R.J., 2009. Large-scale production of bacterial consortia for remediation of chlorinated solvent-contaminated groundwater. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36, 1189–1197. DOI:[10.1007/s10295-009-0600-5](https://doi.org/10.1007/s10295-009-0600-5); PMID:19521729.
- Winchell, L.J., Novak, P.J., 2008. Enhancing polychlorinated biphenyl dechlorination in fresh water sediment with biostimulation and bioaugmentation. Chemosphere 71, 176–182. DOI:[org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.021](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.021).
- Gomes, B.C., Adorno, M.A.T., Okada, D.Y., Delforno, T.P., Lima Gomes, P.C.F., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2014. Analysis of a microbial community associated with polychlorinated biphenyl degradation in anaerobic batch reactors. Biodegradation 25, 797–810. DOI: [10.1007/s10532-014-9700-7](https://doi.org/10.1007/s10532-014-9700-7); PMID 25104219;
- Quero, G.M., Cassin, D., Botter, M., Perini, L., Luna, G.M., 2015. Patterns of benthic bacterial diversity in coastal area contaminated by heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons

- (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). *Front. Microbiol.* 13, 1053. DOI: [10.3389/fmicb.2015.01053](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01053); PMID 26528247;
- Abramowicz, D. A., 1994. Aerobic PCB Biodegradation and Anaerobic PCB Dechlorination in the Environment. *Res. Microbiol.* 145, 42-46. PMCID: PMC1519294;
- Anotai, J., Chyan, J. M., Sudjarid, W., Wanitchapichat, W., and Chen, I. M. 2010. Hexachlorobenzene Dechlorination by Enriched Mixed Cultures from Thai Canal. *Fres. Environ. Bull.* 19, 469-473.;
- Chen I.M., Wanitchapichat W., Jirakittayakorn T., Sonohniti S., Sudjarid W., Wantawin C., Voranisarakul J., and Anotai J. 2010. Hexachlorobenzene dechlorination by indigenous sediment microorganisms. *J. Hazard. Mat.* 177, 244-250. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2009.12.024](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.024);
- Sudjarid W, Chen I-M, Monkong W, Anotai J. 2012. Reductive dechlorination of 2, 3, 4-chlorobiphenyl by biostimulation and bioaugmentation. *Environ. Eng. Sci.* 29, 255-261. DOI: [10.1089/ees.2011.0228](https://doi.org/10.1089/ees.2011.0228);
- Borja, J., Taleon, D. M., Auresenia, J., and Gallardo, S. 2005. Polychlorinated Biphenyls and Their Biodegradation. *Process Biochem.* 40, 1999-2013. DOI: [10.1016/j.procbio.2004.08.006](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.006);
- Nies, L. and Vogel, T. M. 1990. Effects of Organic Substrate on Dechlorination of Aroclor 1242 in Anaerobic Sediments. *App. Environ. Microbiol.* 56, 2612-2617. PMCID 184808;
- Wiegel, J. and Wu, Q. 2000. Microbial Reductive Dehalogenation of Polychlorinated Biphenyls. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32, 1-15. PMID 10779614;
- Krumins, V., Park, J.W., Son, E.K., Rodenburg, L.A., Kerkhof, L.J., Häggblom, M.M. and Fennell, D.E. 2009. PCB Dechlorination Enhancement in Anacostia River Sediment Microcosms. *Water Res.* 43, 4549-4558. DOI: [10.1016/j.watres.2009.08.003](https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.003); PMID 19744693;
- Bedard D. L., Heidi, M. V. D., and Kim, A. D. 1998. Brominated Biphenyls Prime Extensive Microbial Dechlorination of Aroclor 1260 in Housatonic River Sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1786-1795. Available from: <http://aem.asm.org/content/64/5/1786.full> [Accessed May 1998]
- Kim, A.D. and Bedard, D.L. 1999. Use of halogenated benzoates and other halogenated aromatic compounds to stimulate the microbial dechlorination of PCBs. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2057-2063. DOI: [10.1021/es9812498](https://doi.org/10.1021/es9812498);
- Chang, B. V., Chou, S. W. and Yuan, S. Y. 1999. Microbial Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls in Anaerobic Sewage Sludge. *Chemosphere.* 39, 45-54. DOI: [10.1016/S0045-6535\(98\)00587-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00587-6);
- Bedard D. L., Quensen, J.F.III. 1995. Microbial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. In: *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*, Lily Y. Y. and Carl E. C. Wiley-Liss Inc., New York, pp. 127-137.;
- Oh, K.-H., Ostrofsky, E. and Cho, Y.-C. 2008. Molecular Characterization of Polychlorinated Biphenyl-Dechlorinating Populations in Contaminated Sediments. *J. Microbiol.* 46, 165-173. DOI: [10.1007/s12275-007-0214-4](https://doi.org/10.1007/s12275-007-0214-4); PMID: 18545966
- Fennell D.E., Nijenhuis I., Wilson S.F., Häggblom M.M. 2004. Dehalococcoides ethenogenes strain 195 reductively dechlorinates diverse chlorinated aromatic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 38, 2075-2081. DOI: [10.1021/es034989b](https://doi.org/10.1021/es034989b);

- Bedard, D. L., Ritalahti, K. M., and Löffler, F. E. 2007. The Dehalococcoides Population in Sediment-Free Mixed Cultures Metabolically Dechlorinates the Commercial Polychlorinated Biphenyls Mixture Aroclor 1260. *App. Environ. Microbiol.* 73, 2513-2521. DOI: [10.1128/AEM.02909-06](https://doi.org/10.1128/AEM.02909-06); PMID: 17308182;
- Cutter L.A., Watt J.E.M., Sower K.R., May H.D. 2001. Identification of a microorganism that links its growth to the reductive dechlorination of 2345-chlorobiphenyl. *Environ. Microbiol.* 3, 699-709. DOI: [10.1046/j.1462-2920.2001.00246.x](https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00246.x);
- Orphan V.J., Hinrichs K.U., Ussler, W., Paull C.K., Taylor L.T., Sylva S.P., Hayes J.M., Delong E.F. 2001. Comparative analysis of methane-oxidizing *archaea* and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Applied. Environ. Microbiol.* 67, 1922-1934. DOI:[10.1128/AEM.67.4.1922-1934.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1922-1934.2001); PMCID: PMC92814;
- Muyzer G., De Waal E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695–700. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202176/> [Accessed March 1993]
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215: 403-10. DOI:[10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2) ;PMID: 2231712;
- Metcalf and Eddy, 1991. Wastewater engineering treatment disposal reuse. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Chen I.M., Chang F.C. and Wang, Y.S. 2000. Correlation of gas chromatographic properties of chlorobenzenes and polychlorinated biphenyls with the occurrence of reductive dechlorination by untamed microorganisms. *Chemosphere.* 45, 223-229. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11572614> [Accessed Oct 2001]
- Chen I.M., Chang Y.F. and Lin, H. 2004. Microbial Dechlorination of Hexachlorobenzene by Untamed Sediment Microorganisms in Taiwan. *Pract. period. hazard., toxic, radioact. waste manag.* 8. 1-6. DOI: [10.1061/\(ASCE\)1090-025X\(2004\)8:2\(73\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)1090-025X(2004)8:2(73));
- Katayama A., Fujie K. 2000. Charaterization of soil microbiota with quinone profile. In: *Soil. Biochem*, Bollag J.M. and Stotzky G., Marcel Cekker, Inc., pp. 303-347.

Figure Legends

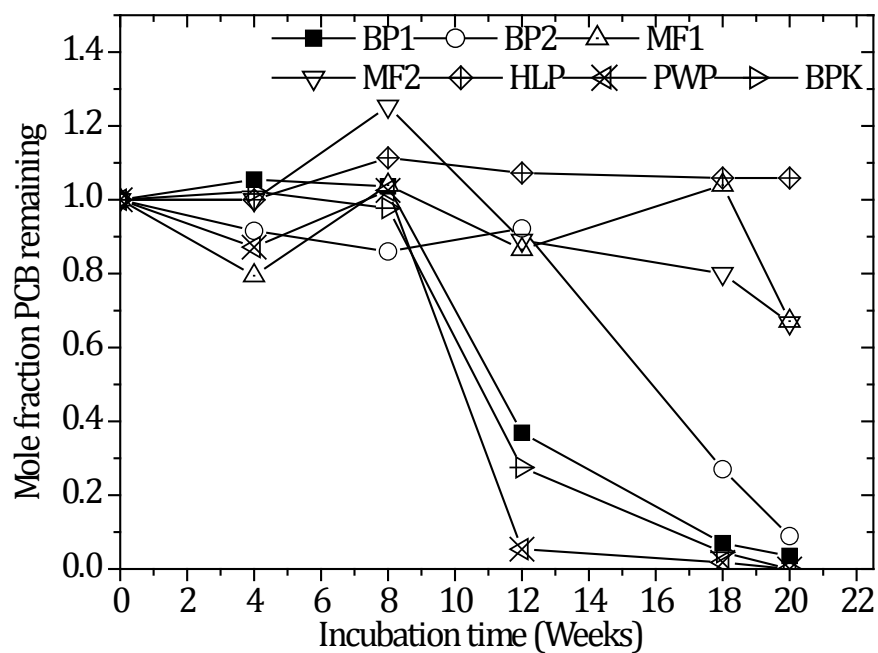


Figure 1. 2345-CBp dechlorination profiles by indigenous microbes in stored samples

Note: Hum Lum Poo Canal (HCB), Bangplee Industrial Estate (BP1, BP2), Material recovery facilities (MF1, MF2), South-Bangkok Power Plant (PWP), Bangpakod Canal (BPK)

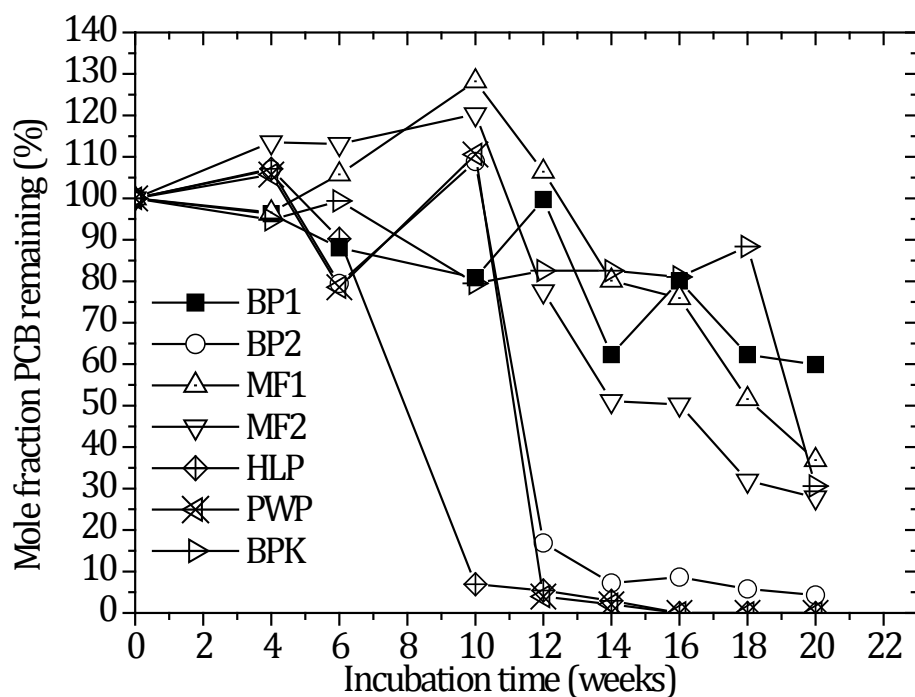


Figure 2. 234-CBp dechlorination profiles in stored sediment slurry amending with methyl 4-bromobenzene

Note: Hum Lum Poo Canal (HCB), Bangplee Industrial Estate (BP1, BP2), Material recovery facilities (MF1, MF2), South-Bangkok Power Plant (PWP), Bangpakod Canal (BPK)

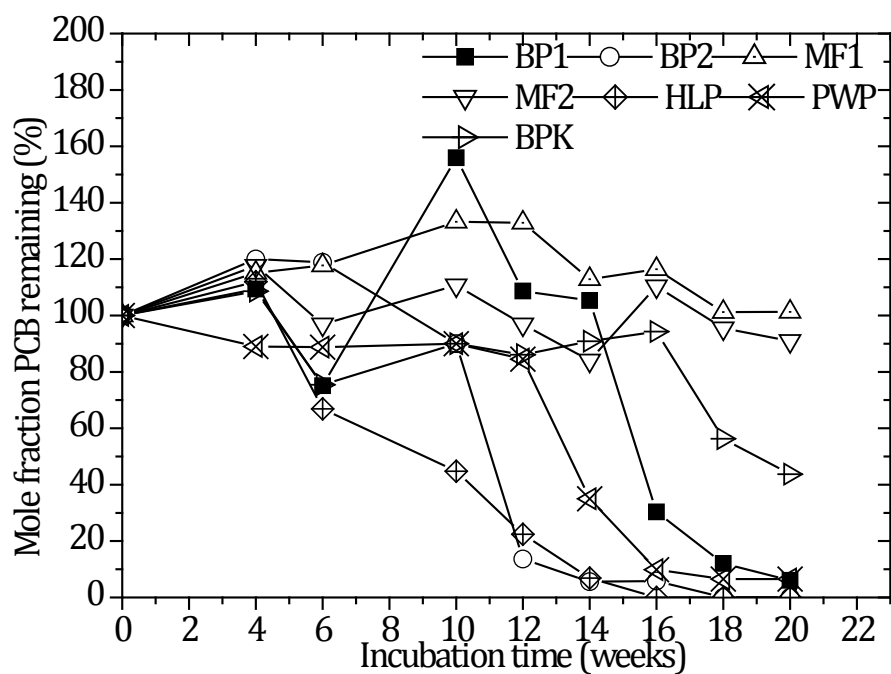


Figure 3. 234-CBP dechlorination profiles in stored sediment slurry amending with 14-dibromobenzene

Note: Hum Lum Poo Canal (HCB), Bangplee Industrial Estate (BP1, BP2), Material recovery facilities (MF1, MF2), South-Bangkok Power Plant (PWP), Bangpakod Canal (BPK)

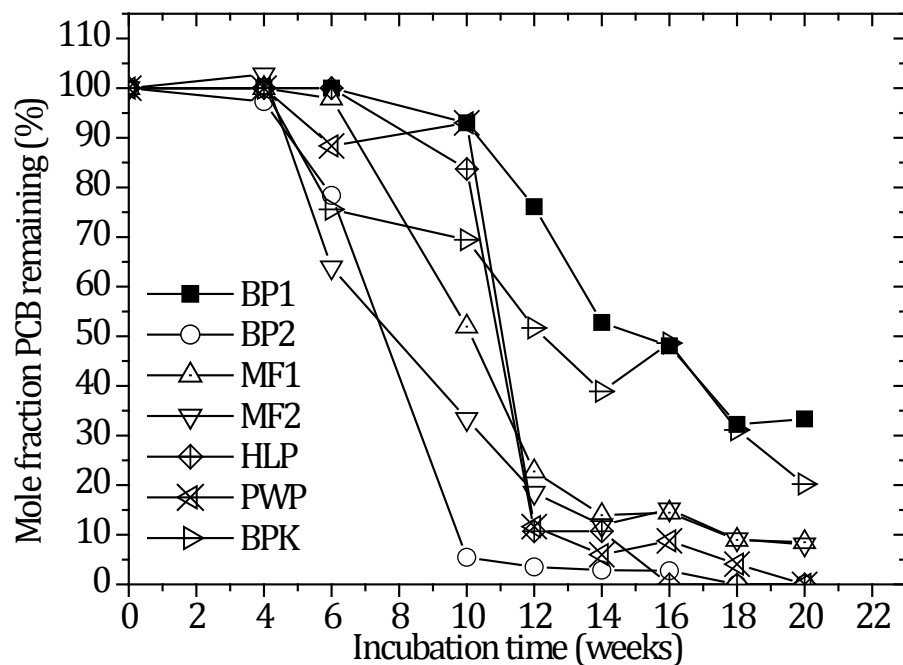


Figure 4. 234-CBP dechlorination profiles in stored sediment slurry amending with 4-bromobenzonitrile

Note: Hum Lum Poo Canal (HCB), Bangplee Industrial Estate (BP1, BP2), Material recovery facilities (MF1, MF2), South-Bangkok Power Plant (PWP), Bangpakod Canal (BPK)

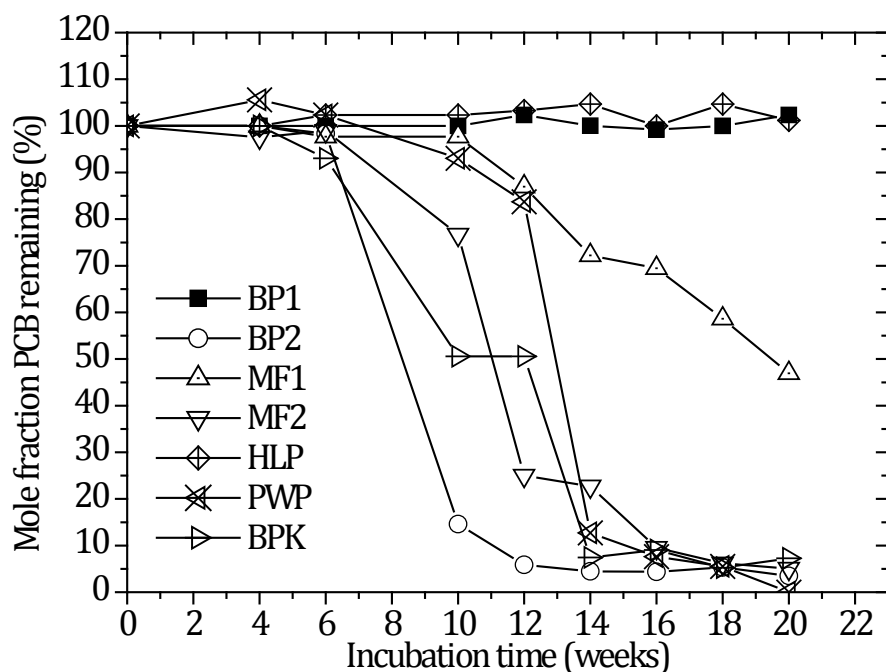


Figure 5. 234-CBP dechlorination profiles in stored sediment slurry amended with 4-bromobenzoic hydrazide.

Note: Hum Lum Poo Canal (HCB), Bangplee Industrial Estate (BP1, BP2), Material recovery facilities (MF1, MF2), South-Bangkok Power Plant (PWP), Bangpakod Canal (BPK)

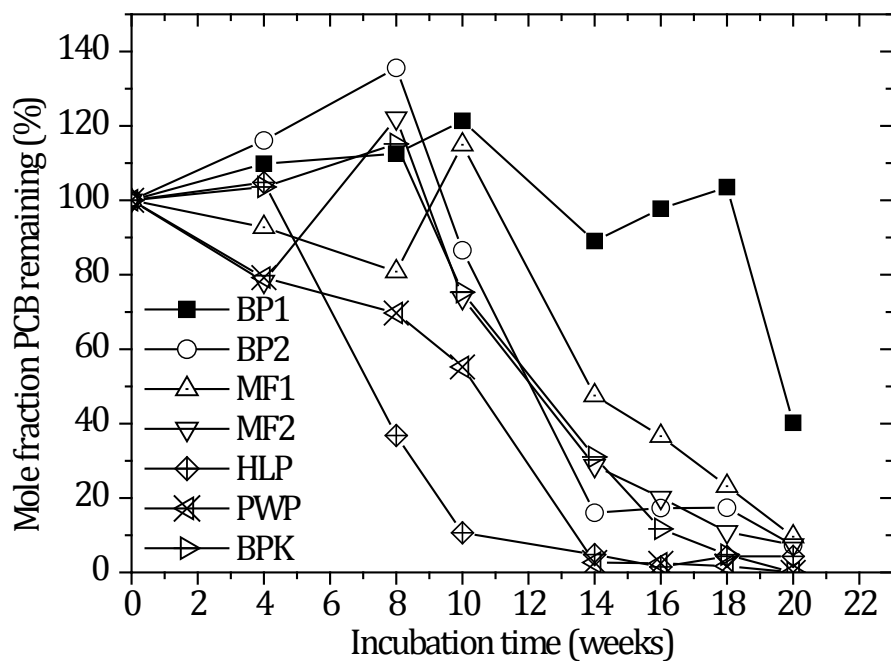


Figure 6. 2345-CBP dechlorination profiles in stored sediment slurry amended with methyl 4-bromobenzene

Note: Hum Lum Poo Canal (HCB), Bangplee Industrial Estate (BP1, BP2), Material recovery facilities (MF1, MF2), South-Bangkok Power Plant (PWP), Bangpakod Canal (BPK)

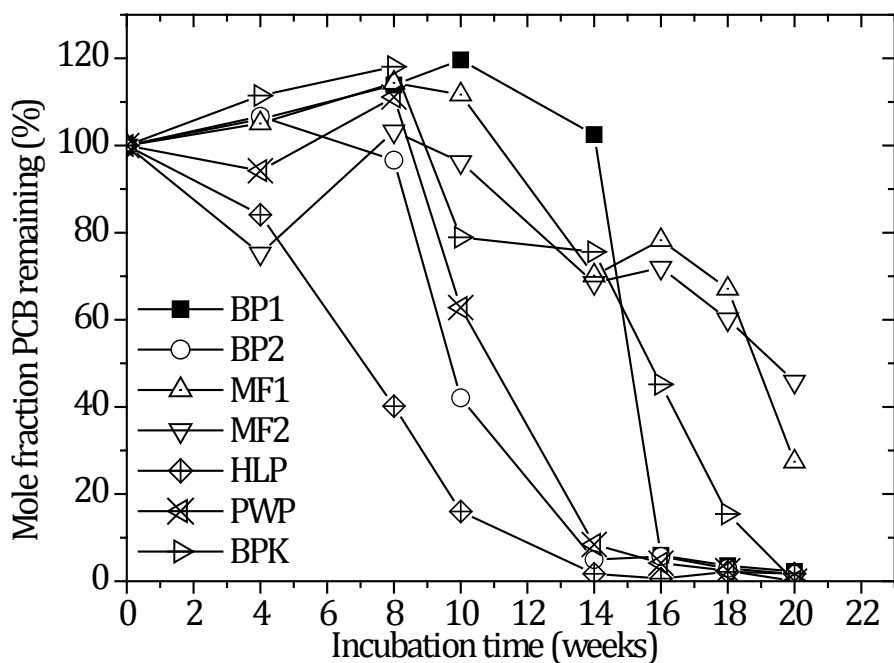


Figure 7. 2345-CBP dechlorination profiles in stored sediment slurry amending with 14-dibromobenzene

Note: Hum Lum Poo Canal (HCB), Bangplee Industrial Estate (BP1, BP2), Material recovery facilities (MF1, MF2), South-Bangkok Power Plant (PWP), Bangpakod Canal (BPK)

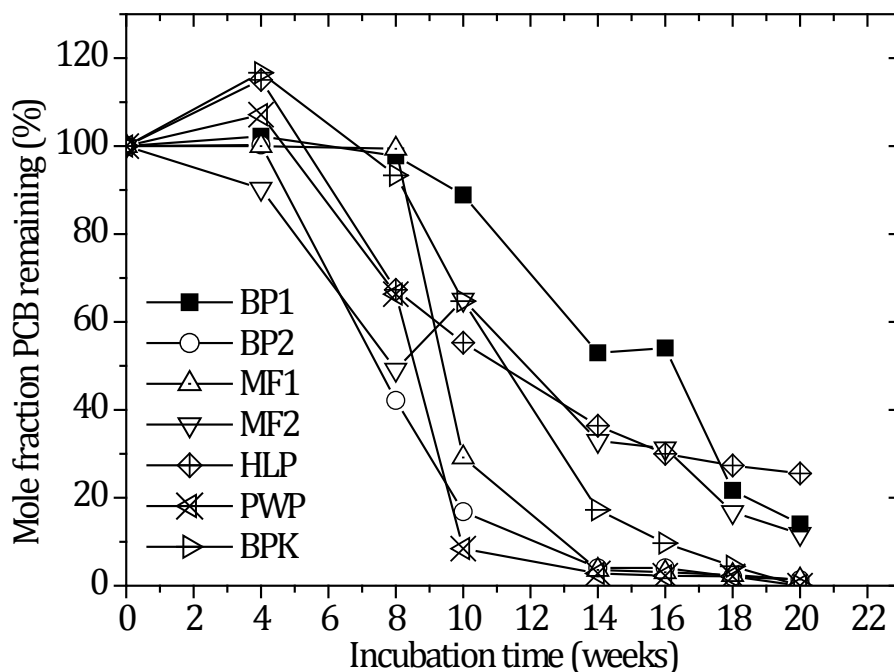


Figure 8. 2345-CBP dechlorination profiles in stored sediment slurry amending with 4-bromobenzonitrile

Note: Hum Lum Poo Canal (HCB), Bangplee Industrial Estate (BP1, BP2), Material recovery facilities (MF1, MF2), South-Bangkok Power Plant (PWP), Bangpakod Canal (BPK)

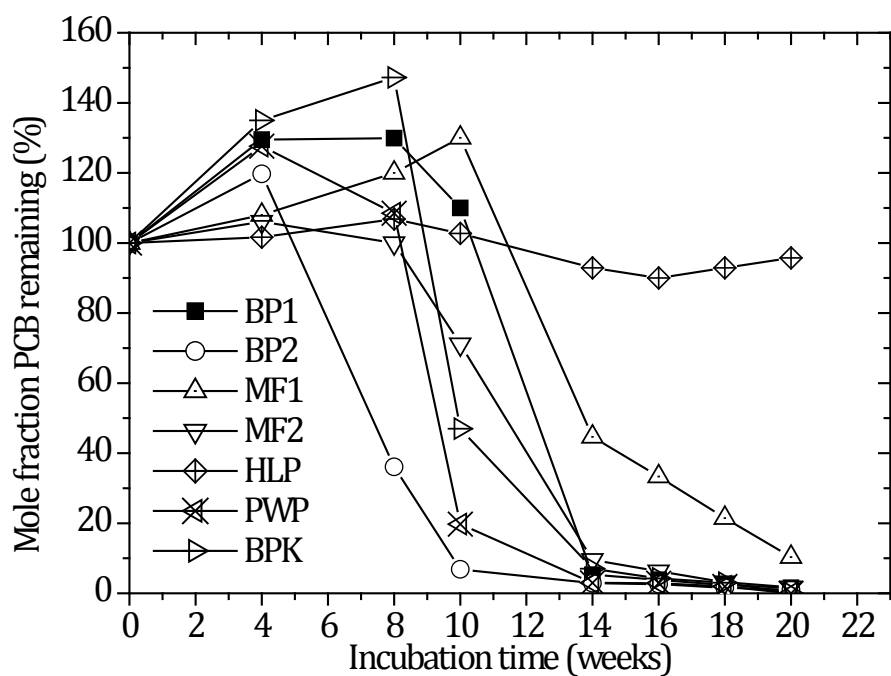


Figure 9. 2345-CBp dechlorination profiles in stored sediment slurry amending with 4-bromobenzoic hydrazide

Note: Hum Lum Poo Canal (HCB), Bangplee Industrial Estate (BP1, BP2), Material recovery facilities (MF1, MF2), South-Bangkok Power Plant (PWP), Bangpakod Canal (BPK)

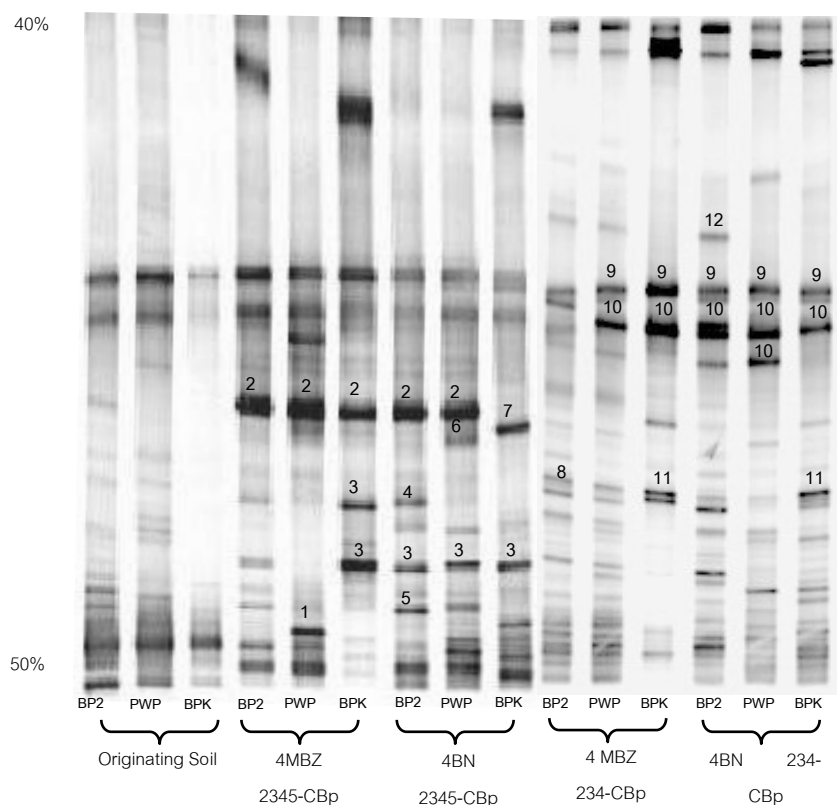


Figure 10. The PCR-DGGE profiling of PCB dechlorinating cultures

Note: Methyl 4-Bromobenzene (4-MBZ); 4-Bromobenzonitrile (4-BN) Bangplee Industrial Estate Site 2 (BP2); South-Bangkok Power Plant (PWP); Bangplakod Canal (BPK)

Tables

Table 1 Sediment slurry characterizations

Sampling Sites		COD	Phosphorus	TKN	SS	VSS
Bangplee Industrial Estate	Site 1	9,350 (11,034)	50 (305)	520 (933)	152,630 (740,760)	10,800 (17,400)
	Site 2	12,750 (19,862)	100 (540)	780 (1,053)	125,750 (751,210)	11,650 (18,765)
Small Material Recovery Facilities	Site 1	15,130 (19,310)	90 (241)	1,020 (547)	100,770 (800,680)	8,650 (14,760)
	Site 2	36,160 (24,828)	90 (179)	400 (1,107)	144,320 (858,910)	8,560 (12,985)
Hua Lum Poo Canal		23,040 (25,379)	320 (270)	930 (827)	94,950 (894,425)	14,700 (14,735)
South-Bangkok Power Plant		13,480 (13,241)	200 (229)	1,580 (747)	205,990 (858,910)	12,100 (13,620)
Bangplakod Canal		12,480 (11,030)	40 (72)	640 (427)	188,050 (741,450)	19,850 (17,350)

Note: all units are mg/l; in parenthesis were storage condition

Table 2 234-CBp dechlorination in fresh sediment slurry by using untamed microbes

Sampling sites		Occurrences time of intermediates (weeks)	Dechlorination completion time (weeks)
Bangplee Industrial Estate	Site 1	18	20
	Site 2	20	>24
Material Recovery Facility	Site 1	12	18
	Site 2	14	24
Hua Lum Poo Canal		8	10
South-Bangkok Power Plant		14	20
Bangplakod Canal		10	24

Note: 24-CBp was found only sole intermediate product.

Table 3 234-CBp dechlorination ability of various halogenated priming congeners amended

Priming congeners	Locations	Occurrences time of intermediates (weeks)	Dechlorination completion time (weeks)
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide Un-amended primers*	Bangplee Industrial Estate Site 1	14 14 12 14 x	>20 20 >20 >20 x
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide Un-amended primers*	Bangplee Industrial Estate Site 2	8 8 10 10 x	18 18 18 20 x
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide Un-amended primers*	Material Recovery Facility Site 1	12 14 10 10 x	>20 >20 20 >20 x
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide Un-amended primers*	Material Recovery Facility Site 2	8 8 10 10 x	>20 >20 20 20 x
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide Un-amended primers*	South- Bangkok Power Plant	8 8 12 14 x	14 20 20 20 x
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide Un-amended primers*	Bangplakod Canal	14 14 12 10 12	>20 >20 20 20 >20
Methyl 4-bromobenzene 14-dibromobezene 4-bromobenzonitrile 4-bromobezoic hydrazide	Hua Lum Poo Canal	8 8 10 x	14 14 14 x

Priming congeners	Locations	Occurrences time of intermediates (weeks)	Dechlorination completion time (weeks)
Un-amended primers*		×	×

Note: 24-CBp was detected as only sole its intermediate

× : the dechlorination was not occurred within incubation time (20 weeks)

* : the dechlorination by using indigenous microbes

Table 4 2345-CBp dechlorination ability of various halogenated priming congeners amended

Priming Congeners	Locations	Occurrences time of intermediates (weeks)	Dechlorination completion time (weeks)	Intermediate Products
Methyl 4-bromobenzene	Bangplee	10	>20	2,3,5-**, 2,4,5-*
14-dibromobezene	Industrial	10	20	2,3,5-*, 2,4,5-**, 2,4-/2,5-
4-bromobenzonitrile	Estate	8	>20	2,3,5-**, 2,4,5-*
4-bromobezoic hydrazide	Site 1	8	20	2,3,5-
Un-amended primers*		8	20	2,3,5-
Methyl 4-bromobenzene	Bangplee	8	20	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
14-dibromobezene	Industrial	8	20	2,3,5-*, 2,4,5-**, 2,4-/2,5-
4-bromobenzonitrile	Estate	6	20	2,3,5-, 2,4,5-
4-bromobezoic hydrazide	Site 2	6	18	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
Un-amended primers*		8	20	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
Methyl 4-bromobenzene	Material	8	20	2,3,5-, 2,4,5-, 2,4-/2,5-
14-dibromobezene	Recovery	8	>20	2,3,5-*, 2,4,5-**, 2,4-/2,5-
4-bromobenzonitrile	Facility Site	8	20	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
4-bromobezoic hydrazide	1	8	20	2,3,5-, 2,4,5-, 2,4-/2,5-
Un-amended primers*		8	>20	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
Methyl 4-bromobenzene	Material	8	20	2,3,5-, 2,4,5-, 2,4-/2,5-
14-dibromobezene	Recovery	8	>20	2,3,5-*, 2,4,5-**, 2,4-/2,5-
4-bromobenzonitrile	Facility Site	6	20	2,3,5-, 2,4,5-, 2,4-/2,5-
4-bromobezoic hydrazide	2	8	18	2,3,5-, 2,4,5-, 2,4-/2,5-
Un-amended primers*		8	>20	2,3,5-*, 2,4,5-**, 2,4-/2,5-
Methyl 4-bromobenzene	South-	8	18	2,3,5-, 2,4-/2,5-
14-dibromobezene	Bangkok	8	18	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
4-bromobenzonitrile	Power Plant	8	18	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
4-bromobezoic hydrazide		8	18	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
Un-amended primers*		8	18	2,3,5-**, 2,4,5-*

Priming Congeners	Locations	Occurrences time of intermediates (weeks)	Dechlorination completion time (weeks)	Intermediate Products
Methyl 4-bromobenzene	Bangplakod	8	18	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
14-dibromobezene	Canal	8	18	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
4-bromobenzonitrile		8	18	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-2,3,5-
4-bromobezoic hydrazide		8	18	**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
Un-amended primers*		8	18	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
Methyl 4-bromobenzene	Hua Lum	6	20	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
14-dibromobezene	Poo Canal	6	14	2,4,5-, 2,4-/2,5-
4-bromobenzonitrile		6	>20	2,3,5-**, 2,4,5-*, 2,4-/2,5-
4-bromobezoic hydrazide		×	×	-
Un-amended primers*		×	×	-

Note: **Majority occurred

*Minority occurred

×: Dechlorination was not occurred during incubation period (20 weeks)

2,4-/2,5 were co-eluting peaks

Table 5 Phylogenic analysis of DGGE bands quoted from Bangplee Industrail Estate

Site 2, South-Bangkok Power Plant and Bangplakod Canal primed with 4-bromobezoic hydrazide and 4-bromobenzonitrile

Band ^a	Closest relative	Accession number	% Identity	Phylum/ Class
1	Uncultured Anaerobranca sp. clone SRB2	DQ069229	94	<i>Firmicutes</i>
2	Uncultured gamma proteobacterium clone Aerocomp_NB39 16S ribosomal	FJ754851	90	<i>Proteobacteria</i>
3	Uncultured bacterium clone AR018 16S ribosomal RNA gene, PCB dechlorinating bacterial communities in river sediment	GQ860186	98	<i>Proteobacteria</i>
4	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene	AJ621948	94	<i>Fimicutes</i>
5	Uncultured Firmicutes bacterium clone Z273MB13 16S ribosomal RNA gene	FJ484645	100	<i>Firmicutes</i>
6	Pseudomonas putida strain c204 16S ribosomal RNA gene	FJ950581	83	<i>Proteobacteria</i>
7	Uncultured bacterium clone 3-2 16S ribosomal RNA gene	GQ324229	94	<i>Proteobacteria</i>
8	Uncultured bacterium clone Er-MS-11 16S ribosomal RNA gene, Effects of chemical structure and concentration on the pathways and microbial communities during dechlorination of coplanar PCBs in sediment slurries	EU542432	84	<i>Fimicutes</i>

Band^a	Closest relative	Accession number	% Identity	Phylum/ Class
9	Uncultured gamma proteobacterium clone Aerocomp_NB39 16S ribosomal RNA gene	FJ754851	94	<i>Proteobacteria</i>
10	Uncultured bacterium clone Z552 16S ribosomal RNA gene	AY979304	92	<i>Firmicutes</i>
11	Uncultured bacterium clone AR062 16S ribosomal RNA gene, PCB dechlorinating bacterial communities in river sediment	GQ860277	96	<i>Proteobacteria</i>
12	uncultured Clostridium sp.	FJ609997	88	<i>Firmicutes</i>

Note: ^a : The DNA bands were separated in Figure 10