



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่อง
การพัฒนาศักยภาพความรู้เพื่อการจัดการปัญหาภาวะมลพิษในทะเลและ
อนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณหมู่เกาะสิขัง (ปีที่ 2)
**Knowledge Management for Marine Pollution Abatement and
Biodiversity Conservation around Sichang Islands (2nd Year)**

โดย

รศ. ดร. กัลยา วัฒนากร และคณะ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2556

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนางานความรู้เพื่อการจัดการปัญหาภาวะมลพิษในทะเลและอนุรักษ
ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณหมู่เกาะสิมู (ปีที่ 2)” ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงาน
คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2554 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงต่อสำนักงาน
คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณคณะกรรมการพิจารณาและประเมินโครงการที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขรายงาน
วิจัยนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภารกิจโครงการและประสานงานวิจัย สำนักงาน
คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติทุกท่าน และเจ้าหน้าที่ภารกิจโครงการและประสานงานวิจัย(SciBest) คณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งตลอดการดำเนิน
โครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณบุคลากรและนิสิตของภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย บุคลากรของภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล และผู้ช่วยวิจัยประจำโครงการทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติการภาคสนาม
และการดำเนินการวิจัย จนประสบความสำเร็จตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

กรกฎาคม 2556

บทคัดย่อ
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ชื่อโครงการ การพัฒนาองค์ความรู้เพื่อการจัดการปัญหาภาวะมลพิษในทะเลและอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณหมู่เกาะสิขัง (ปีที่ 2)

Knowledge Management for Marine Pollution Abatement and Biodiversity Conservation
around Sichang Islands (2nd Year)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2554...จำนวนเงิน 2,205,000.- บาท (สองล้านสองแสนห้าพันบาท)
ระยะเวลาทำการวิจัย...18...เดือน ตั้งแต่วันที่ 15 ธันวาคม 2554 ถึงวันที่ 15 มิถุนายน 2556...

ผู้วิจัย		โทรศัพท์	โทรสาร
รศ. ดร. กัลยา วัฒนากร	ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทาง	02-218-8160	02-254-4259
	ทะเล คณะวิทยาศาสตร์	02-218-5407	02-255-0780
	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย		
รศ. ดร. วรวิทย์ จุฬาลักษณ์นกุล	สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ	02-218-8160	02-254-4259
	และคณะวิทยาศาสตร์	02-218-5482	
	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย		
ผศ.ดร.สุภางค์ จุฬาลักษณ์นกุล	ภาควิชาวิศวกรรมเคมี	02-889-2138	02-441-9731
	คณะวิศวกรรมศาสตร์		
	มหาวิทยาลัยมหิดล		
ดร. ชมกฤษ วิรุณานนท์	ภาควิชาพฤกษศาสตร์	02-218-5484	02-252-8979
	คณะวิทยาศาสตร์		
	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย		
ดร. รุ่งทิวา เปี่ยมทองคำ	หน่วยปฏิบัติการวิจัยเชื้อเพลิง	02-218-5482	02-218-5482
	ชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ		
	คณะวิทยาศาสตร์		
	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย		

บทคัดย่อ

แผนการศึกษาวิจัยเรื่อง “การพัฒนาองค์ความรู้เพื่อการจัดการปัญหาภาวะมลพิษในทะเลและอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณหมู่เกาะสีชัง (ปีที่ 2)” ประกอบด้วยการศึกษาวิจัยด้านการกระจายและแหล่งกำเนิดของโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินตะกอนชายฝั่งบริเวณเกาะสีชังและศรีราชา จ.ชลบุรี และการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยไลโปไลติกยีสต์และแบคทีเรียชนิดดีในทรีไฟเออร์

การศึกษาองค์ประกอบและแหล่งที่มาของ PAHs ในตะกอนดินจากทะเลชายฝั่งระหว่างศรีราชา-เกาะสีชังด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี พบความเข้มข้นรวมของ PAHs 16 ชนิดอยู่ในช่วง 65.2-18,970 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ความเข้มข้นเฉลี่ย 282 นาโนกรัม/กรัม PAHs ที่มีจำนวนวงแหวนเบนซีน 4-6 วงมีส่วนสูงโดยเฉลี่ย 87% ของ PAHs รวม อัตราส่วนองค์ประกอบระหว่าง PAHs ที่ใช้บ่งชี้แหล่งกำเนิดพบว่าตะกอนดินบริเวณนี้ส่วนใหญ่มีแหล่งที่มาหลักจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ การตรวจพบ PAHs หลายชนิดที่สามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้ในตะกอนในพื้นที่ศึกษา บ่งชี้ว่าตะกอนเหล่านี้เป็นตะกอนที่มีพิษต่อสิ่งแวดล้อม มีผลกระทบต่อระบบนิเวศทางทะเลและชายฝั่งและต่อสุขภาพของมนุษย์

การศึกษาย่อยสลายทางชีวภาพของสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแลคเคสที่ผลิตได้จากไลโปไลติกยีสต์สายพันธุ์ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* ที่คัดเลือกจากดินเกาะสีชังพบว่า สามารถย่อยสลาย Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene ในสารละลายได้ 24.35, 38.16, 25.38 และ 45.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินด้วยแลคเคสจากยีสต์ พบว่าปริมาณ Naphthalene ลดลง 51.34 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ Anthracene ลดลง 85.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายในเวลา 9 วัน

การคัดแยกจุลินทรีย์ชนิดดีในทรีไฟเออร์จากดินตะกอนใต้ทะเลบริเวณเกาะสีชังจำนวน 26 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกจุลินทรีย์จากตะกอนดินใต้ทะเล 6 ไอโซเลตที่เป็นดีในทรีไฟเออร์แบคทีเรียคือ *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Proteus mirabilis* และ *Enterobacter asburiae* และมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสาร Naphthalene Phenanthrene Pyrene และ Benzo[a]pyrene ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับดีในทรีไฟเออร์แต่ละชนิด

ข้อมูลต่างๆที่ได้รับจากงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนบริหารจัดการสิ่งแวดล้อม กำหนดแนวทางการควบคุม และลดผลกระทบทางด้านลบต่อระบบนิเวศชายฝั่งบริเวณศรีราชาและเกาะสีชัง จ.ชลบุรีต่อไป

คำสำคัญ: โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ไลโปไลติกยีสต์ แลคเคส ดีในทรีไฟเออร์แบคทีเรีย การย่อยสลายทางชีวภาพ

Abstract

The project “Knowledge Management for Marine Pollution Abatement and Biodiversity Conservation around Sichang Islands (2nd Year)” consists of two parts. The first part involves the sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal sediments of Koh Sichang and Siracha in Chonburi Province, while the second part deals with the ability of lipolytic yeast and denitrifying bacteria in biodegrading these PAHs compounds.

The characteristic distribution and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment samples from Koh Sichang and Siracha coastal marine area was carried out by GC-FID. The results showed that the total concentrations of 16 PAHs ranged from 65.2 to 18,970 ng/g dry weight, with median concentration of 282ng/g. The PAHs profiles were dominated by four- to six-ring compounds which accounted for 87% of total PAHs. Source identification using diagnostic PAH ratios indicated that composition of PAHs in most sediment samples were characterized by pyrogenic PAH compositions. The presence of almost all human carcinogenic PAHs in the study area indicated that these sediments can impose serious threat to coastal and marine ecosystems, as well as to human health.

Biodegradability of laccase; produced by lipolytic yeast, *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* from Sichang Island, on naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene was determined using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results revealed that the laccase produced from *A. pullulans* was able to degrade benzo[a]pyrene, anthracene, pyrene and naphthalene by 45.33, 38.16, 25.38 and 24.35 percent respectively, after the 48-h incubation period. For contaminated soils, degradation of naphthalene and anthracene by laccase were 51.34 and 85.06 percent respectively, after incubation for 9 days.

Denitrifying bacteria were screened from marine sediments collected from Sichang Island, Chonburi province. In this study, 8 bacterial isolates screened from marine sediments could be identified as species of *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter asburiae*. Biodegradation efficiencies depended on types of the denitrifiers.

The obtained information from this study will be helpful in developing mitigation plan for eliminating, reducing to acceptable levels and adoption of best practice environmental management technique in order to reduce the negative impacts on coastal ecosystems of Koh Sichang and Siracha.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs, lipolytic yeast, laccase, denitrifying bacteria, biodegradation

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
สารบัญเรื่อง	v
สารบัญตาราง	vii
สารบัญภาพ	x
บทที่ 1 บทนำรวม	1-1
บทที่ 2 การปนเปื้อนและผลกระทบของน้ำมันและมลสารอินทรีย์ต่อสภาวะแวดล้อมบริเวณเกาะสีชัง	
บทคัดย่อภาษาไทย	2-1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	2-2
2.1 บทนำ	2-3
2.1.1 ความสำคัญและที่มาในการวิจัย	2-3
2.1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2-3
2.1.3 ขอบเขตของการทำวิจัย	2-4
2.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	2-4
2.3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	2-18
2.3.1 สถานที่ทำการศึกษา	2-18
2.3.2 การเก็บตัวอย่างและการตรวจวัดภาคสนาม	2-18
2.3.3 การวิเคราะห์ตัวอย่าง	2-19
2.4 ผลการวิจัย	2-22
2.4.1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินตะกอนพื้นทะเล	2-22
2.4.2 การปนเปื้อนของสาร PAHs ในตัวอย่างตะกอนผิวหน้า	2-24
2.4.3 แหล่งที่มาของสาร PAHs ในตะกอน	2-30
2.5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	2-31
2.6 บรรณานุกรม	2-32
ภาคผนวก	2-37
ภาคผนวก ค. ผลงานทางวิชาการของโครงการที่เผยแพร่แล้ว	2-43
บทที่ 3 การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยไลโปไลติกยีสต์	
บทคัดย่อภาษาไทย	3-1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3-2
3.1 บทนำ	3-3

	หน้า
3.1.1 ความสำคัญและที่มาในการวิจัย	3-3
3.1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3-4
3.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3-4
3.3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	3-11
3.4 ผลการวิจัย	3-15
3.4.1 การทดลองวัดอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์	3-15
3.4.2 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปส	3-16
3.4.3 ความสามารถในการย่อยสลายเนฟทาลินของไลเปส	3-17
3.4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเนฟทาลินของแลคเคส	3-18
3.4.5 ทดสอบความสามารถในย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วย แลคเคส	3-18
3.4.6 การทดสอบความสามารถในย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนใน ดินด้วยแลคเคส	3-21
3.4.6.1 ความสามารถในการย่อยสลายเนฟทาลินของแลคเคส	3-21
3.4.6.2 ความสามารถในการย่อยสลายแอนทราซีนของแลคเคส	3-22
3.5 อภิปรายและวิจารณ์ผล	3-22
3.6 ข้อเสนอแนะ	3-23
3.7 บรรณานุกรม	3-24
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ	3-28
ภาคผนวก ข โครมาโตแกรมและกราฟมาตรฐาน	3-30
ภาคผนวก ค แลคเคส	3-35
ภาคผนวก ง ผลงานทางวิชาการของโครงการที่เผยแพร่แล้ว	3-36
บทที่ 4 การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์	
บทคัดย่อภาษาไทย	4-1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4-2
4.1 บทนำ	4-3
4.1.1 ความสำคัญและที่มาในการวิจัย	4-3
4.1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	4-4
4.1.3 ขอบเขตของการทำวิจัย	4-4
4.1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของโครงการ	4-4
4.2 ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4-4
4.2.1 กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน	4-4
4.2.2 ดีไนทริไฟอิงแบคทีเรีย	4-5

4.2.3 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	หน้า
4.3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	4-15
4.3.1 การเก็บตัวอย่างตะกอนดิน	4-15
4.3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพหรือองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างตะกอนดิน	4-18
4.3.3 การคัดแยกชนิดของจุลินทรีย์จากตะกอนดิน	4-18
4.3.4 การคัดแยกดีเอ็นเอในไตรฟองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญใน PAHs	4-18
4.3.5 การจำแนกชนิดจุลินทรีย์ด้วยยีน 16S rRNA	4-18
4.3.6 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายประกอบ PAHs	4-19
4.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography	4-19
4.4 ผลการวิจัย	4-19
4.4.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพหรือองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างตะกอนดิน	4-19
4.4.2 ผลการคัดแยกชนิดของจุลินทรีย์จากตะกอนดิน	4-20
4.4.3 การคัดแยกดีเอ็นเอในไตรฟองแบคทีเรีย	4-23
4.4.4 ผลการบ่งชี้ชนิดจุลินทรีย์ด้วยยีน 16S rRNA	4-29
4.4.5 ความสามารถของดีเอ็นเอในไตรฟองแบคทีเรียในการย่อยสลายสลายประกอบ PAHs	4-31
4.5 อภิปรายและวิจารณ์ผล	4-38
4.6 ข้อเสนอแนะ	4-40
4.7 บรรณานุกรม	4-40
ภาคผนวก	4-43
ภาคผนวก ก.	
ภาคผนวก ข. ผลงานทางวิชาการของโครงการที่เผยแพร่แล้ว	4-48
สรุปภาพรวมของแผนงาน	5-1
ประวัติและผลงานวิจัยของนักวิจัย	6-1

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 2.1	คุณสมบัติของสาร PAHs	2-8
ตารางที่ 2.2	ผลกระทบของสาร PAHs แต่ละชนิดที่มีต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ	2-11
ตารางที่ 2.3	ผลกระทบของ PAHs ที่มีต่อสิ่งมีชีวิตจากการทดลอง	2-12
ตารางที่ 2.4	ผลกระทบของ PAHs ที่มีต่อสิ่งมีชีวิตจากการทดลอง	2-13
ตารางที่ 2.5	ตัวอย่างการศึกษาปริมาณสาร PAHs ในตะกอนชายฝั่งบริเวณต่างๆของโลก	2-15
ตารางที่ 2.6	ค่าเฉลี่ยและพิสัยของคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างตะกอนดิน	2-24
ตารางที่ 2.7	ค่าเฉลี่ยและพิสัยของปริมาณรวมของ PAHs สัดส่วนต่างๆในตัวอย่างตะกอนดิน	2-28
ตารางที่ 2.8	ค่าดัชนีที่ใช้พิจารณาแหล่งที่มาของสาร PAHs ในตัวอย่างตะกอนผิวหน้า	2-30
ตารางที่ 2.9	อัตราส่วนในการพิจารณาแหล่งกำเนิด PAHs จากการเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์	2-31
ตารางที่ 4.1	การแบ่งประเภทของแบคทีเรีย	4-6
ตารางที่ 4.2	แบคทีเรียสกุลต่างๆที่มีสายพันธุ์ที่สามารถทำให้เกิดการหายใจโดยใช้ไนเตรด	4-7
ตารางที่ 4.3	แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ได้ทั้งไนเตรดและไนไตรต์	4-8
ตารางที่ 4.4	แบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน	4-9
ตารางที่ 4.5	พิกัดทางภูมิศาสตร์ของสถานีเก็บตัวอย่าง	4-17
ตารางที่ 4.6	คุณสมบัติทางกายภาพตัวอย่างตะกอนดินของเกาะสีชัง	4-20
ตารางที่ 4.7	จำนวนไอโซเลตที่ได้จากตะกอนดินในแต่ละสถานี	4-22
ตารางที่ 4.8	ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดแก๊สและ Nitrate Reducing ของแต่ละไอโซเลต	4-23
ตารางที่ 4.9	ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดแก๊สและ Nitrate Reducing ของแต่ละไอโซเลต	4-24
ตารางที่ 4.10	ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดแก๊สและ Nitrate Reducing ของแต่ละไอโซเลต	4-25
ตารางที่ 4.11	ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดแก๊สและ Nitrate Reducing ของแต่ละไอโซเลต	4-26
ตารางที่ 4.12	แสดงสถานีและไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเป็นดีไนทริไฟอิงแบคทีเรีย	4-29
ตารางที่ 4.13	ชนิดของดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้สารประกอบโพลีไซคลิกเอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน	4-31
ตารางที่ 4.14	ความสามารถในการใช้โพลีไซคลิกเอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนของดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียแต่ละชนิด หลังการบ่มในอาหารที่มี PAHs 200 ppm ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 วัน	4-36

ตารางที่ 4.15	ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของแบคทีเรียดีไนทริฟิอิงที่คัดแยกได้จากตะกอนดินใต้ทะเล เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MSM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที	หน้า 4-37
---------------	--	--------------

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1	บริเวณที่เป็นเขตการขนถ่ายสินค้าในทะเลระหว่างเกาะสีชัง-ศรีราชา 2-5
ภาพที่ 2.2	สาร PAHs ที่กำหนดอยู่ในรายชื่อสารพิษของ U.S. EPA (USEPA, 2000) 2-6
ภาพที่ 2.3	แสดงบริเวณศึกษาและจุดเก็บตัวอย่างตะกอน 2-19
ภาพที่ 2.4	แผนภูมิสรุปวิธีการวิเคราะห์สาร PAHs ในตะกอนดิน 2-20
ภาพที่ 2.5	การกระจายของ %sand, %silt และ %clay ในบริเวณเกาะสีชัง-อ่าวศรีราชา 2-23
ภาพที่ 2.6	การกระจายของปริมาณสาร PAHs รวมในตัวอย่างตะกอนดินผิวหน้า 2-25
ภาพที่ 2.7	สัดส่วนร้อยละ(%) การกระจายของ PAHs 16 ชนิด ในตัวอย่างตะกอนดินผิวหน้า 2-26
ภาพที่ 2.8	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสัดส่วนการกระจายของ PAHs 16 ชนิดในบริเวณศึกษา 2-28
ภาพที่ 2.9	อัตราส่วนร้อยละของ PAHs 2-3 วง และ PAHs 4-6 วง ในตัวอย่างตะกอนแต่ละสถานี 2-28
ภาพที่ 2.10	การกระจายเชิงพื้นที่ของ PAHs ที่พบสูงสุด 6 ลำดับแรกในบริเวณศึกษา 2-29
ภาพที่ 2.11	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของ Flt/(Flt+Pyr)vs.Ant/(Ant+Phe) และ InP/(InP+BGP)vs.BaA/(BaA+Chr) ในตะกอนบริเวณศึกษา 2-31
ภาพที่ 3.1	สารโพลียูรีเทน 3-7
ภาพที่ 3.2	ไลเพสเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสบริเวณพื้นระเอสเตอร์ของโพลียูรีเทน 3-7
ภาพที่ 3.3	โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของสารโพลีเอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน 3-8
ภาพที่ 3.4	ค่าล็อกจำนวนเซลล์และปริมาณโปรตีนของเชื้อยีสต์ <i>Aureobasidium pullulans</i> 3-15
ภาพที่ 3.5	ปริมาณกิจกรรมของไลเพสและค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ของเชื้อยีสต์ <i>Aureobasidium pullulans</i> 3-16
ภาพที่ 3.6	ปริมาณแนฟทาลินที่เหลือยู่จากการย่อยสลายด้วยไลเพส 3-17
ภาพที่ 3.7	ปริมาณแนฟทาลินที่เหลือยู่จากการย่อยสลายด้วยแลคเคสทางการค้า 3-18
ภาพที่ 3.8	ปริมาณสารโพลีเอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เหลือยู่จากการย่อยด้วยแลคเคส 3-19
ภาพที่ 3.9	ปริมาณแนฟทาลินที่เหลือยู่จากการย่อยด้วยแลคเคส 3-19
ภาพที่ 3.10	ปริมาณแอนทราซีนที่เหลือยู่จากการย่อยด้วยแลคเคส 3-20
ภาพที่ 3.11	ปริมาณไพรีนที่เหลือยู่จากการย่อยด้วยแลคเคส 3-20
ภาพที่ 3.12	ปริมาณเบนโซ[เอ]-ไพรีนที่เหลือยู่จากการย่อยด้วยแลคเคส 3-21
ภาพที่ 3.13	ปริมาณแนฟทาลินที่เหลือยู่จากการย่อยด้วยแลคเคสในดิน 3-21
ภาพที่ 3.14	ปริมาณแอนทราซีนที่เหลือยู่จากการย่อยด้วยแลคเคสในดิน 3-22
ภาพที่ 3.15	กราฟมาตรฐาน BSA ที่ปริมาณโปรตีน 2.5-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 3-28
ภาพที่ 3.16	กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลปริมาณ 0-0.4 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร 3-28

	หน้า
ภาพที่ 3.17 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเนฟทาไลน์	3-29
ภาพที่ 3.18 ปริมาณเนฟทาไลน์ที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายด้วยไลเพส	3-30
ภาพที่ 3.19 ปริมาณเนฟทาไลน์ที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายด้วยแลคเคสทางการค้า	3-31
ภาพที่ 3.20 ปริมาณเนฟทาไลน์จากการย่อยด้วยแลคเคสในดินเมื่อเวลาผ่าน 0 วัน	3-31
ภาพที่ 3.21 ปริมาณเนฟทาไลน์จากการย่อยด้วยแลคเคสในดินเมื่อเวลาผ่าน 9 วัน	3-31
ภาพที่ 3.22 ปริมาณแอนทราซีนจากการย่อยด้วยแลคเคสในดินเมื่อเวลาผ่าน 0 วัน	3-32
ภาพที่ 3.23 ปริมาณแอนทราซีนจากการย่อยด้วยแลคเคสในดินเมื่อเวลาผ่าน 9 วัน	3-32
ภาพที่ 3.24 แลคเคสที่ผลิตได้จาก <i>Aureobasidium pullulans</i> ใน Laccase production medium	3-33
ภาพที่ 3.25 การย่อยสลายสาร โพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแลคเคส	3-33
ภาพที่ 4.1 แสดงแผนที่เกาะสีชังและชายฝั่งทะเล	4-16
ภาพที่ 4.2 แสดงสถานีเก็บตัวอย่างบริเวณพื้นที่เกาะสีชัง	4-16
ภาพที่ 4.3 แสดงโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกจากตัวอย่างตะกอนดินสถานีที่ 9	4-21
ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกได้จากสถานีต่างๆ	4-22
ภาพที่ 4.5 แสดงดีเอ็นเอในรีไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากสถานีต่างๆ	4-28
ภาพที่ 4.6 แสดงดีเอ็นเอขนาด 1600 กิโลเบสของ 16S rDNA ของจุลินทรีย์สกัดได้จากตะกอนดินหมายเลข 5 และตะกอนดินหมายเลข 9	4-30
ภาพที่ 4.7 ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เมื่อเวลาเริ่มต้นและเมื่อเวลาผ่านไป 45 วัน	4-32
ภาพที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Naphthalene ต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%	4-33
ภาพที่ 4.9 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Phenanthrene ต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%	4-34
ภาพที่ 4.10 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Pyrene ต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%	4-34
ภาพที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Benzo[a]pyrene ต่อเวลาเมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%	4-35
ภาพที่ 4.12 เปรียบเทียบปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงที่คัดแยกได้จากตะกอนดินใต้ทะเล เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MSM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที	4-38
ภาพที่ 4.13 ความสามารถในการละลายของ PAHs ทั้ง 4 ชนิดคือ Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene ที่ความเข้มข้น 200 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	4-43

	หน้า
ภาพที่ 4.14	สภาพการละลายของ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนคือ Naphthalene ที่ความเข้มข้น 200 ppm เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ (ขวา) เป็นเวลา 8 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส
ภาพที่ 4.15	สภาพการละลายของ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอน คือ Phenanthrene ที่ความเข้มข้น 200 ppm เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ (ขวา) เป็นเวลา 8 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส
ภาพที่ 4.16	สภาพการละลายของ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนคือ Pyrene ที่ความเข้มข้น 200 ppm เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ (ขวา) เป็นเวลา 8 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส
ภาพที่ 4.17	สภาพการละลายของ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนคือ Benzo[a]pyrene ที่ความเข้มข้น 200 ppm เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ (ขวา) เป็นเวลา 8 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส

บทที่ 1

1. บทนำรวม

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เกะสีซังเป็นเกาะขนาดใหญ่ในอ่าวไทยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจแห่งหนึ่งโดยเฉพาะด้านการท่องเที่ยว เนื่องจากมีแหล่งท่องเที่ยวทางธรรมชาติ และเป็นที่ตั้งของโบราณสถานที่สำคัญทางประวัติศาสตร์สมัยต้นรัตนโกสินทร์ คือ พระจุฑาธุชราชสถาน ซึ่งเป็นพระราชวังฤดูร้อนในพระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัวรัชกาลที่ 5 เกาะสีซังยังเป็นแหล่งตกปลาและแหล่งค่าน้ำดูปะการังน้ำตื้นที่มีชื่อเสียงเนื่องจากมีระยะทางไม่ไกลจากกรุงเทพฯ และชลบุรี ภูมิประเทศและที่ตั้งของเกาะสีซังและกลุ่มเกาะบริวารเอื้อต่อการจอดเรือจึงเป็นแหล่งขนถ่ายสินค้าทางทะเลที่สำคัญ โดยเฉพาะการขนถ่ายน้ำมันและสินค้าการเกษตรเช่นแป้งมันสำปะหลังกลางทะเลระหว่างเกาะสีซัง-ศรีราชา กิจกรรมสำคัญที่จะก่อให้เกิดการรั่วไหลของน้ำมันมากที่สุดคือการขนถ่ายน้ำมันกลางทะเลจากทุ่นขนถ่ายน้ำมัน นอกจากนี้การพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์ที่ดินบนเกาะสีซัง การขยายตัวของการขนส่งทางทะเล และการพัฒนาการท่องเที่ยว ทำให้เกิดปัญหาหลายประการต่อสภาพแวดล้อมของเกาะและบริเวณใกล้เคียง เช่น ปัญหาฝุ่นละอองจากการขนถ่ายแป้งมันสำปะหลังและถ่านหิน ปัญหาจากการทิ้งน้ำเสีย การระบายน้ำทิ้งจากท้องเรือ ตลอดจนการปล่อยทิ้งน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วลงทะเล เป็นต้น ส่งผลให้มีสารพิษประเภทน้ำมันถูกนำสู่ทะเลชายฝั่งมากขึ้น จะเห็นได้จากปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่สะสมในตะกอนดินซึ่งมีปริมาณสูงมากในหลายบริเวณ ถึงแม้ว่าโดยภาพรวมในปัจจุบันปริมาณสารพิษต่างๆยังไม่สูงมากจนก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในทะเลในลักษณะเฉียบพลันที่ทำให้สัตว์ทะเลถึงตาย แต่ในระยะยาวผลกระทบจากความเปื้อนพิษเรื้อรังของน้ำมัน โดยเฉพาะสารกลุ่มโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ยังเป็นปัญหาที่ควรได้รับความสนใจศึกษาให้ทราบรายละเอียดถึงชนิดและปริมาณที่สะสมอยู่ในตะกอนดิน การกระจายตัวและแหล่งกำเนิดของสารกลุ่มนี้ เพื่อหามาตรการในการแก้ไขป้องกันปัญหาในระยะยาว และจากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์จากดินชายฝั่งทะเลเกาะสีซังในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน พบจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายไขมันคราบน้ำมันและไฮโดรคาร์บอนมากถึง 80 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถนำไปวิจัยและพัฒนาต่อยอดเพื่อการใช้ประโยชน์ด้านการปรับปรุงคุณภาพสิ่งแวดล้อม เช่น การพัฒนาวิธีการกำจัดคราบน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีการทางชีวภาพ (bioremediation) ต่อไปได้ จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้ดำเนินการศึกษาต่อในปีที่สองนี้

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยต่อยอดในเชิงการหาแหล่งที่มาของสารพิษกลุ่มโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) และการใช้ประโยชน์จุลินทรีย์เพื่อการจัดการปัญหาภาวะมลพิษในทะเลและฟื้นฟูทรัพยากรทางทะเลในธรรมชาติอย่างมีสมดุล โดยมุ่งเน้นศึกษาสารไฮโดรคาร์บอนชนิดก่อมะเร็งกลุ่มโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เพื่อให้ทราบถึง

รายละเอียดชนิด ปริมาณ และแหล่งที่มาของสารกลุ่ม PAHs ในบริเวณนี้ เพื่อประเมินความเสี่ยงต่อความเป็นพิษของสารกลุ่มนี้ต่อระบบนิเวศสัตว์ทะเลหน้าดิน สัตว์ทะเลวัยอ่อน และต่อมนุษย์ต่อไป PAHs เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารพิษประเภทสารอินทรีย์ที่มีความคงทน (Persistent organic pollutants, POPs) อยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานเนื่องจากสลายตัวช้ามากนับว่าเป็นสารพิษที่มีความสำคัญทางด้านสิ่งแวดล้อมมากกลุ่มหนึ่ง เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenic) ตัวอย่าง เช่น เบนโซ(เอ)แอนทราซีน ไครซีน เบนโซ(บี)ฟลูออแรนทีน เบนโซ(เอเอช)ไพรีน เบนโซ(จีเอชไอ)เพอร์ลิโน และเป็นสารก่อการกลายพันธุ์(mutagenic) ด้วย ดังนั้นองค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (US.EPA) จึงได้กำหนดให้ PAHs จำนวน 16 ชนิดเป็นสารพิษอันตรายที่ควรได้รับความสำคัญในการศึกษาเป็นอันดับต้นๆ เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำทั่วไปและมีผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ถ้าบริโภคสัตว์น้ำที่มีการปนเปื้อนสาร PAHs เป็นระยะเวลายาวนาน เพราะ PAHs สามารถถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหารได้

จุลินทรีย์กลุ่มไลโปไลติกยีสต์ซึ่งนอกจากจะสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำมันและไขมันได้แล้ว ยังสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส (Laccase; EC 1.10.3.2) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductase) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมไฮโดรเจน ออกซิเจน หรืออิเล็กตรอน จากสารประกอบหนึ่งไปยังสารประกอบอื่นได้ โดยในกระบวนการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนของเอนไซม์แลคเคส เอนไซม์แลคเคสจะเข้าไปเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาและมีความสามารถในการใช้สับสเตรทได้หลากหลายชนิด เช่น polyphenol, aromatic, benzinethiols, anthraquinone, syringalazine, 2,6 dimethoxyphenol, veratryl alcohol, 2,5 xyliidene, ferulic acid รวมทั้งสับสเตรทที่เป็นพวก non-phenolic compounds เช่น HAA, HPI, VLA และ ABTS เป็นต้น ข้อดีของการใช้เอนไซม์แลคเคสเป็นตัวเร่งที่เหนือกว่าตัวเร่งปฏิกิริยานินทรีย์ ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) และอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง ไม่เป็นพิษ มีความสามารถในการละลายน้ำ สามารถทำซ้ำ(Repeatability)ได้ ปฏิกิริยาเกิดได้ภายใต้สภาวะการทดลอง เช่น พีเอชของสารละลาย อุณหภูมิ และความดันที่ไม่รุนแรง และสามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ จากโครงสร้างสารดังกล่าวเบื้องต้นที่แลคเคสมิชอบพบในการย่อยสลายพบว่าเป็นกลุ่มสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับสารกลุ่มโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน งานวิจัยนี้จึงสนใจนำแลคเคสจากไลโปไลติกยีสต์มาทดลองย่อยสลายสารกลุ่มโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินตะกอนชายฝั่งที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมัน สำหรับดินตะกอนในทะเลบริเวณที่มีออกซิเจนต่ำหรือไร้ออกซิเจนซึ่งยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์แลคเคสไม่สามารถย่อยสลายคราบน้ำมันได้ดี พบว่ามีแบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์ที่มีความสามารถในการใช้สารประเภทอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตได้เช่นกันในสภาวะดังกล่าวได้ งานวิจัยนี้จึงสนใจนำยีสต์และแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ ในการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารกลุ่มโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินตะกอนชายฝั่งที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันในสถานการณ์แตกต่างกัน คือในสภาวะที่มีออกซิเจนและในสภาวะเมื่อไร้ออกซิเจน เพื่อช่วยในการลดปัญหาภาวะมลพิษทางทะเลด้านน้ำมัน พื้นฟูสภาพแวดล้อมในทะเลให้ดีขึ้น และอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณเกาะสีชังและศรีราชาให้ยั่งยืนสืบต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- วิเคราะห์ชนิด ปริมาณ และแหล่งกำเนิดของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างตะกอนชายฝั่งระหว่างเกาะสีชังและศรีราชา จ.ชลบุรี
- ทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียที่ผลิตได้จากไลโปไลติกยีสต์ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และในตัวอย่างตะกอนดินจากพื้นที่ศึกษา
- คัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์จากตะกอนดิน ศึกษาการเจริญและทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะไร้ออกซิเจนในระดับห้องปฏิบัติการ

1.3 รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย

แผนงานวิจัยเรื่อง “การพัฒนาศักยภาพความรู้เพื่อการจัดการปัญหาภาวะมลพิษในทะเลและอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณหมู่เกาะสีชัง (ปีที่ 2)” ประกอบด้วยโครงการวิจัยย่อย 3 โครงการ ดังนี้

1. แหล่งกำเนิดและการกระจายของโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินตะกอนชายฝั่งบริเวณเกาะสีชังและศรีราชา จ.ชลบุรี
2. การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยไลโปไลติกยีสต์
3. การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์

แผนงานวิจัยนี้ประกอบด้วยการศึกษาวิจัยสองส่วน ส่วนแรกเป็นการศึกษาวิจัยด้านการปนเปื้อนของสาร PAHs ในระบบนิเวศทางทะเลบริเวณศรีราชาและเกาะสีชัง จ.ชลบุรี ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ได้จากการบริโภคอาหารทะเลที่สะสมการปนเปื้อนสาร PAHs เป็นการศึกษาวิจัยเพื่อให้เข้าใจถึงลักษณะการกระจายตัวของสารปนเปื้อนในตะกอนบริเวณพื้นที่ศึกษา และวิเคราะห์หาแหล่งกำเนิดหรือที่มาของสาร PAHs ทั้งนี้การกระจายตัวของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลมีแหล่งที่มาที่สำคัญ 2 แหล่งใหญ่ๆดังนี้ (1) การเคลื่อนที่ของ PAHs ที่สามารถละลายในน้ำได้และส่วนประกอบที่อยู่ในรูปของอนุภาค และ (2) การสะสม PAHs จากบรรยากาศทั้งที่เกิดจากการสะสมโดยการตกตะกอนและการตกสะสมแห้งของ PAHs ที่เข้าสู่สิ่งแวดล้อมผ่านทางบรรยากาศ โดยไปเกาะติดอยู่กับผิวของอนุภาค และมีการสะสมตัวของสารส่วนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ก็จะมีการปล่อยตัวตกลงสู่พื้นดิน PAHs ที่มาจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ (Pyrogenic PAHs) เช่น การเผาไหม้ของน้ำมันเชื้อเพลิงในการใช้ยานยนต์โดยน้ำมันเบนซินและดีเซล เครื่องจักรต่างๆในโรงงานอุตสาหกรรม การเผาป่า เผาขยะเป็นต้น รวมทั้งน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว (น้ำมันเครื่องเก่า) เพราะได้เผาไหม้ไปแล้วแต่ไม่หมด PAHs จากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์นี้ปนเปื้อนลงสู่ท้องทะเล ทั้งโดยผ่านมาทั้งทางชั้นบรรยากาศ การชะล้างน้ำมันเครื่องเก่าทั้งหลายมากับน้ำทั้งจากชุมชน อุตสาหกรรม น้ำจากแม่น้ำ และน้ำที่ไหลผ่านเมืองลงสู่ทะเล สำหรับ PAHs ที่มาจากการผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม (Petrogenic PAHs) หรือฟองน้ำมัน เป็น PAHs ที่มาจากการเกิดขึ้นของผลิตภัณฑ์

เชื้อเพลิงฟอสซิลจากธรรมชาติ หรือการใช้ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมโดยมนุษย์ รวมทั้งการเกิดอุบัติเหตุ น้ำมันหกรั่วไหล ซึ่งมีแหล่งกำเนิดมาจากการคมนาคมขนส่งทางเรือ ได้แก่การขนส่งน้ำมัน ขนถ่ายถ่านหิน การเกิดอุบัติเหตุของเรือบรรทุกน้ำมันหรือเรือสินค้าทั่วไป ที่เป็นผลให้น้ำมันรั่วไหลออกสู่ท้องทะเล ตลอดจนการปล่อยน้ำอับเฉาใต้ท้องเรือที่ออกมาเป็นดิน รวมทั้งน้ำทิ้งจากชุมชนและอุตสาหกรรม น้ำจากแม่น้ำ และน้ำที่ไหลผ่านตัวเมืองลงสู่ทะเล

ส่วนที่สองเป็นการศึกษาวิจัยด้านการใช้ประโยชน์จุลินทรีย์ในการกำจัดคราบน้ำมันที่ประกอบด้วยสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีการทางชีวภาพ โดยใช้ยีสต์กลุ่มไลโปไลติกและแบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์ ที่สามารถย่อยสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ประสิทธิภาพสูงสุดในสถานการณ์แตกต่างกันคือมีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน เพื่อให้ครอบคลุมทุกสถานการณ์ที่อาจเกิดขึ้นในบริเวณศึกษา ทั้งนี้เพื่อให้ได้องค์ความรู้ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการบำบัดน้ำทิ้งจากกิจกรรมต่างๆของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน การฟื้นฟูคุณภาพสิ่งแวดล้อมทางทะเล การหามาตรการป้องกันและแก้ไขปัญหา ตลอดจนการฟื้นฟูสภาพความเสื่อมโทรมของทรัพยากรทางทะเล บริเวณศรีราชาและเกาะสีชังต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

- ทราบถึงชนิด ปริมาณการปนเปื้อนและแหล่งกำเนิดของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตะกอนดินชายฝั่งทะเลบริเวณศรีราชาและเกาะสีชัง
- ผลิตเอนไซม์แลคเคสจากยีสต์ที่คัดได้ในโครงการ ซึ่งสามารถย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้
- ได้สายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์ที่มีความสามารถในการใช้สารไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อนำไปประยุกต์ใช้บำบัดตะกอนดินที่ปนเปื้อนสารสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้
- สามารถนำไปจดสิทธิบัตร และ/หรือเผยแพร่ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติ

1.5 ผลผลิต (Output) ที่ได้เมื่อแผนงานเสร็จสิ้นประกอบด้วย

- ผลงานวิชาการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติหรือระดับชาติ และ/หรือการเผยแพร่ผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติหรือระดับชาติ 9 เรื่อง: โครงการที่ 1 (4 เรื่อง) โครงการที่ 2 (2 เรื่อง) และโครงการที่ 3 (3 เรื่อง)
- เว็บไซต์เกี่ยวกับการปนเปื้อนของสาร PAHs ในตะกอนดินบริเวณทะเลชายฝั่งระหว่างเกาะสีชังและศรีราชา สายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์ที่มีความสามารถในการใช้สารไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน <http://sichang.webatu.com/> ซึ่งเป็นแหล่งให้ความรู้แก่นักศึกษาทั่วไป

- สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาวะที่มีออกซิเจน และสภาวะไร้ออกซิเจน (โครงการที่ 2 และ 3)
- นักวิจัยรุ่นใหม่ซึ่งเป็นนิสิตระดับปริญญาโท/เอก โดยทำงานเป็นผู้ช่วยนักวิจัยในแต่ละโครงการย่อย ทำให้บัณฑิตได้มีประสบการณ์ในการดำเนินการวิจัยของตนเองต่อไป โดยในแผนงานนี้มีจำนวน 4 คน ดังนี้
 - นางสาวรัตนศิริินทร์ ทรัพย์เจริญ (ปริญญาเอกหลักสูตรวิทยาศาสตร์ทางทะเล)
 - นายฉัตร บุญเพิ่ม (ปริญญาโทหลักสูตรสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
 - นางสาวพัชรภรณ์ การงาน (ปริญญาโทหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ)
 - นางสาวจิราพร พวงแก้ว (ปริญญาโทหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ)

1.6 ผลลัพธ์ (Outcome) ที่ได้จากแผนงานวิจัยนี้ ได้แก่

- องค์ความรู้ด้านสิ่งแวดล้อมและภาวะมลพิษในทะเลบริเวณเกาะสีชังและบริเวณใกล้เคียง ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งอ้างอิงสำหรับนิสิต นักศึกษาในสถาบันการศึกษาตั้งแต่ระดับมัธยมถึงระดับอุดมศึกษา
- ทราบถึงปริมาณการปนเปื้อนของมลสาร PAHs ที่สะสมอยู่ในตะกอนดิน และการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- มีความรู้จากการศึกษาครั้งนี้ไปบูรณาการเพื่อออกมาตรการหรือข้อกำหนดเพื่อลดผลกระทบ หรือป้องกันปัญหาภาวะมลพิษในทะเล
- มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมัน/สารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

1.7 หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

หน่วยงานที่เกี่ยวข้องสามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น

1. อำเภอสัตหีบและอำเภอกะสีชัง จังหวัดชลบุรี
2. กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
3. กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
4. กรมการขนส่งทางน้ำและพาณิชยนาวี กระทรวงคมนาคม
5. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
6. สำนักงานนโยบาย และแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
7. มหาวิทยาลัย
8. ชุมชน เกษตรกร ภาคเอกชนและนิสิตนักศึกษาที่สนใจ

**โครงการที่ 1: แหล่งกำเนิดและการกระจายของโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินตะกอนชายฝั่ง
บริเวณเกาะสีชังและศรีราชา จ.ชลบุรี**

**Sources and Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Coastal Sediments
of Sichang and Siracha, Chonburi Province**

โดย

รศ.ดร. กัลยา วัฒนากร

บทคัดย่อ

ศึกษาองค์ประกอบและแหล่งที่มาของ PAHs ในตะกอนดินผิวหน้าจำนวน 26 ตัวอย่างจากทะเลชายฝั่งระหว่างศรีราชา-เกาะสีชังด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี(GC-FID) พบความเข้มข้นรวมของ PAHs 16 ชนิดตามรายชื่อของ US EPA อยู่ในช่วง 65.2-18,970 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยมีความเข้มข้นเฉลี่ย (median concentration) เท่ากับ 282 นาโนกรัม/กรัม ตัวอย่างตะกอนดินที่มีความเข้มข้นของ PAHs สูงที่สุดพบที่บริเวณท่าเรือทางตอนใต้ของเกาะสีชัง) ระดับของ PAHs ที่ตรวจพบบ่งชี้การปนเปื้อนในระดับปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับ PAHs ที่พบในตะกอนดินบริเวณชายฝั่งทะเลอื่นของโลก PAHs ที่มีจำนวนวงแหวนเบนซีน 4-6 วงมีสัดส่วนสูงโดยเฉลี่ย 87% ของ PAHs รวม โดยทั่วไปพบ Dibenzo[a,h]anthracene Benzo[b]fluoranthene Benzo[ghi]perylene Benzo[a]pyrene และ Fluoranthene ในปริมาณสูงกว่า PAHs ตัวอื่นเกือบทุกตัวอย่าง การวิเคราะห์อัตราส่วนองค์ประกอบระหว่าง PAHs ที่ใช้บ่งชี้แหล่งกำเนิดพบว่า PAHs ในตะกอนดินผิวหน้าบริเวณนี้ส่วนใหญ่มีแหล่งที่มาหลักจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ โดยมีบางสถานที่พบ PAHs มีแหล่งที่มาทั้งจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมและการเผาไหม้ การตรวจพบ PAHs หลายชนิดที่สามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้ในตะกอนในพื้นที่ศึกษา บ่งชี้ว่าตะกอนเหล่านี้เป็นตะกอนที่มีพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งควรมีการตรวจติดตามต่อไปพร้อมกับกระบวนการจัดการชายฝั่งที่มีประสิทธิภาพ เพื่อลดผลกระทบทางด้านลบต่อระบบนิเวศชายฝั่งและต่อสุขภาพของมนุษย์

คำสำคัญ: โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน แหล่งที่มา จากการเผาไหม้ จากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม

Abstract

The objectives of this study were to determine the concentration and types, characteristic distribution and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments collected from Ko Sichang and Siracha coastal marine area, as measured by GC-FID. The results showed that the total concentrations of 16 PAHs US EPA priority pollutants ranged from 65.2 to 18,970 ng/g dry weight (median concentration was 282 ng/g), which indicated that the level of total PAHs concentrations were at moderate level compared to those observed in other regions. The PAHs profiles were dominated by four- to six-ring compounds which accounted for 87% of total PAHs. Dibenzo[a,h]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[ghi]perylene, benzo[a]pyrene and fluoranthene represented the highest fractions in most surface sediment samples. Source identification using diagnostic PAH ratios indicated that composition of PAHs in most sediment samples were characterized by pyrogenic PAH compositions. However, surface sediments from some stations exhibited a mixed petrogenic and pyrogenic sources. The presence of almost all human carcinogenic PAHs in the analyzed areas indicate that these sediments can be considered polluted, suggesting that future monitoring programs together with an effective coastal management program must be implemented in order to reduce the negative impact on valuable coastal ecosystems as well as to human health.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs, source, pyrogenic, petrogenic

2.1 บทนำ

2.1.1 ความสำคัญและที่มาในการวิจัย

โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารพิษอินทรีย์ที่มีความคงทน (Persistent Organic Pollutants, POPs) เป็นสารพิษที่มีความสำคัญทางด้านสิ่งแวดล้อม โดยสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) ได้กำหนดให้ PAHs 16 ชนิดเป็นสารพิษอันตรายที่ควรได้รับความสำคัญศึกษาในอันดับต้นๆ (priority PAHs) เนื่องจาก PAHs มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำทั่วไปรวมถึงสัตว์ทะเลเลี้ยงลูกด้วยนม และมีผลกระทบต่อความเสี่ยงสำหรับสุขภาพมนุษย์เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อการกลายพันธุ์ PAHs จัดอยู่ในกลุ่มสารเคมีที่พบกระจายทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป PAHs เป็นสารพิษที่สามารถสะสมได้ดีในไขมันและมีความคงทนในธรรมชาติ จึงทำให้มีการสะสมในตะกอนดินของสิ่งแวดล้อมทางทะเลและชายฝั่ง การทับถมของตะกอนดินที่ปนเปื้อน PAHs เป็นที่มาของการสัมผัส PAHs โดยตรงไปสู่สิ่งมีชีวิตบริเวณพื้นที่ท้องทะเล และการสัมผัสทางอ้อม (เช่น จากสารแขวนลอย) ไปยังสิ่งมีชีวิตบริเวณน้ำขึ้นบนของทะเล

PAHs เป็นกลุ่มสารเคมีซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของถ่านหิน น้ำมัน และก๊าซ ขยะ หรือสารอินทรีย์อื่นๆ สาร PAHs สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ก็ได้ แหล่งกำเนิดหลักของสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปมาจากการเผาไหม้ เช่น จากการปล่อยควันเสียจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลจากยานพาหนะ จากโรงงานอุตสาหกรรม และการปล่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว หรือการหกรั่วไหลของน้ำมันต่างๆ จากกิจกรรมมนุษย์ลงสู่แหล่งน้ำจึงพบ PAHs ปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในตะกอนพื้นท้องทะเล บริเวณที่มีปริมาณสูงมักเนื่องมาจากการปนเปื้อนจากกิจกรรมมนุษย์ โดยอิทธิพลโดยตรงของแหล่งที่มาเหล่านี้มีผลต่อการกระจายของสารพิษ เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทะเล การเกิดขึ้นของ PAHs ซึ่งเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ จึงมีแนวโน้มจะยึดเกาะอยู่กับอนุภาคสารแขวนลอยที่มีการเคลื่อนที่และสะสมในตะกอนดินในที่สุด

บริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลศรีราชาและเกาะสีชัง จ.ชลบุรี เป็นพื้นที่จอดเรือทอดสมอที่มีการจอดเรือสินค้าขนาดใหญ่และเรือบรรทุกน้ำมันมาเป็นระยะเวลายาวนาน มีการขนถ่ายถ่านหินแบบเทกองจากเรือใหญ่เพื่อนำต่อไปยังแหล่งใช้ ซึ่งกิจกรรมดังกล่าวก่อให้เกิดการฟุ้งกระจายของฝุ่นละอองถ่านหิน ซึ่งเมื่อฝุ่นถ่านหินตกสู่พื้นผิวน้ำทะเลจะถูกดูดซับบนสารแขวนลอยและจมตัวลงสะสมในตะกอนดินพื้นท้องทะเล PAHs ทั้งในถ่านหินและน้ำมันจะส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศทางทะเลและสัตว์น้ำ ตลอดจนคุณภาพชีวิตของชุมชนบนเกาะสีชัง เนื่องจากเมื่อ PAHs ได้สะสมเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารย่อมส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในห่วงโซ่อาหารและส่งผลกระทบต่อมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคอันดับสุดท้าย ซึ่งข้อมูลต่างๆ ที่ได้รับจากงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนบริหารจัดการสิ่งแวดล้อม กำหนดแนวทางการควบคุม และป้องกันปัญหามลพิษเกี่ยวกับสาร PAHs บริเวณพื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสีชัง จ.ชลบุรีต่อไป

2.1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยมีดังนี้

1. วิเคราะห์ชนิด ปริมาณ และการกระจายของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างตะกอนชายฝั่งระหว่างเกาะสีชังและศรีราชา จ.ชลบุรี
2. วิเคราะห์แหล่งกำเนิดของโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตะกอนดินในบริเวณพื้นที่ศึกษา

2.1.3 ขอบเขตของการทำวิจัย

1. เก็บตัวอย่างตะกอนดินผิวหน้า 26 สถานี ครอบคลุมพื้นที่ในทะเลระหว่างศรีราชา-เกาะสีชัง ประมาณ 100 ตารางกิโลเมตร วิเคราะห์ชนิด ปริมาณ และการกระจายของ PAHs ในตะกอนดิน ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีใช้ตัวตรวจชนิดเปลวไอออไนเซชัน (Flame Ionization Detector, FID) (GC/FID) และยืนยันการระบุชนิด PAHs ในตัวอย่างด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC/MS)
2. วิเคราะห์แหล่งกำเนิดของ PAHs ในตะกอนดินจากอัตราส่วนของสารประกอบ PAHs ว่ามีแหล่งกำเนิดจากปิโตรเลียม (Petrogenic sources) หรือจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิง (Pyrogenic sources)

2.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 พื้นที่ศึกษาของโครงการ

บริเวณชายฝั่งทะเลที่ทำการศึกษาครอบคลุมอำเภอศรีราชาและอำเภอเกาะสีชังบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน เกาะสีชังตั้งอยู่บริเวณอ่าวไทยตอนในตรงข้ามกับอำเภอศรีราชา มีระยะห่างกันประมาณ 12 กิโลเมตร นอกจากจะเป็นสถานที่ท่องเที่ยวขึ้นชื่อของภาคตะวันออกแล้วเกาะสีชังยังเป็นที่เรือส่งออกสินค้าที่สำคัญของไทย เนื่องจากเกาะสีชังอยู่ในจุดทำเลที่เปรียบเสมือนที่กำบังคลื่นลมทะเลโดยธรรมชาติ ทำให้ด้านหลังเกาะเป็นจุดจอดเรือเดินทะเลที่เหมาะสมแก่การขนถ่ายสินค้า ในแต่ละวันจะมีเรือสินค้าจำนวนมากมาจอดเพื่อขนถ่ายสินค้าโดยเฉพาะสินค้าทางการเกษตรที่สำคัญของไทยเช่น มันสำปะหลัง ข้าวสาร น้ำตาลและกากถั่วเหลือง ส่วนสินค้าเข้าที่สำคัญได้แก่ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม ถ่านหิน และปุ๋ยเคมี เป็นต้น อำเภอศรีราชาเป็นที่ตั้งของนิคมอุตสาหกรรม ท่าเรือน้ำลึกแหลมฉบัง และโรงกลั่นน้ำมัน ทำให้มีเรือสินค้าต่างประเทศขนาดใหญ่เข้ามาเทียบท่าเป็นจำนวนมากเช่นกัน ดังนั้นทะเลบริเวณอำเภอศรีราชาและเกาะสีชัง จึงเป็นบริเวณที่สามารถรองรับการจอดเรือบรรทุกสินค้าขนาดใหญ่ เพื่อลำเลียงและขนถ่ายสินค้าลงเรือเล็กเข้าท่าเรือคลองเตยในกรุงเทพ รวมทั้งมีการทำประมงชายฝั่ง และมีการเดินเรือโดยสารข้ามฟาก ทำให้กิจกรรมทางน้ำค่อนข้างหนาแน่น ความเสี่ยงที่จะเกิดน้ำมันรั่วไหลลงสู่ทะเลก็มีสูงตามไปด้วย

แหล่งกำเนิดและกิจกรรมสำคัญที่เป็นต้นเหตุของน้ำมันและอินทรีย์สารที่ลงสู่ทะเลชายฝั่งระหว่างเกาะสีชัง-ศรีราชาประกอบด้วย (1) โรงงานอุตสาหกรรมโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำ และอื่นๆบริเวณชายฝั่งศรีราชา โดยเป็นโรงงานขนาดใหญ่จำนวน 16 โรงงานที่ติดชายฝั่งทะเล (2) ท่าเทียบเรือสินค้าประกอบด้วยท่าเรือน้ำลึกแหลมฉบังซึ่งรองรับเรือขนาดใหญ่ที่ขนสินค้าแบบเทกองและแบบตู้ขนส่งสินค้ามีท่าเทียบเรือ 4 ท่า ท่าเรือน้ำลึกเกาะสีชังซึ่งรองรับเรือสินค้าขนาดใหญ่ที่มีระวางขนาด 10,000-240,000 ตัน และท่าเรือศรีราชาฮาร์เบอร์ซึ่งเป็นท่าเรือน้ำลึกเทียบชายฝั่งทะเลแบบ Jetty ที่มีโครงสร้างท่าเรือยื่นออกไปจากชายฝั่งทะเลมีท่าเทียบเรือจำนวน 4 ท่า นอกจากนี้ยังมีท่าเทียบเรือประมง 3 แห่ง ท่าเทียบเรือน้ำมันและปิโตรเลียม 1 แห่ง และท่าเทียบเรือท่องเที่ยว 1 แห่งในบริเวณศึกษา (3) กิจกรรมการขนถ่ายน้ำมัน ถ่านหิน ปูนซีเมนต์ผง

และอัดเม็ด และมันสำปะหลังอัดเม็ดกลางทะเล บริเวณที่เป็นเขตการขนถ่ายแป้งมันสำปะหลังอัดเม็ดและ ถ่านหินในทะเล ระหว่างเกาะสีชัง-ศรีราชาแสดงในภาพที่ 2.1 โดยเรือขนส่งสินค้าจะจอดรอการขนส่งอยู่ บริเวณทิศตะวันออกของเกาะสีชังและเกาะขามใหญ่ ในช่วงเวลาที่ผ่านมา(ระหว่าง พ.ศ.2547-2554)มี อุบัติเหตุที่ทำให้มีน้ำมันรั่วไหลบริเวณศรีราชา-เกาะสีชัง-แหลมฉบัง จำนวน 15 ครั้ง (<http://www.pcd.go.th>)

2.2.2 สารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

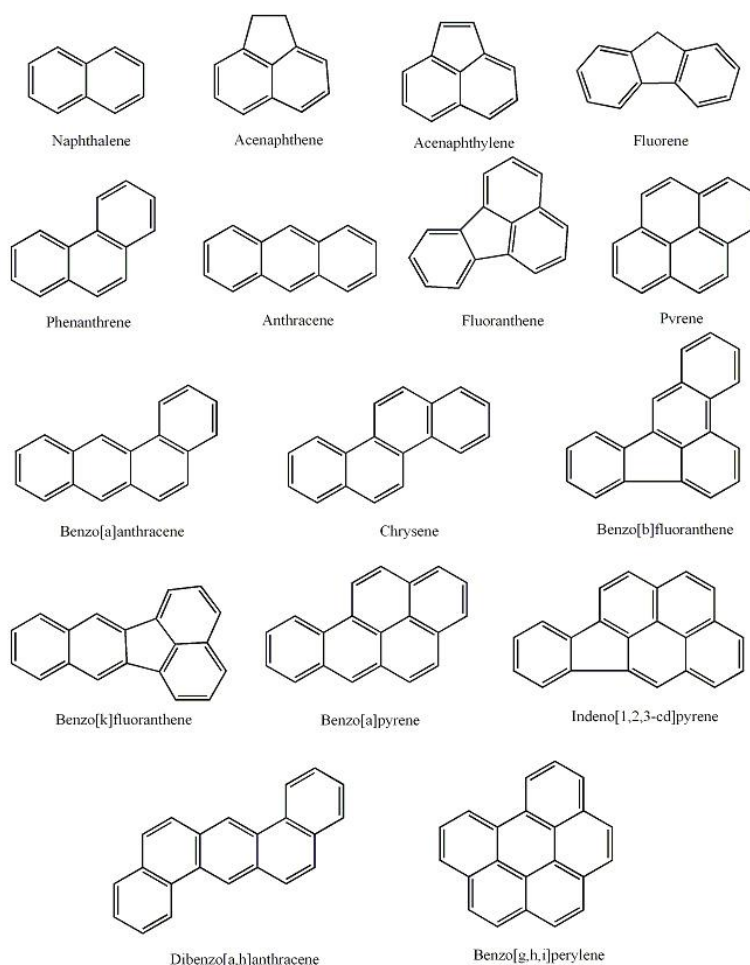
โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) หรือที่รู้จักกันในชื่อของ Polynuclear aromatic hydrocarbons หรือ polyarenes คือ กลุ่มสารเคมีที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกเบนซีนรวมกันตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป ในลักษณะที่เป็นเส้นตรง มุม หรือรวมกันเป็นกลุ่ม และมีเฉพาะ C และ H เท่านั้นที่เป็นองค์ประกอบ และมักจะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเชื้อเพลิงฟอสซิลต่างๆ เช่นปิโตรเลียม ถ่านหิน น้ำมันดีเซล ฯลฯ PAHs ยังมีแหล่งกำเนิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของอินทรีย์สารต่างๆ เช่น การเผาหญ้า ต้นไม้ ถ่านหิน น้ำมัน และขยะ เป็นต้น ซึ่งเป็นกิจกรรมการเผาไหม้ที่เกิดขึ้นจากการกระทำของมนุษย์เป็นส่วนใหญ่ (anthropogenic source) รวมถึงการเผาไหม้ของป่าโดยธรรมชาติด้วย สาร PAHs หลายตัวเป็นสารก่อมะเร็ง สามารถแพร่เข้าสู่สิ่งแวดล้อมได้ทั้งในอากาศ น้ำ และดิน PAHs มีมากกว่าร้อยชนิด แต่ละตัวมีผลกระทบต่อสุขภาพไม่แน่นอน ขึ้นกับคุณสมบัติทางเคมี เช่น ความสามารถในการละลายน้ำและโครงสร้างโมเลกุล



ภาพที่ 2.1 บริเวณที่เป็นเขตการขนถ่ายสินค้าในทะเลระหว่างเกาะสีชัง-ศรีราชา

สำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency , EPA) ได้กำหนดให้สาร PAHs 16 ชนิดเป็นสารพิษอันตรายที่ควรให้ความสำคัญในอันดับต้นๆ ประกอบด้วย Naphthalene(Nap) Acenaphthylene(Acy) Acenaphthene(Ace) Fluorene(Flu) Phenanthrene(Phe) Anthracene(Ant) Fluoranthene(Flt) Pyrene(Pyr) Benzo[a]anthracene(BaA) Chrysene(Chr) Benzo[b]fluoranthene(BbF) Benzo[k]fluoranthene(BkF) Benzo[a]pyrene(BaP) Indeno[1,2,3-cd]pyrene(InP) Dibenzo[a,h]anthracene(DBA) และ Benzo[g,h,i]perylene(BgP) โดยมีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในภาพที่ 2.2

สาร PAHs เกิดจากการเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ในกระบวนการต่างๆ เช่น การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงในเครื่องจักรต่างๆ ที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม เครื่องยนต์ในรถยนต์ รวมทั้งการปิ้งย่างอาหารประเภทเนื้อสัตว์ การเผาไหม้บุหรี และการเกิดไฟไหม้ป่า เป็นต้น นอกจากนี้สาร PAHs ยังพบอยู่ในเชื้อเพลิงทั่วไป เช่นในถ่านหิน น้ำมันปิโตรเลียม น้ำมันเตา และน้ำมันดีเซล เป็นต้น ดังนั้นจึงพบสาร PAHs ในสถานะแวดล้อมทั่วไปได้ จากการรั่วไหลของน้ำมัน เชื้อเพลิงต่างๆเหล่านี้ หรือในกระบวนการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงาน โดยสารประเภท alkylated PAHs ในเชื้อเพลิงถูกปล่อยออกสู่สถานะแวดล้อมพร้อมกับไอเสีย ส่วนสาร PAHs ที่เกิดจากการเผาไหม้ที่อุณหภูมิสูงของสารอินทรีย์อื่น รวมทั้งสาร PAHs ในน้ำมันหล่อลื่นเก่าที่ผ่านการใช้แล้ว จะเป็นสารประเภท non-alkylated PAHs (GESAMP, 1993)



ภาพที่ 2.2 สาร PAHs ที่กำหนดอยู่ในรายชื่อสารพิษของ U.S. EPA (USEPA, 2000)

2.2.2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี

สารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนส่วนใหญ่มีจุดเดือดและจุดหลอมเหลวสูงของแข็งจะไม่ละลายในน้ำ ส่วนสารประกอบที่มีความบริสุทธิ์และเป็นสารประกอบเดี่ยวกลายเป็นไอได้ที่มีความดัน 10^{-4} Torr (3wg)– 10^{-12} Torr (7wg) (ตารางที่ 2.1) และสารประกอบ PAHs สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ดีที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 200–400 นาโนเมตร สามารถถูกออกซิไดซ์ได้โดยคลอรีน โอโซน และแสงอัลตราไวโอเล็ตเช่นเดียวกับสารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ สาร PAHs ละลายน้ำได้น้อยมากเนื่องจากไม่สามารถแตกตัวให้อิออนได้ หรือเป็นโมเลกุลที่ไม่มีขั้วจึงไม่สามารถยึดติดกับโมเลกุลของน้ำได้ (hydrophobicity) สาร PAHs จึงมักถูกดูดซับบนตะกอนแขวนลอยในแหล่งน้ำ ดังนั้นจึงพบสาร PAHs ในน้ำในปริมาณค่อนข้างต่ำมาก สาร PAHs ที่ถูกดูดซับบนตะกอนแขวนลอย จะตกลงสู่พื้นท้องน้ำและสะสมอยู่ในชั้นของดินตะกอน ทำให้ความเข้มข้นของ PAHs ในดินตะกอนสูงกว่าในน้ำถึง 1000 เท่า หรืออาจมากกว่านี้

PAHs เป็นสารที่มีความคงทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลายาวนาน หรือที่เรียกว่า Persistent Organic Pollutants (POPs) ทำให้ PAHs มีช่วงครึ่งชีวิต (half-life) ในสิ่งแวดล้อมที่ยาวนาน อย่างไรก็ตาม PAHs ที่มีจำนวนวงแหวนอะโรมาติกเบนซีนน้อย (<4 วง) ถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่ายกว่า PAHs ที่มีจำนวนวงแหวนอะโรมาติกเบนซีนมาก ตัวอย่างเช่น phenanthrene ที่มีวงแหวนอะโรมาติกเบนซีนเป็นองค์ประกอบ 3 วง มีช่วงครึ่งชีวิตอยู่ที่ 16–123 วัน ในขณะที่ benzo[a]pyrene มีวงแหวนเบนซีน 5 วงเป็นองค์ประกอบ มีช่วงครึ่งชีวิตอยู่ที่ 229–1,400 วัน หรือมากกว่า (Shuttleworth and Cerniglia, 1995)

2.2.2.2 แหล่งที่มาของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม

แหล่งกำเนิดของสาร PAHs สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แหล่งใหญ่ คือ

1. ธรรมชาติ (Natural source) เช่น ภูเขาไฟระเบิด ไฟป่า จากการสังเคราะห์ด้วยแบคทีเรียบางชนิดมาจากพืชชั้นสูง หรือเกิดจากการย่อยสลายจาก triterpenoid หรือ steroid ในตะกอนดินที่ทับถมกัน triterpenoid มีสารตั้งต้นเป็นกลุ่ม aliphatic isoprenoid ตัวที่เรียกว่า squalene สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นแหล่งกำเนิดของน้ำมันดิบ และมีสาร PAHs เป็นองค์ประกอบ สาร PAHs ที่พบว่ามีแหล่งกำเนิดมาจาก triterpenoid ได้แก่ perylene มีแหล่งกำเนิดหลักมาจาก triterpenoid ถึง 30–70 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในพืชชั้นสูงที่มี triterpenoid ก็สามารถสังเคราะห์สาร PAHs ได้ โดยมีสารเริ่มต้นเป็น α -amyrin หรือ β -amyrin สารทั้งสองตัวสามารถใช้เป็นดัชนีบอกถึงแหล่งที่มาของสารที่กำเนิดมาจากธรรมชาติ (Budzinski et al., 1997)

2. การกระทำของมนุษย์ (anthropogenic source) จากการเผาไหม้ของน้ำมันเชื้อเพลิง เช่น แก๊สโซลีน ถ่านหิน น้ำมันดีเซล การปล่อยควันเสียจากยานพาหนะ การเผาขยะ การปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำ การสูบบุหรี่ การเผาทุ่งหญ้า เป็นต้น สาร PAHs ที่พบมาจากแหล่งกำเนิดที่เกิดจากการเผาไหม้ ได้แก่ Fluoranthene Benzo[e]pyrene และ Benzo[g,h,i]perylene นอกจากนี้สาร PAHs มีความเกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนเนื่องมาจากการหกหล่นของน้ำมันจากถังเก็บ การเดินเรือ และมีการถ่ายเทไปยังบริเวณซึ่งทำให้เกิด

การรั่วซึมได้ เช่น การสำรวจและขุดเจาะ น้ำมัน หรือการรั่วไหลจากเรือบรรทุกน้ำมัน ทำให้มีปริมาณสาร PAHs ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้นๆมากกว่าปกติ ซึ่งสามารถทำให้เกิดพิษกลับพลันกับสิ่งมีชีวิตบริเวณนั้นได้ง่ายและยังทำให้เกิดการก่อตัวเป็นสารก่อมะเร็งและสารเปลี่ยนพันธุกรรมได้ในปริมาณที่น้อย พบว่าน้ำมันดิบที่รั่วไหลออกมาจะมีสาร PAHs เป็นองค์ประกอบอยู่มาก

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของสาร PAHs

PAHs	ตัวย่อ	จำนวนวงแหวนเบนซีน	จุดหลอมเหลว (°C)	จุดเดือด (°C)	ความสามารถในการละลายน้ำ (mg/l)	log k_{ow}	ความดันไอ (Torr at 20°C)
1. Naphthalene	Nap	2	80	218	30	3.37	4.9×10^{-2}
2. Acenaphthylene	Acy	3	92	265	3.93	4.07	2.9×10^{-2}
3. Acenaphthene	Ace	3	96	279	3.47	4.33	2.0×10^{-2}
4. Fluorene	Flu	3	116	293	1.98	4.18	1.3×10^{-2}
5. Phenanthrene	Phe	3	101	340	1.29	4.46	6.9×10^{-4}
6. Anthracene	Ant	3	216	340	0.07	4.45	1.9×10^{-7}
7. Fluoranthene	Flt	4	111	-	0.26	5.33	6.0×10^{-6}
8. Pyrene	Pyr	4	149	360	0.14	5.32	6.9×10^{-7}
9. Benzo[a]anthracene	BaA	4	158	400	0.014	5.61	5.0×10^{-9}
10. Chrysene	Chr	4	255	-	0.002	5.61	6.3×10^{-7}
11. Benzo[b]fluoranthene	BbF	5	167	-	1.2×10^{-3}	6.57	5.0×10^{-7}
12. Benzo[k]fluoranthene	BkF	5	217	480	5.5×10^{-4}	6.84	5.0×10^{-7}
13. Benzo[a]pyrene	BaP	5	179	496	3.8×10^{-3}	6.04	5.0×10^{-7}
14. Indeno[1,2,3-cd]pyrene	InP	6	163	-	0.062	7.66	1.0×10^{-10}
15. Dibenzo[a,h]anthracene	DBA	5	262	-	5.0×10^{-4}	5.97	1.0×10^{-10}
16. Benzo[g,h,i]perylene	BgP	6	222	-	2.6×10^{-4}	7.23	1.0×10^{-10}

ที่มา: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2010)

สาร PAHs จากกิจกรรมของมนุษย์ตามกระบวนการของการเกิดสามารถจำแนกประเภทได้เป็น 2 แหล่งใหญ่ๆ ดังนี้ (Page et al., 1999)

1. สาร PAHs ที่มาจากปิโตรเลียม (Petrogenic PAHs) คือ สาร PAHs ที่เกี่ยวข้องกับน้ำมันปิโตรเลียมหรือผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม โดยคุณสมบัติที่พบบ่อยคือ เป็นสารที่เป็นกลุ่มโมเลกุลหลักของ PAHs (Parent PAHs) ได้แก่ Naphthalene Fluorene Phenanthrene Dibenzothiophene และ Chrysene เป็นโมเลกุลที่มีจำนวนวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 2-4 วง กับกลุ่มที่มีหมู่ฮัลโคเจนแทนที่ในโมเลกุล โดยที่พบว่าปริมาณของสารกลุ่มที่มีหมู่ฮัลโคเจนแทนที่มักมีปริมาณรวมมากกว่ากลุ่มหลัก (unsubstituted PAHs)

2. PAHs ที่เกิดจากการเผาไหม้ของชีวมวลในปัจจุบัน เช่น การเผาป่า เผาหญ้า และเชื้อเพลิงฟอสซิล (ปิโตรเลียมและถ่านหิน) โดยโมเลกุลที่มักพบจะเป็น โมเลกุลประเภท unsubstituted PAHs โดยมีจำนวนวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 4-5 วง โดยมักจะพบ Fluoranthene Pyrene Benzo[a]anthracene Chrysene Benzo[b+k]fluoranthene และ Benzo[a]pyrene

2.2.2.3 การกระจายของโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม

สาร PAHs แพร่กระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น

- ในอนุภาคในบรรยากาศ เป็นอนุภาคที่ประกอบขึ้นจากสารประกอบเชิงซ้อนของของแข็งและของเหลว และมี PAHs เป็นองค์ประกอบร่วมด้วย ความสามารถในการถูกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยแสงของสาร PAHs ขึ้นกับอนุภาคที่ไปเกาะติดอยู่ สารประกอบเหล่านี้มาจากหลาย ๆ แหล่ง และอนุภาคเหล่านี้ก็ถูกปล่อยออกสู่บรรยากาศ และแผ่กระจายไปทั่วสิ่งแวดล้อมนั้น มนุษย์จะสามารถรับสัมผัสกับ PAHs ได้ง่ายจากการหายใจเอาสาร PAHs ในบรรยากาศเข้าไป ทำให้มีโอกาสที่จะทำให้เกิดเป็นมะเร็งได้ง่าย

- ในดิน สารประกอบ PAHs เป็นสารที่กระจายอยู่ในดินได้เป็นบริเวณกว้าง และยังพบว่าสามารถแพร่กระจายไปได้ไกลจากบริเวณที่อยู่อาศัย และโรงงานอุตสาหกรรม และเชื่อว่าปริมาณของสารประกอบ PAHs ส่วนใหญ่มาจากการปล่อยควันเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ทั้งนี้พบว่าต้นไม้และพืชผักสามารถดูดซึมสารประกอบ PAHs จากในดินที่มีสารประกอบนี้ปนเปื้อนอยู่ได้เช่นกัน

- ในแหล่งน้ำ สารประกอบ PAHs สามารถแพร่กระจายไปได้ทั่วในแหล่งน้ำ เนื่องจากสารประกอบนี้มีแหล่งกำเนิดมาจากการที่อนุภาคที่ถูกพัดพาทางอากาศตกลงสู่ผิวน้ำ หรือจากการดูดซับที่ผิวน้ำที่สัมผัสโดยตรงกับสารประกอบเหล่านี้ในบรรยากาศ และจากน้ำเสีย และมลภาวะเหล่านี้ส่งผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพของมนุษย์เนื่องจากการใช้น้ำในการอุปโภคและบริโภค

- ในตะกอนดิน สารประกอบ PAHs กระจายตัวอยู่ในน้ำและเกิดการรวมตัวกันเกิดการตกตะกอนไปสะสมอยู่ในตะกอนดินซึ่งมักพบว่ามีปริมาณมากกว่าในบริเวณผิวน้ำประมาณ 2-5 เท่า

- ในตะกอนจากการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งเกิดจากการบำบัดน้ำทิ้งที่มาจากโรงงานอุตสาหกรรมและบ้านเรือน

- ในปิโตรเลียมและผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม สารประกอบปิโตรเลียมหรือที่เรียกกันว่า “น้ำมันดิบ” เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เกิดขึ้นในธรรมชาติจากการทับถมกันของซากอินทรีย์ภายใต้พื้นผิวโลกเป็นเวลาหลายล้านปี เป็นสารที่มีสารประกอบ PAHs เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ และมักจะเป็นแหล่งกำเนิดที่สำคัญแหล่งหนึ่ง ของสารประกอบนี้สะสมอยู่ในตะกอนดิน ดังนั้นน้ำมันที่เหลือใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะบริเวณที่มีประชากรอาศัยอยู่หนาแน่น และมีโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ มาก เนื่องจากต้องการใช้น้ำมันในกิจกรรมต่าง ๆ ปริมาณที่มาก ผลกระทบที่เกิดจากการใช้น้ำมันก็มากขึ้นตามลำดับ การปนเปื้อนของน้ำมันในแหล่งน้ำ มีสาเหตุมาจากหลายประการ ได้แก่

- 1) จากการขนส่งโดยเรือบรรทุกน้ำมัน มีโอกาสที่น้ำมันรั่วไหลในขณะที่ขนถ่าย
- 2) จากอุบัติเหตุเรือบรรทุกน้ำมันชนกันหรืออับปาง รวมทั้งการรั่วของถังน้ำมัน
- 3) การปฏิบัติการนอกชายฝั่ง เช่น การขุดเจาะน้ำมันหรือแก๊สธรรมชาติ การแตกหรือรั่วชำรุดของท่อส่งน้ำมันใต้ทะเล
- 4) จากโรงกลั่นน้ำมัน น้ำทิ้งจากโรงน้ำมันมีคราบน้ำมันบางส่วนปนอยู่หรือกรณีถังน้ำมันสำรองบนบกบริเวณชายฝั่งเกิดชำรุด หรือเกิดอุบัติเหตุทำให้มีน้ำมันรั่วไหลออกมา
- 5) จากการล้างทำความสะอาดถังน้ำมัน
- 6) น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ตั้งอยู่บริเวณชายฝั่ง
- 7) น้ำทิ้งจากชุมชน รวมทั้งจากการชะล้างคราบน้ำมันบนถนนหนทางในเขตเมือง
- 8) จากบรรยากาศ
- 9) จากกระบวนการซึมผ่านตามธรรมชาติ

2.2.2.4 ผลกระทบของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม

U.S. Department of Health and Human Services (USEPA, 2000) ได้สรุปว่า PAHs หลายตัวอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดมะเร็งได้ ตัวอย่างเช่น Benzo[a]anthracene, Benzo[a]pyrene, Benzo[b]fluoranthene, Chrysene, Dibenz[a,h]anthracene และ Indeno[1,2,3-cd]pyrene เป็นสาเหตุของการเกิดเนื้องอกจากการทดลองในห้องปฏิบัติการกับสัตว์ทดลองเมื่อให้สัตว์กิน ได้รับผ่านทางผิวหนัง หรือหายใจเอาอากาศที่มีสารเหล่านี้เข้าไปเป็นระยะเวลานาน และหน่วยงาน The International Agency for Research on Cancer (IARC, 2010) ซึ่งเป็นหน่วยงานหนึ่งขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้จัดแยกกลุ่ม PAHs โดยใช้ข้อมูลที่แสดงศักยภาพของการก่อมะเร็งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง การเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogenicity) ของสาร PAHs แบ่งได้ 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการก่อมะเร็ง คือ กลุ่มที่ก่อมะเร็งและกลุ่มที่ไม่ก่อมะเร็ง ทั้งนี้สาร Benzo[a]pyrene (BaP) ได้ถูกระบุว่าเป็นสารที่ก่อมะเร็งในคน ความเป็นพิษในแง่ต่างๆ ของสาร PAHs อาจแตกต่างกันไปได้ ขึ้นอยู่กับลักษณะการจัดเรียงตัวของวงแหวนเบนซีนในโมเลกุลของสารกลุ่มนั้น ตัวอย่างเช่น Benzo[a]pyrene เป็นสารพิษที่พบว่าสามารถก่อให้เกิดมะเร็งอย่างรุนแรงในสัตว์ทดลอง ส่วนสาร PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันแต่ต่างกันที่ลักษณะการจัดเรียงตัวของวงแหวนเบนซีนในโมเลกุลคือ Benzo[e]pyrene กลับไม่ได้ก่อให้เกิดภาวะการเกิดเซลล์มะเร็งขึ้น สาร Benzo[b]fluoranthene ก็เป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง ในขณะที่คู่เหมือนคือ Benzo[k]fluoranthene ไม่ได้ก่อให้เกิดเซลล์มะเร็ง เช่นเดียวกันกับ Benz[a]anthracene ซึ่งพบว่ามี ความรุนแรงในการเป็นสารก่อมะเร็งมากกว่า Chrysene เป็นต้น ความเป็นพิษของสาร PAHs ยังขึ้นกับความสามารถในการละลายน้ำของมันด้วย โดยสาร PAHs ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าและละลายน้ำได้ดีกว่า เช่น Naphthalene และ Phenanthrene ซึ่งประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนเพียง 2 และ 3 วงตามลำดับ จะมีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อสัตว์น้ำสูงกว่าสาร PAHs ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า (Kennish, 1992)

1.ผลกระทบต่อมนุษย์

PAHs สามารถที่จะเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ได้โดยทางเดินหายใจ การหายใจเอาอากาศที่มี PAHs เจือปนเข้าไป สำหรับคนที่อยู่ใกล้กับแหล่งขยะอันตราย การดื่มน้ำที่ การกินอาหาร ดิน หรืออนุภาคฝุ่นที่มี PAHs เจือปน ก็เป็นอีกทางหนึ่งที่ร่างกายได้รับ PAHs ภายใต้อิทธิพลของ PAHs ก็เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้โดย ถ้าหากผิวหนังไปสัมผัสกับดินที่มี PAHs เจือปนอยู่ในระดับที่สูง

PAHs เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้ง่ายและรวดเร็วทุกๆทาง อัตราการเข้าสู่ร่างกายจะสูงขึ้นเมื่ออยู่ในรูปของ Oil mixture และจะเข้าสู่เนื้อเยื่อจนถึงชั้นไขมัน และมีการสะสมอยู่ในไต ตับ และไขมัน เป็นส่วนมาก บางส่วนก็สะสมอยู่ในร่างกายได้ไม่นานมาก เนื่องจากจะถูกขับถ่ายออกโดยทางปัสสาวะและอุจจาระ PAHs แพร่กระจายอยู่ตามสภาพแวดล้อม มนุษย์อาจได้รับสารเหล่านี้ทั้งภายในบ้าน นอกบ้าน หรือที่ทำงาน และไม่ว่าจะจะได้รับ PAHs เพียงตัวเดียวแต่ละจะได้รับ PAHs ที่เป็นสารผสมรวมกันหลายๆตัว ในสภาพแวดล้อมมนุษย์จะได้รับ PAHs มาจากแหล่งต่างๆ เช่น ไอเสียจากยานพาหนะ ถนนลาดยางมะตอย ถ่านหิน ไฟป่า การเผาพืชพันธุ์ทางการเกษตร และขยะอันตราย ในชนบทสามารถตรวจวัด PAHs ในระดับปกติประมาณ 0.02 – 1.2 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร มนุษย์อาจได้รับ PAHs ที่ปะปนอยู่ในดินที่อยู่บนหรือใกล้ๆกับแหล่งขยะอันตราย เช่น โรงงานผลิตแก๊สเก่า โรงงานผลิตผลิตภัณฑ์รักษาเนื้อไม้ PAHs ยังพบในแหล่งน้ำดื่มซึ่งในสหรัฐพบว่ามี PAHs อยู่ในน้ำดื่มประมาณ 4-24 นาโนกรัมต่อลิตร (USEPA,2000)

2.ผลกระทบต่อสัตว์ทะเล

จากการศึกษาของ Shore et al., (1999) พบว่า นกทะเลที่อยู่บริเวณชายฝั่งที่ได้รับอิทธิพลจากน้ำมันที่รั่วไหลมาจากเรือบรรทุกน้ำมันบริเวณ Exxon Valdez ซึ่งเป็นน้ำมันดิบ พบว่าทำให้นกทะเลหลายชนิดได้รับผลกระทบต่อไข่และตัวอ่อนของนก รวมทั้งการพัฒนาการของการฟักไข่ของนก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาปริมาณของสาร PAHs แต่ละชนิดที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ โดยปริมาณของสาร PAHs แต่ละชนิดที่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในแต่ละชนิดจะมีปริมาณที่แตกต่างกันไป ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 2.3

3.ผลกระทบที่เกิดกับสัตว์ทดลอง

หนู Mice ที่กิน Benzo[a]pyrene ระดับสูง ในช่วงระหว่างการตั้งท้องจะทำให้หนู mice ที่ตั้งท้องซึ่งกิน Benzo[a]pyrene เข้าไปแสดงอาการให้เห็นเช่น มีความผิดปกติของคลอด และน้ำหนักลด อาจเหมือนกับผลที่เกิดขึ้นกับมนุษย์ แต่ไม่มีข้อมูลที่จะมาแสดงให้เห็นถึงผลกระทบนี้ ดังที่ได้มีการศึกษาในหนูหลายๆชนิด ดังตารางที่ 2.4 การศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่า PAHs เป็นสาเหตุในการเกิดความผิดปกติของผิวหนัง และของเหลวในร่างกาย ส่งผลต่อความเจ็บป่วยหลังจากที่ได้รับ PAHs ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว อย่างไรก็ตามผลกระทบเหล่านี้ยังไม่มีรายงานในมนุษย์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสาร PAHs ในสิ่งแวดล้อมต่างๆมีการศึกษากันมาก ในที่นี้จะกล่าวถึงการศึกษาที่ผ่านมาพอเป็นสังเขปดังนี้

Page et al., (1999) ศึกษาการสะสมของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เกิดจากกิจกรรมการเผาไหม้ทำให้เกิดการสะสมของสาร PAHs ในตะกอนดิน บริเวณ Prince William Sound อ่าว Alaska โดยทำการศึกษาในบริเวณใกล้ฝั่งเพื่อที่จะทราบถึงประวัติกิจกรรมของมนุษย์ พบว่าในอดีตมีปริมาณสาร PAHs อยู่ในระดับที่สูงมาก สาเหตุมาจากการเกิดไฟไหม้ป่า ทำให้สาร PAHs ตกลงมาสะสมในตะกอนดินรวมกับสาร PAHs ที่มีอยู่เดิมซึ่งมาจากธรรมชาติก็มาจากการรั่วซึมของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่มาจากบริเวณทางตะวันออกของอ่าว Alaska นอกจากนี้ก็ยังพบว่ามีสาร PAHs ส่วนหนึ่งมาจากละอองน้ำมันที่มาจาก Exxon Valdez ซึ่งเป็นส่วนน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณสาร PAHs ทั้งหมด

Kim et al., (1999) ศึกษาการกระจายและแหล่งที่มาของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตะกอนดินบริเวณอ่าว Kyeonggi ประเทศเกาหลี พบว่าปริมาณสาร PAHs รวม อยู่ในระดับต่ำจนถึงปานกลาง ค่าเฉลี่ย 120 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง การกระจายของสาร PAHs พบว่ามีความเข้มข้นมากที่สุดบริเวณใกล้แหล่งกำเนิดและจะมีปริมาณน้อยลงเมื่อห่างแหล่งกำเนิดออกไป

ตารางที่ 2.3 ผลกระทบของสาร PAHs แต่ละชนิดที่มีต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ

PAHs, สิ่งมีชีวิต และอื่น ๆ	Concentration in medium ^a	Effect ^b
Benzo[a]pyrene Sandworm, <i>Neanthes arenceodentata</i>	>1,000	LC-50 (96h)
Chrysene Sandworm	>1,000	LC-50 (96h)
Dibenz[a,h]anthracene Sandworm	>1,000	LC-50 (96h)
Fluoranthene Sandworm	500	LC-50 (96h)
Fluorene Grass shrimp, <i>Palaemonetes pugio</i>	320	LC-50 (96h)
Amphipod, <i>Gammarus Psuedoliminaeus</i>	600	LC-50 (96h)
Sandworm	1,000	LC-50 (96h)
Sheepshead minnow, <i>Cyprinodon variegatus</i>	1,680	LC-50 (96h)
Naphthalene Copepod, <i>Eurytemora affinis</i>	50	LC-30 (10d)
Pink salmon, <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> , fry	920	LC-50 (24h)
Dungeness crab, <i>Cancer magister</i>	2,000	LC-50 (96h)
Grass shrimp	2,400	LC-50 (96h)
Sheepshead minnow	2,400	LC-50 (96h)
1-Methylnaphthalene Dungeness crab, <i>Cancer</i>	1,900	LC-50 (96h)
Sheepshead minnow	3,400	LC-50 (96h)
2-Methylnaphthalene Grass shrimp	1,100	LC-50 (96h)
Trimethylnaphthalenes Copepod, <i>Eurytemora affinis</i>	2,000	LC-50 (24h)

Phenanthrene Grass shrimp	370	LC-50 (24h)
1-Methylphenanthrene Sandworm	300	LC-50 (96h)

ที่มา: Kennish (1992)

หมายเหตุ: a คือ ความเข้มข้นหน่วย $\mu\text{g/L}$; b คือ m= month d=day h= hours

Oanh et al., (1999) ศึกษาการปล่อยสาร PAHs และ Particulate Matter ออกมาจากการเผาไหม้ที่เกิดขึ้นในครัวเรือนบริเวณ Southeast Asia โดยการวัดจากการปล่อยควันเสียของเตา 3 ชนิดที่ใช้ในบ้านเรือน ได้แก่ Eucalyptus wood sticks open burning, charcoal stove , coal briquette วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC/FLD พบว่าปริมาณสาร PAHs ที่ถูกปล่อยออกมาจาก wood burning มีปริมาณมากที่สุดและพบว่ามีทั้งหมด 18 ชนิด มี 11 ชนิดที่มีผลทางด้านพันธุกรรม ในขณะที่ charcoal stove จะให้ปริมาณสาร PAHs ที่น้อยที่สุด จากการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าการเผาไหม้โดยใช้ charcoal fuel เป็นระบบที่ก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากสาร PAHs น้อยที่สุด

ตารางที่ 2.4 ผลกระทบของ PAHs ที่มีต่อสิ่งมีชีวิตจากการทดลอง

PAHs	ขนาดที่ได้รับ	ผลที่เกิด
Benzo[a]anthracene	5มก. ต่อหนู 1 ตัวที่กำลังตั้งครรภ์	ตัวอ่อนตายภายใน 1 วันและลดประสิทธิภาพของการผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจน
Benzo[k]fluoranthene	0.1 หรือ 0.5 % ในอะซิโตนที่ทาบบนผิวของหนูตัวเมีย	8/20, 3/20 จะตายภายใน 13 เดือน
Benzo[ghi]perylene	0.2 มล 0.01 % ในไคคลอโรมีเทน	32/50 ไม่มีการตาย 3/50 ไม่เป็นเนื้องอก
Chrysene	0.3% ใน benzene 440วัน สำหรับหนู 20, 50 และ 100 ตัว ถูกทาที่บริเวณผิวหนัง	20/170 ไม่เป็นเนื้องอก 50/170 ทำให้เป็นหูด 30/170 ยังคงมีชีวิตอยู่จนถึง 6 เดือน

ที่มา: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2010)

Yim et al., (2005) ศึกษาการกระจายและลักษณะเฉพาะของ PAHs ในตะกอนดินจากอ่าว Masan ประเทศเกาหลี พบปริมาณ PAHs รวมในตะกอนดินผิวหน้าอยู่ในช่วง 27–2,600 นาโนกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 680 นาโนกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง การกระจายมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันแต่มีปริมาณที่แตกต่างกันระหว่างพื้นที่ภายในอ่าวและพื้นที่ภายนอกอ่าว โดย PAHs มีที่มาจากแหล่งที่มาเหมือนกัน การกระจายของ PAHs ในตะกอนดินตามความลึก โดยใช้การวิเคราะห์แบบ PCA พบความเข้มข้นของ PAHs มากที่สุด (แหล่งที่มาจากอุตสาหกรรม) เกิดขึ้นหลังช่วงปี 1950s และ 1980 การวิเคราะห์บ่งชี้แหล่งกำเนิด

ที่มาจาก การเผาไหม้ (Pyrolytic source fingerprint) พบว่ามีอิทธิพลเล็กน้อยจากแหล่งกำเนิดที่มาจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม (Petrogenic source) ในบริเวณที่ศึกษา

Hyun et al., (2005) ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อย PAHs โดยจุลินทรีย์ในตะกอนดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันถ่านหิน (Coal tar) ในห้องปฏิบัติการ มีสมมติฐานว่าตะกอนดินที่มีความสมดุลของออกซิเจนและปริมาณสารอาหารที่เพียงพอในชั้นทรายที่มีกิจกรรมของจุลินทรีย์ มีปริมาณการปนเปื้อนของ PAHs ลดลง การเปลี่ยนแปลงของปริมาณการปนเปื้อนลดน้อยลงตามความลึกของน้ำเนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่ลดน้อยลงในระดับลึก โดยทำการศึกษาแบบแบทช์ (Batch) กับชุมชนจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากตะกอนดินที่มีการปนเปื้อน PAHs กำหนดให้มีการเติมสารอาหารและการให้ออกซิเจนที่แตกต่างกัน ผลจากการศึกษาการย่อยสลาย PAHs จากสารละลายที่สกัดได้จากตะกอนดินที่ปนเปื้อนถ่านหินในระยะเวลา 30 วัน พบว่าความเข้มข้นของออกซิเจนและสารอาหารเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการควบคุมอัตราการย่อยสลาย PAHs ในตะกอนดิน

Qiao et al., (2005) ศึกษาองค์ประกอบและแหล่งที่มาของ PAHs ในตะกอนดินผิวหน้าจำนวน 25 ตัวอย่างจากอำเภอ Meiliang, ทะเลสาบ Taihu, ประเทศจีนในปี 2003 ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโตรเมตรี (Gas Chromatography – Mass Spectrometry, GC-MS) พบความเข้มข้นรวมของ PAHs (16 ชนิด ตาม US EPA) อยู่ในช่วง 1,207–4,754 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตัวอย่างตะกอนดินที่มีความเข้มข้นของ PAHs สูงที่สุดพบที่บริเวณทางตอนเหนือของอำเภอ ซึ่ง PAHs มีแหล่งที่มาจากบริเวณที่อยู่ใกล้เคียง ส่วนใหญ่มาจากการเผาไหม้ที่ใช้อุณหภูมิสูง (High – temperature pyrolytic process) ขณะที่ระดับ PAHs ที่อยู่ทางตอนใต้มีปริมาณค่อนข้างต่ำ มีแหล่งกำเนิดมาจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม (Petrogenic process) ระดับของ PAHs ที่สำรวจได้มีปริมาณสูงกว่า PAHs ที่พบในตะกอนดินทั่วไปในแม่น้ำของประเทศจีน แต่ต่ำกว่าตะกอนดินของพื้นที่ชุมชนและบริเวณอำเภอ

Yim et al., (2007) ศึกษาการกระจายของ PAHs ตามลักษณะทางภูมิศาสตร์เพื่อประเมินการปนเปื้อนของ PAHs ในตะกอนดินจากสิ่งแวดล้อมทางทะเลประเทศเกาหลี โดยวิเคราะห์ตัวอย่างตะกอนดินจำนวน 117 ตัวอย่างที่เก็บตลอดแนวชายฝั่ง พบความเข้มข้นของ PAHs รวม 16 ชนิด อยู่ในช่วง 8.80 – 18,500 นาโนกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ในเขตอุตสาหกรรมและเขตเมืองพบระดับการปนเปื้อนของ PAHs ในปริมาณสูงกว่าบริเวณอื่น เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของประเทศสหรัฐอเมริกาและสหราชอาณาจักร พบว่าความเข้มข้นของ PAHs ในตะกอนดินจากสหราชอาณาจักร > สหรัฐอเมริกา > เกาหลี การวิเคราะห์แหล่งที่มาของ PAHs ในตะกอนดินบริเวณชายฝั่งและบริเวณที่อยู่ไกลฝั่งออกไปใช้ดัชนีและสถิติในการอธิบายแหล่งกำเนิด PAHs ที่มาจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ (Pyrogenic) และมาจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม (Petrogenic) ในตะกอนดิน จากการคำนวณค่าอัตราส่วนของ PAHs (PAHs quotient) พบว่าประมาณ 7.76% ของตัวอย่างที่วิเคราะห์มีค่าอัตราส่วนของ PAHs เฉลี่ย > 1.0 แสดงว่ามีความเป็นไปได้ในการเกิดผลกระทบทางด้านลบต่อสิ่งมีชีวิตที่มีความอ่อนไหวในอำเภอ Youngil

Stout et al., (2008) ศึกษาความเข้มข้นและลักษณะเฉพาะของ PAHs และสารไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ ในถ่านหิน 15 แหล่ง โดยใช้ไดคลอโรมีเทนสกัดที่อุณหภูมิห้อง ตามวิธี EPA Method 3500 พบความเข้มข้น

ของไฮโดรคาร์บอนที่สามารถสกัดได้ทั้งหมด (Total Extractable Hydrocarbons, TEH) มีปริมาณอยู่ในช่วง 8.2–2,500 ไมโครกรัมต่อกรัมถ่านหิน(น้ำหนักแห้ง) ความเข้มข้นของ PAHs มีปริมาณอยู่ในช่วง 35 – 11,000 ไมโครกรัมต่อกรัมถ่านหิน(น้ำหนักแห้ง) หรือ 38–12,000 นาโนกรัมต่อกรัมคาร์บอน และมีการผันแปรตามตำแหน่งแหล่งที่เกิดของถ่านหิน PAHs ที่สามารถสกัดได้จากถ่านหินมีผลมาจาก“แหล่งกำเนิด” และ “การเปลี่ยนแปลงตามอายุ (Maturity)” โดยเรียงลำดับจากแอนทราไซต์, บิทูมินัส, ซับบิทูมินัส และ ลิกไนต์ ตามลำดับ

Mostafa et al., (2009) ทำการศึกษาการกระจายและลักษณะเฉพาะของ PAHs ในตะกอนดินของพื้นที่ชายฝั่ง Hadhramout อ่าว Aden ประเทศ Yemen เพื่อประเมินสภาพการปนเปื้อนของ PAHs ในตะกอนดินของพื้นที่ชายฝั่ง Hadhramout โดยเก็บตัวอย่างตะกอนผิวหน้าจำนวน 17 ตัวอย่างในเดือนมีนาคม – เมษายน 2005 และวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ PAHs ที่มีวงแหวนเบนซีนจำนวน 2–6 วงด้วยเทคนิค GC-MS ความเข้มข้นของ PAHs ในตะกอนดินผิวหน้าอยู่ในช่วง 2.2–604 นาโนกรัมต่อกรัม (ค่าเฉลี่ย: 82.4 นาโนกรัมต่อกรัม) การปนเปื้อนที่มีปริมาณสูงอันเกิดจากกิจกรรมของท่าเรือใกล้กับสถานีปิโตรเลียม Al-Dhabah และพื้นที่ในเขตเมือง การเปรียบเทียบช่วงความเข้มข้นกับการสำรวจจากทั่วโลกของตำแหน่งตะกอนดินที่มีการปนเปื้อน PAHs ในชายฝั่ง Hadhramout อยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง การประเมินแหล่งที่มาในตะกอนดินบริเวณชายฝั่ง Hadhramout พบว่าส่วนใหญ่มาจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม (Petrogenic) และมีแหล่งกำเนิดของ PAHs จากการเผาไหม้ (Pyrolytic) มาจากพื้นที่ในเขตเมืองที่ส่งผลกระทบต่อตัวน้ำ

นอกจากการศึกษาที่กล่าวแล้วยังมีการศึกษาในตะกอนบริเวณชายฝั่งประเทศต่างๆดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างการศึกษาปริมาณสาร PAHs ในตะกอนชายฝั่งบริเวณต่างๆของโลก

บริเวณที่ทำการศึกษา	พิสัย (ng/g น้ำหนักแห้ง)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (ng/g น้ำหนักแห้ง)	รายการอ้างอิง
Western Mediterranean Sea *	180-3200	1300	Lipiatou and Salot (1991)
New Bedford Harbour, MA	63,000	-	Kennish (1992)
Adriatic Sea *	18-580	200	Caricchia et al., (1993)
Manukau Harbour, New Zealand*	16-5300	820	Holland et al., (1993)
Casco Bay, USA*	16-21000	2900	Kennicutt et al., (1994)
Baltic sea*	720-1900	1200	Witt et al., (1995)
San Diego Bay, USA*	80-20000	3000	Anderson et al., (1996)
Caribbean island of Guadeloupe	103-1656.5	-	Bernard et al., (1996)
Laguna Madra, United States	850-721000	-	Sharma et al., (1997)
Green Bay, Wisconsin	460-8040	6000	Su et al., (1997)
Kyeonggi Bay, Korea	9.1-1400	120	Kim et al., (1999)
Casco Bay, USA	16-20,748	2900	Kennicutt et al., 1999
Northwestern Black sea	52.6-269	136	Maldonado et al., 1999
South China sea	24.7-275.4	146	Yang, 2000

Dalian Bay, China	32.7-3558	152.08	Liu et al., 2001
Todos Santos Bay, Mexico	7.6-813	96	Macias-Zamora, 2002
Daya Bay, China	42.5-158.2	126.2	Yan et al., 2009
Gulf of Aden, Yemen	2.2-604	82.4	Mostafa et al., 2009

* ที่มา Kim et al., (1999)

สำหรับประเทศไทยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนดังนี้ (Wattayakorn, 2012)

พรศรี สุทธนารักษ์ (2534) ศึกษาปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำ ตะกอนดินที่เก็บในบริเวณอุตสาหกรรมแปรสภาพเรือเหล็กเก่า มาบตาพุด จังหวัดระยอง โดยวิเคราะห์สารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่แยกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) พบสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนรวม ในช่วง 0.003–0.32 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยมีค่าเฉลี่ย 0.05 ± 0.07 ไมโครกรัมต่อกรัม สาร PAHs ที่พบได้แก่ Acenaphthene Dibenzothiophene Phenanthrene Anthracene 1-methylphenanthrene Pyrene และ Benzo[a]pyrene

เกศินี สรรวานิช (2534) ทำการศึกษาสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำ ตะกอนดิน และหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) บริเวณแม่น้ำท่าจีนตอนล่าง ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างตะกอนดินพบสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) ที่มีจำนวนวงแหวนตั้งแต่ 2–6 วง โดยมีปริมาณรวมเฉลี่ย 2.71 ± 0.46 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตัวอย่างหอยแมลงภู่ตรวจพบสาร PAHs ได้แก่ naphthalene biphenyl 2,6-dimethylnaphthalene dibenzofuran fluoranthene pyrene และ chrysene โดยมีปริมาณในช่วง 12.5–81.0 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

จรรณู สารินทร์ (2537) ทำการศึกษาสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตะกอนดินตามลำดับความลึกของแท่งดินตะกอนที่เก็บจากบริเวณอ่าวไทยจำนวน 8 สถานี วิเคราะห์โดยวิธี GC ใช้คอลัมน์ชนิด Fused silica capillary และตัวตรวจวัดแบบเฟลมไอโอไนเซชัน ผลการวิเคราะห์สารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนกลุ่ม PAHs พบน้อยมากทั้งปริมาณและชนิด โดยสารส่วนใหญ่ที่พบคือ Dibenzothiophene 1,2-dihydro-1-phenylnaphthalene และ 2-methylphenanthrene โดยมีปริมาณรวมของ PAHs ในตะกอนชั้นบนของแต่ละสถานีดังนี้ ในบริเวณอ่าวไทยตอนบนมีค่าในช่วง 38.7 - 123.5 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง บริเวณชายฝั่งตะวันตกมีค่า 66.9 นาโนกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง บริเวณชายฝั่งตะวันออกมีค่า 43.1 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง บริเวณอ่าวไทยตอนล่างมีค่าในช่วง 13.6–67.3 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

กฤตยาพร ทัพพะทัต (2538) ศึกษาปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำและตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดระยอง ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสาร PAHs ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าปริมาณสาร PAHs รวมอยู่ในช่วง trace–1.99 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.28 ± 0.18 ไมโครกรัมต่อกรัม ปริมาณเฉลี่ยรวมตามการใช้พื้นที่ที่มีปริมาณสูงสุดในบริเวณชุมชน ตามมาด้วยบริเวณ

อุตสาหกรรมและเพาะเลี้ยง ปริมาณ PAHs เปลี่ยนตามระยะทางค่าสูงสุดอยู่ในบริเวณชายฝั่ง และลดลงตามระยะทางที่ห่างฝั่งตามลำดับ

เชาวน์ นกอยู่ (2538) ศึกษาการปนเปื้อนของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในน้ำ ตะกอนและตัวอย่างหอยแมลงภู่ ซึ่งเก็บจากบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยาตอนล่าง ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างตะกอน พบสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) มีจำนวนวงตั้งแต่ 2-6 วง โดยมีปริมาณรวมเฉลี่ย 1.93 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในเดือนพฤษภาคม และ 2.14 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งในเดือนกันยายน สาร PAHs ที่พบได้แก่ Naphthalene Biphenyl 2,6-dimethylnaphthalene Fluorene Anthracene 1-methylphenanthrene Fluoranthene Pyrene และ Chrysene มีค่าความเข้มข้นของ PAHs แต่ละตัวอยู่ในช่วง 15.6-76.8 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แหล่งกำเนิดของสารไฮโดรคาร์บอนในบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยาตอนล่าง พบว่าส่วนใหญ่มีแหล่งกำเนิดมาจากน้ำมัน โดยการปนเปื้อนมากับน้ำทิ้งจากชุมชน น้ำทิ้งอุตสาหกรรม การคมนาคมทางเรือ และเกิดจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงต่าง ๆ

กัลยา วัฒนากร (2543) ศึกษาการปนเปื้อนของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในเอสทรีแม่น้ำเจ้าพระยา ทำการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งแบบแผ่น และทดสอบด้วยวิธี HPLC พบว่า Empore™ extraction disk สามารถสกัดสาร PAHs จากตัวอย่างน้ำแม่น้ำ และน้ำทะเลที่มีระดับความเค็ม ตั้งแต่ 5 – 35 psu ได้ดี โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ส่วนคืนกลับ (% recovery) ของการสกัดสารอยู่ในช่วง 60 – 88 เปอร์เซ็นต์ สาร Naphthalene และ Anthracene มีค่าเปอร์เซ็นต์ส่วนคืนกลับต่ำที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 60 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับความแปรปรวนของความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์สาร PAHs พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 2 ถึง 7 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาพบว่า วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมในการศึกษาการปนเปื้อนของสาร PAHs ในแหล่งน้ำต่างๆ ได้ทั่วไป และจากผลการวิเคราะห์ปริมาณของสาร PAHs พบว่า ในช่วงฤดูน้ำหลากและช่วงฤดูแล้ง พบสาร PAHs ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 2-3 วงเป็นส่วนใหญ่ เช่น Naphthalene Acenaphthene Fluorene Phenanthrene และ Anthracene ซึ่งพบในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.37 นาโนกรัมต่อลิตร โดยปริมาณสาร PAHs รวมที่พบในช่วงฤดูน้ำหลากสูงกว่าในช่วงฤดูแล้ง

Boonyatumanond (1999) วิเคราะห์สารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างน้ำ โดยอาศัยเทคนิคไฮเปอร์ฟอร์แมนลิควิดโครมาโทกราฟี เพื่อที่จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ ที่มีหน่วยตรวจวัดแบบกรดและโฟโตไดโอดอาร์เรย์ โดยศึกษาเงื่อนไขในการแยกสารประกอบ PAHs 16 ชนิด โดยระบบ gradient elution mode เทคนิคการสกัดสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ถูกพัฒนาโดยใช้เทคนิควัฏภาคของแข็ง และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด เช่น การหาปริมาณน้ำที่ใช้ในการผ่านเข้าระบบการสกัดอย่างมีประสิทธิภาพโดยทดลองกับตัวอย่างน้ำประปาและน้ำจากแม่น้ำ นอกจากนั้นได้ทำการทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำในการวิเคราะห์โดยการเติมสารที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างจริง การหาความสามารถในการสกัดพบว่าสามารถวิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 1 นาโนกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในระดับที่สามารถพบในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมทั่วไป

วรารณ ศรีมูล (2544) ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตะกอนดินผิวหน้าที่เก็บจากอ่าวศรีราชา จ. ชลบุรี ผลการศึกษาพบสาร Anthracene Fluoranthene และ

Dibenz[a,h]anthracene ในปริมาณที่สูงกว่า PAHs ตัวอื่นๆ ปริมาณ PAHs รวมอยู่ในช่วง 1.31-3.59 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (เฉลี่ย 2.44 ± 0.73 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) การปนเปื้อนของสารไฮโดรคาร์บอนในบริเวณอ่าวศรีราชายังอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่สูงมากนัก เมื่อเทียบกับบริเวณที่มีปัญหาภาวะมลพิษทางน้ำมันจากบริเวณอื่นของโลก

Wattayakorn and Chaipuriwong (2006) ศึกษาการกระจายของสาร PAHs ในดินตะกอนผิวหน้าและในแท่งตะกอนดินจากบริเวณเอสทูรีแม่น้ำท่าจีน พบว่าปริมาณ PAHs รวมของตัวอย่างตะกอนผิวหน้าตามลำน้ำท่าจีนอยู่ในช่วง 263 ถึง 1,524 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 503 นาโนกรัมต่อกรัมสาร PAHs ที่พบได้มากได้แก่ Naphthalene, Biphenyl, Acenaphthene, Fluorene, Phenanthrene, Chrysene, Benzo[a]anthracene, Perylene, Anthracene, Fluoranthene และ Pyrene การกระจายของสาร PAHs รวมในตะกอนดินผิวหน้าพบว่าบริเวณที่อยู่ใกล้แหล่งกำเนิดของสาร PAHs จะเป็นบริเวณที่พบการสะสมได้มากกว่าบริเวณที่อยู่ไกลแหล่งกำเนิดออกไป การสะสมของสาร PAHs รวมในตะกอนตามความลึกแสดงแนวโน้มของ PAHs ที่ลดลงเมื่อความลึกเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าในปัจจุบันมีการสะสมของสาร PAHs มากกว่าในอดีต การพิจารณาแหล่งกำเนิดของสาร PAHs จากดัชนี Fluoranthene/Pyrene Phenanthrene/Anthracene ΣMPhe/Phe และ (2+3-ring)PAHs/(4+5-ring)PAHs พบว่าแหล่งกำเนิดหลักของสาร PAHs ในดินตะกอนบริเวณเอสทูรีแม่น้ำท่าจีน ส่วนใหญ่มาจากการเผาไหม้ เช่น จากการปล่อยควันเสียจากยานพาหนะจากโรงงานอุตสาหกรรม และการปล่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วลงสู่แหล่งน้ำ แหล่งกำเนิดรองมาจากการปนเปื้อนจากน้ำมัน

Boonyatumanond et al., (2006; 2007) ศึกษาการปนเปื้อนของสารกลุ่มโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) และหาสาเหตุหลักและแหล่งที่มาของสาร PAHs ในตะกอนดินบริเวณคลองที่เชื่อมต่อกับแม่น้ำเจ้าพระยา บริเวณแม่น้ำเจ้าพระยา ตั้งแต่จังหวัดอยุธยาถึงปากแม่น้ำเจ้าพระยาจังหวัดสมุทรปราการ และบริเวณชายฝั่งทะเลของไทย จากตัวอย่างตะกอนผิวหน้าจำนวน 41 ตัวอย่าง และแท่งตะกอนดินจำนวน 4 แท่ง พบปริมาณ PAHs รวมมีความเข้มข้นเฉลี่ยบริเวณคลอง แม่น้ำเจ้าพระยา ปากแม่น้ำ และชายฝั่งทะเลเท่ากับ 2,290, 251, 178 และ 50 นาโนกรัมต่อกรัม(น้ำหนักกรัมแห้ง)ตามลำดับ โดยความเข้มข้นของสาร PAHs มีแนวโน้มลดลงจากแหล่งน้ำที่ใกล้แผ่นดินสู่แหล่งน้ำไกลออกไป แหล่งที่มาของสาร PAHs ในตะกอนสามารถสรุปได้ว่ามาจากทั้งผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม และ PAHs จากการเผาไหม้ผสมกัน โดยมาในรูปแบบฝุ่นจากถนนและดินที่ถูกชะล้างสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ โดยมีองค์ประกอบของ PAHs และ Hopanes สอดคล้องกับในตะกอนดินในพื้นที่ศึกษา การสะสม PAHs ในตะกอนจากการศึกษานี้พบว่าอยู่ในระดับปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับในประเทศต่างๆ เช่น ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเป็นประเทศอุตสาหกรรมและมีปัญหาการปนเปื้อน PAHs ในปริมาณสูงกว่า เช่น บริเวณอ่าวโตเกียว พบ PAHs ในช่วง 65-2,010 นาโนกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง และมีค่าอัตราส่วนของ MP/P อยู่ในช่วง 0.3-1.0 แสดงให้เห็นว่า PAHs มีรูปแบบ pyrogenic เป็นหลัก (Yamashita et al., 2000)

2.3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

2.3.1 สถานที่ทำการศึกษา

พื้นที่ศึกษาอยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเลศรีราชาและหมู่เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี โดยกำหนดจุดเก็บตะกอนดินในทะเลจำนวน 26 สถานี (ภาพที่ 2.3) ครอบคลุมพื้นที่ในทะเลประมาณ 100 ตารางกิโลเมตร โดยมีพิกัดตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของสถานีเก็บตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ ก.1 (ภาคผนวก ก)

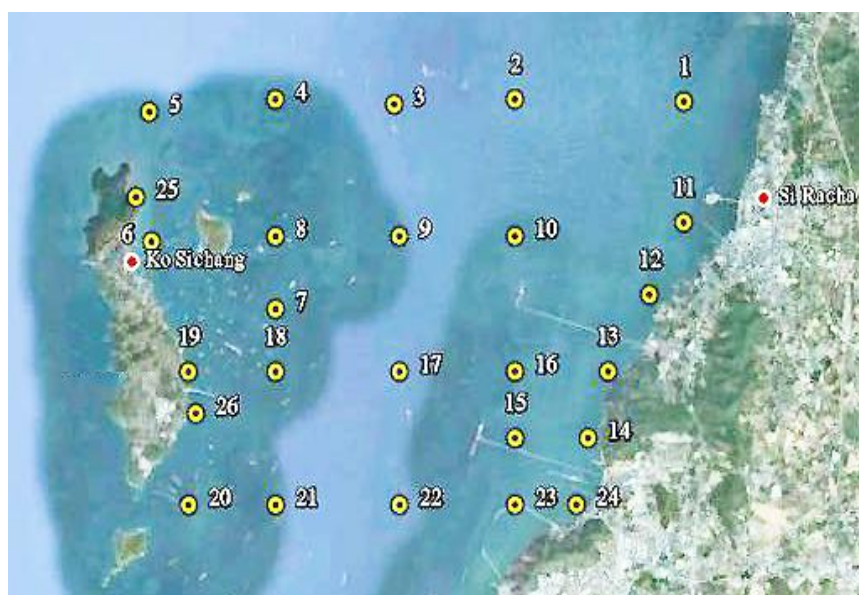
2.3.2 การเก็บตัวอย่างและการตรวจวัดภาคสนาม

เก็บตัวอย่างตะกอนผิวหน้าโดยใช้ที่ตักดินแบบ Young-modified van Veen grab ขนาดพื้นที่ 0.1 ตารางเมตร ตักตะกอนดินผิวหน้าบรรจุใส่ขวดแก้วปากกว้างที่ทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว ปิดฝาและแช่แข็งไว้เพื่อรอการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เก็บตัวอย่างตะกอนดินจากบริเวณศึกษารวมทั้งหมด 26 สถานี วัดความเป็นกรด-เบส และค่ารีด็อกซ์โพเทนเชียล (Eh) ของตัวอย่างตะกอนดินทุกสถานีที่เก็บตัวอย่างด้วย

2.3.3 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของตัวอย่างตะกอนดิน

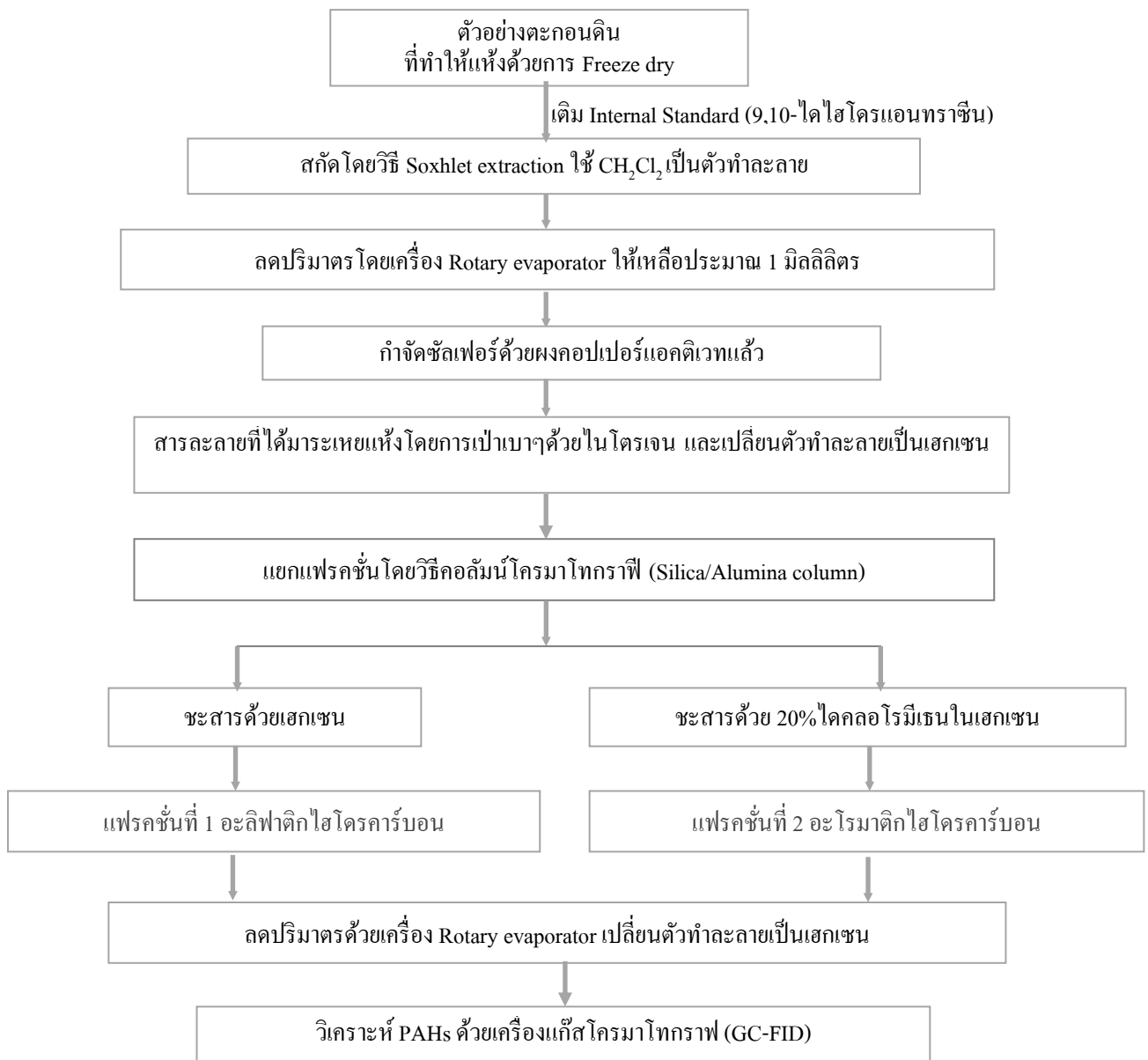
นำตัวอย่างดินตะกอนไปวิเคราะห์หาเนื้อดิน(Texture) โดยวิธีไฮโครมิเตอร์ (Caver, 1971) แบ่งตะกอนส่วนหนึ่งประมาณ 3 กรัม ไปหาปริมาณน้ำด้วยวิธีการอบในเตาอบที่ 103 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาทำให้เย็นในเคซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักตะกอนแห้งจนคงที่ และแบ่งดินอีกส่วนหนึ่งไปทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียสในเตาอบ นำมาบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.2 มิลลิเมตร และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณอินทรีย์คาร์บอนในตัวอย่างดินตะกอนโดยวิธี Walkley Black (Loring and Rantala, 1990)



ภาพที่ 2.3 แสดงบริเวณศึกษาและจุดเก็บตัวอย่างตะกอน

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตะกอนดิน

ปริมาณการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างตะกอนดิน วิเคราะห์ตามวิธีของ UNEP/IOC/IAEA (1992) โดยสกัดตัวอย่างด้วยเทคนิค Soxhlet extraction และวิเคราะห์ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างตะกอนดินด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ Agilent Hewlett Packard (HP) 6890 โดยใช้ตัวตรวจชนิด Flame Ionization Detector (GC-FID) การวิเคราะห์ชนิดของสารในกลุ่ม PAHs ทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า Retention time กับโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน และคำนวณปริมาณของ PAHs แต่ละชนิดที่ตรวจพบโดยการเปรียบเทียบพื้นที่พีคกับพีคของสารมาตรฐาน PAHs (Supelco PAH Standard, 4743U LB57094) จากกราฟมาตรฐาน (calibration standard curve) นำตัวอย่าง 10% ไปวิเคราะห์หาค่าด้วยเทคนิค Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) เพื่อยืนยันความถูกต้องในการจำแนกชนิดของสาร PAHs ด้วย GC-FID ภาพที่ 2.4 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์สารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างตะกอนดิน



ภาพที่ 2.4 แผนภูมิสรุปวิธีการวิเคราะห์สาร PAHs ในตะกอนดิน

สภาวะของเครื่อง GC/FID ที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร PAHs

Agilent 6890 GC with FID	
Column type	HP5 5% Phenyl Methyl Siloxane
Length	30 m
Internal diameter (ID)	0.32 mm
Film thickness	0.25 μm
Injection	Splitless, 1 μL
Injector temp.	250°C
Carrier gas	Helium (UHP Grade)
He flow	1.0 ml min ⁻¹
He Flow (make-up gas)	30 ml/min
H ₂ flow	30 ml min ⁻¹
Air	300 ml min ⁻¹
Make up gas	Nitrogen
FID Temperature	300°C
โปรแกรมอุณหภูมิของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์	
อุณหภูมิเริ่มต้น	70 องศาเซลเซียส
อัตราของการเพิ่มอุณหภูมิ	6 องศาเซลเซียส/นาที
อุณหภูมิสุดท้าย	290 องศาเซลเซียส (hold 15 นาที)

สภาวะของเครื่อง Gas Chromatograph/Mass Spectrometer (GC/MS)

GC/MS: Saturn 2000 Varian

Mass Data type	: Centroid
Emission Current	: 10 microamps
Mass Defect	: 0 mmu/100 u
Count Thershold	: 1 count
Scan time	: 1.00 second
Segment Low mass	: 40 m/z
Segment High mass	: 650 m/z

2.1 การหาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ

ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) หมายถึงปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ทำโดยทดสอบ spiked sample blank โดยการเติมสารมาตรฐาน PAHs ให้มีความเข้มข้นที่ใกล้ค่า LOD ทำการทดสอบ 7-10 ซ้ำ คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยไม่ต้องหาค่าเฉลี่ย เนื่องจากเป็นสารมาตรฐานที่เติมลงไป และคำนวณ LOD ดังนี้

$$\text{LOD} = 3\text{SD}$$

2.2 ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ

ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) คือ ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสาร PAHs ที่ทดสอบซึ่งสามารถหาปริมาณได้โดยที่มีความแม่นยำและความเที่ยงเป็นที่ยอมรับ โดยทั่วไปพร้อมกับ LOD โดย LOQ มีค่าประมาณ 3 เท่าของ LOD หรือ 10SD ใช้ข้อมูลการตรวจสอบเดียวกัน

2.3 การตรวจสอบค่าคืนกลับ (% Recovery)

การหาค่า % คืนกลับทำเพื่อตรวจสอบวิธีการที่ใช้ในวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ในดินตะกอนว่าให้ผลในการวิเคราะห์ได้ถูกต้องมากน้อยเพียงใด โดยการเติมสารละลายมาตรฐานของ 9,10-ไดไฮโดรแอนทราซีน (Internal Standard, IS) ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (10 µg/mL) ลงไปในตัวอย่างดินตะกอน (Spiked sample) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณตามวิธีการดังกล่าว ควบคู่ไปกับตัวอย่างดินตะกอนที่ไม่ได้เติมสารละลายมาตรฐานลงไป และนำค่าจากทั้งสองส่วนมาคำนวณหาค่า % คืนกลับ โดยสมการ

$$\% \text{ Recovery} = [(C_1 - C_2)/C_3] \times 100$$

โดยที่ C_1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (Spiked sample)

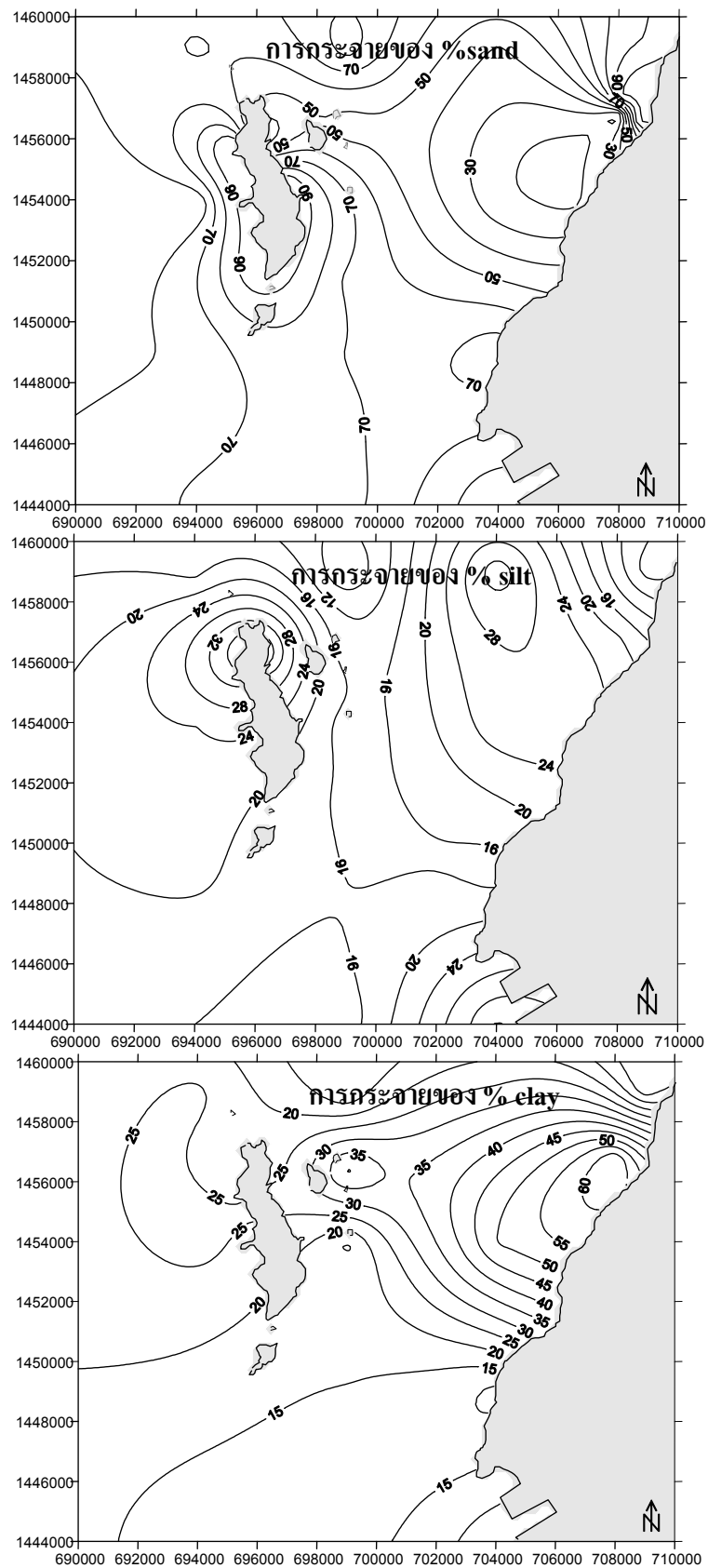
C_2 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน (Unspiked sample)

C_3 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง

2.4 ผลการวิจัย

2.4.1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินตะกอนพื้นทะเล

ตัวอย่างตะกอนดินพื้นทะเลบริเวณชายฝั่งที่เก็บมาวิเคราะห์จำนวน 26 สถานี มีการกระจายของอนุภาคของตะกอนดังแสดงในภาพที่ 2.5 ทั้งนี้บริเวณพื้นที่ศึกษา มีอนุภาคของตะกอนส่วนใหญ่เป็นซิลต์ (silt) มีค่าเฉลี่ย 48% มีอนุภาคทราย (sand) โดยเฉลี่ย 27% และเคลย์ (clay) โดยเฉลี่ย 25% (ตารางที่ 2.6) บริเวณที่เป็นทรายได้แก่สถานีที่ 1,6,12 และ 19 มีการสะสมของอินทรีย์คาร์บอนต่ำด้วย (ในช่วง 0.36-0.90%) ส่วนบริเวณที่เป็นโคลนปนทรายได้แก่สถานี 7,13,15,17 และ 23 ทั้งนี้บริเวณชายฝั่งที่ได้รับอิทธิพลของน้ำเสียจากบ้านเรือนหรือกิจกรรมมนุษย์มักพบเป็นโคลนเหลวสีดำมีกลิ่นเหม็น หลายสถานีกลางร่องน้ำระหว่างศรีราชาและเกาะสีชัง เช่น สถานี 2,3,4,5 และ 18 (ซึ่งมีเรือขนถ่ายแป้งมันสำปะหลังมีจุดจอดเป็นจำนวนมาก) และสถานีที่ 7 และ 8 (บริเวณขนถ่ายถ่านหินในทะเล) พบว่าเป็นโคลนเหลวสีดำมีกลิ่นเหม็นเนื่องจากการสะสมของอินทรีย์สารในดินตะกอนสูง คาดว่าเนื่องจากกิจกรรมขนถ่ายสินค้าประเภทแป้งมันในทะเล ซึ่งมักมีฝุ่นแป้งฟุ้งกระจายรอบเรือและมีการตกลงสู่พื้นน้ำ และตกลงสู่พื้นท้องทะเลในที่สุด ทำให้เกิดการหมักหมมของสารอินทรีย์ในบริเวณสถานีดังกล่าว และพบค่า Redox potential (Eh) ของดินมีค่าติดลบมาก (55 ถึง -187 mV) แสดงให้เห็นถึงสภาพตะกอนผิวหน้าที่ไร้ออกซิเจน รายละเอียดคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างตะกอนดินในแต่ละสถานีแสดงในตารางที่ ก.2 (ภาคผนวก ก.) ตารางที่ 2.6 แสดงค่าเฉลี่ยและพิสัยของคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างตะกอนดินในบริเวณศึกษา



ภาพที่ 2.5 การกระจายของ %sand, %silt และ %clay ในบริเวณเกาะสีชัง-อ่าวศรีราชา

ตารางที่ 2.6 ค่าเฉลี่ยและพิสัยของคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างตะกอนดิน

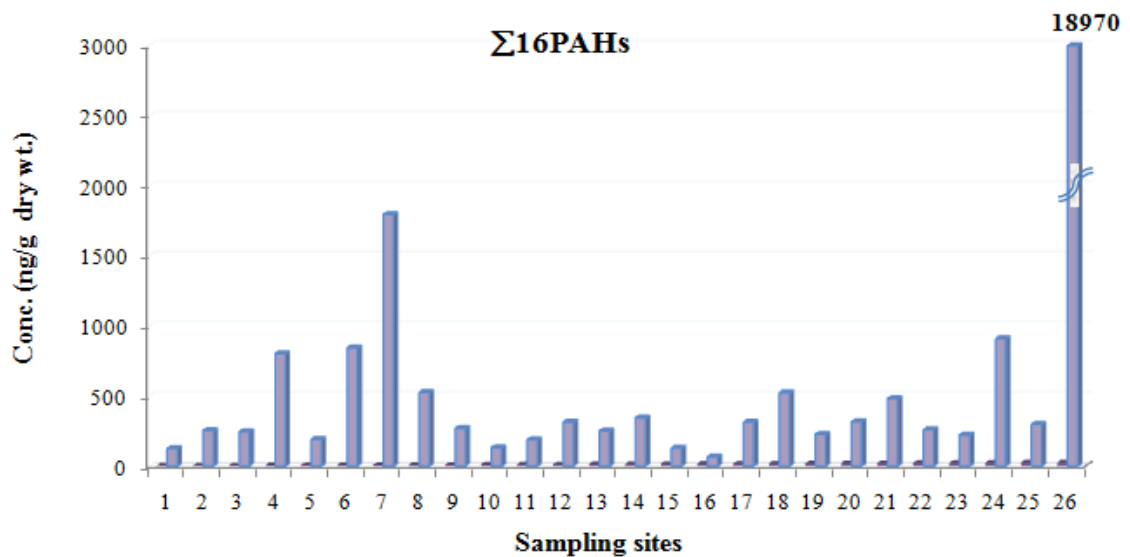
ค่าเฉลี่ยและพิสัย	% sand	% silt	% clay	Texture
Mean $\pm$ s.d.	26.9 $\pm$ 19.7	47.7 $\pm$ 17.1	25.4 $\pm$ 5.7	Silty clay
Range	4.3 – 80.8	1.9 – 65.5	15.5 – 39.2	
ค่าเฉลี่ยและพิสัย	%water	%OC	pH	Eh (mV)
Mean $\pm$ s.d.	48.4 $\pm$ 13.2	1.5 $\pm$ 0.6	7.5 $\pm$ 0.2	-79 $\pm$ 55
Range	21.7– 65.3	0.4–2.5	7.2 – 8.0	55– (-187)

2.4.2 การปนเปื้อนของสาร PAHs ในตัวอย่างตะกอนผิวหน้า

ผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ (LOD) และค่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของการวิเคราะห์ปริมาณสาร PAHs ด้วยเครื่อง GC-FID มีรายละเอียดดังตารางที่ ก.3 (ภาคผนวก ก) ค่า LOD อยู่ในช่วง 6.0-28.0 $\mu\text{g/L}$ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.4 $\pm$ 5.2 $\mu\text{g/L}$ โดยทั่วไปสารที่มีความไวสูง (high sensitivity) จะมีค่า LOD ต่ำ ส่วนสารที่มีความไวต่ำ (low sensitivity) จะมีค่า LOD สูง ค่า LOQ ของการวิเคราะห์ PAHs ในตะกอนดินอยู่ในช่วง 0.08-0.98 ng/g น้ำหนักแห้ง โดยค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.30 $\pm$ 0.24 ng/g น้ำหนักแห้ง สำหรับเปอร์เซ็นต์คืนกลับของสาร 9,10-ไดไฮโดรแอนทราซีน (Internal Standard, IS) ในตัวอย่างตะกอนดินอยู่ในช่วง 79-105% โดยค่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับเฉลี่ยเท่ากับ 85 $\pm$ 8.2% ในการรายงานความเข้มข้นของสาร PAHs ในตัวอย่างตะกอนไม่ได้นำค่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับมาคำนวณด้วย

การวิเคราะห์สาร PAHs ในตัวอย่างตะกอนผิวหน้าจากบริเวณศึกษาจำนวน 26 สถานี พบการปนเปื้อนของสาร PAHs ในทุกตัวอย่าง โดยเฉพาะสาร PAHs ที่อยู่ในรายการสารพิษที่ต้องให้ความสนใจเป็นพิเศษของ US EPA จำนวน 16 ชนิด คือ Naphthalene(Nap), Acenaphthylene(Acy), Acenaphthene(Acn), Fluorene(Flu), Phenanthrene(Phe), Anthracene(Ant), Fluoranthene(Flt), Pyrene(Pyr), Benzo[a]anthracene(BaA), Chrysene(Chr), Benzo[b]fluoranthene(BbF), Benzo[k]fluoranthene(BkF), Benzo[a]pyrene(BaP), Indeno[123,cd]pyrene(InP), Dibenzo[a,h]anthracene(DBA) และ Benzo[ghi]perylene(BgP) โดยพบการกระจายของปริมาณรวมของ PAHs 16 ตัว (ΣPAH_{16}) ดังภาพที่ 2.6 บริเวณที่พบปริมาณ ΣPAH_{16} สูงที่สุดได้แก่สถานีที่ 26 (บริเวณท่าเทววงษ์ หรือท่าล่าง) ของเกาะสีชัง ที่มีเรือข้ามฟากและเรือประมงจอดอยู่หนาแน่น นอกจากนี้ยังมีเรือซ่อมเรืออยู่บนฝั่งด้วย พบปริมาณ ΣPAH_{16} สูงถึง 18,970 ng/g น้ำหนักแห้ง (หรือ 18.97 $\mu\text{g/g}$) และสถานีที่พบ ΣPAH_{16} สูงเป็นอันดับสองคือ สถานีที่ 7 (บริเวณที่มีการขนถ่ายถ่านหินจากเรือบรรทุกสินค้าขนาดใหญ่สู่เรือลากจูงขนาดเล็ก เพื่อลำเลียงสู่แหล่งใช้งาน ตรวจพบการปนเปื้อนของถ่านหินขนาดเล็กปะปนอยู่ในตัวอย่างตะกอนที่เก็บมาด้วย จึงได้ทำการร่อนตะกอนผ่านตะแกรงสแตนเลสก่อนเพื่อแยกถ่านหินออกก่อนนำตะกอนดินมาวิเคราะห์ แต่คาดว่าน่าจะยังมีผงฝุ่นถ่านหินขนาดเล็กปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง) พบ ΣPAH_{16} มีค่า 1794.7 ng/g น้ำหนักแห้ง (หรือ 1.79 $\mu\text{g/g}$) ส่วนบริเวณที่พบ ปริมาณ ΣPAH_{16} ต่ำที่สุดในบริเวณศึกษาคือสถานีที่ 16 โดยมีค่าเท่ากับ 65.2 ng/g ค่าเฉลี่ย

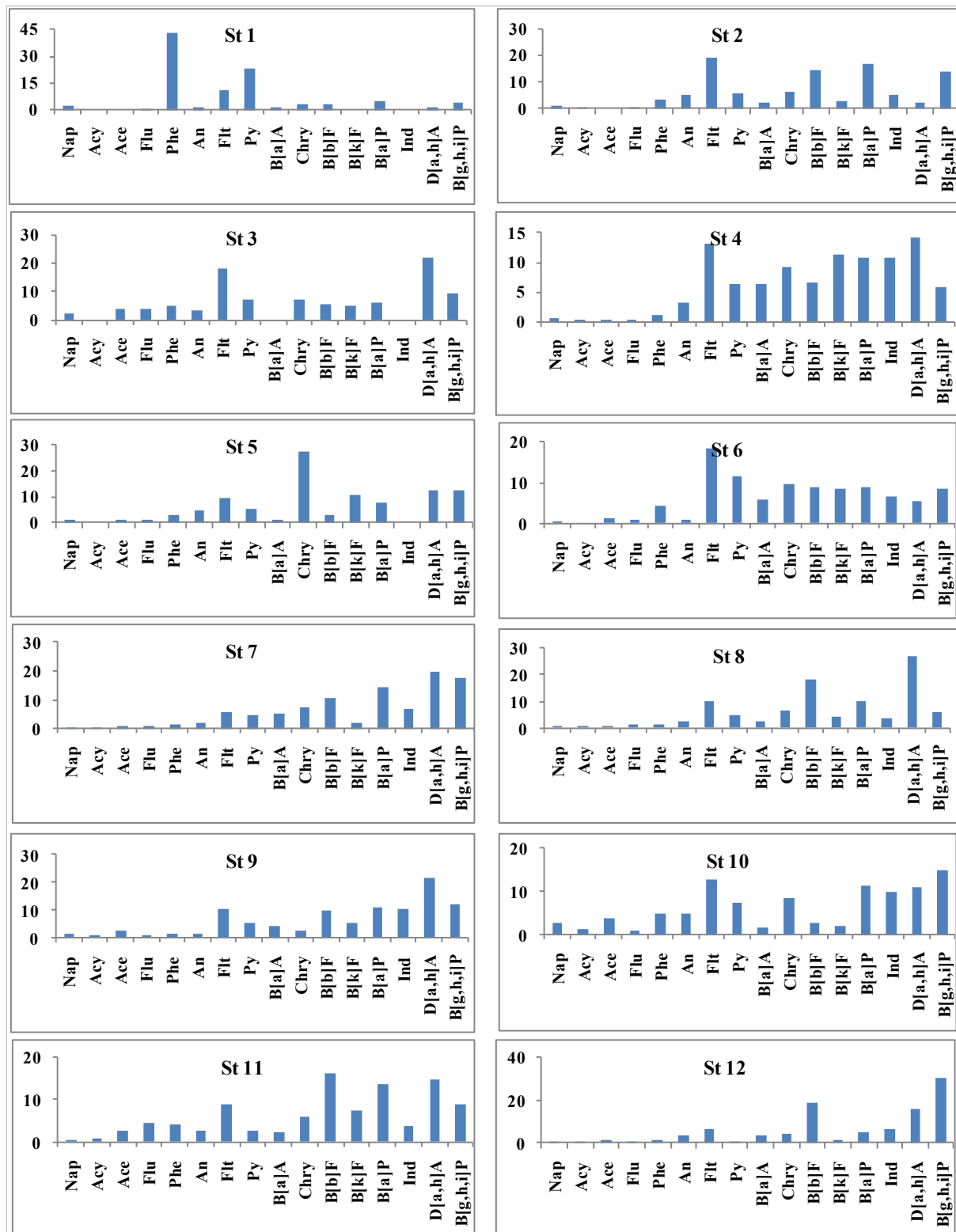
(median concentration) ของปริมาณ PAHs รวมในตะกอนดินบริเวณทะเลชายฝั่งเกาะสีชังและศรีราชา มีค่า 282 ng/g น้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าค่าที่เคยมีการรายงานกันมาสำหรับตะกอนชายฝั่งทะเลของประเทศไทยในอดีต (Wattayakorn, 2012) แต่ยังคงอยู่ในระดับปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ PAHs ที่เคยรายงานในบริเวณทะเลชายฝั่งแหล่งอื่นๆของโลก (ตารางที่ 2.5)



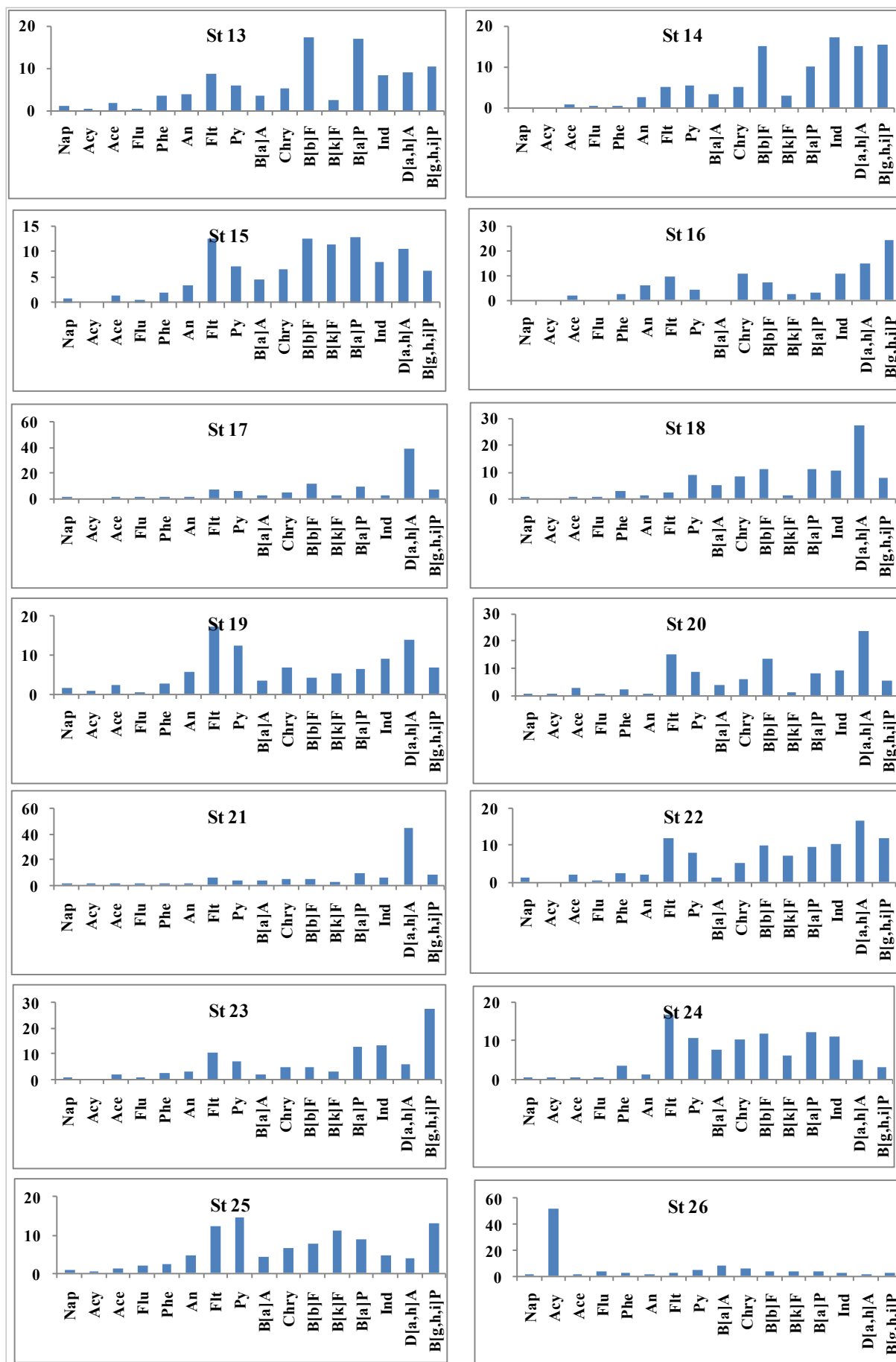
ภาพที่ 2.6 การกระจายของปริมาณสาร PAHs รวมในตัวอย่างตะกอนดินผิวหน้า

การกระจายของสาร PAHs 16 ชนิดในตัวอย่างตะกอนดินผิวหน้าทั้ง 26 สถานีแสดงในภาพที่ 2.7 พบว่าตัวอย่างตะกอนส่วนใหญ่มีองค์ประกอบของสาร PAHs ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ (high molecular weight PAHs (HMWPAH) หรือสาร PAHs ที่โมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 4-6 วง) เป็นหลัก ได้แก่ Fluoranthene (Flt), Pyrene (Pyr), Benzo[a]anthracene (BaA), Chrysene (Chr), Benzo[b]fluoranthene (BbF), Benzo[k]fluoranthene (BkF), Benzo[a]pyrene (BaP), Indeno[123,cd]pyrene (InP), Dibenz[a,h]anthracene (DBA) และ Benzo[ghi]perylene (BgP) โดยพบความเข้มข้นเฉลี่ย (median concentration, ng/g DW) ของสาร PAH แต่ละตัวตามลำดับดังนี้ DBA(45.5) > BbF(33.3) > BgP(30.9) > BaP(28.8) > Flt(28.0) > InP(21.2) > Pyr(19.6) > Chr(16.9) > BkF(13.0) > BaA(9.9) สำหรับ PAHs ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (low molecular weight PAHs (LMWPAH) หรือสาร PAHs ที่โมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 2-3 วง) ได้แก่ Naphthalene (Nap), Acenaphthylene (Acy), Acenaphthene (Acn), Fluorene (Flu), Phenanthrene (Phe) และ Anthracene (Ant) พบในปริมาณต่ำมาก (ภาพที่ 2.8) ยกเว้นสถานีที่ 1 พบ Phe ในปริมาณสูง (54.0 ng/g) และสถานีที่ 26 พบ Acy ในปริมาณสูงมาก (9767.0 ng/g) จึงทำให้ตัวอย่างตะกอนสถานีที่ 1 และ 26 มีสัดส่วนร้อยละของ 2-3rings-PAHs ต่อ 4-6rings-PAHs ($\Sigma\text{PAH}_{2-3\text{Rings}} : \Sigma\text{PAH}_{4-6\text{Rings}}$) สูงกว่าตัวอย่างอื่นในพื้นที่ศึกษา คือ 53% (สถานี 1) และ 60% (สถานี 26) (ดังในภาพที่ 2.9) ตารางที่ 2.7 แสดงปริมาณรวมของ PAHs ทั้งหมด (ΣPAH_{16}) ปริมาณรวมของ PAHs ขนาดเล็ก ($\Sigma\text{PAH}_{2-3\text{Rings}}$) ปริมาณรวมของ PAHs ขนาดใหญ่ ($\Sigma\text{PAH}_{4-6\text{Rings}}$) และร้อยละของสัดส่วน PAHs ขนาดใหญ่ใน PAHs รวม ($\%\Sigma\text{PAH}_{4-6\text{Rings}}$) ซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ย

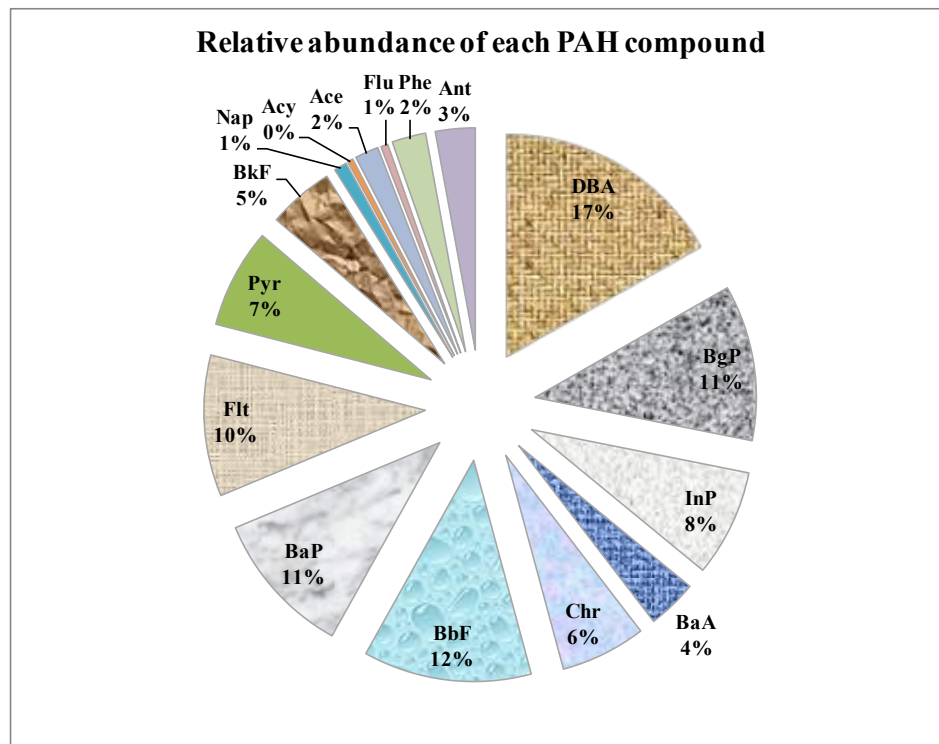
ของ $\% \Sigma \text{PAH}_{4-6\text{Rings}}$ เท่ากับ $87.3 \pm 12.9\%$ โดยค่าต่ำสุดพบที่สถานี 26 และค่าสูงสุดพบที่สถานี 17 โดยมีหลายสถานีที่พบ $\% \Sigma \text{PAH}_{4-6\text{Rings}} \geq 94\%$ ได้แก่ สถานี 4, 7, 8, 14, 17, 18, 21 และ 24



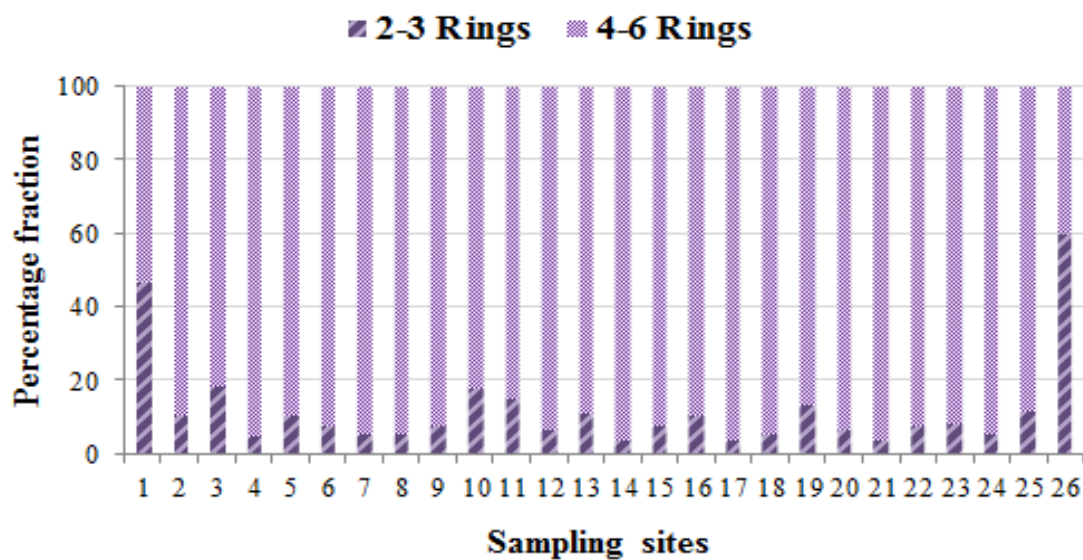
ภาพที่ 2.7 สัดส่วนร้อยละ (%) การกระจายของ PAHs 16 ชนิด ในตัวอย่างตะกอนผิวหน้า 26 สถานี



ภาพที่ 2.7 สัดส่วนร้อยละ (%) การกระจายของ PAHs 16 ชนิด ในตัวอย่างตะกอนผิวหน้า 26 สถานี (ต่อ)



ภาพที่ 2.8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสัดส่วนการกระจายของ PAHs 16 ชนิดในบริเวณศึกษา

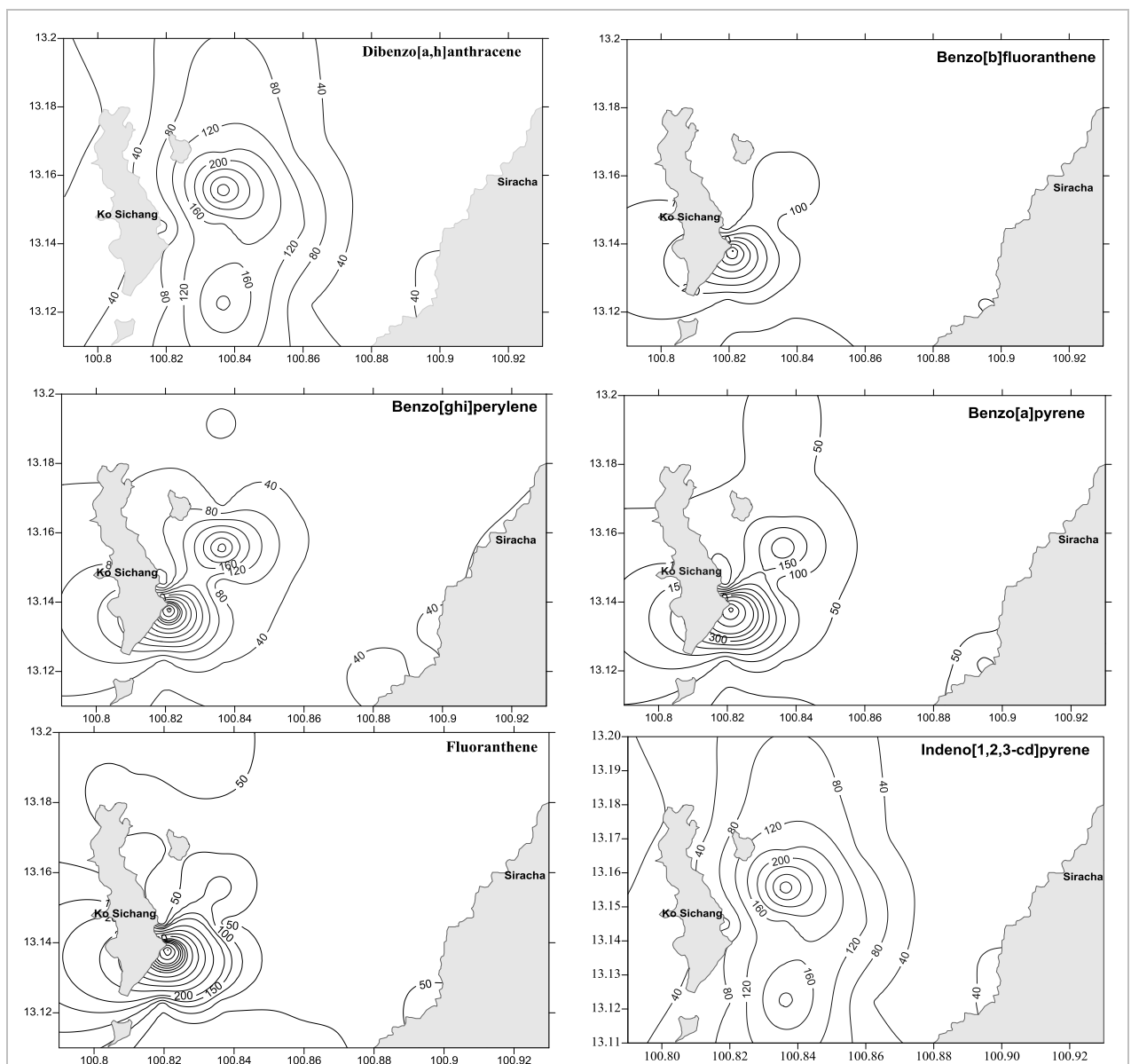


ภาพที่ 2.9 อัตราส่วนร้อยละของ PAHs 2-3 วง และ PAHs 4-6 วงในตัวอย่างตะกอนแต่ละสถานี

ตารางที่ 2.7 ค่าเฉลี่ยและพิสัยของปริมาณรวมของ PAHs สัดส่วนต่างๆ ในตะกอนบริเวณศึกษา

ค่าเฉลี่ยและพิสัย	ΣPAH_{16}	$\Sigma\text{PAH}_{2-3\text{Rings}}$	$\Sigma\text{PAH}_{4-6\text{Rings}}$	$\%\Sigma\text{PAH}_{4-6\text{Rings}}$
Median $\pm$ s.d.	282 $\pm$ 3660	28 $\pm$ 2232	253 $\pm$ 1451	87 $\pm$ 13
Range	65–18970	7–11413	58–7557	40–96

ภาพที่ 2.10 แสดงการกระจายเชิงพื้นที่ของ PAHs ที่พบสูงสุด 6 ลำดับแรกในบริเวณศึกษา แสดงให้เห็นถึงบริเวณที่มีการปนเปื้อน PAHs สูง (hot spot) สองบริเวณคือบริเวณที่มีการขนถ่ายถ่านหินจากเรือใหญ่สู่เรือลากจูงขนาดเล็กเพื่อนำส่งต่อไปยังแหล่งใช้ (บริเวณสถานีที่ 7 และ 8 ใกล้เกาะขามใหญ่) และบริเวณสถานี 26 ซึ่งใกล้เคียงท่าเทียบเรือข้ามฟากระหว่างเกาะสีชังและศรีราชา (ท่าเวียงษ์หรือท่าล่าง) ในแต่ละวันมีเรือวิ่งรับ-ส่งผู้โดยสาร (ชาวบ้านและนักท่องเที่ยว) วันละหลายเที่ยว นอกจากนี้บริเวณนี้ยังเป็นท่าเทียบเรือประมงของเกาะสีชัง และยังมีกิจกรรมเกี่ยวกับการซ่อมเรือ และสถานีเติมน้ำมันเรือในบริเวณใกล้เคียง ซึ่งกิจกรรมต่างๆ ที่กล่าวมาในบริเวณ hot spot ทั้งสองเป็นแหล่งปลดปล่อยมลสาร PAHs ที่สำคัญในบริเวณศึกษาทั้งที่ตั้งใจหรือการเกิดอุบัติเหตุทำให้มีน้ำมันรั่วไหล สำหรับการขนถ่ายถ่านหินมักมีการหกหล่นของเศษถ่านหินและผงฝุ่นถ่านหินฟุ้งกระจายรอบๆ เรือในระหว่างการขนถ่ายทุกครั้งในปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไปแล้วแต่ความระมัดระวังในการปฏิบัติงานหรือสภาพลมฟ้าอากาศในขณะดำเนินการกิจกรรมดังกล่าว



ภาพที่ 2.10 การกระจายเชิงพื้นที่ของ PAHs ที่พบสูงสุด 6 ลำดับแรกในบริเวณศึกษา

2.4.3 แหล่งที่มาของสาร PAHs ในตะกอน

แหล่งที่มาของ PAHs สามารถระบุได้จากอัตราส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง PAHs แต่ละคู่ชนิดหรือที่เรียกว่า “Diagnostic ratios” (Yunker et al., 2002) ตัวอย่างเช่น อัตราส่วน PAHs ที่มีเสถียรภาพน้อยกว่าต่อ PAHs ที่มีเสถียรภาพมากกว่า สำหรับแหล่งที่มาจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์พบว่าอัตราส่วน Phe/An (MW 178) น้อยกว่า 10 ในขณะที่น้ำมันดิบ พบว่ามีอัตราส่วน Phe/An มากกว่า 10 สำหรับอัตราส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง PAHs คู่อื่นในการจำแนกประเภทการเผาไหม้เช่น Flt/Pyr (MW 202) ใช้ในการจำแนกการเผาไหม้ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมออกจากการเผาไหม้อินทรีย์สารประเภทอื่น นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์ระหว่าง PAHs คู่อื่นๆ ที่ใช้เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ของการเผาไหม้และระบุความแตกต่างของแหล่งที่มาของ PAHs (ตารางที่ 2.8) รายละเอียดของ Diagnostic ratios เพื่อระบุแหล่งที่มาของ PAHs ในตะกอนผิวหน้าบริเวณเกาะสีชังและศรีราชาแสดงในตาราง ก.4 มีค่าเฉลี่ยและพิสัยของอัตราส่วนแต่ละคู่ดังแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 ค่าดัชนีที่ใช้พิจารณาแหล่งที่มาของสาร PAHs ในตัวอย่างตะกอนผิวหน้า

(ดัดแปลงจาก: Yunker et al., 2002)

Diagnostic ratios	Petrogenic source	Pyrogenic source	การศึกษานี้	
			Mean ± sd	Range
Ant/(Ant+Phe)	<0.1	>0.1	0.51±0.19	0.03 – 0.82
Phe/Ant	>15	<10	2.27±5.47	0.22 – 28.52
Flt/Pyr	<1.0	>1.0	1.91±1.61	0.28 – 8.86
Flt/(Flt+Pyr)	<0.4	>0.4	0.6±0.15	0.22 – 0.90
BaA/Chr	<0.4	>0.9	0.60±0.31	0.04 – 1.55
BaA/(BaA+Chr)	<0.2(0.2-0.35)	>0.35	0.35±0.12	0.04 – 0.61
InP/(InP+BgP)	<0.2	>0.2	0.43±0.15	0.17 – 0.77

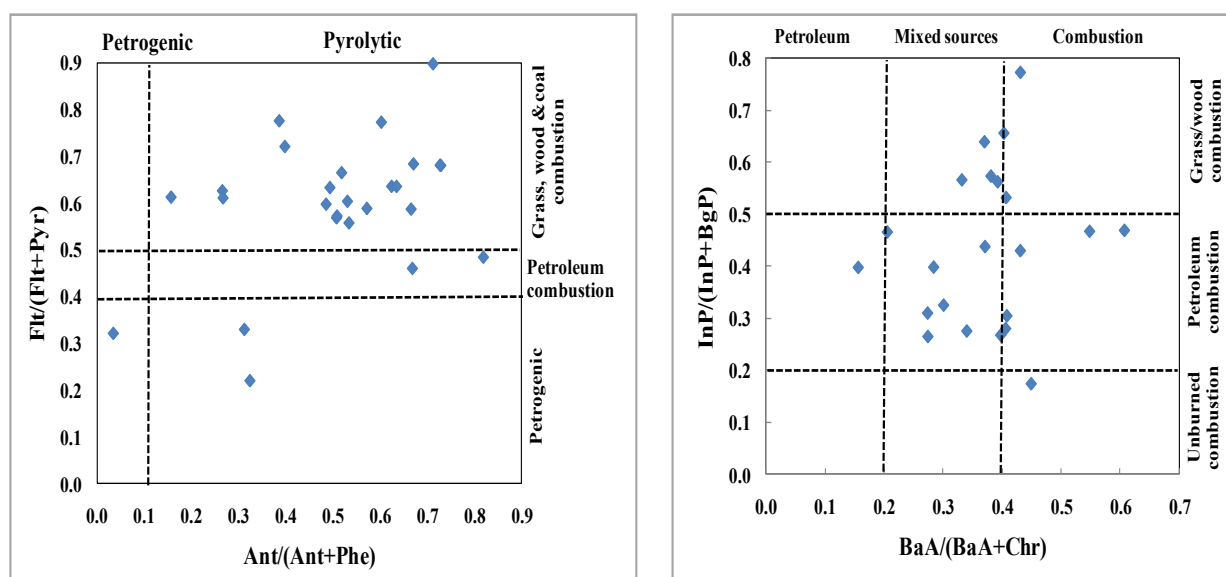
เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของ PAHs (PAHs profile) ของตะกอนดินบริเวณเกาะสีชัง-ศรีราชา พบว่าการสะสม PAHs ในตะกอนดินผิวหน้าบริเวณเกาะสีชัง-ศรีราชา ส่วนใหญ่มีรูปแบบแหล่งที่มาคล้ายคลึงกัน คือมีอิทธิพลจากการเผาไหม้ที่เกิดขึ้นระหว่างการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์เป็นหลัก โดยแสดงให้เห็นด้วยอัตราส่วนของ Ant/Ant+Phe>0.1(ยกเว้นสถานี 1) อัตราส่วนของ Flt/(Flt+Pyr) >0.4 (ยกเว้นสถานี 1, 18, 26) อัตราส่วนของ InP/(InP+BgP)>0.2 (ยกเว้นสถานี 1,3,5,12) อัตราส่วนของ Phe/Ant<10 (ยกเว้นสถานี 1) และอัตราส่วนของ Flt/Pyr >1.0 (ยกเว้นสถานี 1, 18, 25, 26) พบว่ามีหลายสถานีที่พบมีการปนเปื้อนทั้งจากการเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์ของอินทรีย์สารและเชื้อเพลิงฟอสซิล และจากการรั่วไหลของผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม (น้ำมันและถ่านหิน)ปนกัน (นั่นคือมีแหล่งกำเนิดผสมระหว่าง pyrogenic และ petrogenic source)

PAHs ที่มีแหล่งกำเนิดจากการเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์สามารถประเมินต่อเพื่อจำแนกระหว่างแหล่งที่มาจากการเผาไหม้หญ้า/ต้นไม้ และการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิล โดยใช้อัตราส่วนโมเลกุลเพิ่มเติม ดังตารางที่ 2.9 และจากภาพที่ 2.11 (Yunker, et al, 2002) บ่งชี้ว่า PAHs ในตัวอย่างตะกอนส่วนใหญ่มีที่มาจาก การเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์ผสมกันระหว่างการเผาไหม้หญ้าหรือพืชล้มลุกและการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิล

ตารางที่ 2.9 อัตราส่วนในการพิจารณาแหล่งกำเนิด PAHs จากการเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์

	Petroleum combustion	Mixed source	Wood combustion	การศึกษา	แหล่งที่มา
InP/(InP+BgP)	<0.4	0.4-0.5	>0.5	0.43 ± 0.15	Mixed source
Flt/(Flt+Pyr)	<0.4	0.4-0.5	>0.5	0.6 ± 0.15	Wood combustion

*ที่มา: Yunker et al (2002)



ภาพที่ 2.11 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของ $Flt/(Flt+Pyr)$ vs. $Ant/(Ant+Phe)$ และ $InP/(InP+BgP)$ vs. $BaA/(BaA+Chr)$ ในตะกอนบริเวณศึกษา

2.5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการกระจายของสาร PAHs ในตะกอนดินผิวน้ำบริเวณเกาะสี่ช้าง-ศรีราชา จังหวัดชลบุรี พบการปนเปื้อนสาร PAHs ในปริมาณค่อนข้างสูง เฉพาะบริเวณท่าจอดเรือ และบริเวณที่มีการขนถ่าย ถ่านหิน สาเหตุการปนเปื้อนของสาร PAHs เนื่องจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงฟอสซิลของเรือข้ามฟาก เรือประมงชายฝั่ง ตลอดจนเรือบรรทุกสินค้าขนาดใหญ่ที่มีอยู่อย่างหนาแน่นในบริเวณศึกษา ซึ่งถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม รวมทั้งการปล่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของเรือลงสู่ทะเล การรั่วไหลของน้ำมันเรือ

การปล่อยน้ำทิ้งที่มีคราบน้ำมันลงสู่ทะเล การรั่วไหลของคลังน้ำมันเรือ การขนส่งน้ำมัน การล้างถังน้ำมัน การถ่ายน้ำมันหรือน้ำมันเครื่อง การเกิดอุบัติเหตุทางเรือทำให้เกิดการรั่วไหลของน้ำมัน การขนถ่ายน้ำมัน น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมหรือโรงกลั่นน้ำมัน รวมทั้งกิจกรรมด้านอุตสาหกรรมต่างๆ และการเผาไหม้จากการใช้ผลิตภัณฑ์จากเชื้อเพลิงฟอสซิลจากเขตเมืองศรีราชา สามารถพัดพาไปยังพื้นที่อื่นได้โดยอากาศเป็นตัวกลางนำไปสู่แหล่งอื่น หรือมีการชะลงสู่ท่อระบายน้ำข้างถนนและปล่อยออกสู่ทะเลชายฝั่ง การถูกชะจากแหล่งกำเนิดสู่แหล่งน้ำจากอิทธิพลของน้ำท่วม น้ำหลาก การชะหน้าดินจากฝน หรือการพังทลายของดิน อย่างไรก็ตามสมมุติฐานดังกล่าวต้องใช้เทคนิคอื่นเข้ามาอธิบายเพิ่มเติม รวมทั้งรายละเอียดสาเหตุและความเป็นไปได้ของที่มาของสาร PAHs โดยใช้สาร molecular markers ในงานวิจัยขั้นต่อไป นอกจากนี้การตรวจพบสาร PAHs ปนเปื้อนในตะกอนบริเวณที่ศึกษาบางสถานีในปริมาณค่อนข้างสูง(ถึงแม้ว่าความเข้มข้น PAHs ที่พบปนเปื้อนในตะกอนดินที่ตรวจพบอยู่ในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของ PAHs ที่พบในทะเลชายฝั่งทั่วโลก) บ่งชี้ว่าควรมีการตรวจติดตามเฝ้าระวังต่อไปอย่างใกล้ชิด รวมทั้งควรมีการวางมาตรการการจัดการชายฝั่งให้ดีขึ้น ควรมีการตรวจติดตามต่อไปพร้อมกับกระบวนการจัดการชายฝั่งที่มีประสิทธิภาพ เพื่อลดผลกระทบทางด้านลบต่อระบบนิเวศที่มีความอ่อนไหวในบริเวณชายฝั่งศรีราชา-เกาะสีชังและความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์

2.6 บรรณานุกรม

ภาษาไทย

- กฤตยาพร ทัพพะทัต. 2538. ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำและตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเล จ.ระยอง วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- กัลยา วัฒนากร. 2543. การปนเปื้อนของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในเอสทูร์แม่น้ำเจ้าพระยา รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- เกศินี สรรวานิช. 2534. ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำ ดินตะกอน และหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) บริเวณแม่น้ำท่าจีน วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- จรรยา สารินทร์. 2537. การกระจายของอะลิฟาติกและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตะกอนบริเวณอ่าวไทย. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- เชาว์ นกอยู่. 2538. การปนเปื้อนของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในน้ำ ตะกอน และหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) บริเวณแม่น้ำเจ้าพระยาตอนล่าง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พรศรี สุทธารักษ์. 2534. ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสภาวะแวดล้อมทางทะเลบริเวณอุตสาหกรรมแปรรูปเรือเหล็กเก่า มาบตาพุด จังหวัดระยอง วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- วรัญญา วิรุพพผล. 2533. การสะสมของสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในดินตะกอนบริเวณท่าเรือคลองเตยและปากแม่น้ำเจ้าพระยา. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- วราภรณ์ ศรีมูล.2544. การสะสมปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในดินตะกอนบริเวณอ่าวศรีราชา จังหวัดชลบุรี. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

- Baumard, P. 1998. Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in Various Marine Organisms in Relation to those in sediments and to Trophic Level, Marine Pollution Bulletin, 36: 951-960.
- Boehm, P.D. and Saba, T. 2008. Identification and Allocation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Environmental Forensics Notes, 4: 1-4.
- Boonyatumanond, R. 1999. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples by Using High Performance Liquid Chromatography, Master Thesis. Department of Applied Analytical and Inorganic Chemistry, Graduate School, Mahidol University
- Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A. and Takada, H. 2006. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand, Marine Pollution Bulletin, vol.52, 942-956.
- Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Amano, A., Inouchi, Y. and Takada, H. 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. Marine Pollution Bulletin, 54: 554-565.
- Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Pierard, C. and Garriques, P. 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary, Marine Chemistry, 58:85-97.
- Fang, M.D., Hsieh, P.C., Ko, F.C., Baker, J.E. and Lee, C.L. 2007. Source and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of Koaping River and submarine canyon system, Taiwan, Marine Pollution Bulletin, 54: 1179-1189.
- GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution). 1993. Impact of Oil and Related Chemicals and Wastes on the Marine Environment. GESAMP Reports and Studies, No. 50, IMO, London.
- IAEA/IOC/UNEP, 1992. Determination of Petroleum Hydrocarbons in Sediments, Reference Methods for Marine Pollution Studies, No. 20, 75 pp

- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2010. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures, Vol. 92, p.773. [Online]. Available : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/index.php> [2013, March 11].
- Jiang, J.J., Lee, C.L., Fang, M.D. and Liu, J.T., 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal sediments of southwest Taiwan: An appraisal of diagnostic ratios in source recognition. *Marine Pollution Bulletin*, 58: 752-760.
- Kim, G. B., Maruya, K. A., Lee, R. F., Lee, J., KOH, C. and Tanabe, S. 1999. Distribution and Source of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments from Kyeonggi Bay, Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 33: 7-15.
- Kennicutt, II M.C., Wade, T.L., Presley, B.J., Requejo, A.G., Brooks, J.M. and Denoux, G.J. 1999. Sediment contaminants in Casco Bay, Maine: inventories, sources, and potential for biological impact, *Environ. Sci. Technol.*, 28, 1-15.
- Kennish, M.J., 1992. *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effect Marine Science Series*, CRC Press Boca Raton Ann Arbor London.
- Leonardo, R.D., Vizzini, S., Bellanca, A. and Mazzola, A., 2009. Sedimentary record of anthropogenic contaminants (trace metals and PAHs) and organic matter in a Mediterranean coastal area (Gulf of Palermo, Italy), *Journal of Marine Systems*, 78: 136-145.
- Liu, X.M., Xu, X.R., Zhang, X.T., Zhou, C.G. and Li, H. A., 2001. Preliminary study on PAHs in the surface sediment samples from Dalian Bay. *Acta Scientiae Circumstantiae* 21: 507-509.
- Loring, D. H., and Rantala, R.T.T. 1977. Geochemical analysis of marine sediments and suspended particulate matter. *Environmental Canada Technical Report*, 700: 22-25.
- Maldonado, C., Josep, M.B. and Laurent, B., 1999. Sources, Distribution, and Water Column Processes of Aliphatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Northwestern Black Sea Water. *Environmental science & Technology*, 33(16):1693-2702.
- Macias-Zamora, J.V., Mendoza-Vega, E. and Villaescusa-Celaya, J.A., 2002. PAHs composition of surface marine sediments: a comparison to potential local sources in Todos Santos Bay, BC, Mexico. *Chemosphere*, 46: 459-468.
- Mostafa, A.R., Wade, T.L., Sweet, S.T., Al-Alimi, A.A. and Barakat, A.O., 2009. Distribution and characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of Hadhramout coastal area, Gulf of Aden, Yemen, *Journal of Marine Systems*, 78: 1-8.

- Nikolaou, A., Kostopoulou, M., Lofrano, G. and Meric, S. 2009. Determinatio of PAHs in marine sediments: analytical methods and environmental concerns. *Global NEST Journal*, 11(4): 391-405.
- Oanh, N.T.K., Reutergardh, L.B. and Dung, N.T. 1999. Emission of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons of Selected Fuels. *Environmental Science Technology*, 33:2703–2709.
- Page, D.S., Boehm, P.D., Douglas, G.S., Bence, A.E., Burn, W.A. and Mankiewicz, P..J. 1999. Pyrogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments Record Past Human Activity: A case Study in Prince William Sound, Alaska. *Marine Pollution Bulletin*, 4: 247–260.
- PCD (Pollution Control Department), 2006. Proposed marine and coastal sediment quality guidelines, Final Report, UNEP GEF Project “Reversing environmental degradation trends in the South China Sea and Gulf of Thailand”. p.16.
- Ravanbakhsh, S., Abolfasl, F., Farzad, K. and Parvin, B., 2007. The comparison of silica gel-alumina sorbents for separation of PAHs and PCBs, Iran. *J. Chem. Eng.* 26(2): 27-33.
- Saha, M., Togo, A., Mizukawa, K., Murakami, M., Takada, H., Zakaria, M.P., Chiem, N.H., Tuyen, B.C., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Sarkar, S.K., Bhattacharya, B., Mishra, P. and Tana, T.S., 2009. Sources of sedimentary PAHs in tropical Asian waters: Differentiation between pyrogenic and petrogenic sources by alkyl homolog abundance. *Marine Pollution Bulletin* 58: 189–200.
- Shore, R. F., Julian, W., Janice, A. H. and Timothy, H.S., 1999. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Residues in the Eggs of Coastal-Nesting Bird from Britain. *Marine Pollution Bulletin*, 38:509–513.
- Shuttleworth K.L. and Cerniglia, E., 1995. Environmental aspects of PAH biodegradation, *J. Appl. Biochem. Biotechnol*, Vol 54, issue 1-3, 291–302.
- US EPA, 2000. Toxic Release Inventory Public Data Release, Office of Environmental Information, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. [hppt://www.epa.gov/triinter/tridata/index.htm](http://www.epa.gov/triinter/tridata/index.htm).
- Wang, X., Sun, S., Ma, H. and Liu, Y., 2006. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments of Jiaozhou Bay, Qingdao, China, *Marine Pollution Bulletin*, 52: 129–138.
- Wattayakorn, G. and Chaipuriwong, J., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments from the Thachin Estuary, Thailand. *J. Sci. Res. Chula. Univ.*, Vol.31: 76-82, Special Issue II (NRC-EHWM).
- Wattayakorn, G. 2012. Petroleum pollution in the Gulf of Thailand: A historical review. *Coastal Marine Science*, 35(1): 234-245.

- Yamashita, Y., Akiyama, K.-I., Kouno, E., Tsutsumi, S. and Takada, H., 2000. Biomonitoring of organic micropollutants in coastal zones using mussels Characteristics of accumulated pollutants and the application to Tokyo Bay, *Chikyukagaku (Geochemistry)*: 34:1, 41-57.
- Yan, W., Chi, J., Wang, Z., Huang, W. and Zhang, G., 2009. Spatial and temporal distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments from Daya Bay, South China, *Environmental Pollution*, 157: 1823–1830.
- Yang, G.P, 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the South China Sea, *Environmental Pollution*, 108: 163-171.
- Yim, U.H., Hong, S.H., Shim, W.J., Oh, J.R., and Chang, M., 2005. Spatio-temporal distribution and characteristics of PAHs in sediments from Masan Bay, Korea, *Marine Pollution Bulletin*, 50: 319–326.
- Yim, U.H., Hong, S.H. and Shim, W.J., 2007. Distribution and characteristics of PAHs in sediments from the marine environment of Korea, *Chemosphere*, 68: 85–92.
- Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., and Sylvestre, S. 2002. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry* 33, 489–515.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

ตารางที่ ก.1 พิกัดทางภูมิศาสตร์ตำแหน่งจุดเก็บตัวอย่างตะกอนดินในทะเล

สถานี	ละติจูด	ลองจิจูด	ความลึก (ม.)
1	13°11'26.05"N	100°54'53.68"E	6.0
2	13°11'27.59"N	100°52'56.44"E	10.0
3	13°11'24.54"N	100°51'32.75"E	15.4
4	13°11'27.59"N	100°50'10.41"E	18.6
5	13°11'20.03"N	100°48'42.87"E	24.6
6	13°10'1.07"N	100°48'44.40"E	8.0
7	13°9'20.10"N	100°50'10.42"E	30.5
8	13°10'4.26"N	100°50'10.42"E	31.6
9	13°10'4.26"N	100°51'36.32"E	16.8
10	13°10'4.26"N	100°52'56.44"E	10.0
11	13°10'12.50"N	100°54'53.41"E	6.7
12	13° 9'20.7"N	100°55'33.72"E	4.5
13	13° 8'42.00"N	100°54'1.00"E	7.9
14	13° 8'1.50"N	100°53'47.00"E	8.4
15	13° 8'1.50"N	100°52'56.44"E	19.5
16	13° 8'42.00"N	100°52'56.44"E	18.3
17	13° 8'42.00"N	100°51'36.32"E	26.5
18	13° 8'42.00"N	100°50'10.42"E	17.4
19	13° 8'42.00"N	100°49'10.00"E	5.7
20	13° 7'21.00"N	100°49'10.00"E	17.4
21	13° 7'21.00"N	100°50'10.42"E	28.2
22	13° 7'21.00"N	100°51'36.32"E	25.9
23	13° 7'21.00"N	100°52'56.44"E	14.5
24	13° 7'21.00"N	100°53'39.00"E	6.2
25	13°10'28.00"N	100°48'33.91"E	3.0
26	13° 8'16.65"N	100°49'15.09"E	2.5

ตารางที่ ก.2 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างตะกอนดินผิวหน้า

สถานี	ขนาดตะกอน			% น้ำ	%OC	pH	Eh (mV)
	% sand	% silt	% clay				
1	65.0	17.6	17.5	21.7	0.57	7.71	-25
2	7.1	65.5	27.4	56.0	2.10	7.87	-132
3	20.6	55.2	24.2	56.8	1.96	7.61	-118
4	29.3	47.5	23.2	56.4	1.91	7.74	-107
5	24.4	51.1	24.5	59.4	2.10	7.64	-131
6	68.4	11.9	19.7	22.6	0.36	7.85	-65
7	11.2	64.0	24.8	57.9	2.24	7.44	-135
8	16.1	59.5	24.4	57.9	2.02	8.01	-187
9	14.1	63.1	22.8	49.0	1.57	7.51	-57
10	13.7	64.2	22.1	48.1	1.60	7.87	-118
11	22.1	55.9	22.0	47.7	1.31	7.27	-100
12	41.6	42.9	15.5	42.5	0.90	7.28	-64
13	7.9	64.9	27.2	41.5	0.86	7.36	-99
14	11.6	54.5	33.9	60.5	1.58	7.46	-59
15	8.6	63.2	28.3	61.2	1.57	7.55	-80
16	21.2	51.3	27.5	59.8	1.65	7.52	55
17	9.1	62.6	28.3	56.7	1.52	7.53	-20
18	32.9	30.1	37.0	60.9	1.92	7.4	34
19	80.8	1.9	17.4	34.7	0.78	7.43	-76
20	33.9	38.6	27.5	25.8	0.52	7.33	-62
21	32.8	37.0	30.2	44.5	1.00	7.38	-100
22	17.5	54.1	28.4	58.1	1.56	7.3	-35
23	4.3	56.5	39.2	51.8	1.56	7.42	-131
24	32.1	47.8	20.1	65.3	1.75	7.21	-87
25	38.5	35.3	26.2	30.3	2.30	-	-
26	33.9	45.0	21.1	31.0	2.50	-	-

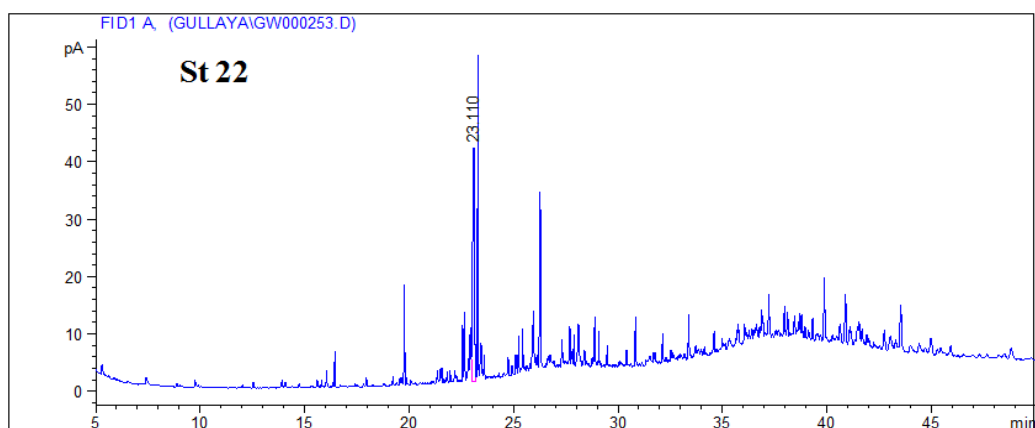
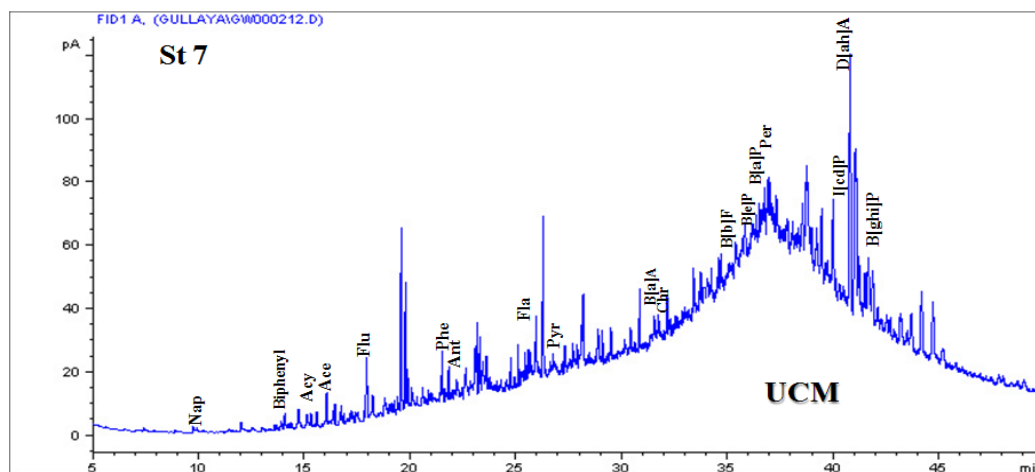
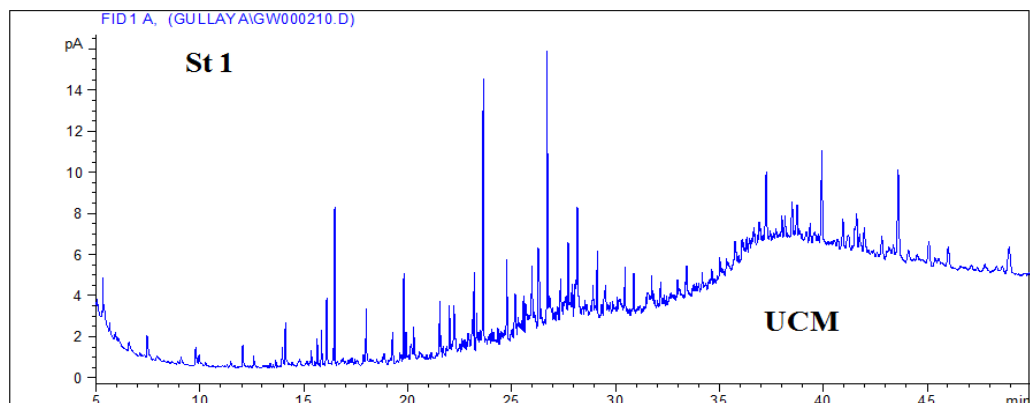
ตารางที่ ก.3 Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ของ PAHs (n=10)

No	Name	Retention Time (min)		LOD (µg/L)	LOQ (ng/g dw)
		Mean	SD		
1	Nap	9.88	0.04	11.0	0.25
2	Acy	15.36	0.01	7.0	0.27
3	Ace	16.06	0.02	16.0	0.24
4	Flu	17.93	0.02	9.0	0.10
5	Phe	21.48	0.02	14.0	0.11
6	Ant	21.65	0.02	10.0	0.08
7	Fla	26.00	0.02	6.0	0.11
8	Pyr	26.80	0.02	13.0	0.31
9	BaA	31.45	0.02	14.0	0.13
10	Chr	31.60	0.03	14.0	0.15
11	BbF	35.34	0.03	9.0	0.11
12	BkF	35.47	0.07	16.0	0.59
13	BaP	36.37	0.03	19.0	0.47
14	IcdP	40.50	0.05	28.0	0.35
15	DahA	40.67	0.05	14.0	0.55
16	BghiP	41.59	0.07	14.0	0.98

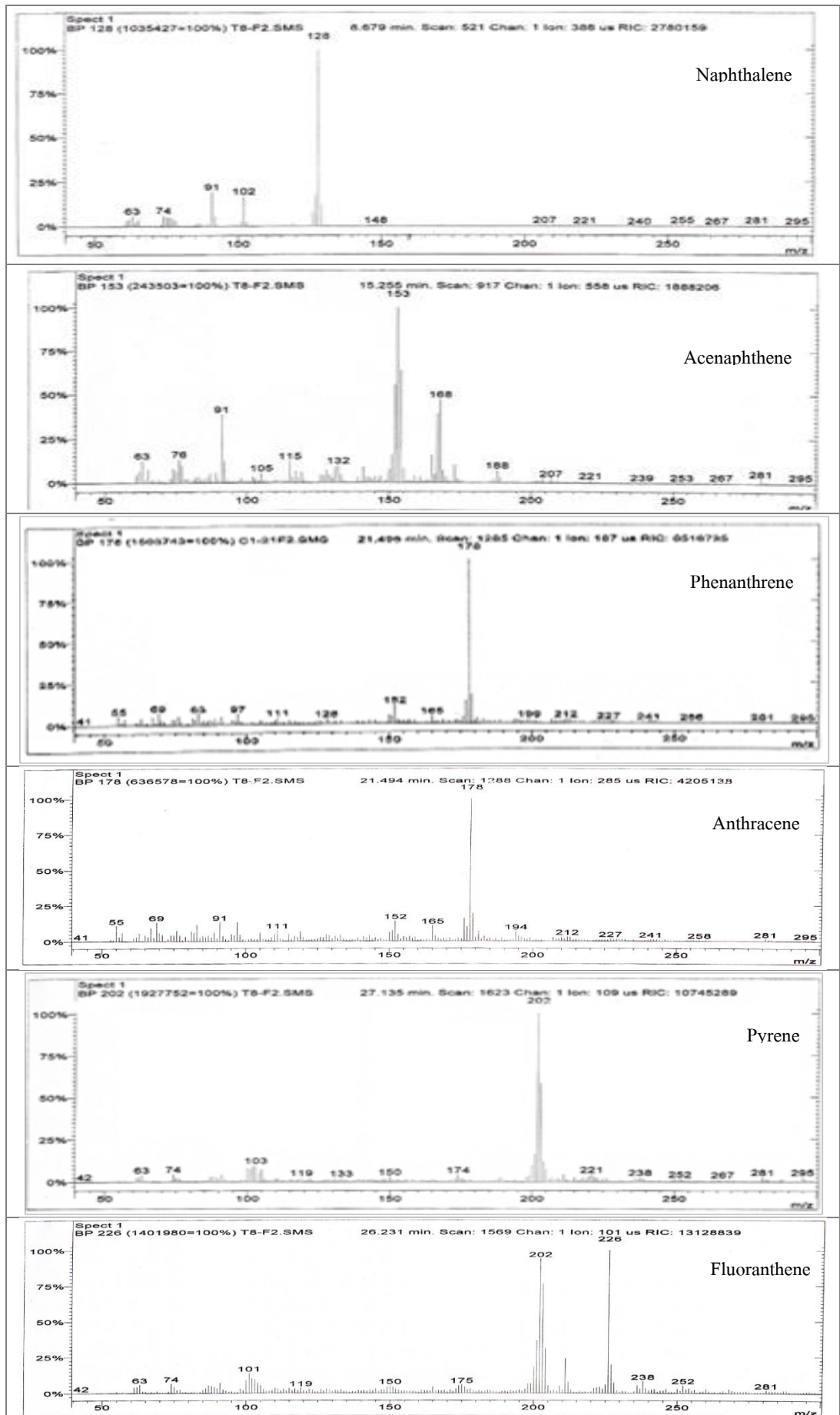
ตารางที่ ก.4 อัตราส่วนความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเมอร์ของ PAHs (Source diagnostic ratios) ในตัวอย่างตะกอน

Station	Ant/(Ant+Phe)	Flt/(Flt+Pyr)	BaA/Chr	BaA/(BaA+Chr)	InP/(InP+BgP)	Phe/Ant	Flt/Pyr
1	0.03	0.32	0.37	0.27	-	28.52	0.47
2	0.60	0.77	0.38	0.27	0.26	0.66	3.42
3	0.40	0.72	-	-	-	1.51	2.59
4	0.73	0.68	0.68	0.40	0.66	0.37	2.13
5	0.63	0.64	0.04	0.04	-	0.60	1.75
6	0.16	0.61	0.59	0.37	0.44	5.38	1.58
7	0.53	0.56	0.69	0.41	0.28	0.87	1.26
8	0.67	0.68	0.40	0.28	0.40	0.49	2.17
9	0.52	0.67	1.55	0.61	0.47	0.93	1.99
10	0.49	0.63	0.19	0.16	0.40	1.02	1.73
11	0.39	0.78	0.38	0.27	0.31	1.59	3.47
12	0.71	0.90	0.82	0.45	0.17	0.40	8.86
13	0.53	0.60	0.69	0.41	0.53	0.88	1.53
14	0.82	0.48	0.65	0.39	0.56	0.22	0.94
15	0.64	0.64	0.69	0.41	0.30	0.57	1.75
16	0.73	0.68	-	0.00	0.30	0.37	2.14
17	0.51	0.57	0.52	0.34	0.27	0.97	1.32
18	0.32	0.22	0.62	0.38	0.57	2.08	0.28
19	0.67	0.59	0.50	0.33	0.57	0.50	1.42
20	0.27	0.63	0.59	0.37	0.64	2.76	1.68
21	0.51	0.57	0.76	0.43	0.43	0.96	1.34
22	0.49	0.60	0.26	0.21	0.47	1.06	1.49
23	0.57	0.59	0.43	0.30	0.32	0.75	1.43
24	0.27	0.61	0.76	0.43	0.77	2.74	1.57
25	0.67	0.46	0.66	0.40	0.27	0.49	0.85
26	0.31	0.33	1.22	0.55	0.47	2.20	0.49

ภาคผนวก ข.



ภาพที่ ข.1 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของ PAHs ที่สกัดจากตัวอย่างตะกอนผิวหน้าสถานีต่างๆ บริเวณชายฝั่งศรีราชา-เกาะสีชัง

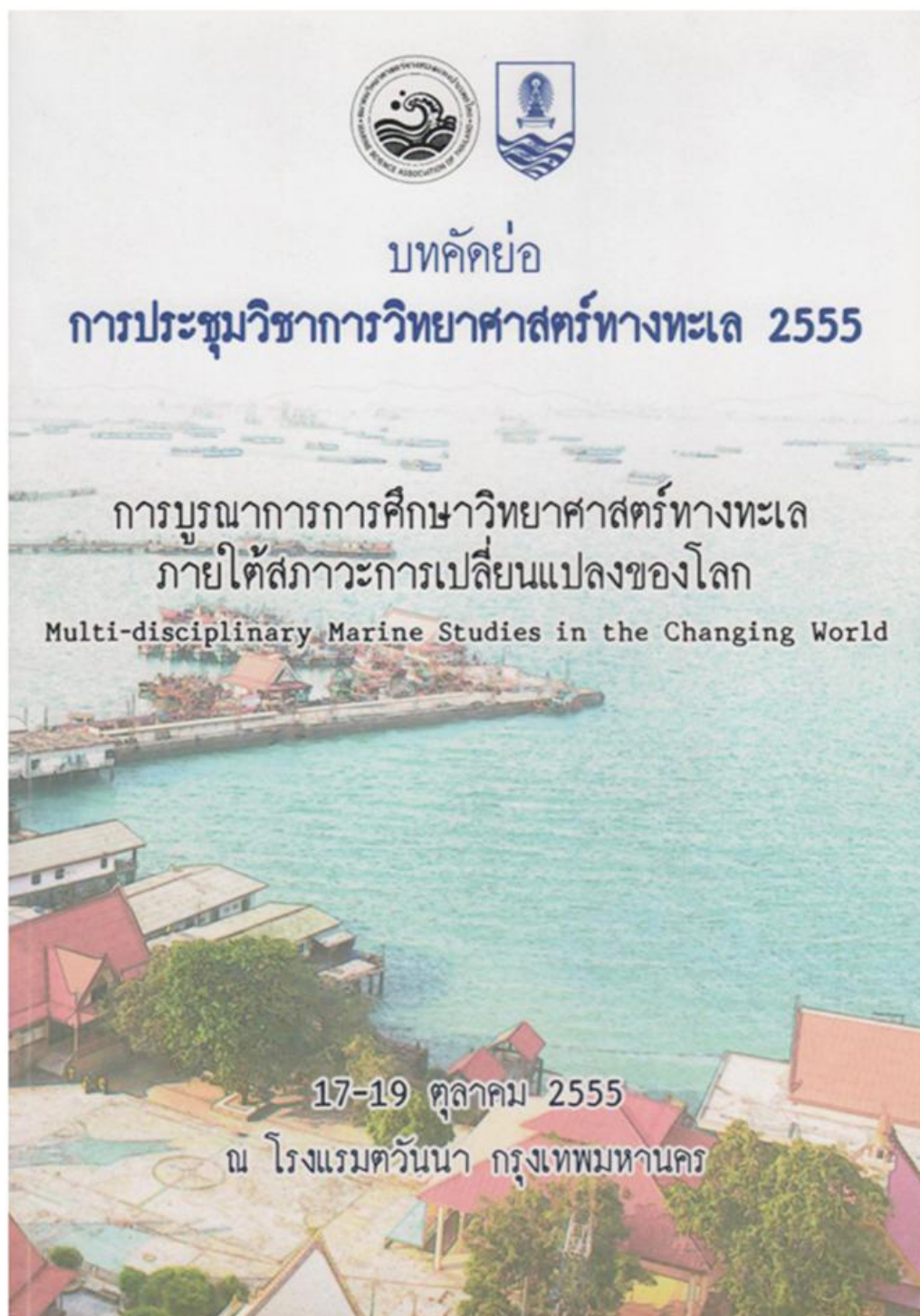


ภาพที่ ข.2 ตัวอย่างแมสเปกตรัมของตัวอย่างตะกอนดินผิวน้ำจากการวิเคราะห์โดยเทคนิค GC-MS

ภาคผนวก ค.

ผลงานทางวิชาการของโครงการที่เผยแพร่แล้ว

1. เรื่อง การศึกษาอัตราพัดถมของตะกอนดินบริเวณพื้นที่จ่อคอเรือทอดสมอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี โดยวิวิธ กัมมันตภาพรังสีของตะกั่ว-210 นำเสนอในรูปแบบ oral presentation ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ทางทะเล 2555: การบูรณาการการศึกษาวิทยาศาสตร์ทางทะเลภายใต้สภาวะการเปลี่ยนแปลงของโลก, 17-19 ตุลาคม 2555, โรงแรมตวันนา กรุงเทพมหานคร



การศึกษาอัตราการทับถมของตะกอนดินบริเวณพื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี
โดยวิธีวัดกัมมันตภาพรังสีของตะกั่ว-210

Study on Sediment Accumulation Rate at Koh Sichang Anchorage Area, Chonburi Province
by Using Pb-210 Method

รัตนศิรินทร์ ทรัพย์เจริญ^{1,*} กัลยา วัฒนยากร¹ และชนินฐา ศรีสุขสวัสดิ์²

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พญาไท ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

² สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) ต.ทรายมูล อ.องครักษ์ จ.นครนายก 26120

* Corresponding Author, E-mail: ratsirins@gmail.com

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาอัตราการทับถมของตะกอนดินโดยวิธีวัดกัมมันตภาพรังสีของตะกั่ว-210 ในแท่งตะกอนดินบริเวณพื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสีชัง โดยเก็บแท่งตะกอนดิน 4 แท่ง (ความยาว 50-80 เซนติเมตร) ในเดือนสิงหาคม 2554 จากด้านเหนือ ด้านตะวันออก ด้านใต้และตรงกลางของพื้นที่จอดเรือ ทุกความถี่ของชั้นตะกอนดินในช่วง 5 เซนติเมตรได้วิเคราะห์หา ^{210}Pb โดยการวัดกัมมันตภาพรังสี ^{210}Po และสารติดตาม ^{209}Po ด้วยเครื่อง Alpha spectrometry ปริมาณ $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$ ที่วัดได้ถูกนำไปคำนวณหาอัตราการทับถมของตะกอนโดยใช้แบบจำลอง Constant Initial Concentration model (CIC model) และ Constant Rate of Supply model (CRS model) ผลจาก CIC model พบอัตราการทับถมของตะกอนมากที่สุดด้านเหนือของพื้นที่จอดเรือด้วยอัตรา $0.403 \text{ g/cm}^2/\text{y}$ ในขณะที่อัตราการทับถมของตะกอนด้านใต้และตะวันออกมีค่าใกล้เคียงกันที่ 0.212 และ $0.243 \text{ g/cm}^2/\text{y}$ ตามลำดับ อัตราการทับถมของตะกอนตรงกลางของพื้นที่จอดเรือไม่สามารถคำนวณได้เนื่องจากค่า $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$ ใกล้เคียงกันทุกระดับความลึกซึ่งอาจเป็นผลมาจากการรบกวนของชั้นตะกอน ส่วนผลของอัตราการทับถมของตะกอนจาก CRS model นั้นมีค่าบางช่วงที่เหลื่อมและซ้อนทับกันระหว่างสามบริเวณจึงไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจน อัตราการทับถมของตะกอนมากที่สุดด้านเหนือของพื้นที่จอดเรือเป็นไปตามที่คาดไว้เนื่องจากแหล่งของตะกอนมาจากแม่น้ำบางปะกงซึ่งอยู่ทางด้านเหนือของพื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสีชัง

คำสำคัญ: อัตราการทับถมของตะกอน, เกาะสีชัง, ตะกั่ว-210

Abstract

Sediment accumulation rates were studied in sediment cores from Koh Sichang anchorage area by using ^{210}Pb method. Total of 4 sediment cores (50-80 cm long) were collected in August 2011 from the north, the east, the south, and the middle of the anchorage area. For every 5 cm interval depth of sediments, ^{210}Pb were analyzed via the measurement of ^{210}Po and the internal tracer ^{209}Po by Alpha spectrometry. Sediment accumulation rates were estimated from excess ^{210}Pb profiles by applying two models: Constant Initial Concentration model (CIC model) and Constant Rate of Supply model (CRS model). Based on the CIC model, sediment accumulation rate was highest at the north of the anchorage area with the value of $0.403 \text{ g/cm}^2/\text{y}$ whereas the east and the south areas has similar sediment accumulation rate with the values of 0.212 and $0.243 \text{ g/cm}^2/\text{y}$, respectively. Sediment accumulation rate at the middle anchorage area cannot be estimated because the $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$ values were nearly constant at all sediment depths. The constant $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$ profile possibly results from the sediment disturbance in the middle anchorage area. Based on the CRS model, the ranges of sediment accumulation rates were overlapped between the three calculated sediment cores, showing no significant difference. The higher sediment accumulation rate in the north of anchorage area could be explained by the major source of sediment from Bangpakong River, which is located in the north of Koh Sichang anchorage area.

Keywords: sediment accumulation rate, Koh Sichang, ^{210}Pb

2. นำเสนอผลงานทางวิชาการ เรื่อง การสะสมพอลิไซคลิกแอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตะกอนดินบริเวณพื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ในการประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 12 และ 2nd International Conference on Environmental Science & Engineering and Management ระหว่างวันที่ 27-29 มีนาคม 2556 ณ โรงแรมพูลแมน ขอนแก่นราชาออร์คิด จังหวัดขอนแก่น



สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย
Est. 1984 Environmental Engineering Association of Thailand

ที่ ศวสท. ว 054/2556

15 กุมภาพันธ์ 2556

เรื่อง คอบรับบทความเพื่อนำเสนอในการประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 12

เรียน จักร บุญเพิ่ม และ กัลยา วัฒนากร

สิ่งที่ส่งมาด้วย ข้อเสนอแนะ

สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย (สวสท.) มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อเป็นการร่วมเฉลิมฉลองโอกาสครบรอบ 50 ปี คณะวิศวกรรมศาสตร์ และครบรอบ 30 ปี ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยมีหน่วยงานร่วมจัด คือ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ ร่วมกับ ศูนย์การจัดการสิ่งแวดล้อมและสารอันตราย มหาวิทยาลัยขอนแก่น กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงอุตสาหกรรม และ กระทรวงพลังงาน จะจัดงานการประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 12 และ 2nd International Conference on Environmental Science & Engineering and Management ขึ้นระหว่างวันที่ 27-29 มีนาคม 2556 ณ โรงแรมพูลแมน ขอนแก่น ราชา ออร์คิด จังหวัดขอนแก่น และท่านได้ส่งบทความเพื่อเข้ารับการพิจารณาให้นำเสนอบทความในการประชุมวิชาการฯ นั้น

สมาคมฯ ขอแจ้งให้ท่านทราบว่าบทความของท่าน เรื่อง “การสะสมพอลิไซคลิกแอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตะกอนดินบริเวณพื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี” ได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาบทความให้นำเสนอในรูปแบบ **oral presentation** โดยขอให้ท่านดำเนินการดังนี้

1. ปรับปรุงแก้ไขบทความย่อแบบยาว (Extended abstract) ในกรณีที่มีข้อเสนอแนะของผู้ประเมิน โดยปรับแก้แล้วต้องไม่เกิน 2 หน้ากระดาษ A4 ภายในวันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2556 เพื่อจัดทำรูปเล่ม proceeding ต่อไป
2. จัดทำบทความฉบับเต็ม (Full paper) ตามรูปแบบที่ได้กำหนดไว้อย่างเคร่งครัด ไม่เกิน 8 หน้ากระดาษ A4 เพื่อจัดทำ CD proceeding โดยสมาคมฯ จะพิจารณาเฉพาะบทความที่เขียนตามรูปแบบที่กำหนด ภายในวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2556
3. จัดส่งแบบลงทะเบียยนสำหรับวิทยากร และทำเนียบวิทยากร ภายในวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2556

ทั้งนี้ จึงขอให้ท่านใช้โปรแกรม Microsoft Word 2003 แล้วส่งกลับทางอีเมล confer@eeat.or.th มายังสมาคมฯ ภายในเวลาที่กำหนด วันและเวลาในการนำเสนอบทความจะแจ้งให้ทราบอีกครั้ง อนึ่ง ผู้ที่มีความประสงค์จะให้คณะกรรมการ peer review บทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมไทย (TEEJ) บทความดังกล่าวเอกสารอ้างอิงจะต้องเขียนเป็นภาษาอังกฤษเท่านั้น

ในการนี้ การเข้าร่วมนำเสนอบทความ ผู้นำเสนอบทความที่ได้รับอนุญาตจากต้นสังกัด สามารถเข้าร่วมการนำเสนอ บทความและเข้าร่วมประชุมฯ ได้โดยไม่ถือเป็นวันลา และมีสิทธิ์เบิกค่าลงทะเบียนและค่าใช้จ่ายอื่นๆ ได้ตามระเบียบฯ ของทางราชการ ทั้งนี้ ในการประชุมฯ ดังกล่าว มีผู้เข้าร่วมการประชุมฯ จากภาคเอกชนและราชการ โดยมีภาคเอกชนเข้าร่วมไม่น้อยกว่าจำนวน 3 ใน 4 ของผู้เข้าร่วมการประชุมฯ ทั้งหมด

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วันเพ็ญ วิโรจนัญญ)

อุปนายกสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย

การสะสมพอลิไซคลิกแอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตะกอนดินบริเวณ พื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

Accumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediment around Koh Sichang Anchorage Area, Chonburi Province

ฉัตร บุญเต็ม¹ และ กัลยา วัฒยากร^{2*}

Chatt Boonperm¹ and Gallaya Wattayakorn^{2*}

¹นิสิตบัณฑิตศึกษา หลักสูตรสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

²รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ : 0-2218-5409, โทรสาร : 0-2255-0780, E-mail : Gallaya.W@chula.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณ รูปแบบองค์ประกอบ การกระจาย และแหล่งกำเนิดของพอลิไซคลิกแอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน(PAHs) ที่ปนเปื้อนในตะกอนดินบริเวณพื้นที่จอดเรือทอดสมอ เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี โดยทำการเก็บตัวอย่างตะกอนดินผิวหน้าจำนวน 24 ตัวอย่างนำมาตรวจวิเคราะห์สาร PAHs ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟ์โดยใช้ตัวตรวจวัดชนิดฟลูออโรอินเซนส์(GC-FID) พบว่าความเข้มข้นรวมของ PAHs 16 ชนิดตามรายชื่อของ US EPA อยู่ในช่วงตั้งแต่ 65.2 นาโนกรัม/กรัม ถึง 1,794.1 นาโนกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง (ความเข้มข้นเฉลี่ยเท่ากับ 403.7 นาโนกรัม/กรัม) ซึ่งเป็นปริมาณค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการปนเปื้อนของ PAHs ในตะกอนดินบริเวณชายฝั่งทะเลของไทยที่เคยรายงานว่ามีปริมาณ PAHs ที่มีจำนวนวงแหวนเบนซีน 4 - 6 วง มีสัดส่วนสูงถึง 90 % ของ PAHs รวม โดยทั่วไปพบ fluoranthene, benzo[b]fluoranthene, benzo[a]pyrene, dibenzo[a,h]anthracene และ benzo[ghi]perylene ในปริมาณสูงกว่า PAHs ตัวอื่นเกือบทุกตัวอย่าง การวิเคราะห์อัตราส่วนองค์ประกอบระหว่าง PAHs ที่ใช้บ่งชี้แหล่งกำเนิด พบว่าตะกอนดินผิวหน้าบริเวณนี้ส่วนใหญ่มีแหล่งที่มาหลักมาจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ โดยมีบางสถานี (สถานี 4 และ 18) ที่พบว่า PAHs มีแหล่งที่มาทั้งจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม และจากการเผาไหม้

คำสำคัญ : พอลิไซคลิกแอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน; ตะกอนดิน; พื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

Abstract

The objectives of this study were to determine the concentration and types, characteristic distribution and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments collected from Koh Sichang anchorage area, Chonburi province, as measured by GC-FID. The results showed that the total concentrations of 16 PAH priority pollutant listed by US EPA varied from 65.2 to 1,794.1 ng/g dry weight (average concentration was 403.7 ng/g), which indicated that the total PAHs concentrations were relatively high compared to other coastal areas of Thailand. The PAHs profiles were dominated by four to six ring compounds which accounted for 90 % of total PAHs. Fluoranthene, benzo[b]fluoranthene, benzo[a]pyrene,

dibenzo[a,h]anthracene and benzo[ghi]perylene represented the highest fractions in most surface sediment samples. Source identification using diagnostic PAH ratios indicated that composition of PAHs in most sediment samples were characterized by pyrogenic PAH compositions. However, surface sediments from some stations (eg, station 14 and 18) exhibited a mixed petrogenic and pyrogenic sources.

Keywords : polycyclic aromatic hydrocarbons; sediment; Koh Sichang anchorage area, Chonburi province

บทนำ

พอลิไซคลิกแอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นสารพิษที่มีความสำคัญทางด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อการกลายพันธุ์ โดยสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) ได้กำหนดให้ PAHs 16 ชนิด เป็นสารพิษอันตรายที่ควรได้รับความสำคัญศึกษาเป็นอันดับต้นๆ (priority PAHs) เนื่องจาก PAHs มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำทั่วไป รวมถึงสัตว์ทะเลเลี้ยงลูกด้วยนม และมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมสำหรับสุขภาพมนุษย์ ในการได้รับสาร PAHs จากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร

PAHs จัดอยู่ในกลุ่มสารเคมีที่พบกระจายทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป นับว่าเป็นสารพิษปนเปื้อนที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อการกลายพันธุ์ ซึ่งมีหลายบทความรายงานการเพิ่มขึ้นของการเกิดมะเร็งในสัตว์ทะเลจากบริเวณที่มีอุบัติเหตุน้ำมันดิบรั่วไหลของน้ำมัน โดยความเป็นห่วงเกี่ยวกับ PAHs ในสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นจากข้อมูลที่ว่า PAHs เป็นสารพิษที่สามารถสะสมได้ดีในไขมัน และมีความคงทนในธรรมชาติ จึงทำให้มีการสะสมในตะกอนดินของสิ่งแวดล้อมทางทะเลและชายฝั่ง การปนเปื้อนของตะกอนดินที่ปนเปื้อน PAHs เป็นที่มาของการสัมผัส PAHs โดยตรงไปสู่สิ่งมีชีวิตบริเวณพื้นท้องน้ำ และการสัมผัสทางอ้อม (เช่น จากสารแขวนลอย) ไปยังสิ่งมีชีวิตบริเวณน้ำชั้นบนของทะเล [1]

ด้วยลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของ PAHs ที่มีความแข็งแรงเป็นอย่างมาก PAHs จึงคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงและการสลายตัวในระหว่างการตกตะกอนสู่พื้นท้องน้ำ ทำให้พบแหล่งที่มาของ PAHs ในปัจจุบันมักเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ที่เกี่ยวข้องกับการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล ซึ่งในอดีตมีการบันทึกว่าการปนเปื้อนในตะกอนดินมาจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิล มีบ้างที่พบว่ามีตัวตั้งต้นที่เป็นสารอันตรายเนื่องมาจากการใช้กิจกรรมของมนุษย์ ซึ่งขนาดและผลกระทบอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของมนุษย์มักจะเพิ่มขึ้นตามกาลเวลา ดังนั้นความเข้มข้นของ PAHs ในตะกอนดินผิวหน้าจะมีค่าสูงกว่าตะกอนดินเก่าที่ถูกทับถมอยู่ในที่ลึก [2]

PAHs เป็นสารพิษที่กระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งตรวจพบทั้งบริเวณผิวน้ำน้ำ ตะกอนดิน ดิน และพืช รวมทั้งในอากาศของพื้นที่ที่ชนบทและในตัวเมือง PAHs ส่วนใหญ่เกิดขึ้นจะเกิดการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ แหล่งที่มาของ PAHs ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากการปล่อยของเสียจากท่อไอเสียเครื่องยนต์ การเผาไหม้ในครัวเรือน และจากของเสียอุตสาหกรรม PAHs เป็นสารพิษหลักที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพการเกิดมะเร็งในอวัยวะหลายชนิด โรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือดหัวใจ อัตราการเกิดที่ลดลง และมีผลต่อการยับยั้งภูมิคุ้มกันโรค [3]

แหล่งที่มาของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ทั้ง PAHs ที่มาจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมที่ยังไม่ได้ผ่านการเผาไหม้ (petrogenic PAHs) และสามารถปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมโดยตรงจากการกระทำของมนุษย์ (อุบัติเหตุน้ำมันดิบรั่วไหลของน้ำมัน) และกระบวนการทางธรรมชาติ (การไหลซึมของน้ำมัน) PAHs ที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการทางธรรมชาติ (diagenetic PAHs) (เช่น perylene) ที่มาจากตัวตั้งต้นที่กำเนิดจากกระบวนการของสิ่งมีชีวิต และ PAHs ที่เกิดขึ้นระหว่างการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ (pyrogenic PAHs) ของชีวมวลในปัจจุบัน เช่น การเผาป่า เผาหญ้า และเชื้อเพลิงฟอสซิล (ปิโตรเลียมและถ่านหิน) [4]

PAHs ที่มาจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม เป็นสารประกอบที่มีระยะเวลาในการเกิดอย่างช้าๆ ใช้เวลานาน อุณหภูมิปานกลาง และเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่นปิโตรเลียมและถ่านหิน ส่วน PAHs ที่เกิดขึ้นระหว่างการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของอินทรีย์สารเป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระหว่างการเผาไหม้ภายใต้อุณหภูมิสูงของเครื่องยนต์ในรถยนต์ เครื่องยนต์เรือขนส่งสินค้าต่างๆ และในระบบการเผาไหม้ของโรงไฟฟ้าที่ใช้ถ่านหินและน้ำมัน เป็นต้น [5] PAHs ที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการทางธรรมชาติ เป็นสารที่เกิดขึ้นเมื่อสารประกอบอินทรีย์ถูกทับถมกันตามธรรมชาติทั้งในดินและตะกอนดิน ที่เรียกว่ากระบวนการ diagenesis โดยเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิต่ำหลังจากที่ปริมาณออกซิเจนลดลง และเชื่อว่ามีจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียเข้ามาเกี่ยวข้องรวมทั้งกระบวนการอื่นที่ไม่มีสิ่งมีชีวิตเข้ามาเกี่ยวข้องที่เกื้อหนุนเนื่องกัน ซึ่งกระบวนการนี้เป็นปฏิกิริยาทั่วไปของการเกิดสารแอโรมาติกในธรรมชาติ [6]

PAHs มีการปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในตะกอนพื้นท้องทะเล บริเวณที่มีปริมาณสูงมักเนื่องมาจากการปนเปื้อนจากกิจกรรมมนุษย์ โดยอิทธิพลโดยตรงของแหล่งที่มาเหล่านี้มีผลต่อการกระจายของสารพิษ เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทะเล การเกิดขึ้นของ PAHs ซึ่งเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ จึงมีแนวโน้มเกาะติดอยู่กับอนุภาคของสารแขวนลอยที่มีการเคลื่อนที่และสะสมในตะกอนดินในที่สุด [7]

สำหรับพื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสิริขันธ์ จังหวัดชลบุรี ที่มีการจอดเรือสินค้าขนาดใหญ่และเรือบรรทุกน้ำมันเป็นระยะเวลายาวนาน มีการขนถ่ายสินค้าเกษตร ปูนซีเมนต์ และถ่านหินแบบเทกองจากเรือใหญ่เพื่อนำต่อไปยังแหล่งใช้ ซึ่งกิจกรรมดังกล่าวมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทางทะเลโดยรอบบริเวณจอดเรือ โดย PAHs ในถ่านหินที่ทิ้งกระจายและน้ำมันที่รั่วไหลจากกิจกรรมต่างๆ ในทะเลจะส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศทางทะเลและสัตว์น้ำ ตลอดจนคุณภาพชีวิตของชุมชนเกาะสิริขันธ์ เนื่องจากเมื่อ PAHs เข้าสู่อวัยวะอาหาร ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลและจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคอันดับสุดท้าย

แหล่งที่มาของ PAHs สามารถระบุได้จากอัตราส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง PAHs แต่ละชนิดหรือที่เรียกว่า "Diagnostic ratios" ตัวอย่างเช่น อัตราส่วน PAHs ที่มีเสถียรภาพน้อยกว่าต่อ PAHs ที่มีเสถียรภาพมากกว่า สำหรับแหล่งที่มาจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์พบว่ามีอัตราส่วน Pb/Am (MW 178) น้อยกว่า 10 ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม พบว่ามีอัตราส่วน Pb/Am มากกว่า 10 สำหรับอัตราส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง PAHs คู่อื่นในการจำแนกประเภทการเผาไหม้ เช่น Fl/Py (MW 202) ใช้ในการจำแนกการเผาไหม้ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมออกจากการเผาไหม้อินทรีย์สารประเภทอื่น นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์ระหว่าง PAHs คู่อื่นๆ เช่น IP/Cby และ BaA/Cbr ที่ใช้เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ของการเผาไหม้และความแตกต่างของแหล่งที่มา PAHs [8]

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างตะกอนดินผิวหน้า บริเวณพื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสิริขันธ์ อำเภอดงศรีราชา จังหวัดชลบุรี ซึ่งอยู่ระหว่างละติจูด $13^{\circ}11'29''N$ ถึง $13^{\circ}17'21''N$ และลองจิจูด $100^{\circ}49'10''E$ ถึง $100^{\circ}53'39''E$ (ครอบคลุมพื้นที่ในทะเลประมาณ 100 ตารางกิโลเมตร) ทั้งหมด 24 สถานี ดังรูปที่ 1 โดยเก็บในภาชนะอะลูมิเนียม และทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



รูปที่ 1 พื้นที่ศึกษาตะกอนดินบริเวณพื้นที่ออกเรือทอดสมอ เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: อะซีไดน AR grade, ไคคลอโรโรมีเทน AR/pesticide grade, เอ็กซีเทน pesticide grade (Fisher และ Merck)

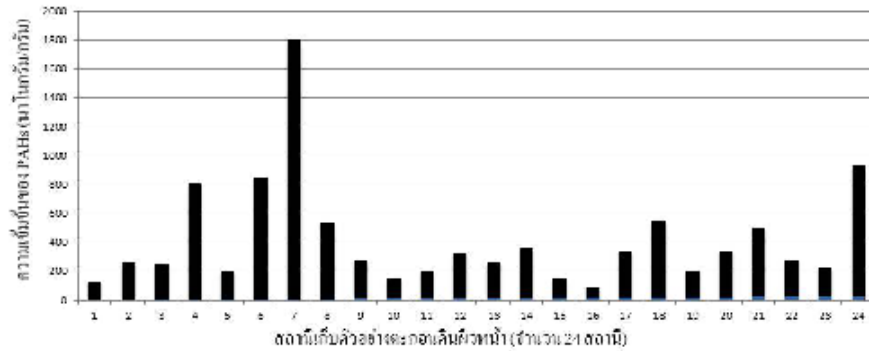
สารมาตรฐาน PAHs ผสม (18 ชนิด) อันประกอบด้วย Naphthalene (Naph), 2-Methylnaphthalene, 1-Methylnaphthalene, Acenaphthene, Acenaphthylene, Fluorene (Fl), Phenanthrene (Phen), Anthracene (Anth), Fluoranthene (Fla), Pyrene (Py), Benz[a]anthracene (BaA), Chrysene (Chry), Benzo[b]fluoranthene (BbF), Benzo[k]fluoranthene (BkF), Benzo[a]pyrene (BaP), Indeno[1,2,3-c,d]pyrene (IP), Dibenzo[a,h]anthracene (DBA) และ Benzo[g,h,i]perylene (BghiP) ซึ่งละลายอยู่ในไคคลอโรโรมีเทน (2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากบริษัท Supelco (4743U LB57094)

วิธีการวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ PAHs ในตัวอย่างตะกอนดินตามวิธีการอ้างอิงสำหรับการศึกษามลพิษในสิ่งแวดล้อมทางทะเลหมายเลข 20 การหาปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนของ IAEA/TOC/UNEP [11] โดยนำตัวอย่างตะกอนดินผิวหน้าที่ทำให้แห้งและผ่านการร่อนแล้วไปสกัดอย่างต่อเนื่องโดย Soxhlet Extractor ด้วยไคคลอโรโรมีเทน 12 ชั่วโมง แล้วทำการแยกส่วนที่เป็น PAHs ออกจากสารละลายที่สกัดได้ด้วยซิลิกาเจล-อะลูมินาคอลัมน์ที่ดัดแปลงมาจาก Ravanbakhsh, S., et al. [12] เพื่อให้เหมาะสมในการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของ PAHs ต่อไปด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี Agilent Hewlett Packard (HP) 6890 โดยใช้ตัวตรวจวัดชนิดฟเลมไอออไนเซชัน (Flame Ionization Detector, FID)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการศึกษา PAHs ในตะกอนดินผิวหน้าจำนวน 24 ตัวอย่าง พบว่ามีความเข้มข้นของ PAHs รวม 16 ชนิด อยู่ในช่วงตั้งแต่ 65.2 นาโนกรัม/กรัม (สถานีที่ 16) ถึง 1,794.1 นาโนกรัม/กรัม (สถานีที่ 7 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการขนถ่ายถ่านหินจากเรือใหญ่สู่เรือลากจูง) ดังรูปที่ 2 โดยสามารถแยกแหล่งที่มาของ PAHs ด้วยอัตราส่วนวิเคราะห์เพื่อระบุแหล่งที่มา (source diagnostic ratios) อันมีพื้นฐานมาจากความสัมพันธ์ทางองค์ประกอบที่แตกต่างกันของการเกิด PAHs และความคงทนของ PAHs แต่ละชนิด โดยอัตราส่วนวิเคราะห์ที่มีประโยชน์อย่างมากในการแยกแหล่งที่มาจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์และแหล่งที่มาจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม



รูปที่ 2 แสดงความเข้มข้นของ PAHs ในตะกอนดินผิวหน้าบริเวณพื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

ความเข้มข้นรวมของ PAHs 16 ชนิดตามรายชื่อของ US EPA อยู่ในช่วงตั้งแต่ 65.2 นาโนกรัม/กรัม ถึง 1,794.1 นาโนกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง (ความเข้มข้นเฉลี่ยเท่ากับ 403.7 นาโนกรัม/กรัม) ซึ่งเป็นปริมาณค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการปนเปื้อนของ PAHs ในตะกอนดินบริเวณชายฝั่งทะเลของไทยที่เคยรายงาน [13] PAHs ที่มีจำนวนวงแหวนเบนซีน 4-6 วงมีสัดส่วนสูงถึง 92 % ของปริมาณ PAHs รวม โดยพบ fluoranthene, benzo[b]fluoranthene, benzo[a]pyrene, dibenzo[a,h]anthracene และ benzo[ghi]perylene ในปริมาณสูงกว่า PAHs ตัวอื่นเกือบทุกตัวอย่าง

สำหรับการระบุแหล่งที่มาของ PAHs สามารถจำแนกได้จากอัตราส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง PAHs แต่ละชนิด หรือที่เรียกว่า "Diagnostic ratios" เพื่อระบุแหล่งที่มา อันมีพื้นฐานมาจากความสัมพันธ์ทางความคงทนของ PAHs แต่ละชนิด โดยอัตราส่วนวิเคราะห์ที่มีประโยชน์อย่างมากในการแยกแหล่งที่มาจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ (Pyrogenic origin) และแหล่งที่มาจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม (Petrogenic origin) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนวิเคราะห์เพื่อระบุแหล่งที่มาของ PAHs จากการเผาไหม้ไม้อ่อนหรือผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม

อัตราส่วนวิเคราะห์เพื่อระบุแหล่งที่มา (source apportionment, source diagnostic ratios) ของ PAHs				
อัตราส่วน	การเผาไหม้ไม้อ่อน	ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม	การศึกษานี้	เอกสารอ้างอิง
Ph/An	< 10	> 10	0.22 – 28.52	Fang et al. (2007)[8], Mostafa et al. (2009)[9]
Fl/Py	> 1.0	< 1.0	0.28 – 8.86	Mostafa et al. (2009)[9]
An/(An+Ph)	> 0.1	< 0.1	0.03 – 0.82	Fan et al. (2010)[10]
Fl/(Fl+Py)	> 0.5	< 0.5	0.32 – 0.90	Fang et al. (2007)[8], Mostafa et al. (2009)[9]
IP/(IP+BghiP)	> 0.5	< 0.2	0.17 – 0.79	Fang et al. (2007)[8], Fan et al. (2010)[10]
BaA/Chr	> 0.35	< 0.2	0.04 – 1.55	Fang et al. (2007)[8]

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของ PAHs รวม (ng/g dry wt.) และอัตราส่วนวิเคราะห์เพื่อระบุแหล่งที่มาของ PAHs ที่ตรวจพบ

สถานีเก็บตัวอย่าง	PAHs รวม (16 ชนิด) (priority PAHs) (ng/g)	อัตราส่วนวิเคราะห์เพื่อระบุแหล่งที่มา (source apportionment, source diagnostic ratios)						แหล่งที่มาหลักของ PAHs
		Ph/An	Fl/Py	An/(An+Ph)	Fl/(Fl+Py)	IP/(IP+BghiP)	BaA/Chr	
1	125.1	28.52	0.47	0.03	0.32	0.00	0.37	Petrogenic
2	253.4	0.66	3.42	0.60	0.77	0.26	0.38	Pyrogenic
3	242.5	1.51	2.59	0.40	0.72	0.00	0.00	Pyrogenic
4	801.1	0.37	2.13	0.73	0.68	0.66	0.68	Pyrogenic
5	189.3	0.60	1.75	0.63	0.64	0.00	0.02	Pyrogenic
6	843.0	5.38	1.58	0.16	0.61	0.44	0.59	Pyrogenic
7	1794.7	0.88	1.28	0.53	0.56	0.28	0.75	Pyrogenic
8	525.5	0.49	2.17	0.67	0.68	0.40	0.40	Pyrogenic
9	266.6	0.93	1.99	0.52	0.67	0.47	1.55	Pyrogenic
10	129.9	1.02	1.73	0.49	0.63	0.40	0.19	Pyrogenic
11	185.9	1.59	3.47	0.39	0.78	0.31	0.38	Pyrogenic
12	312.8	0.40	8.86	0.71	0.90	0.17	0.82	Pyrogenic
13	249.8	0.88	1.53	0.53	0.60	0.45	0.69	Pyrogenic
14	342.2	0.22	0.94	0.82	0.48	0.53	0.65	Pyro + Petro
15	126.9	0.57	1.75	0.64	0.64	0.56	0.69	Pyrogenic
16	65.2	0.37	2.14	0.73	0.68	0.30	0.00	Pyrogenic
17	311.6	1.00	1.22	0.51	0.57	0.27	0.51	Pyrogenic
18	522.7	2.08	0.03	0.32	0.22	0.57	0.62	Pyro + Petro
19	225.6	0.86	1.59	0.56	0.61	0.54	0.50	Pyrogenic
20	315.0	3.53	1.85	0.27	0.63	0.64	0.59	Pyrogenic
21	479.3	0.92	1.35	0.55	0.57	0.43	0.76	Pyrogenic
22	252.4	4.61	0.00	0.18	0.00	0.48	1.49	Pyrogenic
23	220.8	0.75	1.43	0.57	0.59	0.32	0.43	Pyrogenic
24	907.6	4.45	1.57	0.24	0.61	0.77	0.76	Pyrogenic

การสะสม PAHs ในตะกอนดินบริเวณพื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ส่วนใหญ่มีรูปแบบคล้ายคลึงกัน คือ มีอิทธิพลจากการเผาไหม้ ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ โดยแสดงให้เห็นด้วยอัตราส่วนของ phenanthrene(Pb)/anthracene(An) < 10 อัตราส่วนของ fluorene(Fl)/fluorene+pyrene(Py) > 0.5 และอัตราส่วนของ fluorene(Fl)/pyrene(Py) > 1.0 แสดงว่า PAHs มีแหล่งที่มาจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ ยกเว้นในสถานีที่ 1 ที่พบว่าอัตราส่วนของ fluorene(Fl)/fluorene+pyrene(Py) < 0.5 รวมทั้งพบอัตราส่วนของ phenanthrene(Pb)/anthracene(An) > 10 ในสถานีที่ 1 ซึ่งแสดงว่า PAHs มีที่มาจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมเป็นหลัก ส่วนในสถานีที่ 14 และ 18 พบว่า PAHs มีแหล่งที่มาทั้งจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมและการเผาไหม้ ดังตารางที่ 2

สรุป

ผลจากการศึกษา PAHs ในตะกอนดินบริเวณพื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ส่วนใหญ่มีความเข้มข้นของ PAHs รวม (ทั้งหมด 16 ชนิด) อยู่ในช่วงตั้งแต่ 65.2 นาโนกรัม/กรัม (สถานีที่ 16) ถึง 1,794.1 นาโนกรัม/กรัม (สถานีที่ 7) โดยจากผลการวิเคราะห์อัตราส่วนวิเคราะห์เพื่อระบุแหล่งที่มาของ PAHs แสดงให้เห็นว่าแหล่งที่มาของ PAHs ส่วนใหญ่ในตะกอนดินบริเวณพื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี มีอิทธิพลจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงฟอสซิลจากเรือประมง เรือข้ามฟาก ตลอดจนเรือบรรทุกสินค้าขนาดใหญ่ที่มีอยู่อย่างหนาแน่นในบริเวณศึกษา และจากผงฝุ่นถ่านหินในระหว่างการขนถ่ายลงเรือเล็ก มากกว่าจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมที่ยังไม่ได้ผ่านการเผาไหม้ที่ถูกละลายออกสู่สิ่งแวดล้อมโดยตรงจากอุบัติเหตุการหกรั่วไหลของน้ำมัน

ทิศทางการประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนวิจัยและนวัตกรรมจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาองค์ความรู้เพื่อการจัดการปัญหามลภาวะในทะเลและอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณหมู่เกาะสีชัง (ปีที่ 2)” และขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล สำหรับความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการวิเคราะห์ไว้ ณ ที่นี้

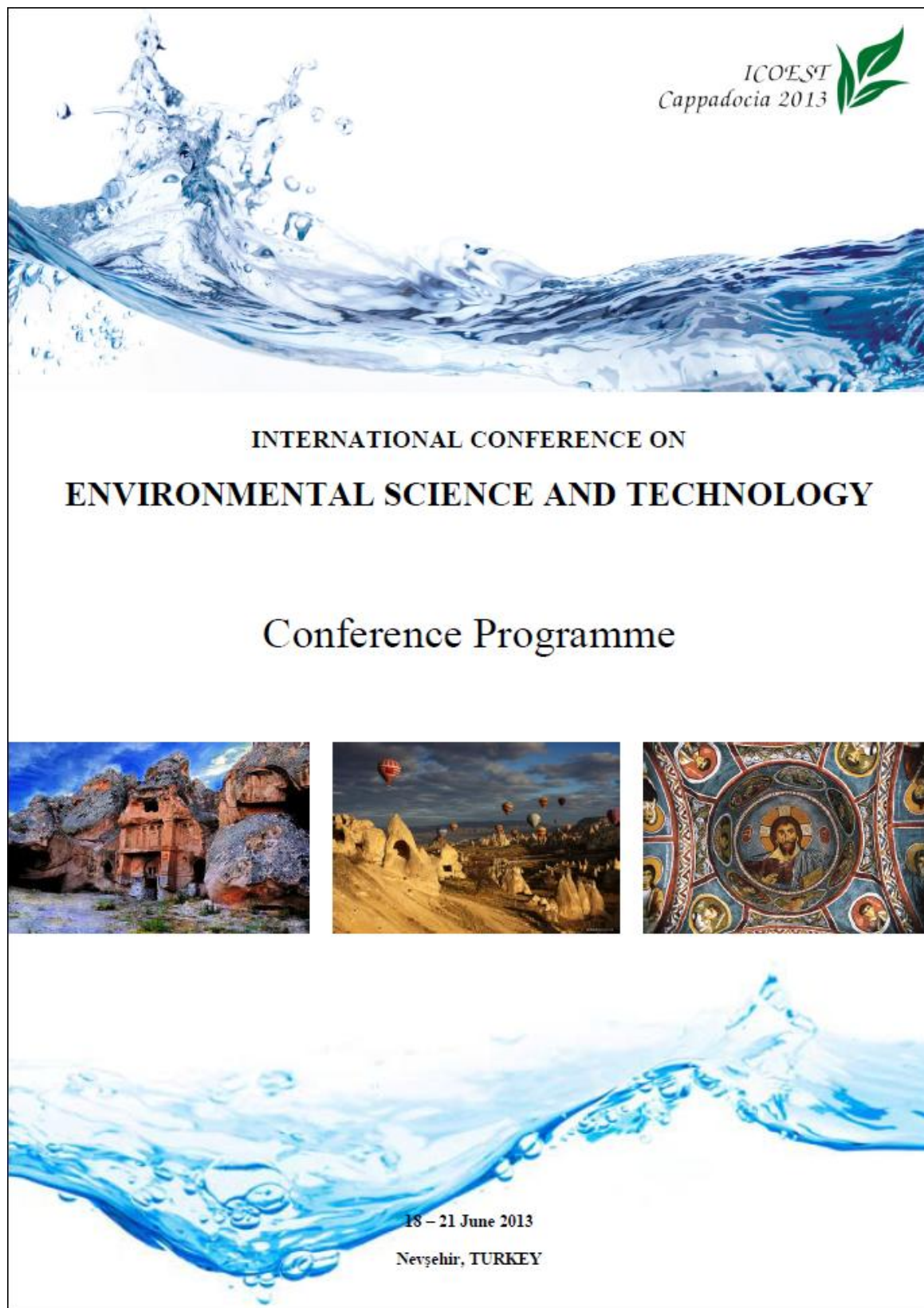
เอกสารอ้างอิง

- [1] Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A. and Takada, H. 2006. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. Marine Pollution Bulletin. 52: 942-256.
- [2] Siliman, J.E., Meyers, P.A., Eadie, B.J. and Klump, J.V. 2001. A hypothesis for the origin of perylene based on its low abundance in sediments of green Bay, Wisconsin. Chemical Geology. 177: 309-322.
- [3] Toyooka, T. and Ibuki, Y. 2007. DNA damage induce by coexposure to PAHs and light. Environmental Toxicology and Pharmacology. 23: 256-263.
- [4] Lima, A.L.C., Farrington, J.W. and Reddy, C.M. 2005. Combustion-Derived Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment-A Review. Environmental Forensics. 6(2): 109-131.
- [5] Boehm, P.D. and Saba, T. 2008. Identification and Allocation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Environmental Forensics Notes. 4: 1-4.
- [6] Boehm, P.D. 2006. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Chapter 15. In Merrison, R.D. and Murphy, B.L. (eds.) Environmental Forensics, Contaminant Specific Guide, pp.313-337. Elsevier Academic Press: publications.
- [7] Nikolaou, A., Kostopoulou, M., Lofrano, G. and Meric, S. 2009. Determination of PAHs in marine sediments: analytical methods and environmental concerns. Global NEST Journal. 11(4): 391-405.



- [8] Fang, M.D., Hsieh, P.C., Ko, F.C., Baker, J.E. and Lee, C.L. 2007. Source and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of Keelung river and submarine canyon system, Taiwan. *Marine Pollution Bulletin*. 54: 1179-1189.
- [9] Mostafa, A.R., Wade, T.W., Sweet, S.T., Al-Alimi, A.K.A. and Barakat, A.O. 2009. Distribution and characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of Hadramout coastal area, Gulf of Aden, Yemen. *Journal of Marine Systems*. 78: 1-8.
- [10] Fan, C.W., Shive, J., Wu, C.Y. and Wu, C.Y. 2010. Perylene dominance in sediments from a subtropical high mountain lake. *Organic Geochemistry*. XXX: XXX-XXX.
- [11] IAEA/IOC/UNEP. 1992. Determination of Petroleum Hydrocarbons in sediments. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 20, 75 pp.
- [12] Ravanbakhsh, S., Abolfathi, F., Farzad, K. and Farvin, B. 2007. The comparison of silica gel-alumina sorbents for separation of PAHs and PCBs, Iran. *J. Chem. Chem. Eng.* 26(2): 27-33.
- [13] Wattayakorn, G. 2012. Petroleum pollution in the Gulf of Thailand: A historical review. *Coastal Marine Science*, 35(1): 234-245.

3. เสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง **Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Marine Environment of Ko Sichang-Siracha, Thailand** ในการประชุม International Conference on Environmental Science and Technology, ICOEST'2013 – CAPPADOCIA Urgup, Turkey, June 18-21, 2013



Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Marine Environment of Ko Sichang-Siracha, Thailand

Gullaya WATTAYAKORN*, Chatt BOONPERM** and Ratsirin SUPCHAROEN*

*Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University,
Pathumwan, Bangkok, 10330, THAILAND

(E-mail: gullaya.w@chula.ac.th)

** Inter-Department of Environmental Science, Graduate School, Chulalongkorn University,
Pathumwan, Bangkok, 10330, THAILAND



Figure 1. The study area

Ko Sichang is a small island located along the eastern coast of the inner Gulf of Thailand, twelve kilometres offshore from the town of Siracha, Chonburi Province. Due to its proximity to shipping lane the marine area between Ko Sichang and Siracha has made a convenient anchorage spot for barges, which transship their cargoes to lighter boats for the trip up the Chaophraya River to the Bangkok Port. Coal transshipment as well as other human activities along Siracha coast are seen as possible point sources of PAHs in the area.

In this study, levels and distribution of EPA's 16 priority pollutant PAHs, a group of widespread environmentally toxic and persistent chemicals, were determined in surface sediments of Ko Sichang and Siracha coastal marine area, using gas chromatography with flame-ionization detection (GC/FID). Recovery of internal spikes added prior to extraction ranged from 80-105%. Concentrations of PAH compounds were not corrected for surrogate recoveries. The ratio of diagnostic PAH congeners was applied to assess potential sources of PAHs in this coastal area.



Figure 2. 16 parental PAHs prioritized by the USEPA

Introduction

Results & Discussion

The total concentrations of 16 PAHs ranged from 65.2 to 18,970 ng/g dry wt (Fig. 3), with a median concentration of 282 ng/g dry wt. The highest concentration was observed at site 26, which is close to a ferry terminal and ship repairing facilities. The second highest concentration was at site 7, which is the coal transshipment area. The level of total PAHs concentrations were at moderate level compared to those observed in other international sites.



Figure 3. Concentration of Σ16PAHs in sediment samples collected from different locations between Ko Sichang and Siracha in February 2011.

Low molecular weight (LMW) PAHs and their alkyl derivatives are mostly of petrogenic origin, while high molecular weight (HMW) PAHs are produced due to pyrolytic activities. Thus the LMW/HMW PAH ratio is normally used to determine the petrogenic source and pyrolytic source. In this study, the relative contribution of LMW PAHs with 2-3 rings was lower, while HMW PAHs with 4-6 rings were dominant (except sites 1 and 26), suggesting that most stations appeared to be contaminated by pyrolytic PAHs.

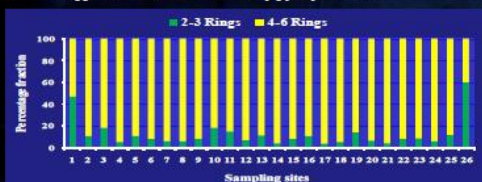


Figure 4. Composition of PAH components in the study area

Ratios of specific PAH compounds (Table 1) were also used to differentiate PAHs from pyrogenic and petrogenic origins. Diagnostic PAH source ratios indicated that pyrolytic sources (i.e. derived from combustion of petroleum and other organic materials) were the primary sources of sedimentary PAHs in the study area.

Table 1. The diagnostic PAH source ratio guidelines* and those obtained for sediments in the study area. *Modified from Yunker et al. (2002)

Diagnostic ratios	Petrogenic source	Pyrolytic source	Mean ± sd	Range
Ant/(Ant+Phe)	<0.1	>0.1	0.51±0.19	0.03 – 0.82
Phe/Ant	>15	<10	2.27±5.47	0.22 – 28.52
Flt/Pyr	<1.0	>1.0	1.91±1.61	0.28 – 8.86
Flt/(Flt+Pyr)	<0.4	>0.4	0.6±0.15	0.22 – 0.90
BaA/Chr	<0.4	>0.9	0.60±0.31	0.04 – 1.55
BaA/(BaA+Chr)	<0.2(0.2-0.35)	>0.35	0.35±0.12	0.04 – 0.61
InP/(InP+BgP)	<0.2	>0.2	0.43±0.15	0.17 – 0.77

Binary cross plots between the ratios of Flt/(Flt+Pyr) vs. Ant/(Ant+Phe) and InP/(InP+BgP) vs. BaA/(BaA+Chr) were applied to further identify the potential sources of PAHs contamination in the study area (Fig. 5). The cross plots indicated that most sediment samples have mixed combustion sources (i.e. originated from grass/wood combustion as well as petroleum combustion).

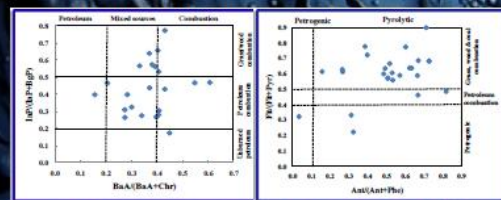


Figure 5. PAH cross plots for the ratios of Flt/(Flt+Pyr) vs. Ant/(Ant+Phe) and InP/(InP+BgP) vs. BaA/(BaA+Chr) in sediments of the study area.

Conclusions

Analysis of 26 surface sediment samples from Ko Sichang-Siracha marine area has provided very useful information for the evaluation of PAH contamination and probable sources. The PAH distribution profiles indicated potential source dependence, as the levels were generally higher in the vicinity of known inputs such as coal transshipment area, ferry terminals and ports. The results of diagnostic ratios showed that pyrogenic sources were the major source of PAHs in Ko Sichang-Siracha surface sediments. These could derived from combustion of petroleum, ship/boat emissions and other combustion processes. The presence of almost all human carcinogenic PAHs in the study area suggesting that future monitoring programs together with an effective coastal management program must be implemented to protect environmental and human health.

Acknowledgements: This work was financially supported by the National Research Council of Thailand, via the project "Knowledge Management for Marine Pollution Abatement and Biodiversity Conservation around Sichang and Siracha, Chonburi Province". The authors wish to thank the research assistants and field personnel of the Institute of Aquatic Resources, Chulalongkorn University for their help in sampling the sediments.

The ICOEST 2013 - Cappadocia

Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Marine Environment of Ko Sichang-Siracha, Thailand

G. Wattayakorn^{*1}, C. Boonperm² and R. Supcharoen¹

¹Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, THAILAND

²Inter-Department of Environmental Science, Graduate School, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, THAILAND

*Corresponding Author E- mail: gullaya@gmail.com

ABSTRACT

The levels and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were investigated in surface sediments of Ko Sichang and Siracha coastal marine area, Thailand using gas chromatography with flame-ionization detection (GC/FID). The total concentrations of 16 PAHs US EPA priority pollutants ranged from 65.2 to 18,970 ng/g dry weight (median concentration was 282.5 ng/g), which indicated that the level of total PAHs concentrations were at moderate level compared to those observed in other regions. PAH compositional signatures among Ko Sichang-Siracha coastal marine sediments are remarkably similar, with a prevalence of high-molecular weight PAHs (>3rings) comprising about 87 per cent of total PAH concentrations. Dibenzo[a,h]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[g,h,i]perylene, benzo[a]pyrene, fluoranthene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, and pyrene represented the highest fractions in most surface sediment samples. Source identification using diagnostic PAH ratios indicated that composition of PAHs in most sediment samples originated mainly from incomplete combustion of organic matter (pyrolytic origin), with a mixture of pyrolytic and petrogenic PAHs were observed in some of the study sites. The presence of almost all human carcinogenic PAHs in the analysed area indicate that these sediments can be considered contaminated sites, suggesting that future monitoring programs together with an effective coastal management program must be implemented to ensure health and safety for all.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); Petrogenic; Pyrolytic; Sichang-Siracha; Source apportionment; Thailand.

1. INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a diverse class of persistent organic chemicals that are widespread in marine, river and lake sediments and tend to be elevated in areas of human settlement. PAHs enter the environment by a variety of pathways. These compounds are present in unburned petroleum (petrogenic PAHs) and can be released directly to the environment both by human activities (oil spill) and natural processes (oil seepage). Diagenetic processes are also suspected to generate certain PAHs (e.g. perylene) from biogenic precursors. In general, biosynthesis is considered a localized source, with little

impact on global concentrations. The most prominent and ubiquitous source of PAHs to the environment is the incomplete combustion of modern (wood) and fossil (petroleum and coal) biomass [1, 2]. High-molecular-weight PAHs from anthropogenic sources can reach toxic concentrations that are detrimental to the environment and human health. Several PAHs are known to be carcinogens and/or mutagens or precursors to carcinogenic daughter compounds [3, 4]. Accordingly, they had been included in the USEPA and the EU priority monitoring pollutants list. PAH compounds persist in the environment and, due to their hydrophobicity, become associated with particulate matter, such as clay, silt and detritus, and preferentially concentrate on sediment or soil particles. Owing to their aromatic structure, PAHs are inherently stable in the environment, particularly under reducing conditions, such as encountered in sediments [5]. Even under favourable conditions, the sorbed PAHs will be released to the water as an extended source to threaten the aquatic ecosystem through bioaccumulation in food chains [6]. Thus, understanding the contributions of the various sources is essential and important for appropriately managing PAHs levels in the environment.

The presence of PAHs in the marine environment has attracted the attention of the scientific community as these compounds are frequently detected in sediments at increasing levels and many of these compounds are potential or proven carcinogens, hence finding the sources of PAH contamination are commonly of environmental concerns. The major sources of PAHs may be either natural or anthropogenic. There are two anthropogenic PAHs sources: pyrolytic hydrocarbons from combustion sources and petrogenic hydrocarbons from petroleum sources. Pyrolytic PAHs, characterized by a predominance of parent compounds with four or more aromatic rings, can be emitted from the incomplete combustion of modern biomass (such as wood) and fossil fuels (petroleum and coal) [1, 2, 7]. Combustion sources of PAHs in the industrialized countries include power plants, refineries, and automobiles (via gasoline and diesel vehicle exhaust [8]. Petrogenic PAHs, compounds with two to three aromatic rings, are produced by the slow maturation of organic matter under geochemical gradient conditions, such as oil spills and the leakage of refined products (e.g., gasoline, diesel fuel and fuel oil vehicle traffics or gas stations) [9,10]. In this respect, the molecular indices based on the ratio of selected PAHs concentrations in sediments can be used to elucidate the possible sources. The ratios between low and high molecular weight PAHs [9] and those of specific compounds, such as Flt/(Flt+Pyr), BaA/(BaA+Chr), Flt/Pyr and BaA/Chr have been proposed as valuable source indicators [10]. In addition, diagnostic ratios of BaA/Chr, BbF/BkF, BaP/BeP and InP/BgP have been applied to identify specific types of combustion, such as vehicle exhaust, coal/coke combustion, forest fires, and smelters [11, 12, 13].

Ko Sichang is a small island located along the eastern coast of the inner Gulf of Thailand, twelve kilometres offshore from the town of Siracha, Chonburi Province (Figure 1). Due to its proximity to shipping lane, the marine area between Ko Sichang and Siracha has made a convenient anchorage spot for dozens of barges which tranship their cargoes to lighter boats for the trip up the Chaophraya River to the Bangkok Port. The transhipment activities of coal in the area has resulted in an increase of fine coal dust and particles which will eventually settle down and act as a likely source of PAHs into the ambient environment. In addition, human activity along Siracha coast has resulted in a number of possible point sources of contamination; including a variety of industry activities, an oil refinery, ports, ferry terminals and fishing piers, being discharged into the receiving environment. Accordingly, data from a previous study [14] demonstrated elevated levels of organic matter and petroleum hydrocarbons in surface sediments of this area; hence it is essential to investigate the pollution sources and their environmental impacts on this coastal marine environment.

The objective of the present work was to quantify and determine the distribution of the 16 US

EPA priority pollutant PAHs in sediments from Ko Sichang and Siracha coastal marine area. In addition, the possible sources of PAH contamination were studied using diagnostic PAH ratios. This study provides valuable information to be referenced by engineers, planners and officials for future management strategies on PAHs in this area.

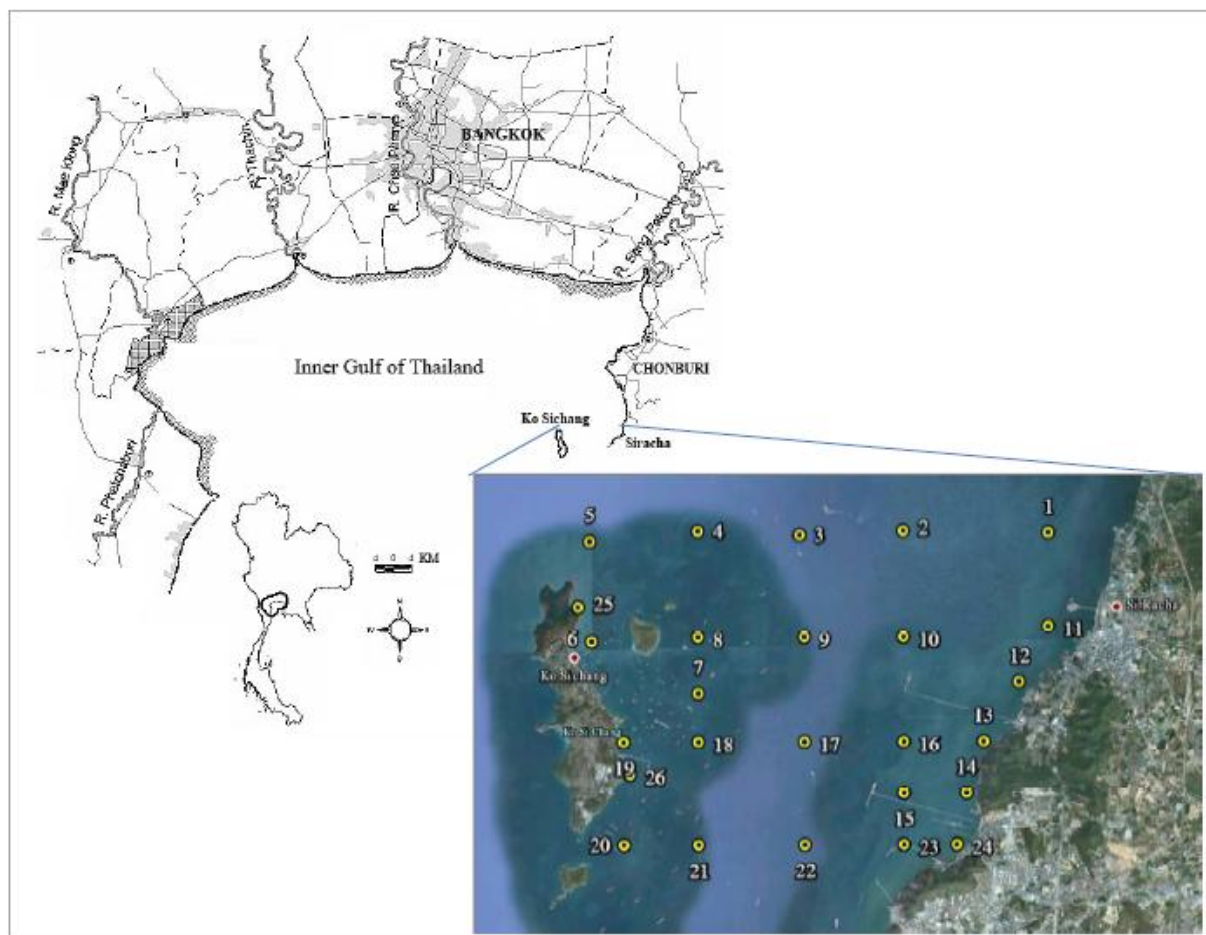


Figure 1. Study area showing sediment sample collection sites (1-26) between Ko Sichang and Siracha marine area.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sample collection and pre-treatment

The sediment samples were collected by a modified Van Veen grab sampler in February 2012; from 26 sites distributed along four transect lines in the marine area of about 100 square kilometres between Ko Sichang and Siracha (Figure 1). The top 0-3 cm of sediment samples were scooped from two replicate grabs and homogenized in a bucket to provide a single composite sample for each site. Homogenized samples were placed in pre-cleaned aluminium boxes and immediately stored in a cooler (4°C) on site, avoiding exposure to light, and then rapidly transported to the laboratory, where they were divided for physico-chemical assessment and for further PAHs evaluation. The considered physico-chemical parameters included the analysis of percentage water content, percentage organic carbon, and sediment characterization. Sediments for PAHs analysis were kept frozen until further processing.

Before extraction sediments were thawed at room temperature and mixed thoroughly, freeze dried and then sieved through the 250 μm screen to remove gravel and detritus.

2.2. Soxhlet extraction and fractionation of the extracts

Samples were analysed using the procedure of IAEA/IOC/UNEP [15], with slight modification. About 50g of the dried sediment sample was carefully transferred into the extraction thimble and placed in the extraction chamber of the Soxhlet extraction unit. An internal standard (9,10 dihydroanthracene) was added, and the sample was Soxhlet extracted with methylenechloride for 12h. The extract was reduced in volume, cleaned up and fractionated on a silica gel-alumina column [16], reduced in volume again with a gentle stream of ultra-pure nitrogen until 0.5mL, and finally the extract was analysed by using capillary gas chromatography.

2.3. Gas chromatographic analysis and quality control

PAHs were analyzed by a Hewlett Packed 6890 gas chromatograph (GC), coupled with flame ionization detector (FID) system equipped with a fused silica capillary column coated with HP-5 5% Phenyl methyl siloxane (30 m length and 0.32 mm ID 0.25 μm film thickness). A 1.0 μL aliquot of the extract was injected while the injector port was held at 250°C and operated in splitless mode. The oven temperature program started at 70°C covered a range from 70°C to 290°C at 6°C/min with 15 min hold. Helium was used as carrier gas with flow rate at 1.0mL/min constant flow and detector temperature was 300°C. Hydrogen and air ratios were optimized and their values were chosen as 30mL·min⁻¹ and 300mL·min⁻¹ respectively.

The following 16 PAHs (with three letter abbreviations) were quantified: naphthalene (Nap), acenaphthylene (Acy), acenaphthene (Acn), fluorene (Flu), phenanthrene (Phe), anthracene (Ant), fluoranthene (Flt), pyrene (Pyr), benzo[a]anthracene (BaA), chrysene (Chr), benzo[b]fluoranthene (BbF), benzo[k]fluoranthene (BkF), benzo[a]pyrene (BaP), indeno[1,2,3-cd]pyrene (InP), dibenzo[a,h]anthracene (DBA), and benzo[g,h,i]perylene (BgP). Total PAHs (ΣPAHs) was the sum of the 16 target PAHs. Compound concentrations below detection limits were assumed to be zero for the summation of ΣPAHs in each sample. The identification of PAHs was based on comparison of the retention times of the peaks with those obtained from standard mixture of PAHs (Supelco Ltd.) and from spiked samples analysed under the same conditions. Quantification was based on external calibrations curves prepared from the standard solution of each of the PAHs. The coefficients of determination (r^2) for the PAH standard calibration plots were Nap (0.994), Acy (0.997), Acn (0.993), Flu (0.994), Phe (0.996), Ant (0.996), Flt (0.992), Pyr (0.998), BaA (0.992), Chr (0.995), BbF (0.991), BkF (0.990), BaP (0.990), InP (0.991), DBA (0.994), and BgP (0.991). All the analysis was carried out in three times. The relative standard deviations ranged from 0.07 to 0.45%.

Analysis of procedural blanks and spiked samples with each set of analysed samples was used to assess quality control measurements. Four deuterated PAH surrogates (d_8 -naphthalene, d_{10} -fluorene, d_{10} -fluoranthene, d_{12} -perylene) were added to the samples and matrix blank prior to extraction. Recoveries of surrogates generally ranged from 80% to 105% of the spike concentration, with the overall mean of recovery $85 \pm 8.2\%$. Concentrations of PAH compounds were not corrected for surrogate recoveries.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Sediments characteristics

The results of sediment characteristics are presented in Table 1. The grain size was utilized to analyse the types of sediments. Sieve analysis and fine grain analysis show the majority of the sediments consisted of a silt mixture. The average mean grain size of surface sediments for most of the studied sites was silty clay. The organic carbon (OC) content ranged from 0.4% to 2.5%, with the average value of $1.5 \pm 0.6\%$. Site 7, 8, 25 and 26 had the highest OC contents, which is expected since these sites are either close to the coal transshipment area (7 and 8) or located near the ferry terminals (25 and 26). Site 1 and 6, had the lowest OC contents due to more sand-sized material (>65%) in the sediments.

Table 1. Mean($\pm$ sd) and range of the measured physico-chemical parameters of sediments of Ko Sichang-Siracha area.

	% sand	% silt	% clay	Texture
Mean $\pm$ s.d.	26.9 $\pm$ 19.7	47.7 $\pm$ 17.1	25.4 $\pm$ 5.7	silty clay
Range	4.3–80.8	1.9–65.5	15.5–39.2	
	%water	%OC	pH	Eh (mV)
Mean $\pm$ s.d.	48.4 $\pm$ 13.2	1.5 $\pm$ 0.6	7.5 $\pm$ 0.2	-79 $\pm$ 55
Range	21.7–65.3	0.4–2.5	7.2–8.0	55– (-187)

3.2. Concentration and distribution of PAHs

The Σ PAHs concentrations in sediment ranged from 65.2 ng/g to 18,970 ng/g, with a median concentration of 282.5 ng/g dry wt. The highest concentration was observed at site 26, which is close to a ferry terminal and ship repairing facilities. The second highest concentration was at site 7, which is the coal transshipment area. The Σ PAHs concentration detected in sediment sample of site 26 is around 290 times higher than the levels detected at site 16 (Figure 2).

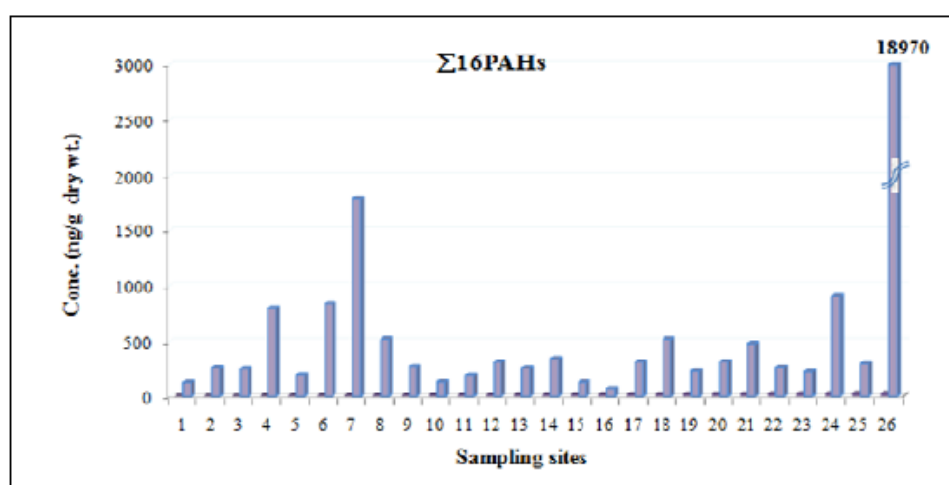


Figure 2. Concentration and comparison of Σ PAH in sediment samples collected from different locations between Ko Sichang and Siracha coastal marine area.

The distribution characteristics of 16 PAHs all through the study area were similar in such a way that the relative contribution of low molecular weight (LMW) components with 2~3 rings was lower (from 4% to 19%), while components with high molecular weight (HMW) with 4~6 rings were dominant (from 81% to 96%), except that of site 1 and 26 (Figure 3). Many of the PAH compounds were present at low concentration range. The individual PAH median concentrations were in the order: DBA(45.5) > BbF(33.3) > BgP(30.9) > BaP(28.8) > Flt(28.0) > InP(21.2) > Pyr(19.6) > Chr(16.9) > BkF(13.0) > BaA(9.9) > Ant(7.8) > Phe(6.7) > Acn(4.7) > Nap(2.5) > Flu(1.4) > Acy(1.1). Four to six ring PAHs are primary bound to particles like soot and engine exhaust and substituted PAHs are of minor significance. LMW compounds originate from petroleum products, burning activities at low to moderate temperature, while HMW PAHs are mainly formed by incomplete combustion processes of organic materials. Therefore pyrolytic and petrogenic sources contribute PAHs to the surface sediments of Ko Sichang-Siracha marine area, however the pyrolytic processes could be the main sources [1, 2].

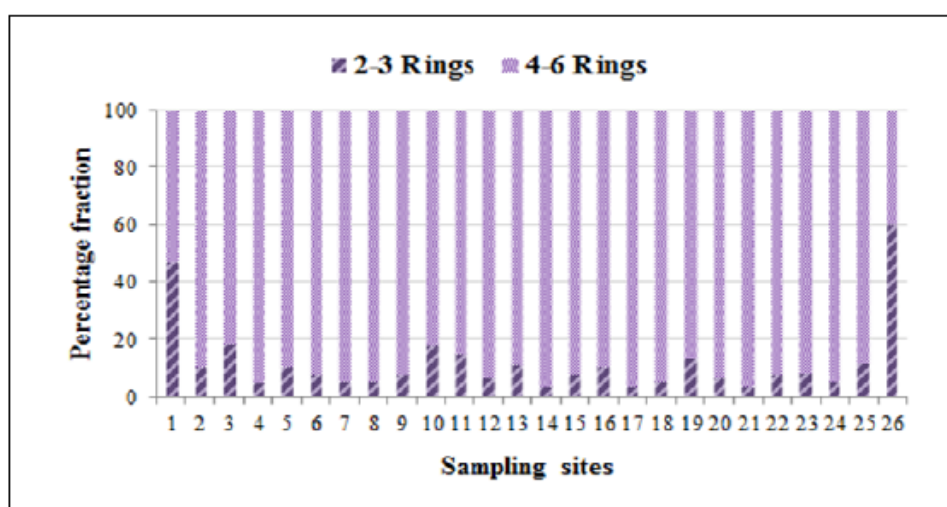


Figure 3. Composition of PAH components in surface sediments from Ko Sichang-Siracha coastal area.

3.3. Diagnostic ratios

The source of PAHs detected in a sample can further be determined by molecular ratios of some PAHs. PAHs of equal mass tend to behave similarly during transport and deposition and the ratios are preserved, hence these ratios are useful indicators of PAH sources, and have been widely used to infer the source of PAHs found in sediments [10-13, 17]. As such, several PAH isomer ratios i.e. Ant/(Ant+Phe), Flt/(Flt+Pyr), BaA/Chr, BaA/(BaA+Chr), InP/(InP+BgP), Phe/Ant and Flt/Pyr were calculated for the sediment samples in order to determine probable PAH sources (Table 2). The Ant/Ant+Phe ratio reveals that ratios <0.1 indicate PAHs source to be of petroleum origin while ratios >0.1 indicate PAHs source to be from pyrolytic activities [17]. When the Flt/Flt+Pyr ratio of sediment is higher than 0.5, combustion of grass, wood, and coal causes an increase of PAHs in the sediment. However, if the Flt/Flt+Pyr ratio is between 0.4 and 0.5, PAHs are mainly from combustion of petroleum; a ratio <0.4 indicates that typical petroleum contamination is usually the cause of PAHs in sediments. BaA/BaA+Chr reveals that ratios <0.2 are of petroleum origin, ratios in the range ≥ 0.2 and ≤ 0.35 as mixed sources and >0.35 as combustion sources. InP/InP+BgP presumes that PAHs ratios <0.2 indicate petroleum sources, ratios in the range ≥ 0.2 and ≤ 0.5 as petroleum combustion sources and >0.5 as grass, wood and coal combustion sources [17-22].

The Phe/Ant lower than 10 or Flt/Pyr ratio higher than 1 are characteristic of a pyrolytic origin whereas Flt/Pyr value lower than 1 or Phe/Ant higher than 15 are typical of a petrogenic origin. Cross plots of some ratios and their cut-off values for the various predicted sources are shown in Figure 4.

Table 2. The diagnostic PAH source ratio guidelines* and those obtained for sediments in the studied sites.

Diagnostic ratios	Petrogenic source	Pyrolytic source	This study	
			Mean $\pm$ sd	Range
Ant/(Ant+Phe)	<0.1	>0.1	0.51 $\pm$ 0.19	0.03 – 0.82
Flt/(Flt+Pyr)	<0.4	>0.4	0.6 $\pm$ 0.15	0.22 – 0.90
BaA/Chr	<0.4	>0.9	0.60 $\pm$ 0.31	0.04 – 1.55
BaA/(BaA+Chr)	<0.2(0.2-0.35)	>0.35	0.35 $\pm$ 0.12	0.04 – 0.61
InP/(InP+BgP)	<0.2	>0.2	0.43 $\pm$ 0.15	0.17 – 0.77
Phe/Ant	>15	<10	2.27 $\pm$ 5.47	0.22 – 28.52
Flt/Pyr	<1.0	>1.0	1.91 $\pm$ 1.61	0.28 – 8.86

*Modified from Yunker *et al.* [12, 23]

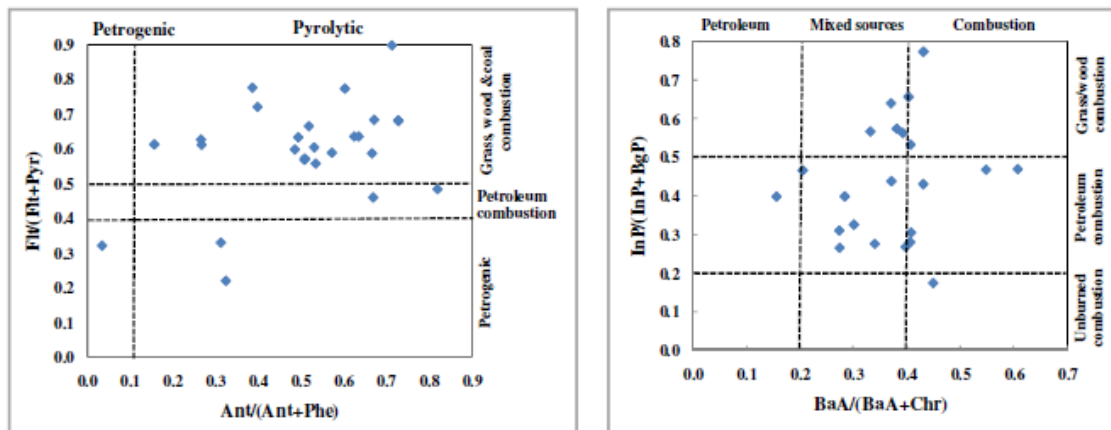


Figure 4. PAH cross plots for the ratios of Flt/(Flt+Pyr) vs. Ant/(Ant+Phe) and InP/(InP+BgP) vs. BaA/(BaA+Chr) in sediments of Ko Sichang-Siracha marine area.

At most of the sites investigated in this study, the Ant/(Ant+Phe) ratios were generally >0.1, ratios of Flt/(Flt+Pyr) were >0.4, ratios of InP/(InP+BgP) >0.2, ratios of Phe/Ant >10, ratios of Flt/Pyr >1.0. These indicate that pyrolytic sources were the primary sources of sedimentary PAHs in the study area. However, the BaA/Chr and BaA/(BaA+Chr) ratios indicated the mixed petrogenic and pyrolytic sources of the sedimentary PAHs. Figure 4 shows the cross plots for the ratios of Flt/(Flt+Pyr) vs. Ant/(Ant+Phe) and InP/(InP+BgP) vs. BaA/(BaA+Chr) in sediments, which indicated that most sediment samples have mixed combustion sources. Several of the Ko Sichang-Siracha sediment samples have InP/(InP+BgP) ratios indicate that the main sources of PAHs were combustion of petroleum, while several sediment samples have InP/(InP+BgP) ratios indicated that of grass or wood combustion source.

4. CONCLUSION

This study provides important data set on PAH levels in surface sediments of Ko Sichang-Siracha marine area. The PAH concentration levels of 16 PAH priority pollutants ranged from 65.2 to 18,970 ng/g dry weight with a median concentration was 282.5 ng/g. The overall levels of PAHs were moderate compared to coastal areas in other regions. The PAH distribution profile indicated potential source dependence, as the levels were generally higher in the vicinity of known inputs such as coal transshipment area, ferry terminals and ports. PAH diagnostic ratios indicated that PAHs in surface sediments mainly from pyrolytic sources (i.e. derived from combustion of petroleum and other organic materials) and very similar to PAH signatures of many coastal marine sediments elsewhere. The pyrolytic part of the pattern could arise from atmospheric transported coal derived particles from coal transshipment area, ship/boat emissions and other combustion processes. At most of the sites investigated in this study, the sedimentary PAH concentrations were dominated by BbF, BaP, DBA, BgP and InP, which are IARC probable and possible human carcinogens [3]. Hence, high contaminated sediment samples in the study area are expected to have a high toxic potential. A detailed assessment of ecological and human health risks associated with these compounds should be carried out as a matter of priority.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the National Research Council of Thailand, via the project "Knowledge Management for Marine Pollution Abatement and Biodiversity Conservation around Sichang and Siracha, Chonburi Province (2nd Year)". The authors wish to thank the research assistants and field personnel of the Institute of Aquatic Resources, Chulalongkorn University and those of Kasetsart University for their help in sampling the sediments.

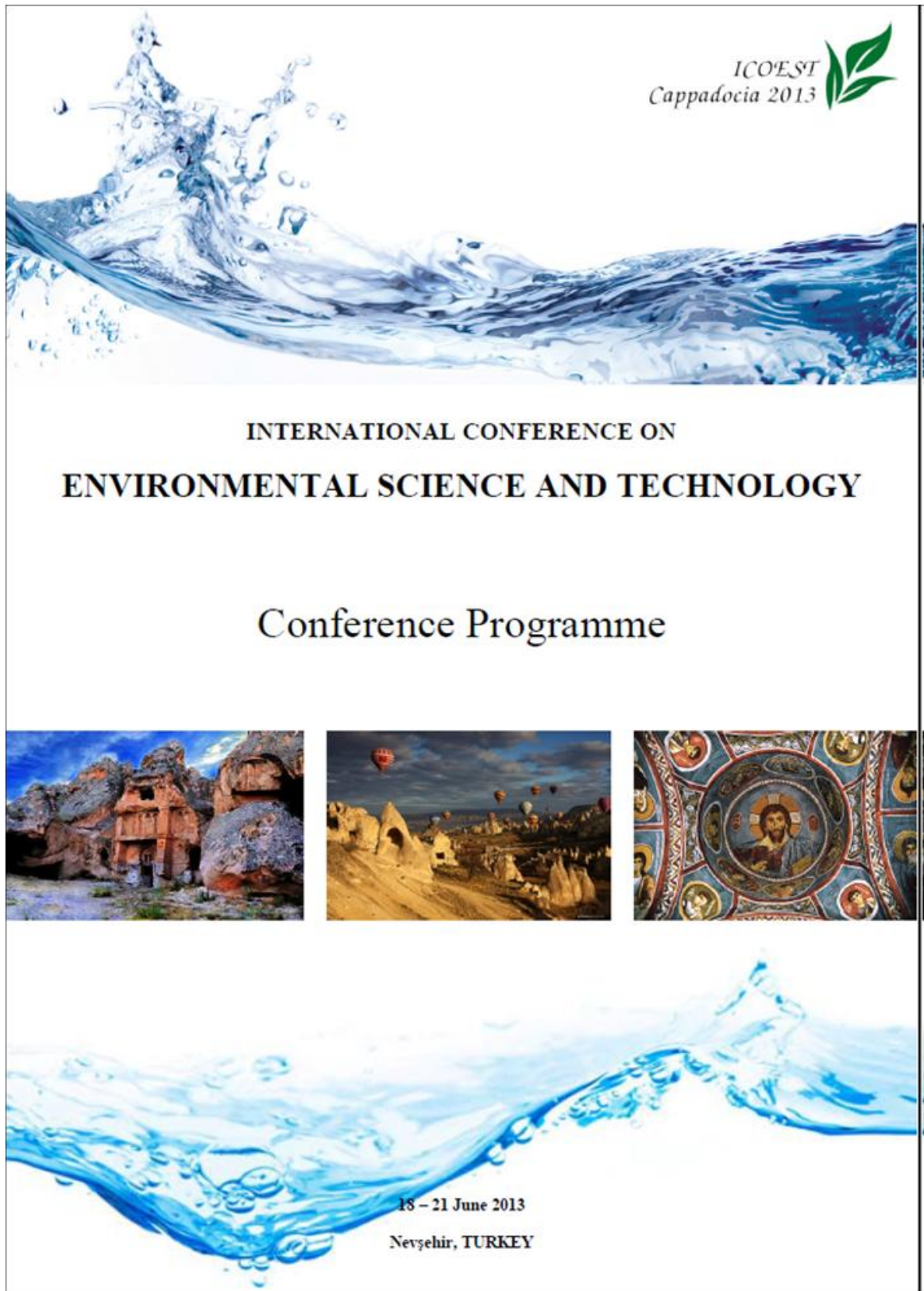
REFERENCES

- [1] R.M. Burgess, M.J. Ahrens, C.W. Hickey, 2003. Geochemistry of PAHs in Aquatic Environments: Source, Persistence and Distribution. In: Douben, P. (ed.). PAHs: An ecotoxicological perspective, pp. 35-45. Wiley, Chichester.
- [2] J.M. Neff, 1979. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Applied Science Publishers, Ltd., Essex.
- [3] IARC (International Agency for Research on Cancer), 2010. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. Vol. 92, p.773. [Online]. Available : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/index.php> [2013, March 11].
- [4] R. Schoeny, and K. Poirier, 1993. Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Office of Health and Environmental Assessment, Washington, DC, EPA/600/R-93/089 (NTIS PB94116571).
- [5] F. Volkerling, A.M. Breure, 2003. Biodegradation and General Aspects of Bioavailability. In: Douben, P. (ed.). PAHs: An Ecotoxicological Perspective, 81-96. Wiley, Chichester.

- [6] C. Zhang and G. Zheng, 2003. Characterization and desorption kinetics of PAHs from contaminated sediment in Houston Ship Channel. *Environmental Institute of Houston 2003 Annual Report*, 39–41.
- [7] C. Venkataraman, and S.K. Friedlander, 1994. Size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons and elemental carbon. 2. Ambient measurements and effects of atmospheric processes. *Environmental Science and Technology*, 28, 563–572.
- [8] H.H. Yang, L.T. Hsieh, H.C. Liu and H.H. Mi, 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbon emissions from motorcycles. *Atmospheric Environment*, 39, 17–25.
- [9] M.P. Zakaria, H. Takada, S. Tsutsumi, K. Ohno, J. Yamada, E. Kouno and H. Kumata, 2002. Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in rivers and estuaries in Malaysia: a widespread input of petrogenic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* 36, 1907–1918.
- [10] S.A. Stout, A.D. Uhler and S.D. Emsbo-Mattingly, 2004. Comparative evaluation of background anthropogenic hydrocarbons in surficial sediments from nine urban waterways. *Environmental Science and Technology* 38, 2987–2994.
- [11] L. Xiang, Y.X. Li, Z.F. Yang and N.H. Shi, 2010. Influence of traffic conditions on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon abundance in street dust, *Journal of Environmental Science and Health Part A* 45(3), 339–347.
- [12] M.B. Yunker, R.W. Macdonald, R. Vingarzan and R. H. Mitchell, 2002. PAHs in the Fraser River Basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition, *Organic Geochemistry* 33(4), 489–515.
- [13] H.H. Soclo, P. Garrigues and M. Ewald, 2000. Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine Pollution Bulletin* 40, 387–396.
- [14] G. Wattayakorn and S. Rungsupa, 2012. Petroleum hydrocarbon residues in the marine environment of Koh Sichang-Sriracha, Thailand, *Coastal Marine Science*, 35(1):122–128.
- [15] IAEA/IOC/UNEP, 1992. Determination of Petroleum Hydrocarbons in sediments. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 20, 75 pp.
- [16] S. Ravanbakhsh, F. Abolfasl, K. Farzad and B. Parvin, 2007. The comparison of silica gel-alumina sorbents for separation of PAHs and PCBs, *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* 26(2): 27–33.
- [17] H. Budzinski, I. Jones, J. Bellocq, C. Pie'rard and P. Garrigues, 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde Estuary. *Marine Chemistry* 58, 85–97.
- [18] A.A. Olajire, R. Altenburger, E. Kuster and W. Brack, 2005. Chemical and Ecotoxicological Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Sediments of the Niger Delta, Southern Nigeria. *Science Total Environment* 340(1–3), 123–136.
- [19] M.D. Fang, P.C. Hsieh, F.C. Ko, J.E. Baker and C.L. Lee, 2007. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of Kaoping River and submarine canyon system, Taiwan. *Marine Pollution Bulletin* 54, 1179–1189.
- [20] E. Morillo, A.S. Romero, L. Madrid, J. Villaverde and C. Maqueda, 2008. Characterization and Sources of PAHs and Potentially Toxic Metals in Urban Environments of Sevilla (Southern Spain). *Water Air Soil Pollution* 187(1–4), 41–51.
- [21] J.J. Jiang, C.L. Lee, M.D. Fang and J.T. Liu, 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal sediments of southwest Taiwan: An appraisal of diagnostic ratios in source recognition. *Marine Pollution Bulletin* 58, 752–760.
- [22] A.K. Inengite, N.C. Oforka and L.C. Osuji, 2010. Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediment of Kolo Creek in the Niger Delta. *International Journal of Applied Environmental Science* 5(1), 127–143.

- [23] M. B. Yunker, A. Perreault and C.J. Lowe, 2012. Source apportionment of elevated PAH concentrations in sediments near deep marine outfalls in Esquimalt and Victoria, BC, Canada: Is coal from an 1891 shipwreck the source? *Organic Geochemistry* 46, 12-37.

4. นำเสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง **Sediment Accumulation Rates and Total Carbon Content in Coastal Area of Ko Sichang-Siracha, Thailand** ในการประชุม International Conference on Environmental Science and Technology, ICOEST'2013 – CAPPADOCIA Urgup, Turkey, June 18-21, 2013





Sediment Accumulation Rates and Total Carbon Content in Coastal Area of Ko Sichang-Siracha, Thailand

Ratsirin SUPCHAROEN*, Gullaya WATTAYAKORN* and Kanidtha SRISUKSAWAD**

*Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, THAILAND
(E-mail: ratsirins@gmail.com)

** Thailand Institute of Nuclear Technology, 9/9 Mu 7, Sai Mun, Ongkharak, Nakhon Nayok 26120, THAILAND



Abstract

Ko Sichang-Siracha area at the Gulf of Thailand has been recognized as a polluted coastal area since it is one of the important shipping transportation industries. In this study, we selected two coring sites in Ko Sichang-Siracha area to determine the recent sediment accumulation rates by using ^{210}Pb method, and the historical record of total carbon content in this region. ^{210}Pb profiles were analyzed via the measurement of ^{210}Po and the internal tracer ^{209}Po by Alpha spectrometry. Sediment accumulation rates were estimated from excess ^{210}Pb profiles by applying constant initial concentration (c.i.c) model. Sediment accumulation rates were found to be 0.21 and 0.18 $\text{g}/\text{cm}^2/\text{yr}$ for the Ko Sichang (core 7) and Siracha (core 10) station, respectively. The percentage total carbon content of the two sediment cores slightly differs. Total carbon content of core 7 is uniform with depth, with an average carbon value of 3.39 ± 0.07 percent; whereas that of core 10 is uniform from the surface to 40 cm depth, with an average carbon value of 2.98 ± 0.18 percent. The greater percentage of total carbon of core 7 reflects the more intense shipping activities around Ko Sichang than Siracha area.

Introduction

Ko Sichang-Siracha area at the northeastern corner of the Gulf of Thailand has been recognized as a polluted coastal area since it is one of the important shipping transportation industries. We studied sediment accumulation rate by ^{210}Pb method and history of total carbon content from two sediment cores. In addition, spatial distribution of total carbon content was investigated to see human activity impact in this area.

Sediment accumulation rate by ^{210}Pb method is one of the classical dating methods. Principle of ^{210}Pb dating method is based on the pathway of ^{210}Pb (Fig. 2), where ^{210}Pb separates into supported and unsupported ^{210}Pb .

Total carbon content includes inorganic (e.g. CaCO_3 in shell) and organic (e.g. carbon from organic matter) parts. Coal fragments from the shipping activity in this area are considered to be one of the components in the total carbon content component here.

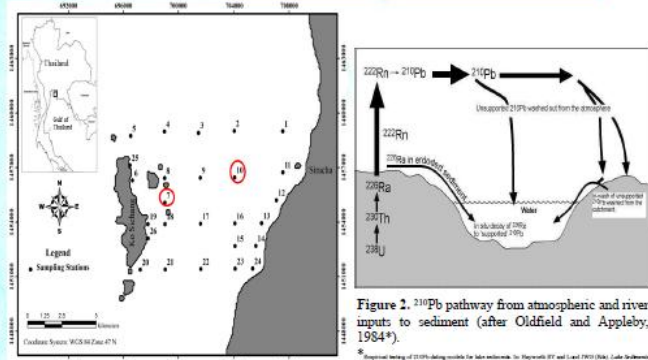


Figure 1. Sampling stations at Ko Sichang-Siracha area. Two sediment core stations are highlighted in red circles. Numbers indicate 26 sampling stations of surface sediment.

Materials and methodology

Sediment accumulation rate by ^{210}Pb

Sediment core 7 and core 10 were collected from the Ko Sichang-Siracha area in August, 2011 by using gravity corer. Core 7 (74cm long) and core 10 (90cm long) were sub-sectioned into 1cm interval and analyzed for ^{210}Pb for every 5 cm interval depth for the top 20 cm and every 10 cm interval depth for the 20–50 cm of sediment cores. The selected 1cm sediment layers were oven dried in the oven at 60°C to obtain water content for the porosity calculation. Dry sediments were ground using the ball mill grinder and sieved through $125\ \mu\text{m}$ size. ^{210}Pb analysis was performed indirectly via the measurement of ^{210}Po the internal tracer ^{209}Po by alpha spectrometry. Sediment accumulation rates were estimated from excess ^{210}Pb profiles by applying c.i.c. model (Eq.1), which assumes that constant initial concentration equals to constant sedimentation rate.

$$C_{ex}(z) = C_{ex}(z=0) \cdot e^{-(\lambda + s)z} \quad \text{Eq.1}$$

The concentrations of excess ^{210}Pb ($C_{ex}(z)$) are constant initially and decay exponentially with depth z . λ = decay constant of ^{210}Pb (yr^{-1}) and s = sediment accumulation rate ($\text{g}/\text{cm}^2/\text{yr}$)

Total carbon content

Sediment core samples for every 5 cm interval and surface sediments from 26 stations were analyzed for total carbon content via the CHN/S/O Elemental analyzer, using 1.5 – 2.5 mg of dried and homogenized sediment samples in tin capsules.

Results & Discussion

Sediment accumulation rate of Core 7 and Core 10 are $0.21\ \text{g}/\text{cm}^2/\text{yr}$ and $0.18\ \text{g}/\text{cm}^2/\text{yr}$, respectively. The slightly greater accumulation rate near Ko Sichang than Siracha may result from the current transport of sediment from the Bangkok River from the north.

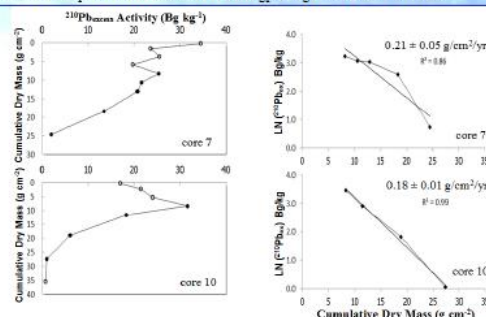


Figure 3. Profiles of excess ^{210}Pb activity from core 7 and core 10 (left column). Sediment core depth is expressed as cumulative dry mass (g/cm^2) to account for the sediment compaction. Filled symbols indicate data points used to calculate accumulation rate. Open symbols at the top sediment core indicate the mixed layer depth and the open symbols at the bottom indicate the depth of supported ^{210}Pb activity. Natural logarithm of ^{210}Pb activity in the left column were the data points used to fit the slopes and calculate the sediment accumulation rate in $\text{g}/\text{cm}^2/\text{yr}$ unit.

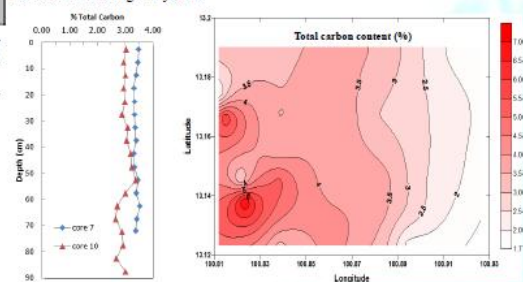


Figure 4. Total carbon content (%wt) vs. Depth (cm) for core 7 and core 10. Figure 5. Contour plot of total carbon content (%wt) from 26 surface sediment stations.

- Average carbon content of core 7 ($3.39 \pm 0.07\%$) is greater than core 10 ($2.98 \pm 0.18\%$)
- total carbon content spatial distribution is greater on Ko Sichang side than Siracha
- carbon content data reflects more intense shipping activities on Ko Sichang side

Conclusions

Study on sediment accumulation rate by ^{210}Pb method provides useful history information on human activity impact at Ko Sichang-Siracha area. Records of total carbon content from the sediment cores and the spatial distribution of recently deposited surface sediment have shown in this study as evidence of human activity impact on the environment, especially from the shipping industries at Ko Sichang-Siracha region.

Acknowledgements

This research is part of the project entitled "Knowledge Management for Marine Pollution Abatement and Biodiversity Conservation around Sichang and Siracha, Chonburi Province (2nd Year)" funded by The National Research Council of Thailand (NRCT). The authors also thank Graduate School of Chulalongkorn University for partially supporting this project and Thailand Institute of Nuclear Technology for providing research facilities on ^{210}Pb analysis.

Sediment Accumulation Rates and Total Carbon Content in Coastal Area of Ko Sichang-Siracha, Thailand

R. Supcharoen and G. Wattayakorn*

Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, THAILAND

*Corresponding Author E- mail: gullaya.w@chula.ac.th

ABSTRACT

Ko Sichang-Siracha area at the northeastern corner of the Gulf of Thailand has been recognized as a polluted coastal area since it is one of the important shipping transportation industries on the east coast of Thailand. Oil spill accidents, tapioca flour and coal spills during barge transport, as well as ballast water discharges by ships have been occurring in Ko Sichang Anchorage area. In this study, we selected two coring sites in Ko Sichang-Siracha area to determine the recent sediment accumulation rates by using ^{210}Pb method, and the historical record of total carbon content in this region. For every 5 cm interval depth of the sediment cores, ^{210}Pb were analyzed via the measurement of ^{210}Po and the internal tracer ^{209}Po by Alpha spectrometry. Sediment accumulation rates were estimated from excess ^{210}Pb profiles by applying Constant Initial Concentration (CIC) model. Based on the CIC model, sediment accumulation rates were found to be 0.21 and 0.18 $\text{g/cm}^2/\text{yr}$ for the Ko Sichang (core 7) and Siracha (core 10) station, respectively (Fig. 1). The percentage total carbon content of the two sediment cores slightly differs. Total carbon content of core 7 is uniform with depth, with an average carbon value of 3.39 ± 0.07 percent; whereas that of core 10 is uniform from the surface to 40 cm depth, with an average carbon value of 2.98 ± 0.18 percent. The greater percentage of total carbon of core 7 reflects the more intense shipping activities around Ko Sichang than Siracha area. Further investigation on sedimentary organic matter in sediment core samples such as C/N ratio might reveal contaminant record from shipping activities at Ko Sichang-Siracha area.

Keywords: Sediment accumulation rate, ^{210}Pb , Total carbon content, Ko Sichang-Siracha, Thailand

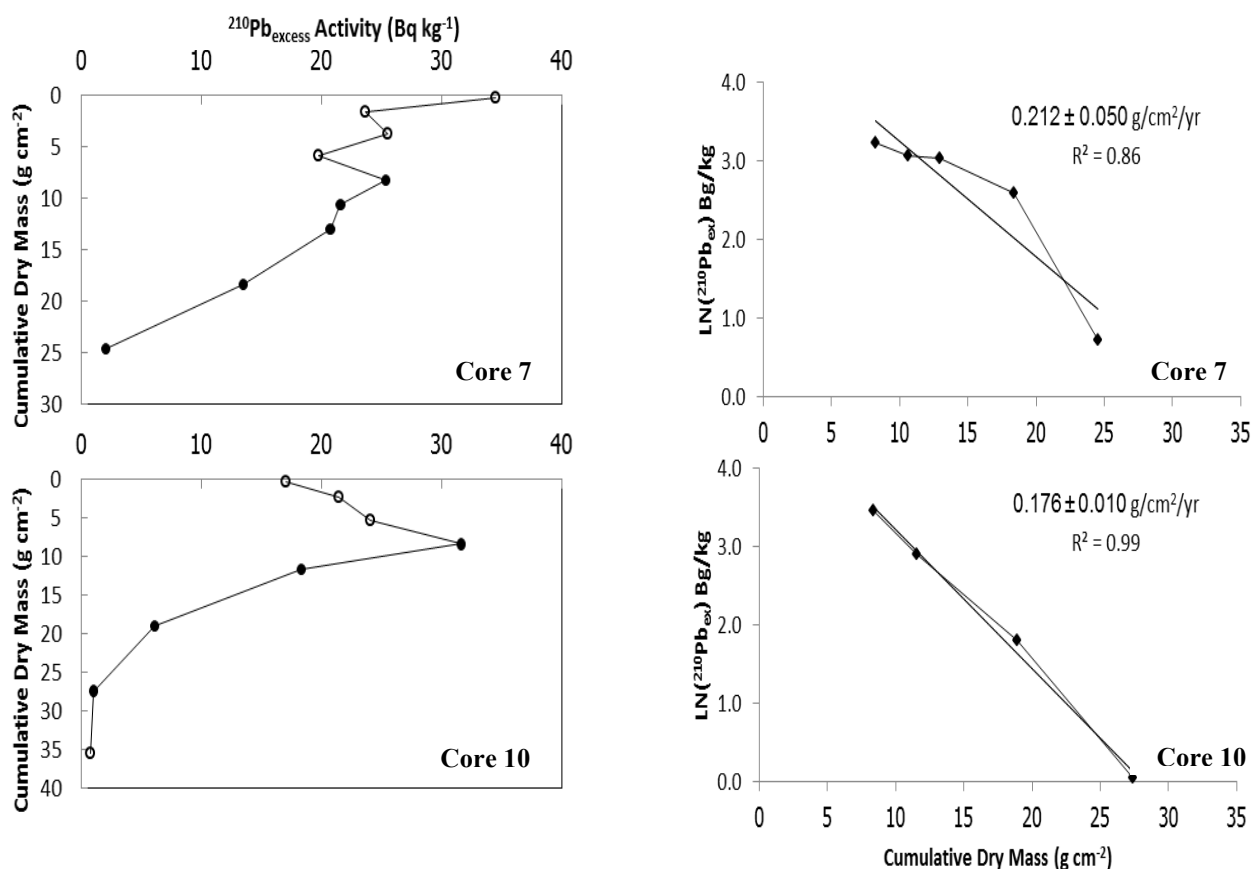


Figure. 1 Profiles of excess ^{210}Pb activity from Sichang (core 7) and Siracha (core 10). Sediment core depth is expressed as cumulative dry mass (g cm $^{-2}$) to account for the sediment compaction. Filled symbols indicate data points used to calculate accumulation rate. Open symbols at the top sediment core indicate the mixed layer depth and the open symbols at the bottom indicate the depth of supported ^{210}Pb activity. Natural logarithm of $^{210}\text{Pb}_{\text{ex}}$ as a function of cumulative dry mass from core 7 and 10 (right column); the filled symbols in the left column were the data points used to fit the slopes and calculate the sediment accumulation rate (in g/cm 2 /yr unit).

Acknowledgment: This research is part of the project entitled “Knowledge Management for Marine Pollution Abatement and Biodiversity Conservation around Sichang and Siracha, Chonburi Province (2 $^{\text{nd}}$ Year)” funded by The National Research Council of Thailand (NRCT). The authors also thank Graduate School of Chulalongkorn University for partially supporting this project.

บทที่ 3

โครงการที่ 2: การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยไลโปไลติกยีสต์

Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons by Lipolytic Yeast

โดย

รศ. ดร. วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล และ ดร. รุ่งทิวา เปี่ยมทองคำ

บทคัดย่อ

ปัญหาทางสิ่งแวดล้อมมีมากมายในปัจจุบันหนึ่งในปัญหาหลักทางด้านสิ่งแวดล้อม คือการปนเปื้อนของน้ำมัน ที่เกิดจากการรั่วไหลของน้ำมันจากการซ่อมเครื่องยนต์ การถ่ายน้ำมันเครื่อง การเดินเรือ การขุดร่อนน้ำ และการขุดเจาะก๊าซธรรมชาติ ทำให้มีการฟุ้งกระจาย และการปนเปื้อนของสารพิษต่างๆลงสู่ น้ำทะเลการย่อยสลายของจุลินทรีย์คือกลไกทางธรรมชาติหนึ่งที่สำคัญที่ดีในการกำจัดมลพิษที่เกิดจากการรั่วไหลของน้ำมันจากสิ่งแวดล้อมได้ วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน โดยใช้แลคเคสที่ผลิตได้จากไลโปไลติกยีสต์สายพันธุ์ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* ที่คัดเลือกจากเกาะสีชัง โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *A. pullulans* และการผลิตเอนไซม์แลคเคส แลคเคสที่สามารถผลิตได้จาก *A. pullulans* โดยการชักนำของ 2 mM guaiacol ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโต และศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของ Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene โดยแลคเคส ผลการศึกษาพบว่าแลคเคสที่ผลิตโดย *A. pullulans* สามารถย่อยสลายสาร Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene ได้ 24.35, 38.16, 25.38 และ 45.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับภายใน 48 ชั่วโมง การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินด้วยแลคเคส พบว่าปริมาณ Naphthalene ลดลง 51.34 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ Anthracene ลดลง 85.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับภายในเวลา 9 วัน

คำสำคัญ: ไลโปไลติกยีสต์ แลคเคส สารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนไฮโดรลิซิส

Abstract

One of the major environmental problems today is petroleum hydrocarbon contamination resulting from the activities related to oil spills as well as the petrochemical industry. Microbial degradation is the major and ultimate natural mechanism which one can clean up the petroleum hydrocarbon pollutants from the environment. The objective of this research was to study the polyaromatic hydrocarbons biodegradability by laccase produced by lipolytic yeast, *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*, screened from Sichang Island. The experiments were firstly performed by study the optimal condition for growing the *A. pullulans* and its laccase production. Laccase can be produced from *A. pullulans* by induction with 2 mM guaiacol in growth medium. Laccase was lyophilized and stored in capsule. Biodegradability of laccase on naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene was then determined using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results revealed that the laccase activity of one capsule (0.16 g) lyophilized laccase was 711.11 U/ml and can degrade benzo[a]pyrene, anthracene, pyrene and naphthalene by 45.33, 38.16, 25.38 and 24.35 percent after 48 hours incubation respectively. The results of that laccase produced by *A. pullulans* can degrade naphthalene and anthracene in soil by 51.34 and 85.06 percent respectively, after incubation for 9 days.

Key words: lipolytic yeast, laccase, polyaromatic hydrocarbons

3.1. บทนำ

3.1.1. ความสำคัญและที่มาในการวิจัย

ปัญหาการปนเปื้อนน้ำมันในแหล่งน้ำทั้งของไทยและประเทศเพื่อนบ้านจากอุบัติเหตุที่เกิดจากการรั่วไหลของเรือขนน้ำมัน ทำให้เกิดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมและเป็นหนึ่งในปัญหาหลักของประเทศไทยที่กำลังประสบอยู่ในขณะนี้ ผลจากการรั่วไหลของน้ำมันชนิดต่างๆลงสู่ทะเลทำให้เกิดผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย เช่น ปลาที่อาศัยในบริเวณนั้นๆ นกทะเล ที่ต้องจับปลาทะเลเป็นอาหาร ดินทรายบริเวณชายฝั่งก็ได้รับการปนเปื้อนของคราบน้ำมัน

จุลินทรีย์กลุ่มไลโปโพลิดิกสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำมันและไขมันได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ไลเปส ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ประเภท Triacylglycerol acylhydrolase ทำหน้าที่ในการเร่งการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลน้ำมันและไขมัน (Triacylglycerol) ซึ่งปฏิกิริยาการย่อยสลายนี้สามารถผันกลับได้ในระบบของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) คือ ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Esterification) และทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) (Rathi *et al.* 2001; Jaeger and Reetz., 1998) และด้วยความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่หลากหลายจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลายอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหารในการปรับแต่งกลิ่นรส อุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมกระดาษและเครื่องหนัง ตลอดจนการนำมาใช้ในระบบการกำจัดน้ำเสีย อย่างไรก็ตามพบว่ายีสต์นี้สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส (Laccase; EC 1.10.3.2) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductase) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมไฮโดรเจน ออกซิเจน หรืออิเล็กตรอน จากสารประกอบหนึ่งไปยังสารประกอบอื่น ในกระบวนการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนของเอนไซม์แลคเคส เอนไซม์แลคเคสจะเข้าไปเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาและมีความสามารถในการใช้สับสเตรทได้หลากหลายชนิด โดยข้อดีของการใช้เอนไซม์แลคเคสเป็นตัวเร่งที่เหนือกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาอนินทรีย์ ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) และอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง ไม่เป็นพิษ มีความสามารถในการละลายน้ำ สามารถทำซ้ำ (Repeatability) ได้ ปฏิกิริยาเกิดได้ภายใต้สภาวะการทดลอง เช่น พีเอชของสารละลาย อุณหภูมิ และความดันที่ไม่รุนแรง และสามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ

เกาะสีชังเป็นเกาะที่มีทำเลที่ตั้งอยู่บริเวณอ่าวไทยตอนใน มีสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างจากแผ่นดิน อีกทั้งพบการปนเปื้อนของน้ำมันและไขมันทั้งจากบ้านเรือนและเรือขนถ่ายสินค้ากลางทะเลตลอดทั้งปี จากงานวิจัยในโครงการ”การพัฒนาองค์ความรู้เพื่อการจัดการปัญหามลภาวะในทะเลและอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณหมู่เกาะสีชัง ปีที่ 1” ที่ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สามารถคัดเลือกไลโปโพลิดิกยีสต์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไลเปส งานวิจัยนี้จึงสนใจนำยีสต์ที่คัดเลือกได้มาใช้ประโยชน์ในการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน โดยเฉพาะสารกลุ่มโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PAHs) ที่มีความเป็นพิษสูงที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำมัน

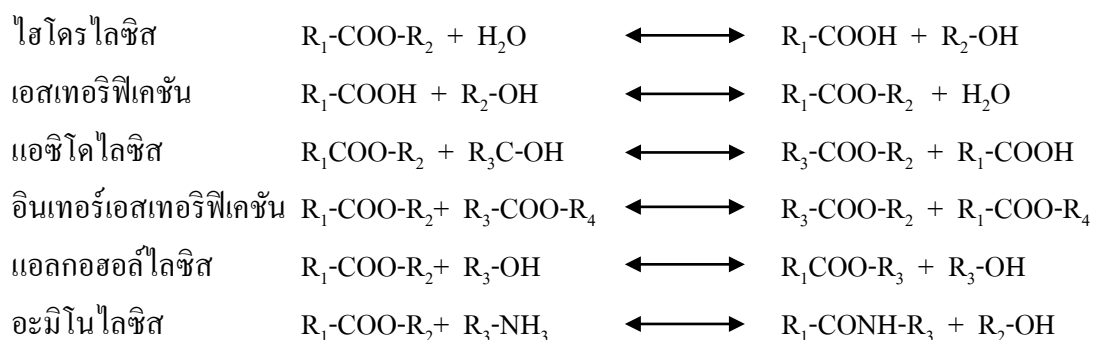
3.1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการเจริญของไลโปไลติกยีสต์เพื่อนำมาใช้ในการกระบวนการย่อยสลายโพลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน
2. ทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการย่อยสลายโพลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของแลคเคสจากไลโปไลติกยีสต์ ในระดับห้องปฏิบัติการ
3. ทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการย่อยสลายโพลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนกับตัวอย่างดินที่ถูกปนเปื้อนด้วยโพลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

3.2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

3.2.1. ไลเปส

ไลเปส (Lipase; EC 3.1.1.3) มีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry ว่า กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (Glycerol ester hydrolase) นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอย่างอื่นอีก เช่น เอซิล-กลีเซอรอลไฮโดรเลส (Acyl glycerol hydrolase) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (Triacyl glycerol hydrolase) ไลเปสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) ซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ในพันธะเอสเทอร์ (Ester bond) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) เป็นไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) โมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) กรดไขมัน (Fatty acid) และกลีเซอรอล (Glycerol) ไลเปสจะทำการย่อยสลายตั้งต้นได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในรูปอิมัลชัน (Oil-water interface) (Cihangir และ Sarikaya, 2004) เนื่องจากสารตั้งต้นอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (Insoluble water) อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (Initial rate) อาจขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลที่ถูกดูดซับไว้ในพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสารตั้งต้น นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาที่เป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (Synthesis reaction) ได้แก่ เอสเทอริฟิเคชัน (Esterification) และทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาประเภทแอซิโดไลซิส (Acidolysis) อินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน (Interesterification) แอลกอฮอล์ไลซิส (Alcoholysis) และ อะมิโนไลซิส (Aminolysis) ดังแสดงในปฏิกิริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเปสซึ่งสามารถเกิดได้ทั้งในภาวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ (Aqueous solution) และไม่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยา (Non-aqueous solution) (Villeneuve et al., 2000) ดังนี้



ความจำเพาะของไลเปสต่อสารตั้งต้น

Macrae (1983) จำแนกไลเปสโดยแบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ได้เป็น 3 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

1. ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อทั้งตำแหน่งและชนิดของกรดไขมันตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่เข้าทำปฏิกิริยา (Non-specific lipase) ปฏิกิริยาจะดำเนินไปแบบสุ่ม มีการแลกเปลี่ยนหมู่เอซิลได้ทุกตำแหน่งบนไตรเอซิลกลีเซอรอล เอนไซม์กลุ่มนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้น จะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium macnes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*

2. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (1,3 specific lipase) ซึ่งจะไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) ไตรกลีเซอไรด์และได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดไขมัน 1,2 ไดกลีเซอไรด์ หรือ 2,3 ไดกลีเซอไรด์ และ 2-มอนอกลิเซอไรด์แต่ (1,2),(2,3) – โมโนกลีเซอไรด์ เป็นสารประกอบชนิดไม่คงตัว ถ้าให้เกิดปฏิกิริยานานอาจจะมีการย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ 1,3-ไดกลีเซอไรด์ และ 1-โมโนกลีเซอไรด์ หรือ 3-โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งหากปฏิกิริยาการย่อยเกิดอย่างสมบูรณ์ก็จะทำให้ได้กลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้จากจุลินทรีย์ ดังนี้ *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus* และไลเปสจากรำข้าว

3. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน (Fatty acid-specific lipase) บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ไลเปสในกลุ่มนี้จะย่อยสลายกรดไขมันที่มีพันธะคู่ในตำแหน่งที่ 9 (Cis double bond) บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้ดี ส่วนกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (Saturated fatty acid) หรือชนิดไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) ที่ไม่มีพันธะคู่ในตำแหน่งที่ 9 จะถูกไฮโดรไลซ์ได้ไม่คืบหน้า เอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางพวก ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไลเปส เช่น ไลเปสจากเชื้อรา *Penicillium cyclopium* และ *Geotrichum candidum* เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดเมื่อสารตั้งต้นเป็น โมโนเอซิลกลีเซอรอล

แหล่งของไลเปส

ไลเปสผลิตได้จากทั้งสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ในสัตว์ไลเปสสร้างขึ้นที่ตับอ่อน (Pancreatic lipase) และในน้ำนม (Milk lipase) ในพืชพบได้ในถั่ว ข้าวสาลี ฝ้าย และละหุ่ง ไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถแยกได้จากทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ แต่เนื่องจากไลเปสจากจุลินทรีย์มีความเสถียรสูง (Stability) ความสามารถในการคัดเลือกสารตั้งต้นดี (Selectivity) และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด (Substrate specificity) จึงเป็นที่น่าสนใจและมีการนำไปประยุกต์ใช้สูงที่สุด (Cardenas et al., 2001) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไลเปสจากยีสต์ เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตง่าย วิธีเก็บรักษาไม่ซับซ้อน มักผลิตไลเปสชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular lipase) ซึ่งง่ายและสะดวกต่อการแยกและนำไปใช้ (Kademi et al., 2003)

การผลิตเอนไซม์ไลเปส

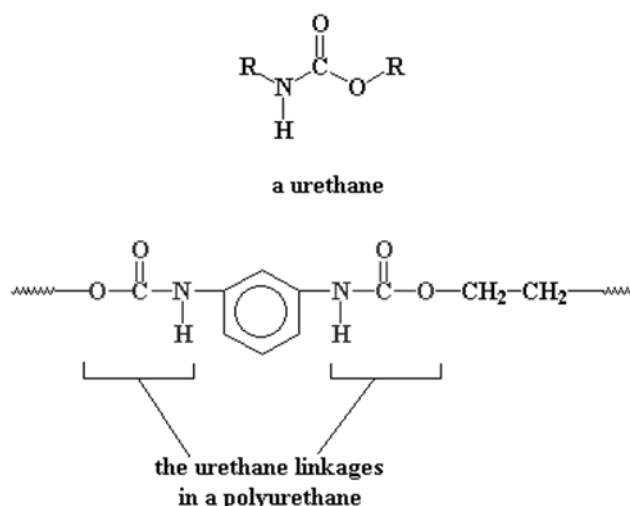
เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ทั้งในอาหารเหลว (submerge culture) และบนอาหารแข็ง (solid state) Pandey et al., (1999) เสนอว่าการผลิตไลเปสบนอาหารแข็งมีข้อดีว่าการผลิตในอาหารเหลวอยู่หลายประการ เช่น จุลินทรีย์สามารถเติบโตได้ง่าย เอนไซม์ที่ผลิตได้มีปริมาณมากกว่า นอกจากนี้ยังสามารถแยกเอนไซม์ออกมาได้ง่ายกว่า และ ทำให้เกิดของเสียน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันการผลิตไลเปสส่วนใหญ่เป็นการผลิตในอาหารเหลวไม่ว่าจะผลิตจากเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ทั้งนี้เป็นเพราะสามารถควบคุมสภาพการเลี้ยง สารอาหาร และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสในอาหารเหลวได้ง่ายกว่า ซึ่งปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และในโตรเจน สภาพความเป็นกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ และการทำงานของเอนไซม์และความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการผลิต (Elibol and Ozer, 2001)

บทบาทของไลเปสในการย่อยสลายทางชีวภาพ

จากกิจกรรมในทะเลที่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นการเดินเรือ การทำประมง และการเทียบเรือบริเวณชายฝั่งก่อให้เกิดการรั่วไหลของน้ำมันจากการซ่อมเครื่องยนต์ การถ่ายน้ำมันเครื่อง และจากกิจกรรมการเดินเรือต่างๆ เป็นจำนวนมาก อีกทั้งการขุดร่องน้ำ การขุดเจาะก๊าซธรรมชาติ ทำให้มีการฟุ้งกระจาย และการปนเปื้อนของสารพิษต่างๆลงสู่ทะเล

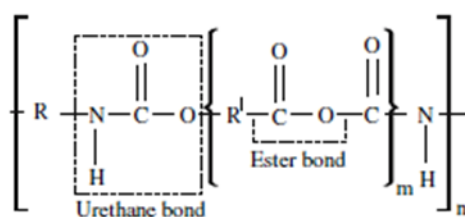
จากการปนเปื้อนของน้ำมันที่รั่วไหลนี้ คราบน้ำมันที่ติดค้างอยู่เป็นเวลานานโดยปราศจากการป้องกันและการบริหารจัดการจะส่งผลกระทบต่อทรัพยากรธรรมชาติ ระบบนิเวศทางทะเล และกระทบถึงปัญหาทางด้านเศรษฐกิจและสังคมตามมาในอนาคต โดยจากการสำรวจสภาพน้ำบริเวณเกาะสีชัง ซึ่งมีที่ตั้งอยู่บริเวณอ่าวไทยตอนในของประเทศไทยเรานั้น พบว่ามีการปนเปื้อนของน้ำมันและไขมันทั้งจากบ้านเรือนและเรือขนถ่ายสินค้ากลางทะเลตลอดทั้งปี

แนวทางการแก้ไขปัญหาล้างสิ่งแวดล้อมโดยอาศัยสารชีวภาพที่ได้จากสิ่งแวดล้อมนั้นๆเป็นตัวบำบัด นับเป็นแนวทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาศึกษา ความเป็นไปได้ในการแก้ปัญหที่เกิดขึ้น และจากคุณสมบัติของไลเปสที่ได้กล่าวมาข้างต้น ไม่ว่าจะเป็นการนำไลเปสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง ตลอดจนอุตสาหกรรมเครื่องแก้ว อีกทั้งการนำไลเปสไปใช้ประโยชน์ในด้านการย่อยสลายขยะไขมัน (Masse et al., 2001) รวมถึงสารโพลียูรีเทน (Takamoto et al., 2001)



ภาพที่ 3.1 สารโพลียูรีเทน (โพลิเมอร์ที่นิยมนำมาทำเบาะโซฟา ที่นอน ฉนวนกันความร้อน กาวคุณภาพสูง และอื่นๆ เป็น Thermoset plastics ชนิดหนึ่งที่ย่อยสลายยากทางธรรมชาติ) (Urquhart et al., 1999)

จากการศึกษาการย่อยสลายสารโพลียูรีเทนของ Takamoto et al., (2001) อาศัยไลเปสที่ได้จากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยากระบวนการไฮโดรไลซิส บริเวณพันธะเอสเทอร์สายโซ่หลักของโพลีเอสเตอร์ โพลียูรีเทน พบว่าเมื่อนำชิ้นส่วนพลาสติกโพลียูรีเทนซึ่งไม่ละลายน้ำใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *C. rugosa* ที่ถูกกระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่า ไลเปสที่ได้สามารถเร่งปฏิกิริยากระบวนการไฮโดรไลซิสของโพลียูรีเทน และวัดอัตราการย่อยสลายโพลียูรีเทน จากอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ร่วม ให้ค่า 0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร ไลเปสสามารถย่อยสลายโพลีเอสเตอร์ โพลียูรีเทน ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่ไม่สามารถละลายน้ำได้



ภาพที่ 3.2 ไลเปสเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสบริเวณพันธะเอสเทอร์ของโพลียูรีเทน (Gautam et al., 2007)

เอนไซม์ไลเปส จัดเป็นเอนไซม์ประเภท Triacylglycerol acylhydrolases ทำหน้าที่ในการเร่งการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (Ester bonds) ของโมเลกุลน้ำมันและไขมัน (Triacylglycerol) จากปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันในทะเล พบว่ามีสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; PAHs) มีความเป็นพิษสูง อีกทั้งยังย่อยสลายได้ยากเจือปนอยู่ด้วย มักเกิดจากกระบวนการเผา

ไหม้ของเชื้อเพลิง จากกระบวนการเคมีของโรงงานอุตสาหกรรม และการประกอบอาหารในครัวเรือน (Lijinsky, 1991) สามารถแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมได้หลายทาง ทั้งจากอากาศ จากการรั่วไหลของน้ำทิ้ง และการทิ้งสิ่งปฏิกูลของโรงงานอุตสาหกรรม การรั่วไหลที่เกิดจากอุบัติเหตุระหว่างการขนส่ง และการใช้ผลิตภัณฑ์น้ำมันปิโตรเลียม สารประกอบโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชนที่อาศัยอยู่ในเขตอุตสาหกรรมต่างๆค่อนข้างรุนแรง เนื่องจากเป็นสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic compounds) มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำทำให้คงทนอยู่ในระบบนิเวศได้เป็นระยะเวลานาน (Hites et al., 1977, 1980; Gschwend and Hites, 1981; Means et al., 1980) สารสามารถยึดเกาะกับอนุภาคของดินหรือดินตะกอนได้ดี จึงพบการปนเปื้อนในบริเวณดังกล่าวได้สูง การกระจายในดินชั้นต่างๆขึ้นกับขนาดของโมเลกุลและชั้นดิน สารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ที่มีวงเบนซีน 2-3 วง มีแนวโน้มการพบมากในชั้นของทรายบริเวณน้ำใต้ดิน ส่วนที่มีวงเบนซีน 5-6 วง มีแนวโน้มการพบในชั้นของดินที่มีสารอินทรีย์มาก สารเหล่านี้มีแนวโน้มถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียได้เช่นกัน (Potin et al., 2004)

การสลายตัวของสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ที่เกิดขึ้นได้แก่ การระเหย การเกิดโฟโตออกซิเดชัน (Photooxidation) การเกิดออกซิเดชันทางเคมี (Chemical oxidation) รวมถึงการถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน จากการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของสารนี้ด้วยสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ของ Kanaly and Harayam (2000) พบว่า ในสถานะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียจะย่อยสลายโดยเริ่มจากการออกซิไดส์ ให้เป็น dihydrodiol จากนั้นจึงแตกวงออกจนได้สารตัวกลางในวัฏจักรเครบส์ และนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ในที่สุด

	PAH	MW	Sol (mg/L)
Recalcitrance ↓	 Naphthalene	128.2	31.700
	 Acenaphthene	154.2	3.900
	 Anthracene	178.2	0.070
	 Phenanthrene	178.2	1.300
	 Fluoranthene	202.3	0.260
	 Pyrene	202.3	0.140
	 Benzo[a]anthracene	228.3	0.002
	 Benzo[a]pyrene	252.3	0.003

ภาพที่ 3.3 โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน พบว่ายิ่งมีวงโมเลกุลเพิ่มขึ้นความสามารถในการละลายน้ำยิ่งลดน้อยลง (Bamforth and Singleton, 2005)

เชื้อราบางกลุ่ม เช่น White rot fungi สามารถย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ได้โดยใช้เอนไซม์สำหรับย่อยสลายลิกนิน เช่น Lignin peroxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเนื้อไม้ แต่มีความจำเพาะต่ำจึงย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนินได้ด้วย (Baldrian et al., 2000)

3.2.2 แลคเคส

แลคเคส (Laccase; EC 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มของออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductase) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมไฮโดรเจน, ออกซิเจน หรืออิเล็กตรอน จากสารประกอบหนึ่งไปยังสารประกอบอื่น มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบหลักและมีโลหะคอปเปอร์ (Cu^{+2}) 4 อะตอมอยู่ในโครงสร้างโมเลกุลด้วย โลหะคอปเปอร์ในโครงสร้างแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ type-1 (T1) มีคอปเปอร์ 1 อะตอม, type-2 (T2) คอปเปอร์ 1 อะตอม และ type-3 (T3 และ T3') มีคอปเปอร์ 2 อะตอม (Zheng, et al., 2008; Solomon, et al., 1992) กระบวนการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนของเอนไซม์แลคเคส เริ่มขึ้นที่ตำแหน่ง T1 ซึ่งเป็นตำแหน่ง active site ที่มีการจับกับสารเป้าหมาย เกิดปฏิกิริยารีดักชันของคอปเปอร์ ที่ตำแหน่ง T1 และส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยัง ตำแหน่ง T2/T3 และออกซิเจนเกิดปฏิกิริยารีดักชันไปเป็นน้ำ (Solomon, et al., 1992) เอนไซม์แลคเคสจะเข้าไปเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาและมีความสามารถในการใช้สับสเตรทได้หลากหลายชนิด เช่น polyphenol, aromatic, benzinethiols, anthraquinone, syringalazine, 2,6 dimethoxyphenol, veratryl alcohol, 2,5 xylylene, ferulic acid และยังมีสับสเตรทที่เป็นพวก non-phenolic compounds เช่น HAA, HPI, VLA และ ABTS เป็นต้น (Bourbonnais et al., 1990) ข้อดีของการใช้เอนไซม์แลคเคสเป็นตัวเร่งที่เหนือกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาอนินทรีย์ ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) และอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง ไม่เป็นพิษ มีความสามารถในการละลายน้ำ สามารถทำซ้ำ (Repeatability) ได้ ปฏิกิริยาเกิดได้ภายใต้สภาวะการทดลอง เช่น พีเอชของสารละลาย อุณหภูมิ และความดันที่ไม่รุนแรง และสามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ

บริเวณที่จับกับสับสเตรทของแลคเคส (Substrate binding sites of laccase)

โครงสร้างผลึกของแลคเคสไม่แสดงลักษณะเฉพาะของตำแหน่งที่เร่งปฏิกิริยา (Active site) แต่มีการวัดสับสเตรทและถ่ายโอนอิเล็กตรอนไปยังคอปเปอร์ T1 (Type-1-copper) อยู่ในโดเมนที่ 3 บริเวณที่จับกับสับสเตรทของแลคเคสเป็นบริเวณที่มีขนาดใหญ่อยู่ใกล้บริเวณคอปเปอร์ T1 (Type-1-copper) กรดอะมิโนส่วนใหญ่เป็น Histidine (His) และเป็นลิแกนด์ของคอปเปอร์ T1 (Type-1-copper) ล้อมรอบด้วยกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการจับของสับสเตรทต่างๆ จึงทำให้แลคเคสมีสมบัติความจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรทได้หลากหลายชนิด ส่วนบริเวณที่ไม่ชอบน้ำก็เป็นกรดอะมิโนชนิด Phe อาจพบร่วมกับกรดอะมิโนที่ชอบน้ำ เช่น Asp, Lys, Tyr และ Prolines ตำแหน่งที่มี Pro ความหลากหลายของชนิดกรดอะมิโนนี้สามารถอธิบาย

ได้ถึงศักยภาพการรีดิวซ์ (Redox potential) ของโมเลกุลคอปเปอร์ T 1 (Type-1-copper) ($> 700 \text{ mV}$) ซึ่งเปรียบเทียบกับแลคเคสที่พบใน *Trametes versicolor*

บริเวณที่ใช้งานภายในโครงสร้างผลึกของแลคเคส (Active sites of laccase)

1. บริเวณที่ใช้งานของกลุ่มคอปเปอร์ T1 (Mononuclear site) บริเวณที่ใช้งานครั้งแรกพบว่าอยู่ใกล้กับผิวภายนอกโมเลกุลและเป็นบริเวณที่จับกับสับสเตรทที่เป็นสารอินทรีย์ ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มฟีนอล (Phenols) หรือกลุ่มอัลลาไมด์ (Arylamines) จะออกซิไดส์อิเล็กตรอนแล้วปล่อยอิเล็กตรอนไป โดยผ่านกลุ่มคอปเปอร์ T1 (Type-1-copper) ส่วนที่จับกับ His และ Cys ทั้งหมดเป็นส่วนของโดเมนที่ 3 และจะส่งเข้าไปยังบริเวณ Trinuclear (T2/T3) (Solomon et al., 2001)

2. บริเวณที่ใช้งานของกลุ่มคอปเปอร์ T2/T3 (Trinuclear site)

เมื่ออิเล็กตรอนถูกส่งเข้ามาบริเวณ Trinuclear (T2/T3) อิเล็กตรอนจะถูกถ่ายโอนผ่านช่องทาง 2 ช่องทางภายในโครงสร้างโมเลกุลของแลคเคส (Intramolecular) (Morgunova et al., 2006) อิเล็กตรอนจะถูกถ่ายโอนผ่านบริเวณที่มี Cys และ His 2 ตัวของคอปเปอร์ T1 (Type-1-copper) ไปยังบริเวณที่ใช้งานบริเวณที่ 2 คือ บริเวณ Trinuclear (T2/T3) บริเวณนี้จะจับและรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนได้น้ำเกิดขึ้น ซึ่งบริเวณ Trinuclear จะประกอบด้วย 1 โมเลกุลของกลุ่มคอปเปอร์ T2 (Type-2-copper) และ 2 โมเลกุลของกลุ่มคอปเปอร์ T3 (Type-3-copper) จัดอยู่ในลักษณะรูปสามเหลี่ยมอยู่ระหว่างโดเมนที่ 1 กับ โดเมนที่ 3 จับกับ His 8 ตัวและ 2 โมเลกุลของน้ำ ส่วนกลุ่มคอปเปอร์ T2 มีลักษณะเป็นไตรโคออดิเนต (Tricoordinated) จับกับ His 2 ตัวและ 1 โมเลกุลของน้ำ 2 โมเลกุลของกลุ่มคอปเปอร์ T3(a) เป็นบริเวณที่จับกับสาร His111, His399 และ His449 ส่วน T3(b) เป็นบริเวณที่จับกับสาร His66, His109 และ His451 นอกจากนี้ยังมีการจับกับโมเลกุลของน้ำแบบไม่สมมาตร (Asymmetrically) กับ 2 โมเลกุลของกลุ่มคอปเปอร์ T3 (T3 (a) ระยะทาง $2.98 \text{ \AA}$ และ T3 (b) มีระยะทางเท่ากับ $2.23 \text{ \AA}$) พื้นผิวของตัวทำละลายมี 2 ช่องทางในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนให้เข้าไปยังบริเวณ Trinuclear (T2/T3) ภายในโครงสร้างโมเลกุลของแลคเคส ซึ่งช่องทางแรกเป็น 2 โมเลกุลของกลุ่มคอปเปอร์ T3 (Type-3-copper) ด้านหนึ่งของกลุ่ม T2/T3 ช่องทางนี้จะยอมจับกับโมเลกุลของออกซิเจน ส่วนช่องทางที่ 2 เป็นโมเลกุลของกลุ่มคอปเปอร์ T2 (Type-2-copper) จะรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนได้น้ำเกิดขึ้นและน้ำก็เคลื่อนที่ไปผสมกับตัวทำละลายต่อไป

ปฏิกิริยาของแลคเคส (Reaction of laccase)

แลคเคสจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชันกับอิเล็กตรอนของสับสเตรทบริเวณ Mononuclear (Type-1-copper) แล้วอิเล็กตรอนก็ถูกถ่ายโอนผ่าน His-Cys-His ซึ่งเป็นบริเวณ Trinuclear (Type-2-copper/Type-3-copper) บริเวณนี้ทำหน้าที่รีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนได้น้ำเกิดขึ้นและส่งออกภายนอกต่อไป โดยอิเล็กตรอนจะถูกถ่ายโอนผ่านช่องทางสำหรับการถ่ายโอนอิเล็กตรอนอยู่ 2 ช่องทาง ซึ่งเป็นบริเวณ Trinuclear (T2/T3) ช่องทางแรกเป็นโมเลกุลของคอปเปอร์ T3 (Type-3-copper) ช่องทางนี้จะจับกับ

โมเลกุลของออกซิเจน ส่วนช่องทางที่ 2 เป็นโมเลกุลของคอปเปอร์ T2 (Type-2-copper) ช่องนี้ จะทำการรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนได้น้ำเกิดขึ้น และน้ำก็เคลื่อนที่ไปผสมกับตัวทำละลายต่อไป

งานวิจัยของ Yucheng et al. (2007) ศึกษาการย่อยสลายของโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินด้วยเชื้อราที่ผลิตแลคเคส และ Wang et al., (2011) พบว่าเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans* สามารถผลิตแลคเคสได้เมื่อมี guaiacol เป็นตัวชักนำ ดังนั้นจึงมีความสนใจในการศึกษาแลคเคสทางการค้า และแลคเคสที่ได้จากเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans* มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

3.2.3. *Aureobasidium pullulans*

A. pullulans เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น อะไมเลส โปรตีนเนส ไลเพส เซลลูเลส ไชแลเนส เป็นต้น (Chi et al., 2009) จึงเป็นยีสต์ที่มีความน่าสนใจในการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับไลเพสจาก *A. pullulans* ยังมีผู้น้อยมาก Liu et al., (2008) ได้ทำการศึกษาไลเพสจาก *A. pullulans* HN2.3 พบว่าภาวะที่เหมาะสมสามารถผลิตไลเพสได้ 8.02 ± 0.24 หน่วยต่อมิลลิลิตร ธนธร วิทิตสานต์ (2553) สามารถคัดแยกเชื้อ *A. pullulans* var. *melanogenum* ได้จากโคมที่ปนเปื้อนน้ำมัน บริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี จากการศึกษาพบว่า เชื้อนี้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 2.304 ± 0.104 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันและทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเท่ากับ 17.84 ± 0.79 และ 25.27 ± 1.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสจากยีสต์ พบว่า มีค่าแอกทิวิตีไฮโดรไลซิสสูงสุดเท่ากับ 4.85 ± 0.15 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไลเพสมาประยุกต์ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ซูการ์แฟคตีแอซิดเอสเทอร์พบว่าน้ำตาลฟรักโทสและกรดปาล์มมิกเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 5.95 ± 0.96 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึง 88.92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้น้ำมันปาล์มและเมทานอลเป็นสารตั้งต้น จะเห็นได้ว่าไลเพสที่ได้จากเชื้อนี้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและการสังเคราะห์ จึงน่าจะนำมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้ดี

3.3. ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต กิจกรรมของไลเพส และปริมาณโปรตีนจากเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans* เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

1. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

การเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารแข็ง (Yeast Malt Agar; YMA) ให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนจานเพาะเชื้อ แล้วเจียโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน (Yeast Malt Broth; YMB) ในหลอดทดลองเพื่อทำเป็นหัวเชื้อ บ่มเลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเพิ่มจำนวนและนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ จากอาหารเหลว YMB ลงในอาหารเหลวสูตร (Lipase Production Medium; LPM) สำหรับการผลิตไลเปสปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมน้ำมันสนุดำ 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชักนำให้ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการได้ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.3 ทำการถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อโดยคำนวณให้มีค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมงนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักน้อยกว่า 10 กิโลดาลตันออกไป จะได้ไลเปสส่วนใสที่บริสุทธิ์ขึ้นอยู่ด้านบน และนำไปตรวจสอบกิจกรรมของไลเปสและปริมาณโปรตีน

2. การวัดอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

วัดค่าความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เก็บผลติดต่อกันเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง แล้วนำมาสร้างกราฟการเจริญเติบโตพร้อมทั้งเก็บตัวอย่างที่ได้มาแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสหรือเอนไซม์ที่ยีสต์ผลิตได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของไลเปสต่อไป

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total protein)

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ มาวัดปริมาณของโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Bradford's method (Bradford, 1976) ด้วยวิธีการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานซึ่งใช้สารละลายมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA) ที่มีปริมาณโปรตีน 0-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปส (Total activity)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาวัดค่ากิจกรรมของไลเปสทั้งหมดโดยใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Maia *et al.*, 2001) โดยใช้สารละลายตั้งต้น คือ พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท (*p*-nitrophenyl palmitate) ตรวจสอบโดยการวัดการดูดกลืนแสงของพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ซึ่งเป็นสารละลายผลิตภัณฑ์หลังทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยวัดที่ 410 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วเปรียบเทียบกับ

ปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจากกราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายพารา-ไนโตรฟีนอล ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Unit) ของแอกทิวิตีของเอนไซม์มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนพารา-ไนโตรฟีนอลปาล์มมิเตทแล้วให้พารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.3.2. ศึกษาความสามารถและประสิทธิภาพการย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของไลโปไลติกยีสต์ในระดับห้องปฏิบัติการ

1. ทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย Naphthalene ด้วยเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans*

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ยีสต์ในอาหารแข็ง (Yeast Malt Agar: YMA) ให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนจานเพาะเชื้อ แล้วเชี่ยโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน (Yeast Malt Broth; YMB) ในหลอดทดลองเพื่อทำเป็นหัวเชื้อ บ่มเลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเพิ่มจำนวนและนำไปใช้เป็นก้ำเชื้อในการทดลองต่อไป หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ จากอาหารเหลว YMB ลงในอาหารเหลวสูตร (Lipase Production Medium; LPM) สำหรับการผลิตไลเปส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมน้ำมันสนับดำ 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชักนำให้ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการได้ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.3 ทำการถ่ายเชื้อจากก้ำเชื้อโดยคำนวณให้มีค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด จากนั้นจึงเติมแนฟทาลีน 1 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ส่วนใสเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแนฟทาลีนที่เหลืออยู่ ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

2. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตแลคเคส

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ยีสต์ในอาหารแข็ง (Yeast Malt Agar: YMA) ให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนจานเพาะเชื้อ แล้วเชี่ยโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน (Yeast Malt Broth; YMB) ในหลอดทดลองเพื่อทำเป็นหัวเชื้อ บ่มเลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเพิ่มจำนวนและนำไปใช้เป็นก้ำเชื้อในการทดลองต่อไป หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ จากอาหารเหลว YMB ลงในอาหารเหลวสูตร (Laccase Production Medium) สำหรับการผลิตแลคเคส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

พร้อมทั้งเติม guaicol 2 mM และ CuSO_4 0.5 mM เพื่อชักนำให้ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการได้ จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยการแช่แข็ง (lyophilization)

3. ทดสอบความสามารถในย่อยสลาย Naphthalene ด้วยแลกเคสทางการค้า

นำแลกเคสทางการค้าความเข้มข้น 23.1 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร เติมลงใน Naphthalene และ Anthracene ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 5 เปอร์เซ็นต์ tween 80, 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 นำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

4. ทดสอบความสามารถในย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแลกเคสจากยีสต์

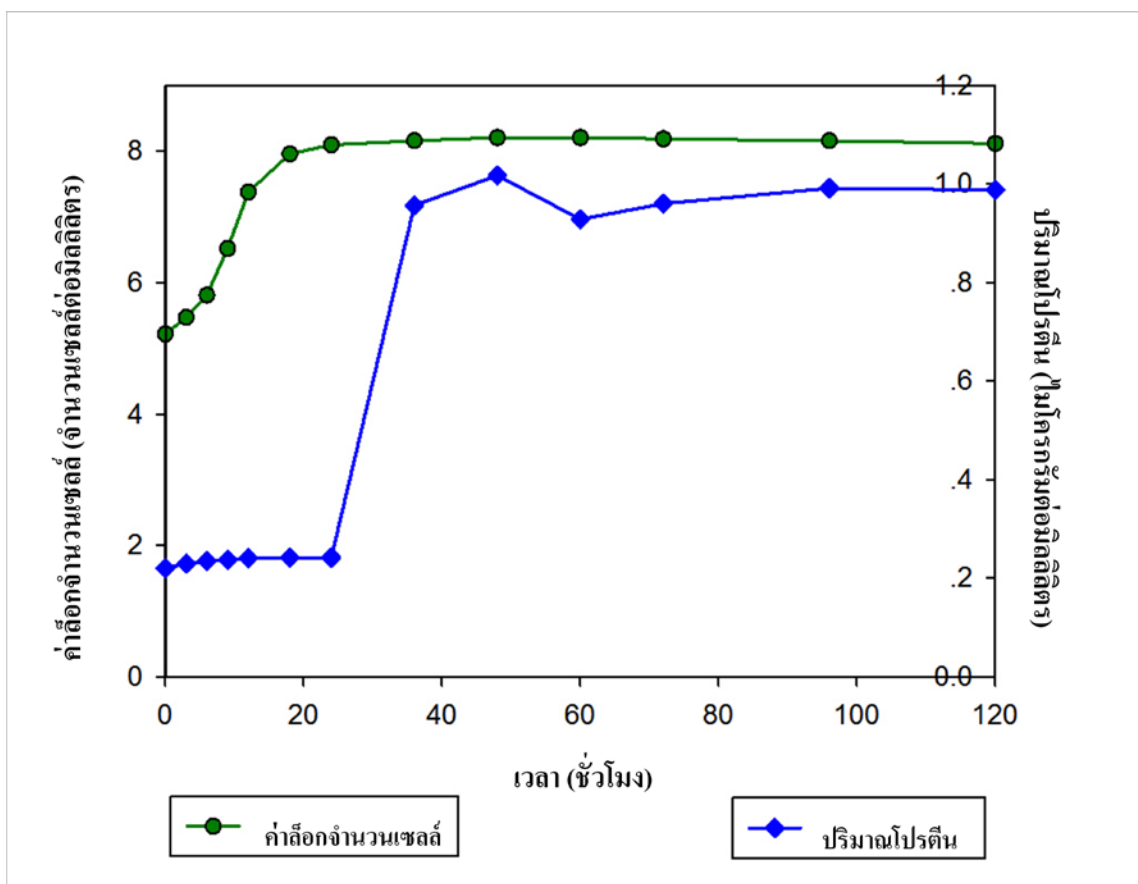
นำแลกเคสจากยีสต์ *A. pullulans* ความเข้มข้น 711 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร (0.16 กรัม) เติมลงสารละลายที่ประกอบด้วย Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene ความเข้มข้นเริ่มต้น 10, 0.908, 0.135 และ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 5 เปอร์เซ็นต์ tween 80, 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ทำการสกัดสาร PAHs ออกจากสารละลายตัวอย่าง โดยเติมเฮกเซน 2 เท่าของปริมาณตัวอย่าง กับ ¼ เท่าของ 15% ไททันเอ็กซ์ 100 เข้าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

3.3.3. ศึกษาความสามารถและประสิทธิภาพของแลกเคสจากยีสต์ ในการย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในตัวอย่างดิน

นำแลกเคสจากยีสต์ *A. pullulans* ปริมาณ 5 กรัม เติมลงในตัวอย่างดินที่ประกอบด้วย Naphthalene หรือ Anthracene ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.45 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 5 เปอร์เซ็นต์ tween 80, 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 ในดิน 1 กรัม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันทำการสกัดสาร PAHs ออกจากสารละลายดินโดยเติมเฮกเซน 2 เท่าของปริมาณตัวอย่าง กับ ¼ เท่าของ 15% ไททันเอ็กซ์ 100 เข้าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

3.4. ผลการวิจัย

3.4.1. การทดลองวัดอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total protein)

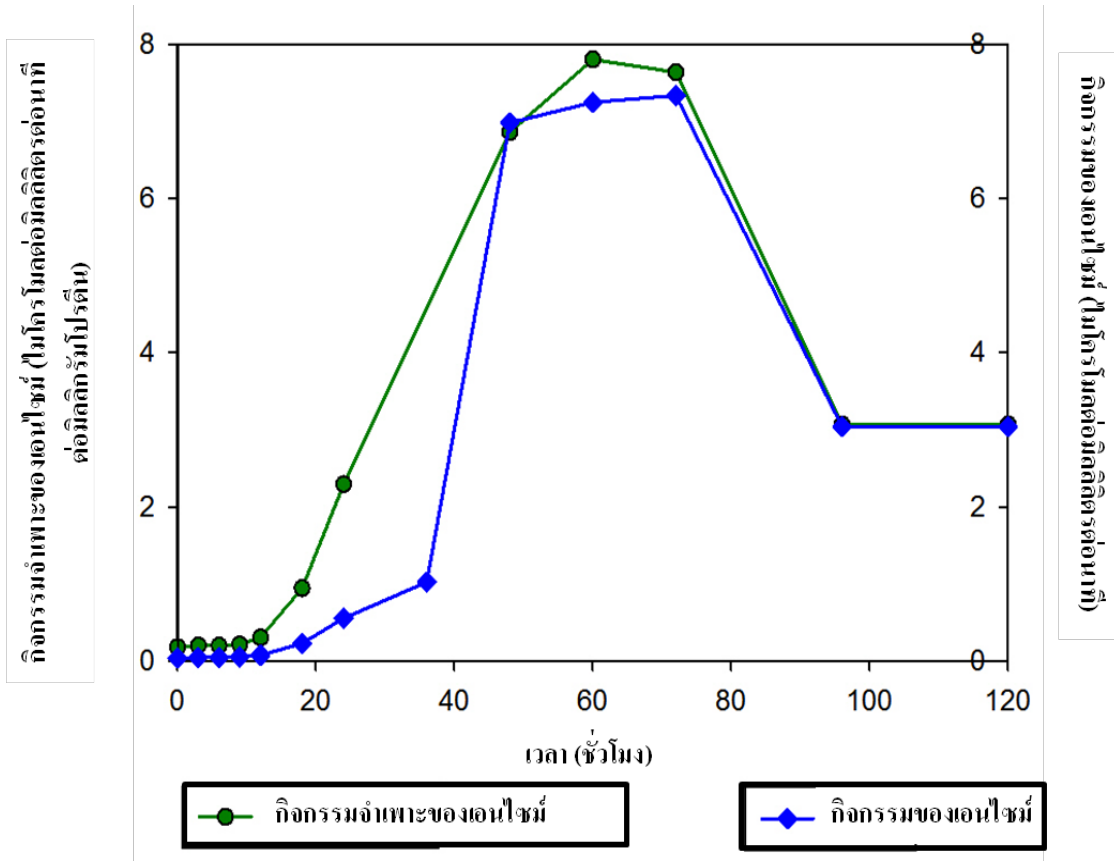


ภาพที่ 3.4 ค่าสื่อจำนวนเซลล์และปริมาณ โปรตีนของเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans*

จากภาพที่ 3.4 กราฟการเจริญเติบโตของยีสต์ *Aureobasidium pullulans* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะเพิ่มจำนวน (Log phase) ที่ช่วงเวลา 0-48 ชั่วโมงแรก และเข้าสู่ช่วงการเจริญเติบโตแบบคงที่ (Stationary phase) ที่ชั่วโมงที่ 48-60 และจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน พบว่าเมื่อนำมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA จะเห็นได้ว่า *Aureobasidium pullulans* มีปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ 310.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในชั่วโมงที่ 48 โดยอยู่ในช่วงสุดท้ายของ log phase และเริ่มเข้าสู่ stationary phase

3.4.2 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปส (Total activity)

ในการคำนวณค่ากิจกรรมของไลเปสของเชื้อจุลินทรีย์เชิงปริมาณ ต้องมีการเทียบกับกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล ในหน่วยไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาทีโดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ยูนิต หรือไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาทีของเอนไซม์ มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนพารา-ไนโตรฟีนอลปาล์มมิเตท ไปเป็นพารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่สภาวะที่กำหนด จากกราฟที่ชั่วโมงที่ 72 มีค่ากิจกรรมของไลเปสที่ 7.336 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง จึงมีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป



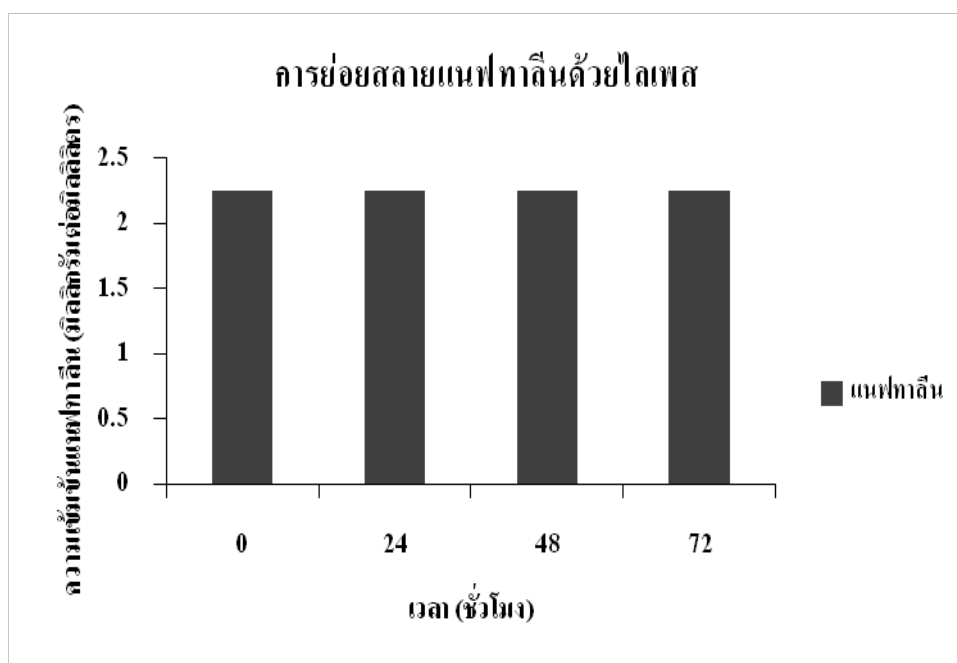
ภาพที่ 3.5 ปริมาณกิจกรรมของไลเปสและค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ของเชื้อยีสต์

Aureobasidium pullulans

จากการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปสจากเชื้อยีสต์ในชั่วโมงที่ 60 พบว่าเชื้อ *Aureobasidium pullulans* มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 769.16 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3.4.3 ความสามารถในการย่อยสลาย Naphthalene ของไลเพส

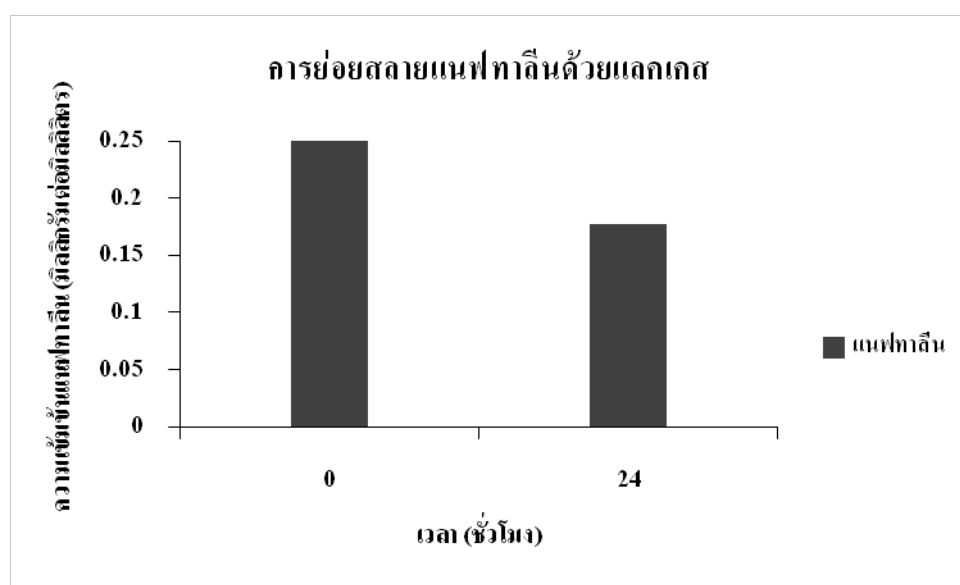
เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Aureobasidium pullulans* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด จากนั้นจึงเติม Naphthalene 1 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอน จะได้ส่วนใสเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง จะเห็นได้ว่าไลเพสที่ได้จากการชักนำด้วยน้ำมันสนบูดำจากเชื้อยีสต์ *A. pullulans* ไม่สามารถย่อย Naphthalene ได้ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์หาปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง พบว่าปริมาณความเข้มข้นของ Naphthalene ที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นเริ่มต้นซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 3.6) เนื่องจากไลเพสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) จึงไม่สามารถทำลายพันธะของวงเบนซีนให้แตกออกได้ จากงานวิจัยของ Yucheng et al., ในปี 2007 ได้ศึกษาการย่อยสลายของโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินด้วยเชื้อราที่ผลิตแลคเคส และ Wang et al. (2011) พบว่าเชื้อยีสต์ *A. pullulans* สามารถผลิตแลคเคสได้เมื่อมี guaiacol เป็นตัวชักนำ ดังนั้นจึงมีความสนใจในการศึกษาเปรียบเทียบแลคเคสทางการค้า และแลคเคสที่ได้จาก *A. pullulans* มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายของโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนต่อไป



ภาพที่ 3.6 ปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายด้วยไลเพส

3.4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย Naphthalene ของแลคเคสทางการค้า

เมื่อนำแลคเคสทางการค้าความเข้มข้น 23.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย Naphthalene ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงพบว่าแลคเคสมีความสามารถในการย่อยสลาย Naphthalene จะเห็นได้จากโครมาโทแกรมภาพที่ 3.7 ปริมาณ Naphthalene ลดลงจากความเข้มข้นเริ่มต้น 27.6 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแลคเคสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตส (Oxidoreductase) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยา โดยให้อิเล็กตรอนและมีโมเลกุลออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ออกซิเจนที่ได้รับอิเล็กตรอนจะรวมกับโปรตอนที่มิอยู่ในสารละลายกลายเป็นน้ำ ดังนั้นแลคเคสสามารถใช้สับสเตรทประเภทสารในกลุ่มโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เช่น Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene (Octavio et al., 2006)

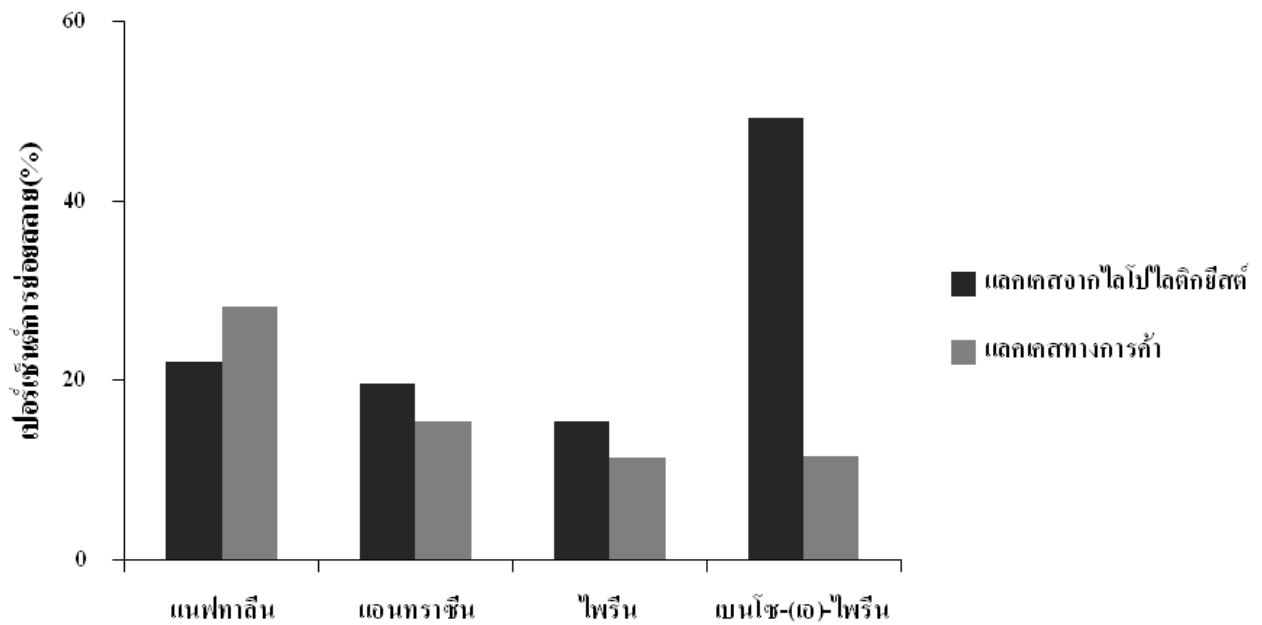


ภาพที่ 3.7 ปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายด้วยแลคเคสทางการค้า

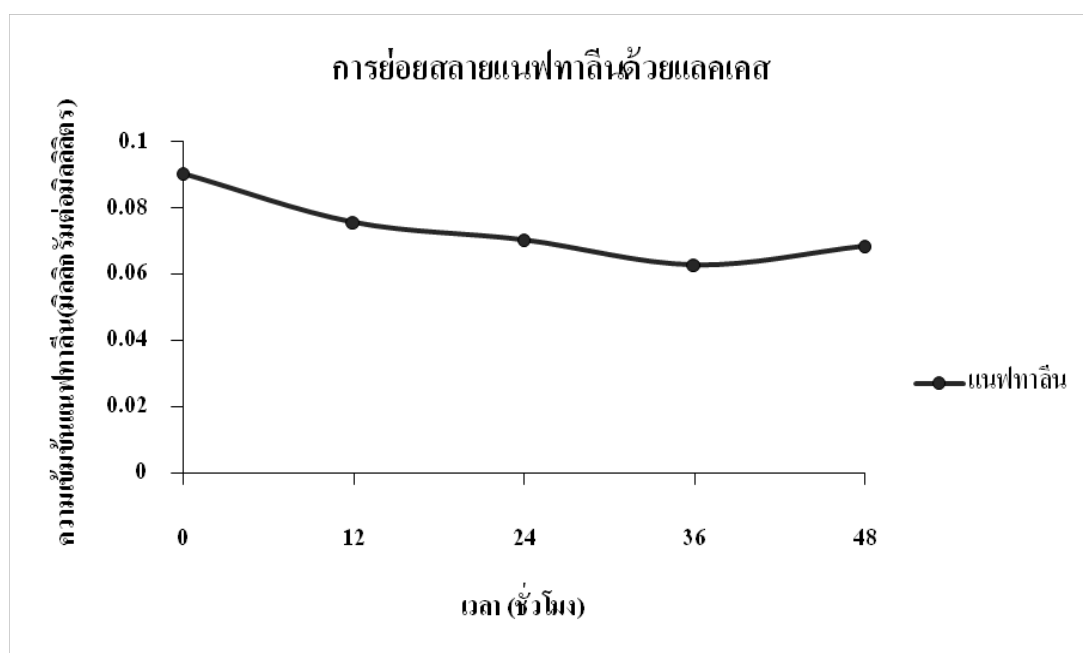
3.4.5 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแลคเคสจากยีสต์

นำแลคเคสจากยีสต์ *A. pullulans* ความเข้มข้น 711 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (0.16 กรัม) เติมลงในสารละลายที่ประกอบด้วย Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene ความเข้มข้นเริ่มต้น 10, 0.908, 0.135 และ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 5 เปอร์เซ็นต์ tween 80, 100 มิลลิโมลาร์อะซิเตตบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมา วิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

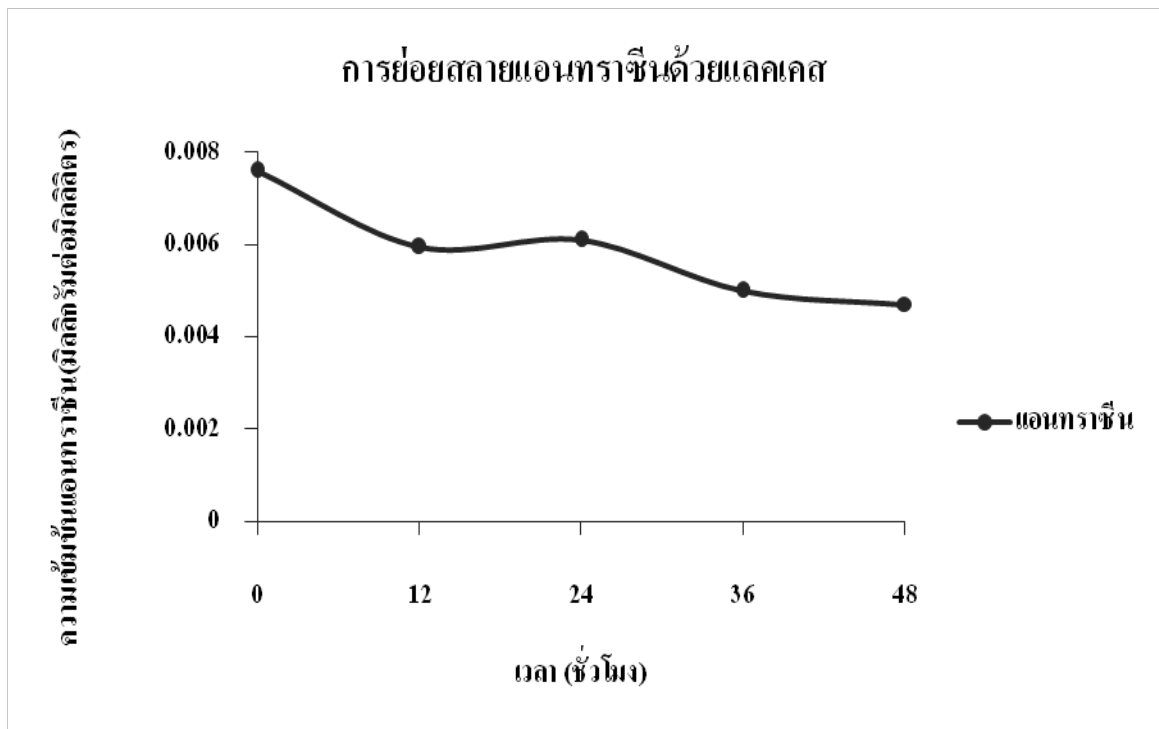
ของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) พบว่าแลกเคสจากไลโปไลติกยีสต์จากเกาสีซึ่งสามารถย่อยสลาย Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene ได้ 24.35, 38.16, 25.38 และ 45.33% ตามลำดับภายในเวลา 48 ชั่วโมง



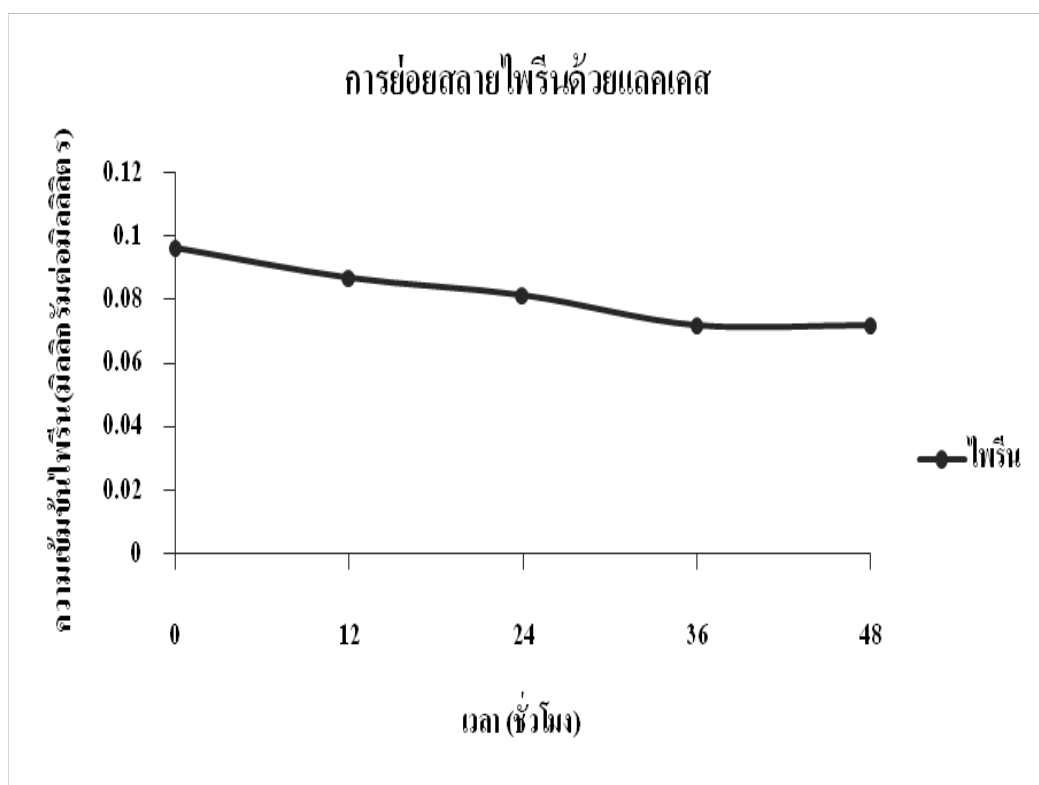
ภาพที่ 3.8 ปริมาณสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่จากการย่อยด้วยแลกเคส



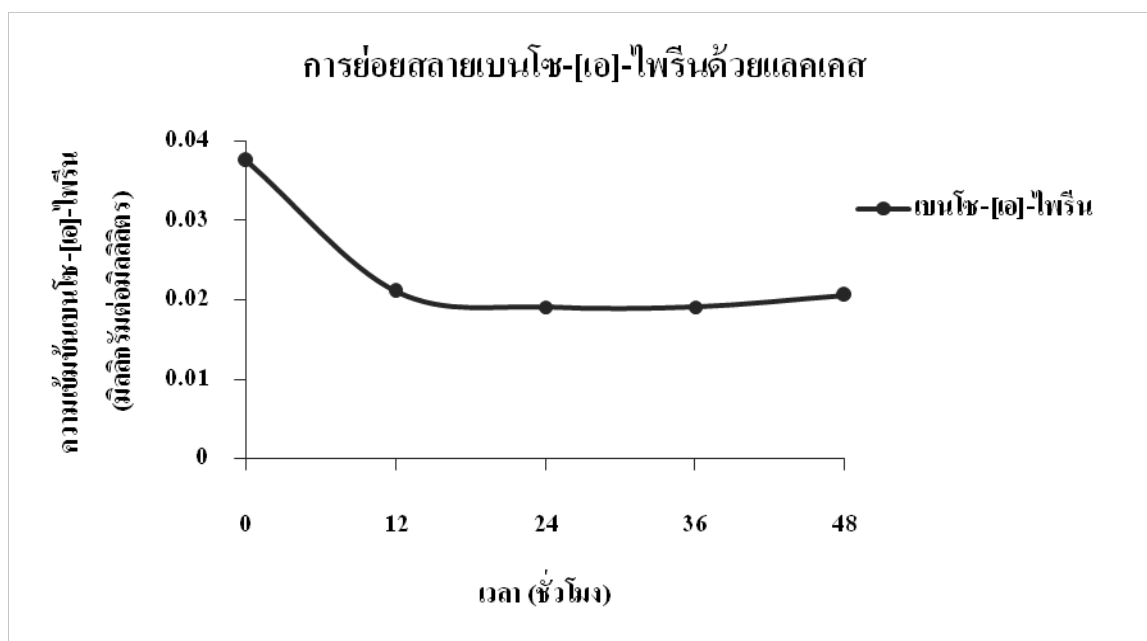
ภาพที่ 3.9 ปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่จากการย่อยด้วยแลกเคสจากยีสต์ *A. pullulans*



ภาพที่ 3.10 ปริมาณ Anthracene ที่เหลืออยู่จากการย่อยด้วยแลกเคสจากยีสต์ *A. pullulans*



ภาพที่ 3.11 ปริมาณ Pyrene ที่เหลืออยู่จากการย่อยด้วยแลกเคสจากยีสต์ *A. pullulans*

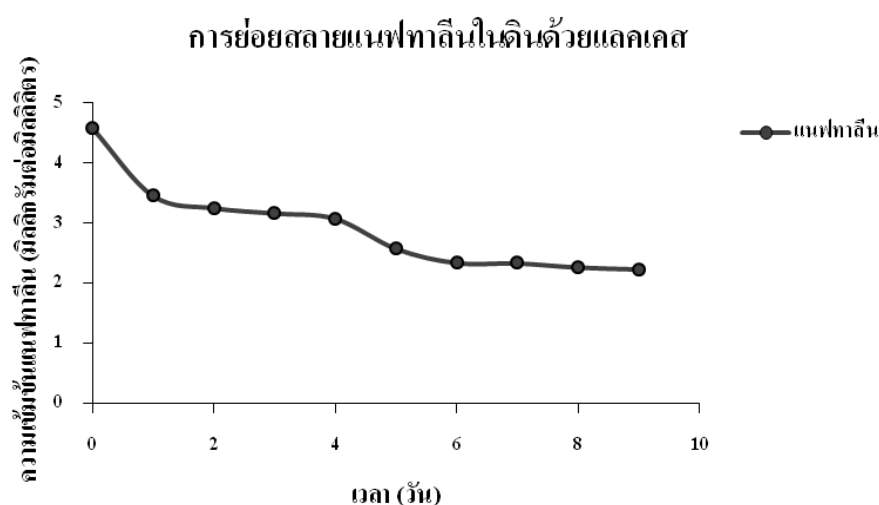


ภาพที่ 3.12 ปริมาณ Benzo[a]pyrene ที่เหลืออยู่จากการย่อยด้วยแลกเคลสจากยีสต์ *A. pullulans*

3.4.6 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ในดินด้วยแลกเคลส

3.4.6.1 ความสามารถในการย่อยสลาย Naphthalene ของแลกเคลสจากยีสต์ *A. pullulans*

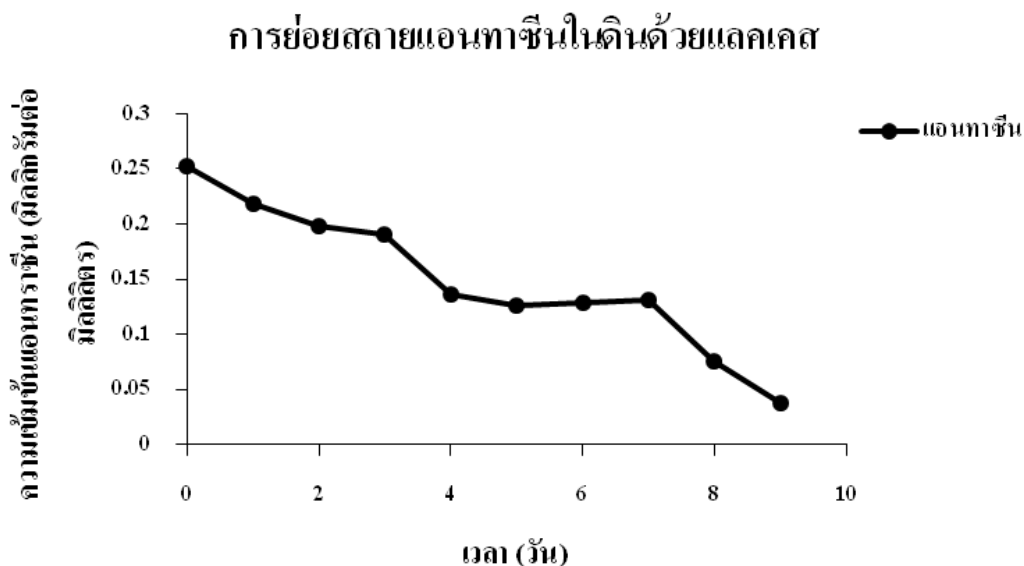
เมื่อนำแลกเคลสปริมาณ 5 กรัม เติมนลงในตัวอย่างดินที่มี Naphthalene ความเข้มข้นเริ่มต้น 4.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง พบว่าแลกเคลสมีความสามารถในการย่อยสลาย Naphthalene โดยทำให้ปริมาณ Naphthalene ลดลง 51.34 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 9 วัน (ภาพที่ 3.13) (ค่าเฉลี่ย 5.8 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)



ภาพที่ 3.13 ปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ในดินหลังจากการย่อยด้วยแลกเคลส

3.4.6.2. ความสามารถในการย่อยสลาย Anthracene ของแอสคัสจากยีสต์ *A. pullulans*

เมื่อนำแอสคัสปริมาณ 5 กรัม เติมลงในตัวอย่างดินที่มี Anthracene ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันและนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Anthracene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง จากโครมาโทแกรมภาพที่ 3.14 พบว่าแอสคัสมีความสามารถในการย่อยสลาย Anthracene ในดินลดลง 85.06 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 9 วัน (เฉลี่ย 9.49 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)



ภาพที่ 3.14 ปริมาณ Anthracene ที่เหลืออยู่ในดินหลังจากการย่อยด้วยแอสคัส

3.5. อภิปรายและวิจารณ์ผล

การเจริญเติบโตของยีสต์ *A. pullulans* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะเพิ่มจำนวน (Log phase) ที่ช่วงเวลา 0-48 ชั่วโมงแรก และเข้าสู่ช่วงการเจริญเติบโตแบบคงที่ (Stationary phase) ที่ชั่วโมงที่ 48-60 โดยมีปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ 310.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 48 โดยอยู่ในช่วงสุดท้ายของ Log phase และเริ่มคงที่ตามอัตราการเจริญที่คงที่ ชั่วโมงที่ 72 มีค่ากิจกรรมของไลเปสที่ 7.336 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงเมื่อวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปสจากเชื้อยีสต์ *A. pullulans* พบว่าในชั่วโมงที่ 60 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 769.16 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีนดังนั้นชั่วโมงที่ 60 จึงเหมาะสมที่สุดที่จะนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเนฟทาลีนของไลเปส แล้ววิเคราะห์หาปริมาณ Naphthalene ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง จะเห็นได้ว่าไลเปสที่ได้จากยีสต์ *A. pullulans* เนื่องจากไลเปสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) จึงไม่สามารถทำลาย

พันธะของวงเบนซีนให้แตกออกได้จากงานวิจัยของ Yucheng et al., ในปี 2007 ได้ศึกษาการย่อยสลายของ โพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ที่ปนเปื้อนในดินด้วยเชื้อราที่ผลิตแลคเคส และในปี 2011 Wang et al., พบว่าเชื้อยีสต์ *A. pullulans* สามารถผลิตแลคเคสได้เมื่อมี guaiacol เป็นตัวชักนำ ดังนั้นจึงมีความสนใจในการศึกษาแลคเคสที่ได้จาก *A. pullulans* มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายของโพลีโรมาติกไฮโดรคาร์บอนต่อไป เมื่อนำแลคเคสจากไลโปไลติกยีสต์ความเข้มข้น 711 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (0.16 กรัม) มาทดสอบการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในระดับห้องปฏิบัติการ แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง พบว่าแลคเคสจากไลโปไลติกยีสต์จากเกาะสีชัง สามารถย่อยสลาย Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene ได้ 24.35, 38.16, 25.38 และ 45.33 % ตามลำดับ ภายใน 48 ชั่วโมง เนื่องจากแลคเคสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductase) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยา โดยให้อิเล็กตรอน และมีโมเลกุลออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ออกซิเจนที่ได้รับอิเล็กตรอนจะรวมกับโปรตอนที่มีอยู่ในสารละลายกลายเป็นน้ำ ดังนั้นแลคเคสสามารถใช้สับสเตรทประเภทสารในกลุ่มโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ (Octavio et al., 2006) สำหรับทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างดินด้วยแลคเคสจากยีสต์ พบว่าปริมาณ Naphthalene ลดลง 51.34 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ Anthracene ลดลง 85.06 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 9 วัน เนื่องจากสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนสามารถยึดเกาะกับอนุภาคของดินได้ดีจึงย่อยสลายได้ยากขึ้นกว่าในสถานะที่อยู่ในสารละลาย โดย Naphthalene ลดลงเฉลี่ย 5.8 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ Anthracene ลดลงเฉลี่ย 9.49 เปอร์เซ็นต์ต่อวันตามลำดับ

3.6. ข้อเสนอแนะ

3.7. บรรณานุกรม

- ชนธร วิทิตสานต์. 2553. การสังเคราะห์ซูการ์แฟตตีแอซิดเอสเทอร์และเมทิลเอสเทอร์ด้วยไลเปสจากยีสต์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Baldrian, P., In der Wiesche, C., Gabriel, J., Nerud, F., and Zadrazil, F. 2000. Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2471–2478.
- Benjamin, S., and Pandey, A. 2001. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation, *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 44: 213-221
- Bourbonnais, R., and Paice, M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation, *FEBS Letters*, 267: 99–102.
- Cardenas, F., De Castrob, M.S., Sanchez-Monterob, J.M., Sinisterrab, J.V., Valmasedaa, M., Elsona, S.W., and Alvareza, E. 2001. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media, *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 145–154.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analysis Biochemistry*, 72: 248–254.
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., and Zhang, T. 2009. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82: 793–804.
- Cihangir, N., and Sarikaya, E. 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 193-197.
- Elibol, M., and Ozer, D. 2001. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*, *Process Biochemistry*, 36, 4: 325-329
- Fernández-Sánchez, C., Tzanov T., Gübitz, G. M., and Paulo, A. C. 2002. Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions, *Bioelectrochemistry*, 58, 149-156.
- Gautam, R., Bassi, A.S. and Yanful, E. K. 2007. *Candida rugosa* lipase-catalyzed polyurethane degradation in aqueous medium, *Biotechnology Letters*, 29: 1081–1086.
- Gschwend, P.M., and Hites, R.A., 1981. Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine and lacustrine sediments in the Northeastern United States, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45: 2359-2367.

- Hites, R.A., Laflamme, R.E., and Farrington, J.W., 1977. Sedimentary polycyclic aromatic hydrocarbons: the historical record, *Science*, 198: 829-831.
- Jaeger, K-E., Reetz, M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 16: 396–403.
- Kademi, A., Lee, B., and Houde, A. 2003. A production of heterologous microbial lipases by yeasts, *Indian Journal of Biotechnology*, 2: 346-355.
- Kakugawa, K., Masahiro, T., Kunihiro, I., Keiko, M., Shozo, M., Yuki, M., Osamu, S., and Tokichi, M. 2002. Isolation of Yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11, Novel Producer of Mannosylerythritol Lipid, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 66: 188- 191
- Kanally, R.A., and Harayama, S., 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria, *Journal of Bacteriology*, 182 (8): 2059-2067.
- Kazlauskas, R. J., and Bornscheuer, U. T. 1998. Biotransformations with lipases, In: Rehm, H. J., Pihler, G., Stadler, A., Kelly, P. J. W. (ed), *Biotechnology*, Vol. 8. 37-192, New York: VCH.
- Lijinsky, W., 1991. The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food, *Mutation Research*, 259: 251-261.
- Liu, Z. Q., Chi, Z. M., Wang, L., and Li, J. 2008. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils, *Biochemical Engineering Journal*, 40: 445–451.
- Macrae, A. R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification oils and fats, *Journal of American oil Chemists' Society*, 60: 291-294.
- Maia, M.M.D., Heasley, A., Camargo de Moraes, M.M., Melo, E.H.M., Moraes J.R., M.A., Ledingham, W.M., and Lima Filho, J.L. 2001. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation, *Bioresource Technology*, 76: 23-27.
- Masse, L., Kennedy, K. J., and Chou, S. P. 2001. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79: 629-635.
- Means, R. C. 1980. Underdevelopment and the Development of Law. Chapel Hill: University of North Carolina Press.
- Morgunova, E., Illarionov, B., Sambaiah, T., Haase, I., Bacher, A., Cushman, M., Fischer, M., and Ladenstein, R. 2006. Structural and thermodynamic insights into the binding mode of five novel inhibitors of lumazine synthase from *Mycobacterium tuberculosis*, *FEBS Journal*, 273: 4790-4804.

- Octavio, L. C., Cristina Irma, M. P. P., Ricardo, J. R. B., and Francisco, V. O. 2006. Laccases, *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 2: 323-340.
- Oishi, H., Morimoto, T., Watanabe, Y., and Tamai, Y. 1999. Purification and Characterization of Phospholipase B from *Kluyveromyceslactis*, and Cloning of Phospholipase B gene, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63: 68-76
- Ota, Y., Gomi, K., Kato, S., Sugiura, T., and Minoda, Y. 1982. Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*, *Agricultural Biology and Chemistry*, 46: 2885-2893
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., and Soccol, V. T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29: 119-131.
- Potin, O., Rafin, C., and Veignie, E. 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) – contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54: 45-52.
- Rathi, P., Goswami, V.K., Sahai, V., Gupta, R. 2002. Response surface methodology for improving production of hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia*, *Journal of Applied Microbiology*, 93: 930–936
- Schmidt, R. D., and Verger, R. 1998. Lipase: Interfacial enzymes with attractive applications, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 37: 1608-1633.
- Solomon, E.I., Baldwin, M.J., and Lowery, M.D. 1992. Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity, *Chemical Reviews*, 92: 521-542.
- Takamoto, T., Shirasaka, H., Uyama, H., and Kobayashi, S. 2001. Lipase-catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane in organic solvent, *Chemistry Letter* 6: 492-493.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J., and Haas, M. J. 2000. Review: Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9: 113-148.
- Wang, H., Kong, W., Jin, J., Zhang, N., and Li, B. 2011. Extracellular Acidic Laccase by *Aureobasidium pullulans*, *Journal of Microbiology*, 2011-02.
- Yucheng, W., Ying, T., Zhengao, L., Xuewei, L., and Yongming L. 2007. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) oxidation by fungal laccase in the remediation of an aged contaminated soil, *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 789–796.

Zheng, W., Zhou, H.M., Zheng, Y.F., and Wang, N. 2008. A comparative study on electrochemistry of laccase at two kinds of carbon nanotubes and its application for biofuel cell, *Chemical Physics Letters*, 457, 381-385.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast Malt Medium (YM)

ประกอบด้วย

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับพีเอชเป็น 5.5 กรณิอาหารแข็งเติมวุ้น 20 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Lipase production medium

ประกอบด้วย

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Meat extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
KH ₂ PO ₄	7	กรัม
Palm oil	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Laccase Production Medium

ประกอบด้วย

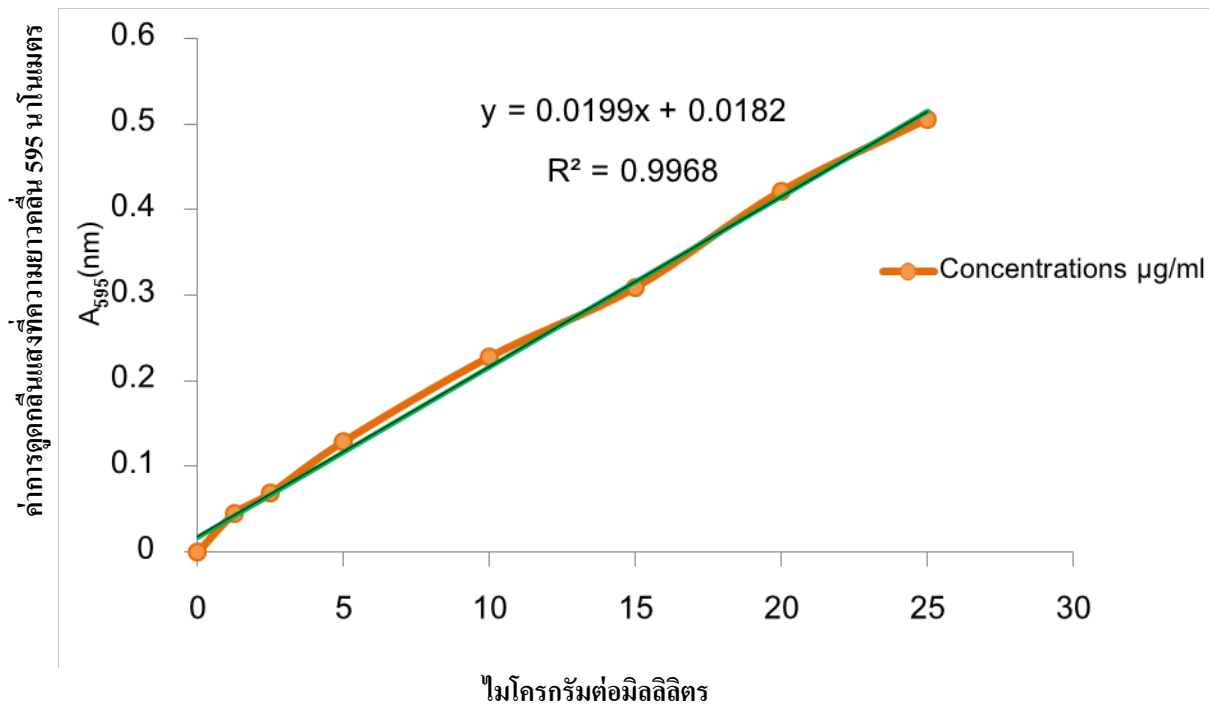
Yeast extract	0.05	กรัม
K ₂ HPO ₄	3.4	กรัม
KH ₂ PO ₄	4.3	กรัม

MgCl ₂ .2H ₂ O	0.3	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	กรัม
Glucose	15	กรัม
Trace salt	5	มิลลิลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
Trace salt ประกอบด้วย		
MnCl ₂ .4H ₂ O	1	มิลลิกรัม
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.6	มิลลิกรัม
CaCl ₂ .H ₂ O	2.6	มิลลิกรัม
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6	มิลลิกรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

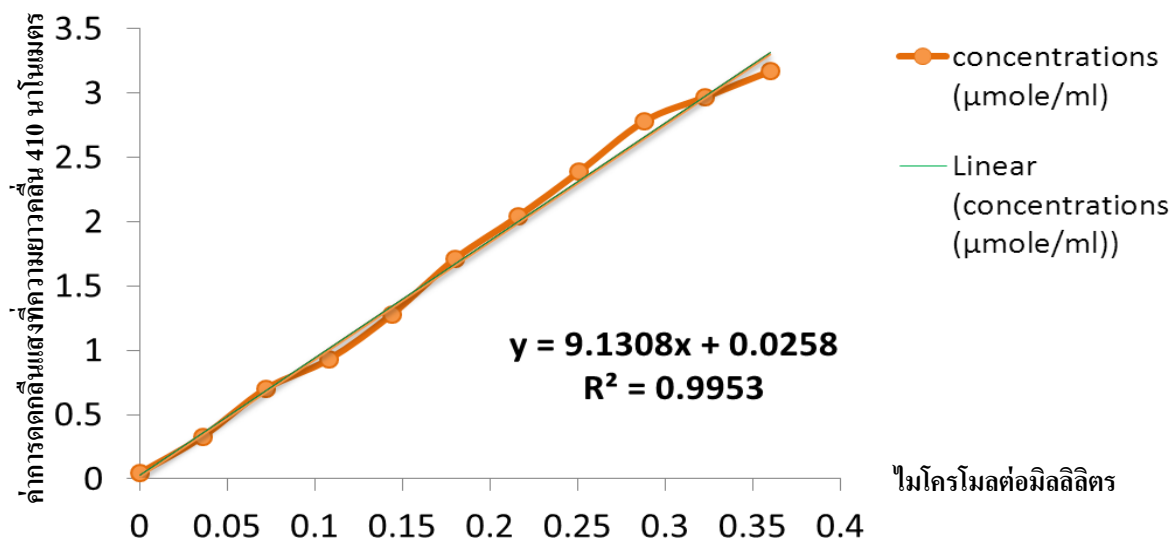
ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม Guaicol 2 mM และ CuSO₄ 0.5 mM

ภาคผนวก ข

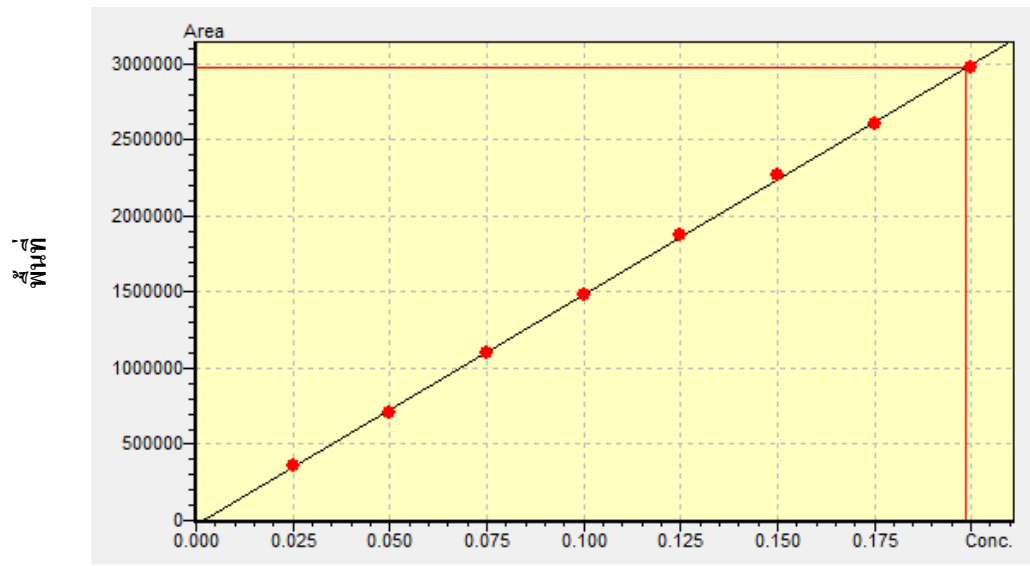
โครมาโตแกรมและกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ 3.15 กราฟมาตรฐาน BSA ที่ปริมาณ โปรตีน 2.5-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

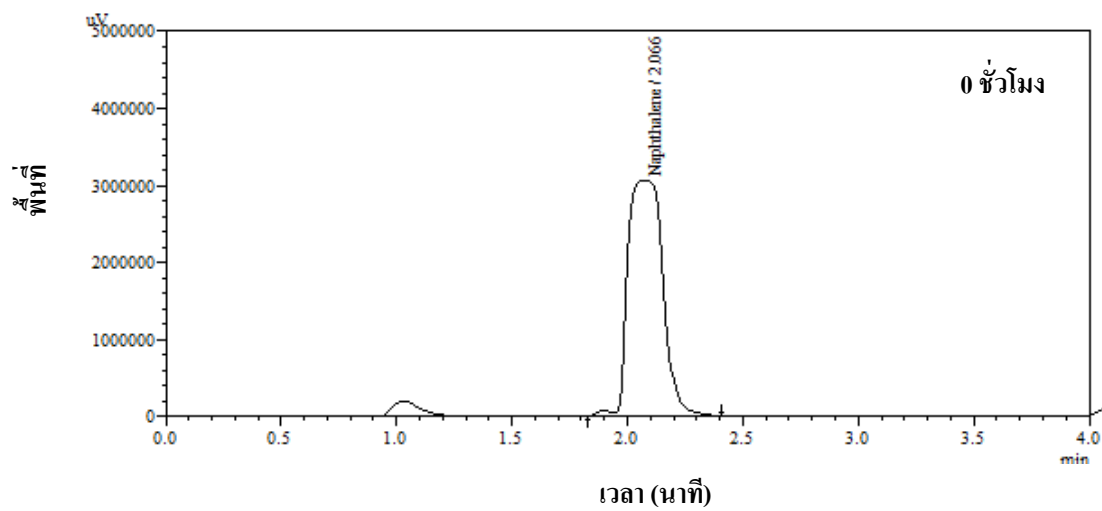


ภาพที่ 3.16 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรเฟนอลปริมาณ 0-0.4 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

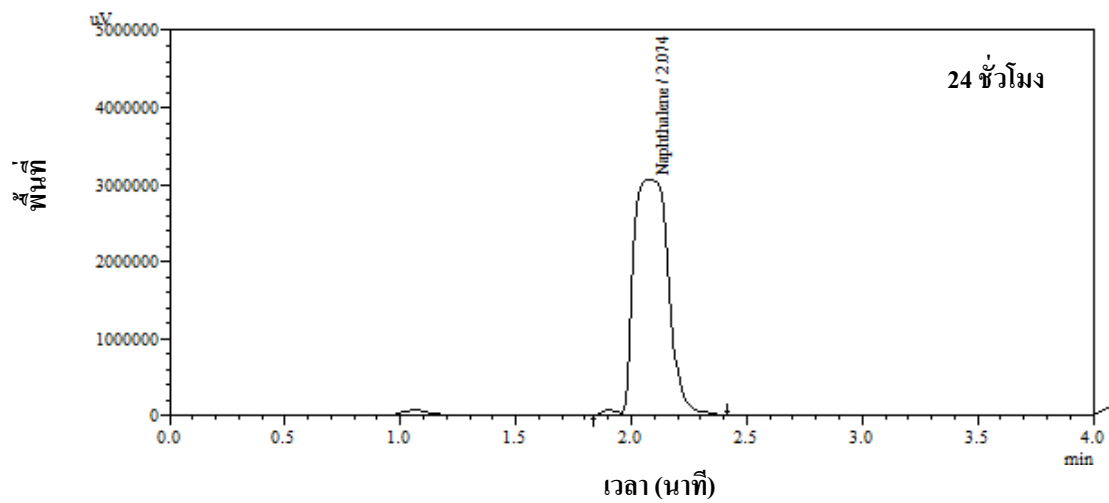


ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)

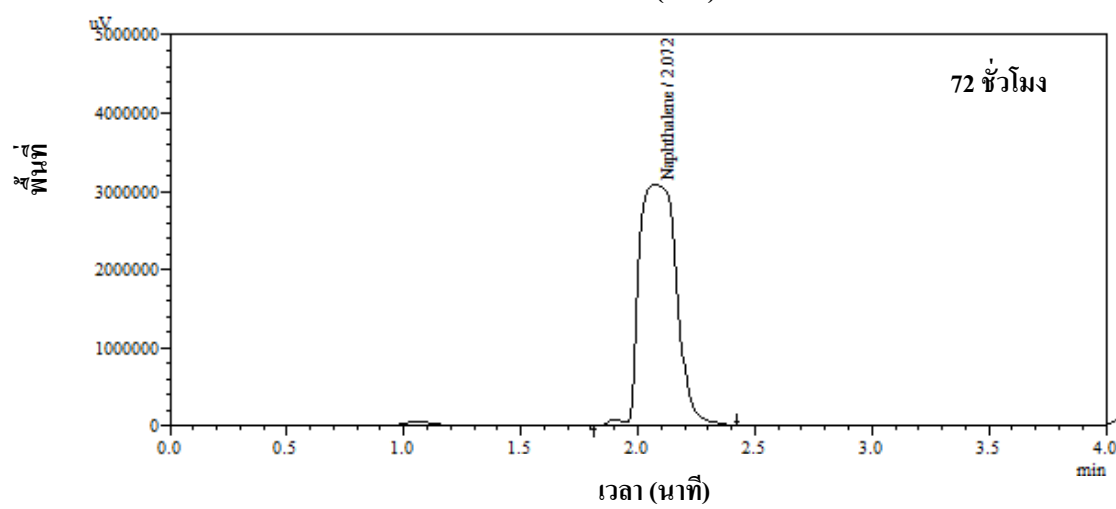
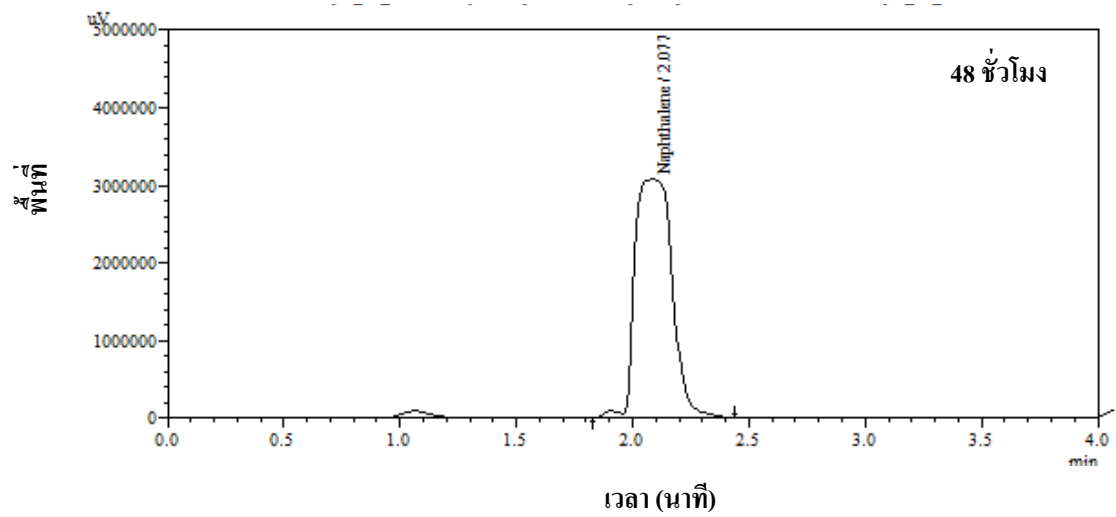
ภาพที่ 3.17 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแนฟทาลีน



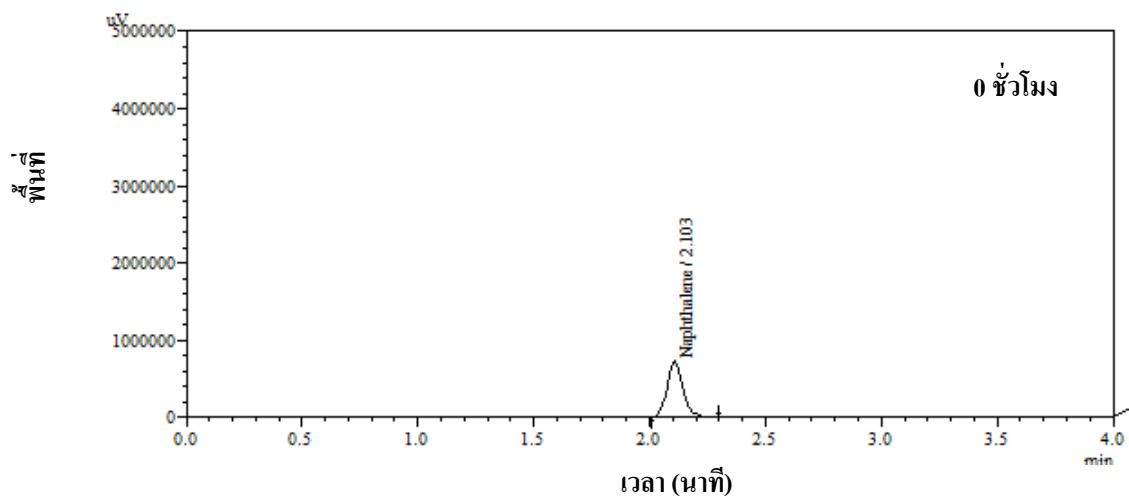
เวลา (นาที)

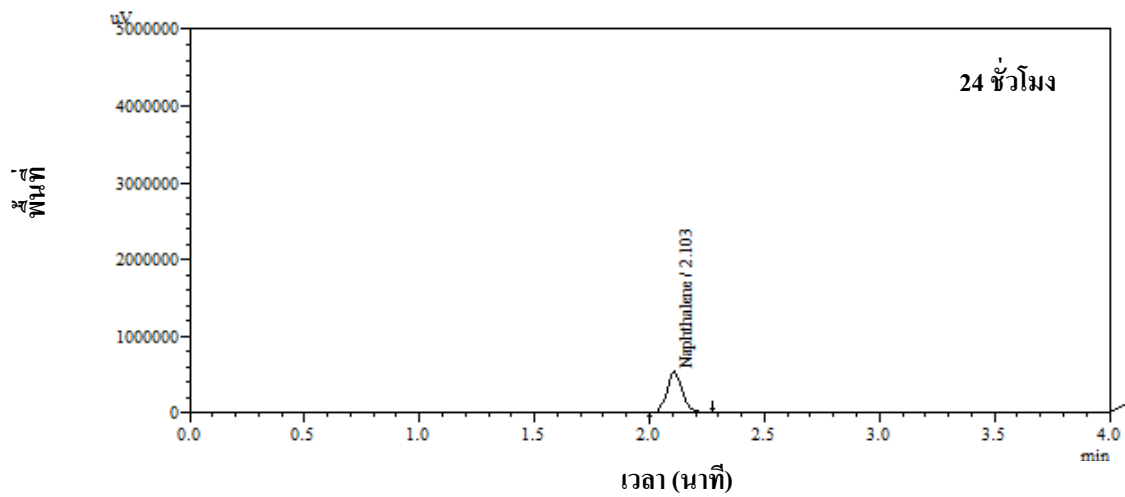


เวลา (นาที)

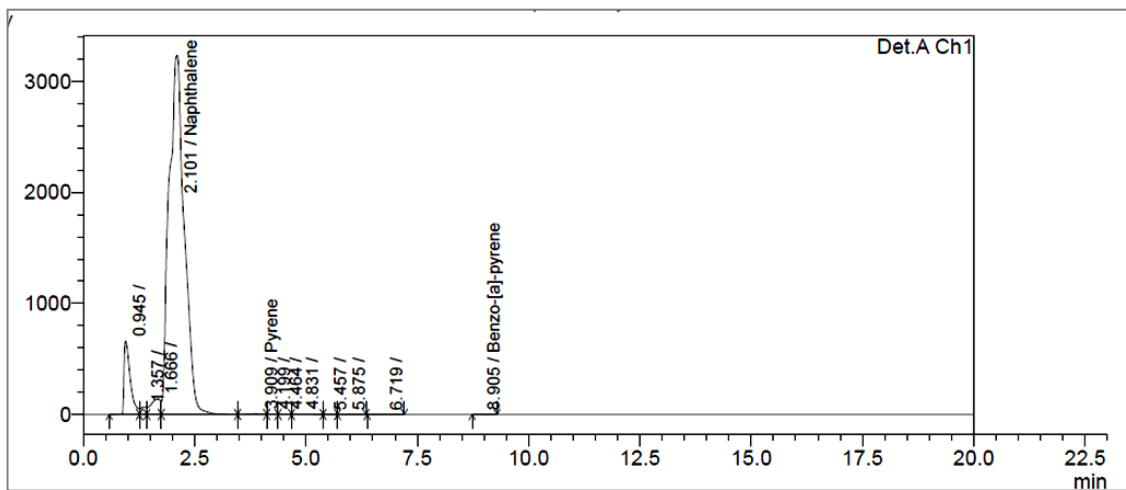


ภาพที่ 3.18 ปริมาณแนฟทาลินที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายด้วยไลเพส

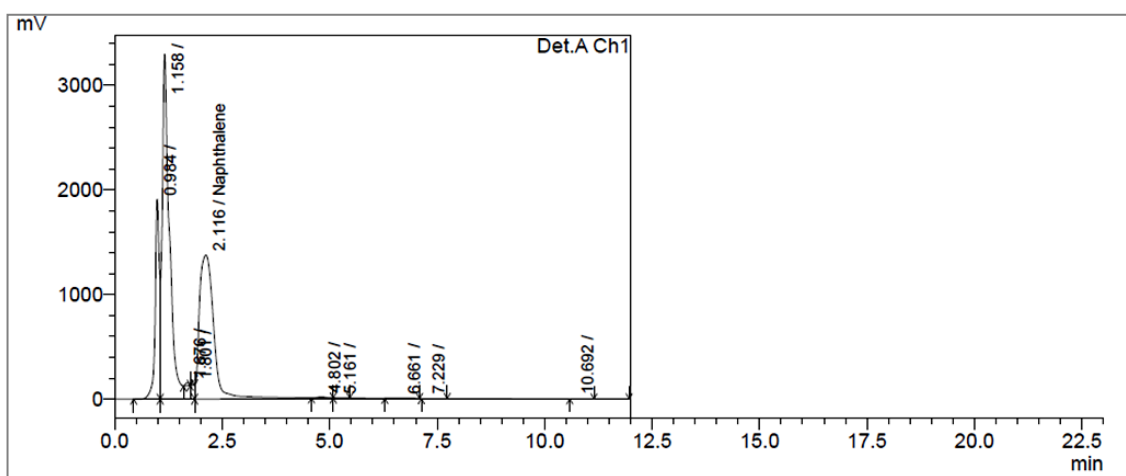




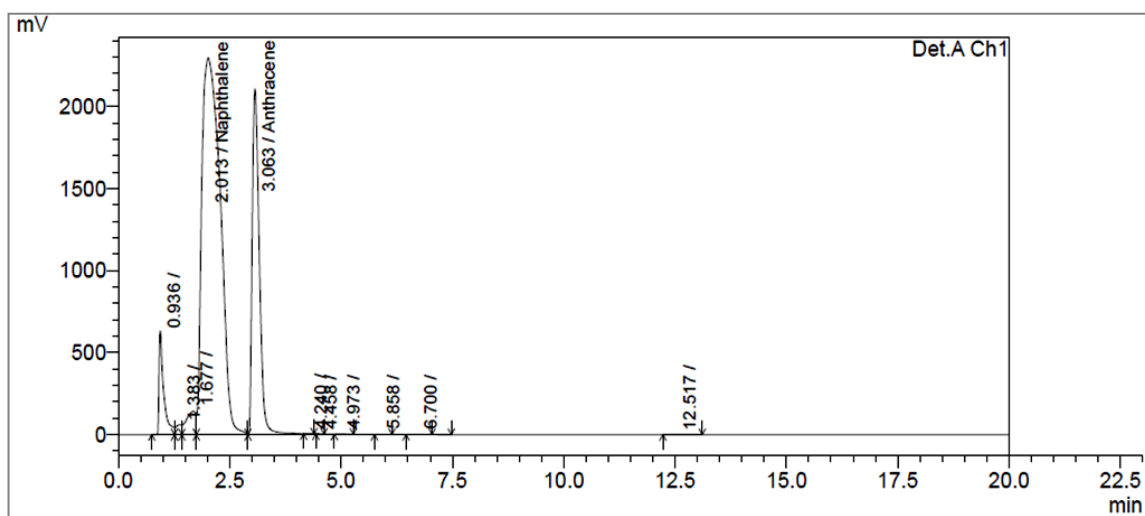
ภาพที่ 3.19 ปริมาณแนฟทาไลน์ที่เหลืออยู่จากการย่อยสลายด้วยแลคเคสทางการค้า



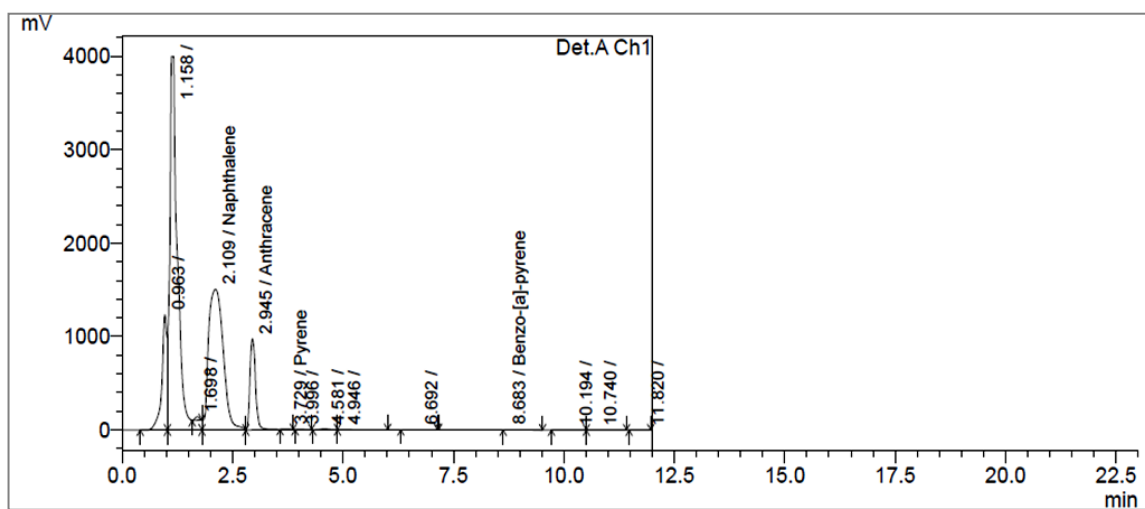
ภาพที่ 3.20 ปริมาณแนฟทาไลน์จากการย่อยด้วยแลคเคสในดินเมื่อเวลาผ่าน 0 วัน



ภาพที่ 3.21 ปริมาณแนฟทาไลน์จากการย่อยด้วยแลคเคสในดินเมื่อเวลาผ่าน 9 วัน



ภาพที่ 3.22 ปริมาณแอนทราซีนจากการย่อยด้วยแลคเคสในดินเมื่อเวลาผ่าน 0 วัน



ภาพที่ 3.23 ปริมาณแอนทราซีนจากการย่อยด้วยแลคเคสในดินเมื่อเวลาผ่าน 9 วัน

ภาคผนวก ค

แลกเคลส



ภาพที่ 3.24 แลกเคลสที่ผลิตได้จาก *Aureobasidium pullulans* ใน Laccase production medium

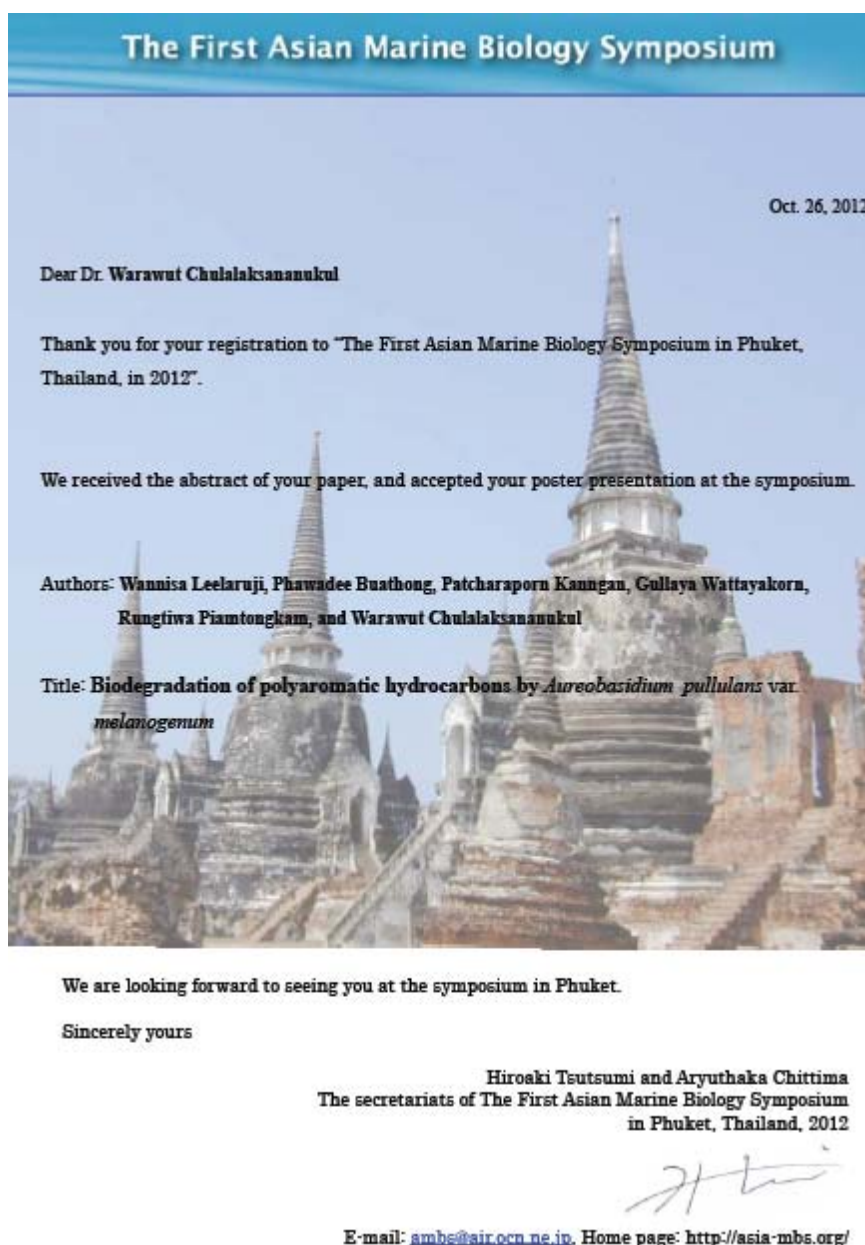


ภาพที่ 3.25 การย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแลกเคลส

ภาคผนวก ง

ผลงานทางวิชาการของโครงการที่เผยแพร่แล้ว

1. เสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง **Biodegradation of Poly-aromatic Hydrocarbons by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*** ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The First Asian Marine Biology Symposium in Phuket, Thailand, December 13 -17, 2012





Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*

Wannisa Leelaruji¹, Phawadee Buathong¹, Patcharaporn Kannan¹, Rungtiwa Piamtongkam², Gullaya Wattayakorn³ and Warawut Chulalaknanakul^{4, 5*}



¹Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand
²Inter-Department of Biotechnology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
³Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand
⁴Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand
⁵Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand
*Corresponding author, e-mail: warawut.c@chula.ac.th



Abstract

One of the major environmental problems today is petroleum hydrocarbon contamination resulting from the activities related to oil spills as well as the petrochemical industry. Microbial degradation is the major and ultimate natural mechanism which one can clean up the petroleum hydrocarbon pollutants from the environment. The objective of this research was to study the polyaromatic hydrocarbons biodegradability by laccase produced by lipolytic yeast, *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*, screened from Sichang Island. The experiments were firstly performed by study the optimal condition for growing the *A. pullulans* and its laccase production. Laccase can be produced from *A. pullulans* by induction with 2 mM guaiacol in growth medium. Biodegradability of naphthalene, anthracene, pyrene and benzo-[a]-pyrene by laccase was then determined. The results revealed that laccase produced by *A. pullulans* can degrade benzo-[a]-pyrene, anthracene, pyrene and naphthalene by 45.33, 38.16, 25.38 and 24.35 percent respectively.

Keywords: lipolytic yeast, laccase, naphthalene, biodegradation

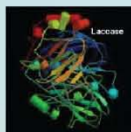
Introduction and Objectives

Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) are a class of persistent organic pollutants which mainly come from incomplete combustion or pyrolysis of fossil fuels or other organic matter (Gao D. et al., 2010). This study focused on four type of PAHs as



Laccase (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) is enzyme that has a potential in toxic material degradation. Laccase can be produced by *A. pullulans* yeast strain (Rich O. J., et al., 2011). In this study, *A. pullulans* was screened from Sichang Island.

Objectives of this study is to test PAHs degradation ability and efficiency of laccase from lipolytic yeast in Laboratory environment and in Sichang island's soil



Results

Figure 1.

PAH Degradation by Laccase at 24 hour

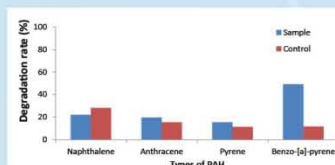


Figure 2.

Remaining naphthalene concentration at different time

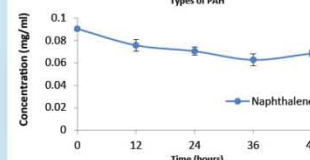


Figure 3.

Remaining anthracene concentration at different time

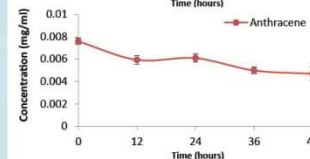


Figure 4.

Remaining pyrene concentration at different time

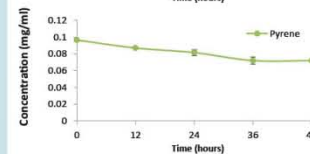
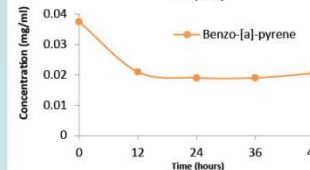
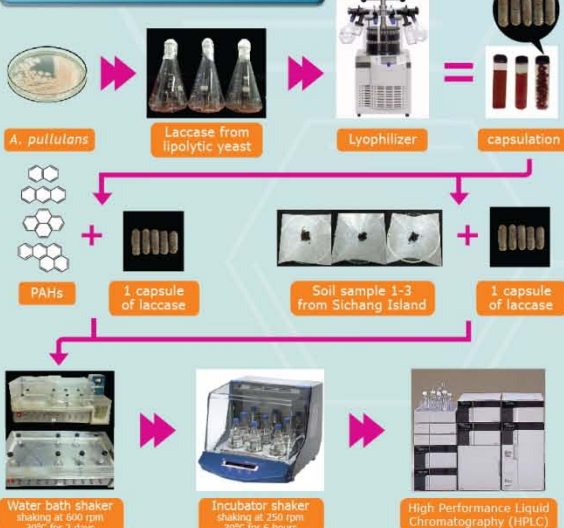


Figure 5.

Remaining benzo-[a]-pyrene concentration at different time



Materials and Methods



Conclusions

One capsule of laccase (0.16 g) has enzyme activity equal to 711 U/ml and PAHs degradation ability as below:

1. Naphthalene (10 mg/ml) was decreased by 24.35%
2. Anthracene (0.908 mg/ml) was decreased by 38.16%
3. Pyrene (0.000135 mg/ml) was decreased by 25.38%
4. Benzo-[a]-pyrene (0.00019 mg/ml) was decreased by 45.33%

However, when testing PAHs degradation ability of laccase from lipolytic yeast by using soil from Sichang island. The result was showed that the laccase from lipolytic yeast can not degraded PAHs in the soil from sichang island.

References:

1. Gao D, Liang H, Du L, Chen J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by white rot-fungus *Pseudotrametes gibosa* isolated from the boreal forest in Notheast China. *African Journal of Biotechnology*. 2010, 9: 6888-6893.
2. Rich O J, Manitchotpitit P, Peterson W S, Leathers D T. Laccase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *RJAS*, 2011, 1: 41-47.

Acknowledgments

This research is part of the project entitled "Knowledge Management for Marine Pollution Abatement and Biodiversity Conservation of Sichang and Sriracha, Chonburi Province on Thailand Coastal Areas" funded by The National Research Council of Thailand (NRCT). Soil samples were gifted from the Aquatic Resources Research Institute (ARRI), Sichang island, Chulalongkorn University.

PROGRAM AND ABSTRACTS

The 1st Asian Marine Biology Symposium

13th-17th December 2012

Cape Panwa Hotel
Phuket, Thailand

Organized by:
Department of Marine Science
Faculty of Fisheries, Kasetsart University

The Japanese Association of Benthology
The Japanese Plankton Society

K-Benthos



**P6-9 Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by
Aureobasidium pullulans var. *melanogenum***

**Wannisa Leelaruji¹⁾, Phawadee Buathong¹⁾, Patcharaporn
Kanngan¹⁾, Gullaya Wattayakorn²⁾, Rungtiwa Piamtongkam³⁾, and
*Warawut Chulalaksananukul^{4, 5)}**

1) Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

2) Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok,
10330, Thailand

3) Inter-Department of Biotechnology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330,
Thailand

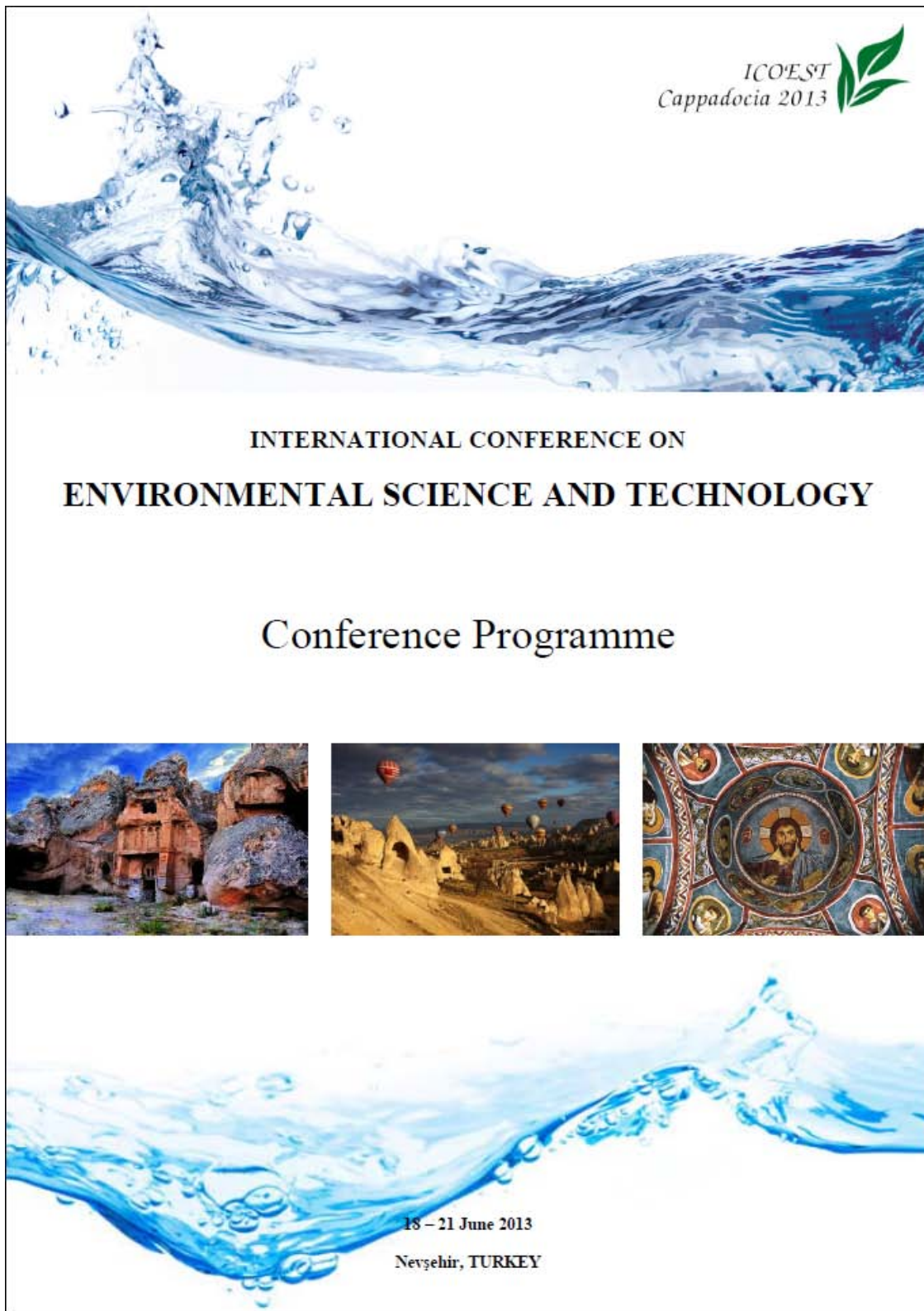
4) Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

5) Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

Abstract: One of the major environmental problems today is petroleum hydrocarbon contamination resulting from the activities related to oil spills as well as the petrochemical industry. Microbial degradation is the major and ultimate natural mechanism which one can clean up the petroleum hydrocarbon pollutants from the environment. The objective of this research was to study the polyaromatic hydrocarbons biodegradability by laccase produced by lipolytic yeast, *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*, screened from Sichang Island. The experiments were firstly performed by study the optimal condition for growing the *A. pullulans* and its laccase production. Laccase can be produced from *A. pullulans* by induction with 2 mM guaiacol in growth medium. Biodegradability of naphthalene by laccase from *A. pullulans* was then determined. The results revealed that laccase from *A. pullulans* can degrade naphthalene about 30 percent in 24 h.

Keywords: biodegradation, laccase, lipolytic yeast, naphthalene,

2. เสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง **Biodegradation of Poly-aromatic Hydrocarbons by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*** ในการประชุม International Conference on Environmental Science and Technology, ICOEST'2013 – CAPPADOCIA Urgup, Turkey, June 18-21, 2013



Biodegradation of poly-aromatic hydrocarbons by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*

Wannisa Leelarujit¹, Phawadee Buathong¹, Patcharaporn Kanngan¹, Rungtiwa Piamtongkam²,
Suphang Chulalaksananukul³, Gullaya Wattayakorn⁴ and Warawut Chulalaksananukul^{5,6*}

¹ Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

² Inter-Department of Biotechnology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

³ Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Mahidol University, Nakornpathom, 73170, Thailand.

⁴ Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

⁵ Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

⁶ Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

(* Corresponding author E-mail: warawut.c@chula.ac.th)



Introduction

Poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) are environmental pollutants in the soil, water and air. They and their derivatives are widespread products of incomplete combustion of organic materials; both from natural combustion, such as forest fires and volcanic eruptions, and also from anthropogenic activities. These compounds are a class of hazardous organic chemicals consisting of two or more fused benzene rings in linear, angular and cluster arrangements.

Biodegradation of PAHs has been performed by fungi, various enzymes from fungi and white rot basidiomycetes. This study was performed in order to investigate the degradation of PAHs using laccase from *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* (Figure 1).

This isolate was obtained from oil-contaminated soil and so was expected to have PAH degradative ability. Laccase enzyme production from *A. pullulans* was induced and applied for degradation the mixture of benzo[a]pyrene, pyrene, anthracene, and naphthalene as model PAHs on varying size and complexity (Figure 2).



Figure 1. PAHs structure

The residual levels of PAHs were followed by HPLC analysis.

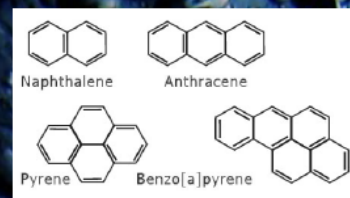


Figure 2. PAHs structure

Results & Discussion

Biodegradation of PAHs by laccase was performed with 1 capsule of lyophilized laccase (0.16 g) with an activity of 711 U/mL. This laccase was added to a mixed solution of naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene at initial concentrations of 90, 7.5, 99 and 37 µg/mL, respectively, and incubated at 30°C with shaking at 150 rpm for 48 h. The degradation curves are shown for each respective PAH in Figure 3 - 6.

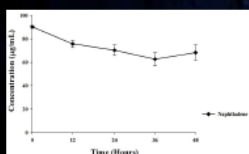


Figure 3. Biodegradation of Naphthalene by laccase

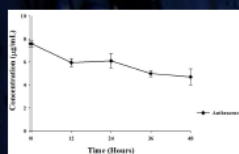


Figure 4. Biodegradation of Anthracene by laccase

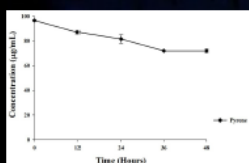


Figure 5. Biodegradation of Pyrene by laccase

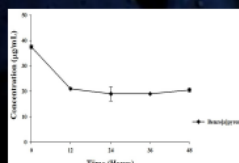


Figure 6. Biodegradation of Benzo[a]pyrene by laccase

After incubation with the laccase for 48 h, the concentration of naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene were all decreased as the incubation time increased to a minimum from 24 h (benzo[a]pyrene) or 36 h (pyrene and naphthalene) onwards, except for anthracene which may not reached completion by the end of the 48 h assay period. At 48 h, the remaining concentrations of the four PAHs were 68, 4.7, 72 and 20 µg/mL for naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene, respectively. Thus, benzo[a]pyrene was the most degradable PAHs, followed by anthracene, pyrene and naphthalene with degradation efficiencies (relative to the initial concentration) of 45.9%, 37.3%, 27.3% and 24.4%, respectively (Figure 7).

In comparison to the commercial laccase preparation, the degradation efficiency of PAHs obtained with the crude laccase preparation from *A. pullulans* var. *melanogenum* was mostly higher, especially for benzo[a]pyrene degradation.

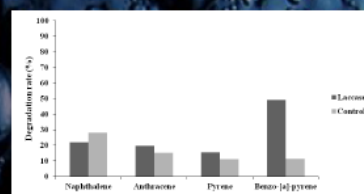


Figure 7. Percentage biodegradation of four poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) using the crude laccase preparation from *A. pullulans* (Laccase) compared to control using commercial laccase (Control).

Conclusions

Laccase was induced by 2 mM of guaiacol and 0.5 mM CuSO₄ in YM media from *A. pullulans* var. *melanogenum*. Its activity of 1 capsule (0.16 g) of lyophilized laccase was 711 U/mL. The biodegradation of a mixture of four different PAHs (90 µg/mL naphthalene, 7.5 µg/mL anthracene, 99 µg/mL pyrene and 37 µg/mL benzo[a]pyrene) by laccase in liquid media occurred within 48 h of incubation without ABTS or HBT with a degradation efficiency for benzo[a]pyrene, pyrene, anthracene and naphthalene of 45.9, 27.3, 37.3 and 24.4%, respectively. Even though the crude laccase preparation from *A. pullulans* could not completely degrade the four tested PAHs under these conditions with a single dose over 48 h, it may potentially be a suitable and promising green method, which may have the potential for environmental performance.

This research was supported by the National Research Council of Thailand (NRCT), the Aquatic Resources Research Institute (ARRI), Sichang island, Chonburi Province, and Biofuel Production by Biocatalyst Research unit, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, THAILAND.

The ICOEST 2013 - Cappadocia

Biodegradation of poly-aromatic hydrocarbons by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*

Wannisa Leelarujij¹, Phawadee Buathong¹, Patcharaporn Kanngan¹, Rungtiwa Piamtongkam², Suphang Chulalakshanukul³, Gullaya Wattayakorn⁴ and Warawut Chulalakshanukul^{5,6*}

¹Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

(E-mail: w.leelarujij@gmail.com, phawadee0210@gmail.com, k.pickpatcha@hotmail.com)

² Inter-Department of Biotechnology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

(E-mail: prungtiwa@gmail.com)

³Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Mahidol University, Nakornpathom, 73170, Thailand.

(E-mail: suphang.chu@mahidol.ac.th)

⁴Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

(E-mail: gullaya@gmail.com)

⁵ Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

⁶Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

(* Corresponding author E-mail: warawut.c@chula.ac.th)

ABSTRACT

Poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of persistent organic pollutants that are resistant to degradation and can remain in the environment for a long time. PAHs contain two or more fused benzene rings and are mainly produced as byproducts of incomplete combustion, such as from fossil fuel burning, forest fires, coal fires or vehicle emissions. Currently, PAHs increasingly cause major environmental problems because of continuing industrial development. Biodegradation by microbes is the major natural mechanism for PAH removal from the environment. The main objective of this research was to study the biodegradation of four types of PAHs (naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene) by laccase produced from the lipolytic yeast, *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*, screened from Sichang Island (Thailand). The optimal condition for growing *A. pullulans* var. *melanogenum* and its laccase production was first evaluated, and revealed that laccase production was induced with 2 mM guaiacol and 0.5 M CuSO₄ in the yeast malt (YM) growth medium. Laccase was then lyophilized and stored in capsule form. The subsequent ability to degrade naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene was determined using high performance liquid chromatography. The results revealed that the laccase activity of one capsule (0.16 g) of lyophilized laccase was 711 U/mL (4.4 U/mg) and could degrade a mixture of benzo[a]pyrene (37 µg/mL), anthracene (7.5 µg/mL), pyrene (99 µg/mL) and naphthalene (90 µg/mL) by 45.9, 37.3, 27.3 and 24.4% respectively.

Keywords: Biodegradation; Laccase; Lipolytic yeast; Poly-aromatic hydrocarbons

1. INTRODUCTION

Poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) are environmental pollutants in the soil, water and air. They and their derivatives are widespread products of incomplete combustion of organic materials; both from natural combustion, such as forest fires and volcanic eruptions, and also from anthropogenic activities [1,2]. These compounds are a class of hazardous organic chemicals consisting of two or more fused benzene rings in linear, angular and cluster arrangements [3,4]. For example, naphthalene is the simplest with two rings and is the most soluble of the PAHs [1]. On the other hand, benzo[a]pyrene, a typical high molecular weight PAHs with five rings, is one of the most recalcitrant and toxic PAHs [5,6]. Recently, benzo[a]pyrene was included as one of 12 target compounds or groups in a new strategy for controlling persistent, bio-accumulative and toxic pollutants [3].

Biodegradation of PAHs has been performed by fungi, various enzymes from fungi and white rot basidiomycetes [7]. *Fusarium* sp. E033, one species of fungi, was shown to be able to degrade 0.4 mM (100 mg/L) benzo[a]pyrene directly [8], whilst fungal laccases from *Trametes versicolor* and *Myceliophthora thermophila* have been shown to be able to oxidize the 12 target aromatic hydrocarbons [3]. Laccase (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2), in the family of blue multi-copper oxidases [9], is a polyphenol oxidase containing four copper atoms in its active site [10] and is capable of oxidizing a wide range of aromatic compounds, with the concomitant reduction of molecular oxygen to water [9]. In addition, laccases can be used in a great variety of process, mainly related to bioremediation, such as pulp delignification, de-colorization and detoxification of textile dyes, as well as for bioremediation of xenobiotic compounds and treatment of wastewater [11].

Aureobasidium pullulans is a ubiquitous, polymorphic and oligotrophic black yeast-like microfungus [12]. It is particularly well known for its biotechnological significance as a producer of the biodegradable extracellular polysaccharide (EPS) pullulan (poly- α -1,6-maltotriose) [13]. This yeast also produces numerous degradative enzymes; including fructofuranosidase, glucoamylase and xylanase. However, laccase production by *A. pullulans* is poorly known [9]. This study was performed in order to investigate the degradation of PAHs using laccase from *A. pullulans* var. *melanogenum* since this isolate was obtained from oil-contaminated soil and so was expected to have PAH degradative ability. Laccase enzyme production from *A. pullulans* was induced and applied for degradation of the mixture of benzo[a]pyrene, pyrene, anthracene, and naphthalene as model PAHs on varying size and complexity. The residual levels of PAHs were followed by HPLC analysis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Microorganism and chemicals

Aureobasidium pullulans was obtained from the Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Chulalongkorn University, Thailand. Benzo[a]pyrene, naphthalene, guaiacol and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) were purchased from Fluka. Anthracene and pyrene were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Culture conditions and enzyme production

The inoculum was grown in yeast malt (YM) broth (3% (w/w) yeast extract, 3% (w/v) malt extract, 5% (w/v) peptone, 10% (w/v) glucose) at 30 °C for 48 h with shaking at 200 rpm. This culture was then inoculated at 1% (v/v) into laccase production medium (2 mM of guaiacol and 0.5 mM CuSO₄ in YM) as described previously [14]. Growth of *A. pullulans* was measured over 120 h of culture in terms of the culture turbidity using the absorption at a wavelength of 600 nm and Colony forming units (CFUs/mL) was determined by spread plate technique and dilutes it to count the number of cell between 30-300 colonies. The culture was centrifuged at

10,000 rpm, 4 °C for 15 min, and the supernatant harvested as a crude laccase preparation, lyophilized and stored in capsules.

2.3. Biodegradation of PAHs

One capsule of laccase (1.6g), found to contain 711unit (U)/mL of enzyme activity, enzyme activity was determined by enzyme activity assays[15]. Capsule of laccase was added to a mixture of benzo[a]pyrene, pyrene, anthracene, and naphthalene at an initial concentration of 37, 99, 7.5 and 90 µg/mL, respectively. Then, 5% (v/v) of Tween 80 and 100 mM acetate buffer (pH 4.5) were added and the mixture was incubated at 30 °C for 48 h with shaking at 150 rpm. Samples were collected every 12 h and extracted with 2 volumes of hexane. After that, 0.75 volumes of 15% (v/v) triton X 100 was added to the solution and shaken for 6 h at 200 rpm before analysis as previously described [6].

2.4. Analysis of PAHs

Residual PAH levels in the extracts were analyzed by HPLC using a model Shimadzu LC-20A series connected to an Inertsil ODS-P HP column (0.46 mm in diameter and 250 mm in length) and equipped with UV detector. The mobile phase was an 80:20 (v/v) ratio acetonitrile:water mixture, run at a flow rate of 1.5 mL/min.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Growth of *A. pullulans* var. *melanogenum*

Growth of *A. pullulans* var. *melanogenum* was measured over 120 h when incubated in YM medium at 30 °C with shaking at 200 rpm. Under these conditions, the growth of *A. pullulans* rapidly increased after 10 h of incubation and reached stationary phase within 48–72 h of incubation. The maximum cell density was obtained at 48 h and so this culture cell time was selected for further cultivation in YM medium supplemented with 2 mM guaiacol and 0.5 mM CuSO₄ to induce laccase production. After that, the crude extracellular enzyme preparation was evaluated for the ability to degrade a mixture of four different PAHs.

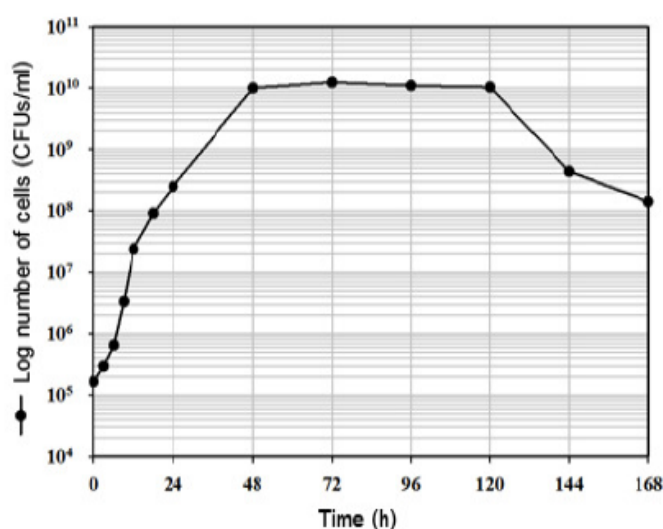
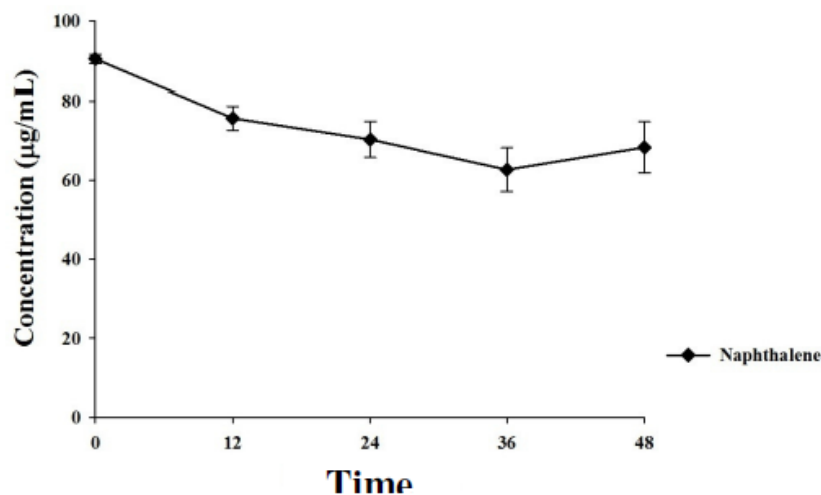


Figure 1. Growth (as colony forming units (CFU)/mL) of *A. pullulans* in YM medium, incubated at 30 °C, 200 rpm for 120 h. Data are shown as the mean $\pm$ 1 SD, derived from 3 independent trials.

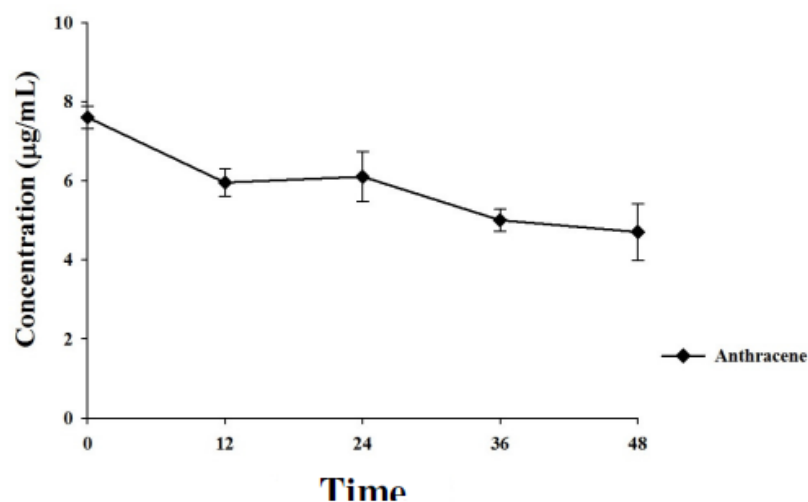
3.2. Biodegradation of PAHs using the crude laccase preparation from *A. pullulans*

Biodegradation of PAHs by laccase was performed with 1 capsule of lyophilized laccase (0.16 g) with an activity of 711 U/mL. This laccase was added to a mixed solution of naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene at initial concentrations of 90, 7.5, 99 and 37 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and incubated at 30 °C with shaking at 150 rpm for 48 h. The degradation curves are shown for each respective PAH in Figure 2.

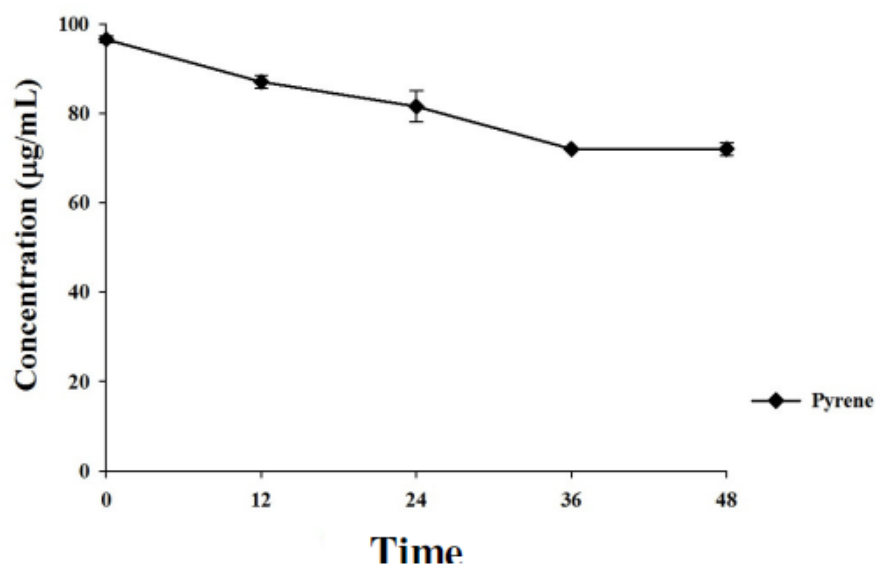
After incubation with the laccase for 48 h, the concentration of naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene were all decreased as the incubation time increased to a minimum from 24 h (benzo[a]pyrene) or 36 h (pyrene and naphthalene) onwards, except for anthracene which may not have reached completion by the end of the 48 h assay period. At 48 h, the remaining concentrations of the four PAHs were 68, 4.7, 72 and 20 $\mu\text{g/mL}$ for naphthalene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene, respectively. Thus, benzo[a]pyrene was the most degradable PAHs, followed by anthracene, pyrene and naphthalene with degradation efficiencies (relative to the initial concentration) of 45.9%, 37.3%, 27.3% and 24.4%, respectively.



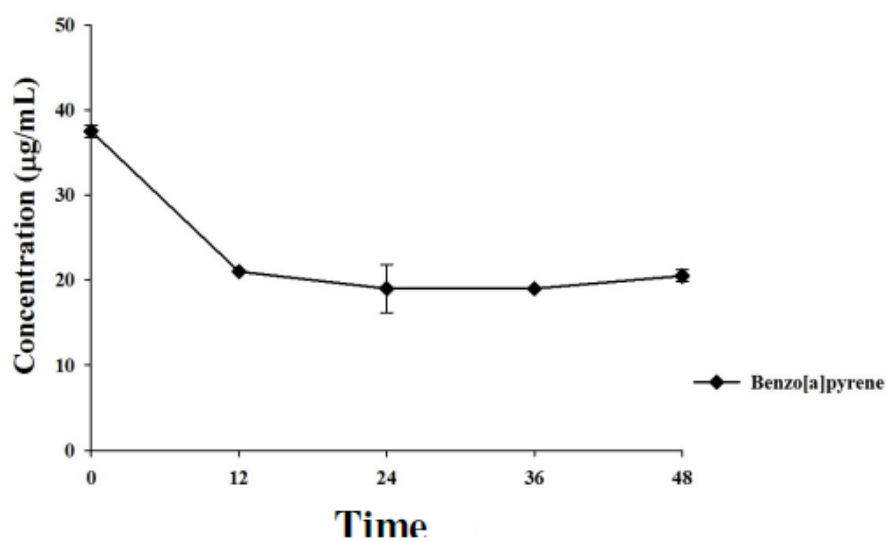
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 2. Biodegradation of poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) by laccase showing the residual concentration over time of: (a) naphthalene, (b) anthracene, (c) pyrene, and (d) benzo[a]pyrene. Data are shown as the mean $\pm$ 1 SD, derived from 3 independent trials.

In comparison to the commercial laccase preparation, the degradation efficiency of PAHs obtained with the crude laccase preparation from *A. pullulans* var. *melanogenum* was mostly higher, especially for benzo[a]pyrene degradation.

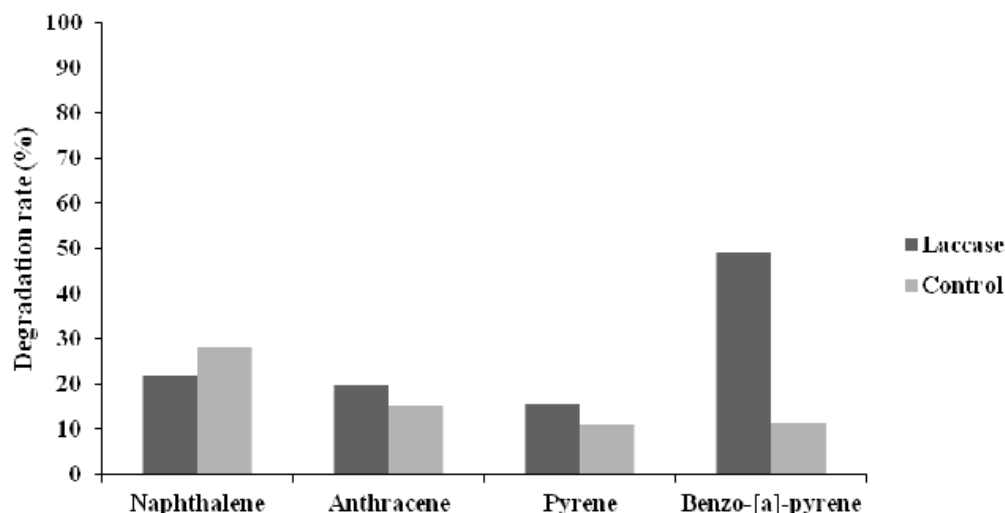


Figure 3. Percentage biodegradation of four poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) using the crude laccase preparation from *A. pullulans* (Laccase) compared to control using commercial laccase (Control). Data are shown as the mean $\pm$ 1 SD, derived from 3 independent trials. Means within each pair with a different lowercase letter are significantly different ($P < 0.05$; Mann-Whitney U test)

This result was similar to that previously reported [5], where laccase was shown to efficiently remove (degrade) aged anthracene, benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene from contaminated soil. The specificity of laccase catalysis was proposed to be related to the ionization potentials (IPs) of the substrates [5]. Moreover, the laccase-catalysed oxidation process was enhanced when adding certain low molecular weight compounds as mediators, such as ABTS. A suitable mediator would form an intermediate with high activity that could transfer electrons from oxygen molecules to the substrate and so enhance the substrate degradation [16]. Previously, it was reported that degradation of phenanthrene with purified laccase from *T. versicolor* 951022 did not occur, but did when ABTS or HBT was added into the reaction mixture [17]. In the presence of 5 mM ABTS or HBT, laccase at 5 U/mL could oxidize 40% and 30% of a 20 mg/L phenanthrene solution in 2 h, respectively. In contrast, other PAHs, such as anthracene, fluorene, benzo[a]pyrene and perylene, were almost completely removed by the laccase from *T. versicolor* after the addition of HBT [17].

4. CONCLUSION

Laccase was induced by 2 mM of guaiacol and 0.5 mM CuSO_4 in YM media from *A. pullulans* var. *melanogenum*. Its activity of 1 capsule (0.16 g) of lyophilized laccase was 711 U/mL. The biodegradation of a mixture of four different PAHs (90 $\mu\text{g/mL}$ naphthalene, 7.5 $\mu\text{g/mL}$ anthracene, 99 $\mu\text{g/mL}$ pyrene and 37 $\mu\text{g/mL}$ benzo[a]pyrene) by laccase in liquid media occurred within 48 h of incubation without ABTS or HBT with a degradation efficiency for benzo[a]pyrene, pyrene, anthracene and naphthalene of 45.9, 27.3, 37.3 and 24.4%, respectively.

Even though the crude laccase preparation from *A. pullulans* could not completely degrade the four tested PAHs under these conditions with a single dose over 48 h, it may potentially be a suitable and promising green method, which may have the potential for environmental performance.

ACKNOWLEDGMENTS

This research is part of the project entitled “Knowledge Management for Marine Pollution

Abatement and Biodiversity Conservation of Sichang and Sriracha, Chonburi Province on Thailand Coastal Areas” funded by The National Research Council of Thailand (NRCT). Soil samples were gifted from the Aquatic Resources Research Institute (ARRI), Sichang Island, Chulalongkorn University.

REFERENCES

- [1] A.Mrozik, Z. Piotrowska-Seget and S. Labuzek, 2003. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*. 12 (1) 15 – 25.
- [2] S. Lundstedt, 2003. *Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes*, PhD Thesis, Department of environmental and toxicological chemistry, University of Amsterdam, The Netherlands.
- [3] M. Alcalde, T. Bulter and F.H. Arnold, 2002. Colorimetric assay for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. *Journal of Biomolecular Screening*. 7 547 – 553.
- [4] K. Juckpech, O. Pinyakong and P. Rerngsamran, 2012. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by newly isolated *Curvularia* sp. S5, and *Phanerochaete* sp. T20. *ScienceAsia*. 38 147 – 156.
- [5] X. Li, X. Lin, R. Yin, Y. Wu, H. Chu, J. Zeng and T. Yang, 2010. Optimization of laccase-mediated benzo[a]pyrene oxidation and the bioremediation application in aged polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soil. *Journal of Health Science*. 56 (5) 534 – 540.
- [6] E. Luepromchai, W. Lertthamrongsak, P. Pinphanichakarn, S. Thaniyavarn, K. Pattaragulwanit and K. Juntongjin, 2007. Biodegradation of PAHs in petroleum-contaminated soil using tamarind leaves as microbial inoculums. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 29 (2) 515 – 527.
- [7] A.I. Canas, M. Alcalde, F. Plou, M.J. Martinez, A.T. Martinez and S. Camarero, 2007. Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environmental Science and Technology*. 41 (8) 2964 – 2971.
- [8] S. Chulalaksananukul, G.M. Gadd, P. Sangvanich, P. Sihanonth, J. Piapukiew and A.S. Vangnai, 2006. Biodegradation of benzo[a]pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 262 99 – 106.
- [9] Y.Z. Xiao, Y.Z. Hong, J.F. Li, J. Hang, P.G. Tong, W. Fang and C.Z. Zhou, 2006. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 71 493 – 501.
- [10] J.O. Rich, P. Manitchotpisit, S.W. Peterson and T.D. Leathers, 2011. Laccase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *Rangsit Journal of Arts and Sciences*. 1 (1) 41 – 47.
- [11] L.C. Octavio, P.P.M.C. Irma, B.R.J. Ricardo and V.O. Francisco, 2006. Laccases. In: *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. R.G. Guevara-Gonzalez, and I. Torres-Pacheco (Eds.). Departamento de Ingenieria Bioquimica, Instituto Tecnológico de Celaya, Kerala, India, ISBN: 81-7736-269-0. pp: 323-340.

- [12] R. Gaur, R. Singh, M. Gupta and M. K. Gaur, 2010. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *African Journal of Biotechnology*. 9 (47) 7989 – 7997.
- [13] P. Zalar, C. Gostinčar, G.S. de Hoog, V. Uršič, M. Sudhadham and N. Gunde-Cimerman, 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*. 61 21–38.
- [14] M. Theerachai, S. Morel, D. Guieysse, M. Remaud-Simeon and W. Chulalaksananukul, 2012. Comparison of synthetic dye decolorization by whole cells and a laccase enriched extract from *Trametes versicolor* DSM11269. *African Journal of Biotechnology*. 11 (8) 1964 – 1969.
- [15] A. Li, Y. Zhu, L. Xu, W. Zhu, and X. Tian, 2008. Comparative study on the determination of assay for laccase of *Trametes* sp. *African Journal Biochemistry Research*. 2 181-183.
- [16] D. Gao, H. Liang, L. Du and J. Chen, 2010. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by white rot-fungus *Pseudotrametes gibbosa* isolated from the boreal forest in Northeast China. *African Journal of Biotechnology*. 9 (41) 6888 – 6893.
- [17] M.-J. Han, H.-T. Choi and H.-G. Song, 2004. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *The Journal of Microbiology*. 42 (2) 94 – 98.

บทที่ 4

โครงการที่ 3: การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแบคทีเรียดีไนทรีไฟเออร์

Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons by Denitrifying Bacteria

โดย

ผศ. ดร.สุภางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล และดร. ชมกฤษ วิรุณานนท์

บทคัดย่อ

การคัดแยกจุลินทรีย์ชนิดดีไนทรีไฟเออร์จากดินตะกอนใต้ทะเลบริเวณเกาะสีชัง จังหวัด ชลบุรี จำนวน 26 ตัวอย่าง พบจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีส่วนประกอบของ PAHs (Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene) ความเข้มข้น 200 ppm ในสภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งถูกคัดแยกมา สกัด จีโนมิกดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ 16S rDNA รวมถึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บน 16S rDNA เพื่อ ระบุชนิด และทำการทดสอบทางชีวเคมี ผลการวิจัยพบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถคัดแยกจากตะกอนดินใต้ทะเล มี 63 ไอโซเลต มี 8 ไอโซเลตที่พบใน 5 สถานี (สถานีที่ 2, 7, 9, 12, 15) คือ *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Proteus mirabilis* และ *Enterobacter asburiae* จัดเป็นดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลต โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับฐานข้อมูล Genbank 96% และมีการประเมินประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบPAHs ทั้ง 4 ชนิดคือ Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน จุลินทรีย์ทั้ง 8 ไอโซเลตสามารถย่อยสลาย สารประกอบPAHs ที่มีจำนวนวงเบนซินต่างกัน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ppm ได้ ในปริมาณที่แตกต่างกันเมื่อใส่เชื้อดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรีย ทั้งนี้โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ ใส่ดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรีย ซึ่งไม่พบการลดลงของสารประกอบPAHs ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า ดีไนทรีไฟเออร์ แบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวน องค์ประกอบของวงเบนซินต่างกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะ Naphthalene ซึ่งเป็นสารประกอบ PAHs ตัวที่เล็กที่สุด ดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียทุกตัวสามารถย่อยสลายได้มากกว่า 60% ส่วน pyrene พบดี ไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียบางตัวที่สามารถย่อยสลายได้ประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 50% ถึง 60% คือ *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus tequilensis*, และ *Bacillus subtilis* สำหรับ Benzo[a]pyrene นั้น มีดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียชนิด *Proteus mirabilis* และ *Paenibacillus macerans* ที่มีประสิทธิภาพสามารถย่อย สลายได้ 50% และ 60%ตามลำดับ ส่วน Phenanthrene นั้นมีดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรีย คือ *Proteus mirabilis* ที่ มีความสามารถในการย่อยสลายได้ 50% ส่วนดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียตัวอื่นๆ พบความสามารถในการย่อย สลายได้น้อยกว่า 50%

คำสำคัญ: ดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรีย โพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน การย่อยสลายทางชีวภาพ

Abstract

Denitrifying bacteria were screened from 26 marine sediments collected from Sichang Island, Chonburi province. The anaerobic bacteria that grown on 200 ppm PAHs (Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene and Benzo[a]pyrene) supplemented media were selected for further genomic identification. The genetical identification of bacteria was performed by using 16S rRNA gene sequence comparison then using BLASTn to search the bacterial database and identifying the species that closely matches their sequence. In this study, 8 of 63 bacterial isolates screened from marine sediments in station 2, 7, 9, 12, 15 could be identified as species of *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter asburiae*. All of them are denitrifying bacteria. The PAH degrading anaerobe isolations were identified closed to GenBank database above 96%. Furthermore, the degradation efficiency was determined for 4 PAHs (Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene and Benzo[a]pyrene) by HPLC technique. All 8 bacterial isolates showed different ability in degrading different PAH compounds, at initial concentration of 200 ppm, after incubation for 16 days. Naphthalene, the smallest PAHs, was found to be degraded more than 60% by all denitrifying bacteria under studied. Pyrene was degraded in the range of 50-60% by some of the denitrifying bacteria which were *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus tequilensis* and *Bacillus subtilis*. Denitrifying bacteria in the species of *Proteus mirabilis* and *Paenibacillus macerans* could degrade benzo[a]pyrene at the efficiency of 50% and 60%, respectively. Phenanthrene was decomposed by *Proteus mirabilis* at the degradation ability of 50% while the others denitrifying bacteria had lower than 50% degradation efficiency.

Keywords: denitrifying bacteria, polyaromatic hydrocarbons, biodegradation

4.1 บทนำ

4.1.1 ความสำคัญและที่มาในการวิจัย

สารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; PAHs) เป็นกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สาร PAHs เป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม เนื่องจากส่วนใหญ่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ ทำให้ยากแก่การกำจัดและยังมีความเป็นพิษสูง (Kanaly and Harayama, 2000) PAHs เป็นองค์ประกอบที่พบได้ในน้ำมันดิบ ถ่านหิน และสามารถเกิดขึ้นเองได้ตามธรรมชาติจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของอินทรีย์สาร นอกจากนี้ยังเป็นผลผลิตพลอยได้จากระบวนการเคมีที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม เช่น การผลิตสีพลาสติก สารปราบศัตรูพืช รวมไปถึงยาบางชนิด ดังนั้นการปนเปื้อนของ PAHs ในสิ่งแวดล้อมจึงเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ ทั้งจากไฟฟ้า ท่อไอเสียรถยนต์ น้ำทิ้งจากบ้านเรือนและโรงงานอุตสาหกรรม กระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ เหมืองถ่านหิน รวมไปถึงการอับปางและรั่วไหลจากเรือบรรทุกน้ำมันสู่ทะเล และด้วยคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้น้อย (hydrophobicity) และ electrochemical stability (Harvey, 1997) ที่มีสัมพันธ์กับขนาดโมเลกุลและจำนวนวงเบนซีน ทำให้ PAHs มีช่วงครึ่งชีวิต (half-life) ในสิ่งแวดล้อมที่ยาวนานขึ้น ตัวอย่างเช่น Phenanthrene ที่มีวงเบนซีนเป็นองค์ประกอบ 3 วง มีช่วงครึ่งชีวิตอยู่ที่ 16–26 วัน ในขณะที่ Benzo[a]pyrene ซึ่งมีวงเบนซีน 5 วงเป็นองค์ประกอบมีช่วงครึ่งชีวิตอยู่ที่ 229–1,400 วัน หรือมากกว่า (Shuttleworth, 1995)

กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) เป็นกระบวนการหนึ่งที่มีความสนใจเพื่อนำมาใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอนในทะเล (Head et al., 1999) เนื่องจากการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน หรือโลหะหนักต่างๆ ทำให้สารเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ไม่เป็นอันตราย หรือก่อปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าวิธีการอื่นๆ จึงมีแนวโน้มในการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์ หรือดีไนทริไฟอิงแบคทีเรีย

ดีไนทริไฟอิงแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการรีดิวซ์สารประกอบไนเตรตให้อยู่ในรูปของก๊าซไนโตรเจนได้ พบได้ทั้งในแบคทีเรียและรา และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน แบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์นับเป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจจากคุณลักษณะความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายของค์ประกอบสารเคมีชนิดไนเตรตได้ จุลินทรีย์นี้เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะแวดล้อมกึ่งไร้ออกซิเจน ซึ่งสามารถใช้ทั้งออกซิเจนและไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายที่เกี่ยวข้องกับกลไกการย่อยสลายและการแตกตัวของสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนไปเป็นสารที่มีสภาพความเป็นพิษลดลงได้ (Roger, 1982)

การศึกษาและแยกชนิดของแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการบำบัดน้ำทิ้ง (สิรินันท์, 2552) ซึ่งมีการปนเปื้อนน้ำมันหรือสารไฮโดรคาร์บอน จึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะเพื่อการกำจัดน้ำมันดิบ (Crude oil) ซึ่งรั่วไหลจากเรือโดยสารหรือเรือประมง รวมทั้งในอุตสาหกรรมเคมีบางประเภท งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการคัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์และมี

คุณสมบัติในการดูดซึมหรือกำจัดสารประกอบโพลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ดี อันจะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้เพื่อรักษาสภาพแวดล้อมต่อไป

โดยธรรมชาติ ปฏิกิริยาระหว่างแสงแดดและสารไฮโดรคาร์บอน จะช่วยลดความเป็นพิษของสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอนได้ ส่วนในทางชีวภาพ สามารถใช้จุลินทรีย์ซึ่งมีความสามารถในการใช้สารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอนในการเจริญเติบโตและเปลี่ยนรูปไปเป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นซึ่งลดความเป็นพิษลง ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาเพื่อคัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์ดังกล่าวจากดินตะกอนบริเวณพื้นที่ชายฝั่งเกาะสีชังที่อาจปนเปื้อนน้ำมันจากเรือประมง เพื่อประเมินความสามารถในการนำไปใช้ในกระบวนการบำบัดสารประกอบโพลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมต่อไป

4.1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

คัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์จากตะกอนดินที่มีคุณสมบัติในการกำจัดสารประกอบประเภทโพลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะไร้ออกซิเจน

4.1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- คัดแยกแบคทีเรียดีไนทริไฟเออร์ที่สามารถเจริญในอาหารที่มีสารประกอบโพลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน
- ศึกษาคุณลักษณะเฉพาะความสามารถในการรีดิวซ์ nitrite-nitrate ของจุลินทรีย์ที่คัดไว้
- ศึกษาคุณลักษณะเฉพาะทางพันธุศาสตร์ของ nitrite reductase gene ของจุลินทรีย์ที่คัดไว้
- ทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการย่อยสลายโพลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

4.1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

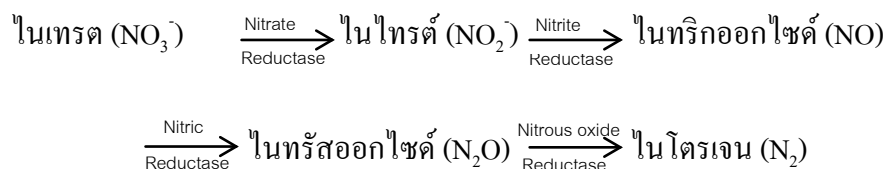
ได้สายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์ที่มีความสามารถย่อยสารโพลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์ในตะกอนดินทะเลที่ปนเปื้อนสารโพลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

4.2 ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรม

4.2.1 กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (Denitrification)

กระบวนการดีไนทริฟิเคชันเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญ มีผลทางนิเวศวิทยาทำให้เกิดการสูญเสียไนโตรเจนจากสิ่งแวดล้อมทางบกและทางน้ำ และส่งผลทางชีวภาพให้ได้พลังงานออกมาในรูป ATP จากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน โดยสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์จะถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้แก่ไน

เทรต ทำให้ไนเตรดถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไตรต์ ซึ่งจะกลายมาเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวใหม่ และถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นไนตริกออกไซด์ ไนตรัสออกไซด์ และก๊าซไนโตรเจนในที่สุด กระบวนการนี้เป็นขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) (Delwiche, 1981) สารประกอบออกไซด์ของไนโตรเจน (Nitrogen oxide) ต่างๆที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในระหว่างกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน จะทำให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันขึ้น ดังสมการ (Payne, 1973)



ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการดีไนตริฟิเคชันถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทส (Nitrogen oxide reductase) ต่างชนิดกัน ซึ่งแต่ละชนิดจะทำหน้าที่ถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากกระบวนการไปสู่วัสดุกลางที่เหมาะสมแล้วให้พลังงานออกมา ดังนั้นถ้าในสิ่งแวดล้อมมีสารไนโตรเจนออกไซด์ที่เป็นตัวกลางของกระบวนการดีไนตริฟิเคชันอยู่ แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทสเพียง 1 ชนิดจะสามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้ตัวกลางที่เหมาะสม ทำให้เกิดขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการดีไนตริฟิเคชันขึ้น (Delwiche, 1981)

4.2.2. ดีไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria) หรือ ดีไนตริไฟเออร์ (Denitrifier)

เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความหลากหลายทางสรีรวิทยา (Physiology) และอนุกรมวิธาน (Taxonomy) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ต่างกัน (Bitton, 1999) โดยทั่วไปแบคทีเรียสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ตามแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่ใช้ ดังสรุปในตารางที่ 2-1

แบคทีเรียที่พบในกระบวนการดีไนตริฟิเคชันเป็นพวกแอโรบิกออโทโทรฟ (aerobic autotrophs) หรือแอโรบิกเฮเทอโรโทรฟ (aerobic heterotrophs) ที่สามารถสลับการเจริญไปเป็นแบบไร้ออกซิเจนได้ เมื่อมีการใช้ในเทรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในภาวะที่ขาดออกซิเจนแบคทีเรียที่สามารถหายใจโดยไม่ใช้ออกซิเจนได้เท่านั้นที่จะทำให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันขึ้น ในทางทฤษฎีดีไนตริไฟอิงแบคทีเรียควรเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันครบทุกขั้นตอน ตั้งแต่รีดิวซ์ไนเตรตจนได้ก๊าซไนโตรเจนเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดเพียงขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งหรือบางขั้นตอนของกระบวนการก็ทำให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันทั้งหมดขึ้นได้ ดังนั้นในทางนิเวศวิทยาแบคทีเรียใดๆที่ทำให้เกิดเพียงขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการ ก็สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันขึ้นได้ เรียกแบคทีเรียเหล่านั้นว่า ดีไนตริไฟอิงแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการขึ้นบางส่วน (partial denitrifying bacteria) (Bitton, 1999)

ตารางที่ 4.1 การแบ่งประเภทของแบคทีเรีย (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544; กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2545)

ประเภทของแบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอน (Carbon source)	แหล่งพลังงาน (Energy source)
Heterotrophs (Organotrophs) -Photoheterotrophs -Chemoheterotrophs	สารอินทรีย์ สารอินทรีย์	แสง ปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน ของสารอินทรีย์
Autotrophs (Lithotrophs) -Photoautotrophs -Chemoautotrophs	สารอนินทรีย์ (CO ₂) สารอนินทรีย์ (CO ₂)	แสง ปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน ของสารอนินทรีย์

กระบวนการดีไนทริฟิเคชันแบบบางส่วน (Partial denitrification) เกิดขึ้นจากสาเหตุทาง สรีรวิทยา หรือทางพันธุกรรม ดังต่อไปนี้คือ

1. ตัวกลางในกระบวนการ เมื่อไม่มีไนเตรตอยู่ด้วย
2. ภาวะทางสิ่งแวดล้อม เช่น ความเข้มข้นของออกซิเจน ค่าความดันกรด-ด่างหรือความเข้มข้นของตัวกลางในกระบวนการ เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งหรือหลายขั้นตอนไม่เกิดขึ้น
3. เนื่องจากเอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทสแต่ละชนิด กระตุ้นขั้นตอนที่แตกต่างกันในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ดังนั้นจึงปรากฏขึ้นในเซลล์ในเวลาที่แตกต่างกัน แล้วแต่ว่าการกระตุ้นขั้นตอนใดจะเริ่มต้นขึ้น (ในสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ ภาวะที่กระตุ้นและยับยั้งกระบวนการดีไนทริฟิเคชันจะเกิดขึ้นสลับกันเสมอ)

4. ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทสในทุกขั้นตอนของกระบวนการดีไนทริฟิเคชันได้

แบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นบางส่วน สามารถแบ่งตามรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ 4 กลุ่ม (Delwiche, 1981) ดังนี้

1. แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ได้เท่านั้น

ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส ไนทริกออกไซด์รีดักเทส และไนทรีสออกไซด์รีดักเทส บางครั้งเรียกกระบวนการรีดิวซ์ไนเตรตแบบดิสสิมิลีเอชันที่จำกัดอยู่ แต่นี้ว่ากระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรต (Nitrate respiration) เกิดขึ้นในแบคทีเรียหลายชนิด และพบว่ามิดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการขึ้น บางส่วนอยู่ในกลุ่มนี้มากที่สุด Hall (1978) ได้รวบรวมแบคทีเรีย

ในสกุล (genera) ต่างๆตาม Bergey's manual ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 8 ที่สามารถเกิดกระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรดได้ไว้ ดังตารางที่ 4-2 ซึ่งจะเห็นว่าเป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายทางสรีรวิทยาอย่างมาก

ตารางที่ 4.2 แบคทีเรียสกุลต่างๆ ที่มีรายงานว่ามีความสามารถทำให้เกิดการหายใจโดยใช้ไนเตรด (nitrate respiration) (Delwiche, 1981)

<i>Actinobacillus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Peptococcus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Photobacterium</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Planobispora</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Planomonospora</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Geodermatophilus</i>	<i>Plesiomonas</i>
<i>Arachnia</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Proteus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Halococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Bacterionema</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>Hyphomonas</i>	<i>Rothia</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Bordetella</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Selenomonas</i>
<i>Branhamella</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Serratia</i>
<i>Brucella</i>	<i>Listeria</i>	<i>Shigella</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Lucibacterium</i>	<i>Simonsiella</i>
<i>Cellulomonas</i>	<i>Microbispora</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Sporosarcina</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Streptosporangium</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Cytophaga</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Thiomicrospira</i>
<i>Dactylsporangium</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Veillonella</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Pasteurella</i>	

2. แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรดเป็นไนตรัสออกไซด์ได้เท่านั้น

ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนตรัสออกไซด์รีดักเทส บางครั้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ เช่น *Aquaspirillum itersonii* และ *Pseudomonas fluorescens* บางสายพันธุ์ จะถูกนำไปเลี้ยงในห้องทดลอง ทำให้ไม่แน่ชัดว่ากระบวนการดีไนตริฟิเคชันบางส่วนลักษณะนี้เกิดขึ้นในสายพันธุ์แท้ (wild type strain) หรือเกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ (mutation) หลายๆครั้ง แล้วทำให้เอนไซม์ไนตรัสออกไซด์รีดัก

ทดสอบไป อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่มีรายงานว่ารีดิวซ์ไนเตรตและไนไตรต์โดยไม่ผลิตก๊าซจืดอยู่ในดีไนไตรไฟอิงแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการขึ้นบางส่วนกลุ่มนี้

ตารางที่ 4.3แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ได้ทั้งไนเตรตและไนไตรต์ (สมศักดิ์ วังโน, 2524)

<i>Bacillus pyocyaneus (Pseudomonas aeruginosa)</i>	<i>Micrococcus denitrificans</i>
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	<i>Pseudomonas denitrificans</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	

แบคทีเรียเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นพวกเฮเทอโรโทรฟ บางพวกก็เป็นคีโมออโตโทรฟ เช่น *Micrococcus denitrificans* และ *Thiobacillus denitrificans*

3. แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนไตรต์แต่ไม่รีดิวซ์ไนเตรตเป็นก๊าซไนโตรเจน

ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนเตรรีดักเตส แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เช่น *Neisseria* และ *Pseudomonas* บางสายพันธุ์ ในการศึกษาทางนิเวศวิทยาแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สามารถแยกออกมาได้อย่างชัดเจน เนื่องจากในการทดสอบทางจุลชีววิทยาทั่วไปพบว่าไม่สามารถผลิตก๊าซจากไนเตรตได้ จึงถูกมองว่าไม่ใช่ดีไนไตรไฟอิงแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าเมื่อนำการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มนี้มารวมกับของพวกที่หายใจโดยใช้ไนเตรตแล้ว จะทำให้เกิดกระบวนการดีไนไตรฟิเคชันที่สมบูรณ์ก็ตาม

4. แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ และไนไตรต์ออกไซด์ไปเป็นไนตรัสออกไซด์

ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนเตรรีดักเตส และไนตรัสออกไซด์รีดักเตส มีเพียงรายงานเดียวที่บอกว่า *Bacillus licheniformis* จัดอยู่ในกลุ่มนี้ กระบวนการดีไนไตรฟิเคชันแบบบางส่วนลักษณะนี้อาจพบน้อยและไม่มีความสำคัญทางนิเวศวิทยา แต่เป็นลักษณะที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของแต่ละขั้นตอน ถึงแม้ว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์จะสามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนไตรฟิเคชันที่สมบูรณ์ได้ แต่ก็ยังมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นอีกมากที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนไตรฟิเคชันได้เพียงบางขั้นตอนของกระบวนการเท่านั้น เนื่องจากแบคทีเรียพวกนี้มีเอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเตสที่ค่อนข้างหลากหลาย แบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนไตรฟิเคชัน สรุปได้ดังตารางที่ 4. 4

ตารางที่ 4.4 แบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (Delwiche, 1981)

A. Phototrophic bacteria

1. *Rhodopseudomonas sphaeroides*

การเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นอยู่กับ
สายพันธุ์ มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

B. Gliding bacteria

2. *Cytophaga johnsonae*

การเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นอยู่กับ

3. *Lysobacter antibioticus*

สายพันธุ์ จากการศึกษาใน 16 สายพันธุ์ พบ 4
สายพันธุ์ที่รีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ซึ่งใน
จำนวนนั้นมี 1 สายพันธุ์ที่รีดิวซ์ไนเตรตไปเป็น
ก๊าซ

4. *Simonsiella muelleri*

จากการศึกษาใน 18 สายพันธุ์ พบ 9 สายพันธุ์ที่
รีดิวซ์ไนเตรต ซึ่งในจำนวนนั้นมี 4 สายพันธุ์ที่
รีดิวซ์ไนไตรต์โดยมีหรือไม่มีการผลิตก๊าซ

C. Budding bacteria

5. *Hypomicrobium* spp.

ดีไนทริไฟแบบเมธิลทรอฟ

D. Spiral and curved bacteria

6. *Aquaspirillum itersonii*

ผลิตไนตรัสออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ
กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

7. *Aquaspirillum psychrophilum*

ผลิตก๊าซที่มองเห็นได้ (visible gas) เป็น
ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

8. *Aquaspirillum dispar*

ไม่ผลิตก๊าซเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ
กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

9. *Azospirillum lipoferum*

การเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นอยู่กับ
สายพันธุ์ บางสายพันธุ์ผลิตไนตรัสออกไซด์
เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการ
ดีไนทริฟิเคชัน มีความสามารถในการตรึง
ไนโตรเจน

10. *Campylobacter sputorum*

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

E. Gram-negative bacteria

11. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
12. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	บางสายพันธุ์ผลิตไนโตรสออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน
13. <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	บางสายพันธุ์ผลิตไนโตรเจนเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการ
14. <i>Pseudomonas aureofaciens</i>	
15. <i>Pseudomonas stutzeri</i>	บางสายพันธุ์เจริญโดยมีไนโตรสออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย
16. <i>Pseudomonas mendocina</i>	
17. <i>Pseudomonas mallei</i>	ทำให้เกิดโรคในสัตว์
18. <i>Pseudomonas pseudomallei</i>	ทำให้เกิดโรคในสัตว์
19. <i>Pseudomonas caryophylli</i>	ทำให้เกิดโรคในพืช
20. <i>Pseudomonas lemoignei</i>	
21. <i>Pseudomonas solanacearum</i>	ทำให้เกิดโรคในพืช
22. <i>Pseudomonas pickettii</i>	บางสายพันธุ์เจริญโดยมีไนโตรสออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย
23. <i>Pseudomonas pseudoflava</i>	เป็นแฟลคัลเลทีฟลิโมลิโทรอฟ (ไฮโดรเจนแบคทีเรีย)
24. <i>Pseudomonas denitrificans</i>	
25. <i>Pseudomonas perfectomarinus</i>	แบคทีเรียที่พบในทะเล
26. <i>Pseudomonas nautica</i>	แบคทีเรียที่พบในทะเล
27. <i>Pseudomonas</i> spp.	
28. <i>Alcaligenes faecalis</i>	บางสายพันธุ์ดิวัชไนโตรได้ไปเป็นก๊าซแต่ไม่สามารถดิวัชไนโตรได้เป็นไนโตรได้
29. <i>Alcaligenes eutrophus</i>	เป็นแฟลคัลเลทีฟลิโมลิโทรอฟ (ไฮโดรเจนแบคทีเรีย)
30. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ทำให้เกิดโรคในพืช บางสายพันธุ์เจริญโดยมีไนโตรสออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย
31. <i>Agrobacterium radiobacter</i>	บางสายพันธุ์เจริญโดยมีไนโตรสออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

F. Gram-negative facultatively anaerobic bacteria

- | | |
|--------------------------------------|---|
| 32. <i>Chromobacterium violaceum</i> | โดยปกติก๊าซที่มองเห็นได้ไม่ได้ผลิตจากไนโตรเจนหรือไนเตรต |
| 33. <i>Chromobacterium lividum</i> | โดยปกติก๊าซที่มองเห็นได้ไม่ได้ผลิตจากไนโตรเจนหรือไนเตรต |
| 34. <i>Flavobacterium</i> spp. | บางสายพันธุ์ไม่สามารถรีดิวซ์ได้ |

G. Gram-negative cocci and coccobacilli

- | | |
|---|--|
| 35. <i>Neisseria sicca</i> | สามารถรีดิวซ์ไนโตรเจนแต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต |
| 36. <i>Neisseria subflava</i> | สามารถรีดิวซ์ไนโตรเจนแต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต |
| 37. <i>Neisseria flavescens</i> | สามารถรีดิวซ์ไนโตรเจนแต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต |
| 38. <i>Neisseria mucosa</i> | สามารถรีดิวซ์ไนโตรเจนแต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต |
| 39. <i>Neisseria animalis</i> | การรีดิวซ์ไนเตรตขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ |
| 40. <i>Neisseria cavie</i> | การรีดิวซ์ไนเตรตขึ้นอยู่กับสายพันธุ์
โดยปกติจะไม่ผลิตก๊าซที่มองเห็นได้ |
| 41. <i>Neisseria denitrificans</i> | สามารถรีดิวซ์ไนโตรเจนแต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต |
| 42. <i>Branhamella catarrhalis</i> | การรีดิวซ์ไนเตรตขึ้นอยู่กับสายพันธุ์
อาจผลิตหรือไม่ผลิตก๊าซที่มองเห็นได้ |
| 43. <i>Acinetobacter</i> spp. | |
| 45. <i>Paracoccus denitrificans</i> | ไนตรัสออกไซด์และไนโตรเจนผลิตจากไนเตรต เป็นแฟคัลเททีฟลิโมลิโททรอฟ (ไฮโดรเจนแบคทีเรีย) |
| 46. <i>Paracoccus halodenitrificans</i> | ไนตรัสออกไซด์และไนโตรเจนผลิตจากไนเตรต |

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

H. Gram-negative chemolithotrophic sulfur bacteria

- | | |
|---|--|
| 47. <i>Thiobacillus denitrificans</i> | บางสายพันธุ์รีดิวซ์ไนตริกออกไซด์และ
ไนตรัสออกไซด์ไปเป็นไนโตรเจน |
| 48. <i>Thiomicrospira denitrificans</i> | ไม่เจริญในภาวะมีออกซิเจน เป็นออบลิเกต
ดีไนทริไฟเออร์ |
| 49. <i>Thermothrix thioparus</i> | ไม่ผลิตก๊าซที่มองเห็นได้จากไนเตรต แตรีดิวซ์
ไนไตรต์ เป็นเทอร์โมฟิลิกแฟลคัลเททีฟ
คีโมลิโธโทรฟ |

I. Gram-positive spore-forming bacteria

- | | |
|--|--|
| 50. <i>Bacillus licheniformis</i> | |
| 51. <i>Bacillus cereus</i> | |
| 52. <i>Bacillus polymyxa</i> | |
| 53. <i>Bacillus macerans</i> | |
| 54. <i>Bacillus stearothermophilus</i> | |
| 55. <i>Bacillus laterosporus</i> | |
| 56. <i>Bacillus pasteurii</i> | |
| 57. <i>Bacillus pantothenicus</i> | |
| 58. <i>Bacillus pulvifaciens</i> | |
| 59. <i>Bacillus nitrollens</i> | |
| 60. <i>Bacillus azotoformans</i> | คัดเลือกโดยอาหารที่อุดมด้วยไนตรัสออกไซด์ |

J. Gram-positive non-spore-forming bacteria

- | | |
|--|--|
| 61. <i>Corynebacterium nephridii</i> | ค้นพบเพียง 1 สายพันธุ์ ผลิตไนตรัสออกไซด์
เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย |
| 62. <i>Propionibacterium acidipropionici</i> | การเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นอยู่กับ
สายพันธุ์ |

K. Others

- | | |
|------------------------------|--|
| 63. <i>Halobacterium</i> sp. | |
|------------------------------|--|

4.2.3. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

น้ำมันและผลผลิตที่เกิดขึ้นจากน้ำมันนับวันเป็นปัญหาที่สำคัญต่อมวลมนุษย์ จากอัตราที่เพิ่มขึ้นการนำมาใช้ประโยชน์ จึงมีกิจกรรมการขนส่งมากยิ่งขึ้น มีระบบการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการรั่วไหลและปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เกิดขึ้นจะมีผลกระทบอย่างสูงกับสุขภาพอนามัยของมนุษย์ (เก็จากัญจน์, 2546)

กระบวนการไบโอรีเมเดชันเป็นการนำสิ่งมีชีวิตเพื่อมาใช้ในการบำบัดรักษาสีแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนจากน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ให้หมดไปหรือให้มีสภาพที่ดีขึ้นและฟื้นฟูได้รวดเร็วขึ้น จึงนับเป็นกระบวนการเพื่อการรักษาสภาพแวดล้อมให้ดียิ่งขึ้นจนเป็นปกติ สะอาด สำหรับสุขภาพอนามัยของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ (เจษฎา, 2541)

จากการศึกษาก่อนหน้าของ Boonyatumanond et al., (2006) ที่ได้การศึกษาการกระจายตัวของสาร PAHs และ Molecular Marker ในตะกอนดินบริเวณคลอง แม่น้ำเจ้าพระยา ปากแม่น้ำและอ่าวไทยตอนบน พบว่าการปนเปื้อนของสาร PAHs ในตะกอนดินจากคลอง แม่น้ำ ปากแม่น้ำ และอ่าวไทยตอนบนเป็นการตกค้างที่เกิดจาก Petrogenic และ Pyrogenic และจากการศึกษาพบปริมาณความเข้มข้นของสาร PAHs พบว่าในคลองมีความเข้มข้นของสาร PAHs อยู่ระหว่าง 512 – 8399 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) แม่น้ำเจ้าพระยาพบ 33 – 590 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) ปากแม่น้ำพบ 29 – 724 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) และชายฝั่งทะเลของไทยพบ 6 – 228 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ซึ่งแนวโน้มการกระจายตัวและสาเหตุการปนเปื้อนสาร PAHs บริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยาและอ่าวไทยตอนใน น่าจะเกิดจากกิจกรรมการใช้น้ำมันในเมืองและมีการชะล้างสู่แหล่งน้ำธรรมชาติผ่านทางคลองต่างๆเป็นหลัก

Rakhimova et al., (2004) ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการ oxidize น้ำมันในการย่อยสลายทางชีวภาพของดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในห้องปฏิบัติการ ภาวะที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการออกซิไดซ์มีทั้งภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic หรือ anoxic) ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันที่เป็นสารไฮโดรคาร์บอนมีลำดับดังนี้ การปล่อยให้เกิดขึ้นเอง (self-remediation) 40% < เมื่อมีการประยุกต์ใช้ในเทรต 42% < ระบบ denitrifying oil-oxidizing 50% ระบบที่ใช้ร่วมกันระหว่าง denitrification พร้อมกับเติมไนเทรต 60%

Coates et al., (1997) ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของตะกอนดินบริเวณท่าเรือที่ปนเปื้อนสารประกอบโพลีไซคลิกแอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนและสารประกอบอัลเคนจากน้ำมันปิโตรเลียมในสภาวะไร้ออกซิเจน (Coates และ คณะ, 1997) และประสบผลสำเร็จเป็นที่น่าพอใจ

Häner et al., (1995) พบว่าจุลินทรีย์จาก diesel fuel-contaminated source มีความสามารถเจริญบน p-xylene การออกซิเดชันของ p-xylene ควบคู่ไปกับ CO₂ แสดงให้เห็นว่าสามารถลดปริมาณ NO₃⁻ ได้สำเร็จ การเพิ่มปริมาณเชื้อในการเจริญบน toluene และ m-xylene สามารถตรวจพบได้ อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อไม่สามารถย่อย benzene, ethylbenzene และ o-xylene ได้

Mille et al., (2007) ทำการทดลอง *in situ* และได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจากตะกอนชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียนบริเวณ Gulf of Fos เพื่อจะศึกษาอิทธิพลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับการเกิดดีไนทริฟิเคชัน (denitrification) หลังจาก 1, 4 และ 6 เดือน สำหรับตัวอย่างควบคุมจะไม่มีตะกอนไฮโดรคาร์บอนในตะกอน การมีอยู่ของจุลินทรีย์และสัตว์หน้าดินกระตุ้นให้เกิดอัตราของดีไนทริฟิเคชันถึง 160% การกระตุ้นถูกเหนี่ยวนำโดยตะกอนทั้ง NO_3^- การมีอยู่ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในการทดลองส่งผลทั้งช่วยกระตุ้นและยับยั้งการเกิดดีไนทริฟิเคชัน กระบวนการดีไนทริฟิเคชันตอบสนองการมีอยู่ของสารไฮโดรคาร์บอนขึ้นกับ ปริมาณของสารที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์และสัตว์หน้าดิน สารอินทรีย์ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการดีไนทริฟิเคชันที่เกี่ยวข้องกับสารไฮโดรคาร์บอน 120% ในทางตรงกันข้าม เมื่อมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนอิมัลชันมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของตะกอนแห้ง พบว่ากระบวนการดีไนทริฟิเคชันถูกยับยั้ง

Bradley et al., (1992) กล่าวถึง ในปี 1975 การรั่วไหลของ JP-4 grade jet fuel ปริมาณราว 83,000 แกลลอนทำให้เกิดการปนเปื้อนใกล้กับ North Charleston South California เป็นบริเวณกว้าง เพื่อที่จะศึกษาปัจจัยที่จะส่งผลต่อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ปริมาณ NO_3^- ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ PO_4 ได้ถูกบันทึกถึงผลกระทบต่อกระบวนการดีไนทริฟิเคชันในตะกอนที่เก็บอย่างหลากหลาย พบว่ากระบวนการดีไนทริฟิเคชันลดลง 98% ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจน อัตราการเกิดดีไนทริฟิเคชันและคาร์บอนมิเนอราไลเซชันเพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณ NO_3^- มากที่สุดโดยประมาณ 1 mM ส่วน PO_4 ไม่มีผลต่อทั้งสองกระบวนการ การเกิดดีไนทริฟิเคชันลดลง 38% เป็นอย่างน้อยที่ความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 4 เมื่อเทียบกับความเป็นกรดด่างที่ 7 การวิเคราะห์ตัวอย่างพบว่ามี ความแตกต่างเกิดขึ้นในการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอย่างน้อย 10 เท่าในบริเวณชายฝั่งที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับงานของ Oleszczuk and Baran (2003) ซึ่งศึกษาการย่อยสลายในดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบ PAHs

Fukui et al., (1999) สรุปว่าน้ำมันดิบเป็นองค์ประกอบที่มีความซับซ้อนโดยองค์ประกอบหลักประกอบด้วยหลาย ๆ อย่าง (saturated aromatic hydrocarbons) การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วยแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนในการหายใจเป็นที่รู้จักกันมานานนับร้อยปี ส่วนการย่อยสลายสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนเพิ่งมีการค้นพบมาในไม่กี่สิบปี ในงานวิจัยนี้กล่าวถึงการสำรวจการย่อยสลายสารประกอบโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบที่ภาวะไร้ออกซิเจน จุลินทรีย์ที่มีความสามารถดังกล่าวอยู่ในกลุ่มที่เป็นซัลไฟด์รีดิวซิงแบคทีเรีย (sulfite-reducing bacteria) นอกจากนี้สารประกอบ alkyl-benzene และ n-alkane ถูกพบว่าการย่อยสลายได้ไปพร้อมกับการเปลี่ยนซัลเฟต (sulfate) ไปเป็นซัลไฟด์ (sulfide) ซึ่งนับเป็น 10% aromatic hydrocarbons ในน้ำมันดิบ อย่างไรก็ตามการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ตามค่าการวัด C_{13} และ C_{12} และจึงเป็นคำอธิบายที่ว่าทำไมแบคทีเรียโบราณบางชนิดจึงสามารถพบว่าเจริญได้ในแหล่งน้ำมันดิบซึ่งมีกำมะถันอยู่ และเป็นสาเหตุว่าทำไมจึงมีซัลไฟด์ที่ไม่พึงประสงค์ปนอยู่ในน้ำมันและโรงกลั่นน้ำมัน ยิ่งไปกว่านั้นยังมีการพบแอนแอโร

บิกเบคทีเรียที่ใช้ alkylbenzene และ n-alkane และเชื้อไวรัสที่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มดีไนทรีไฟเออร์ในน้ำมันดิบจากการศึกษา

วิธีการวิจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่งโดยรวมคือการศึกษาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนน้ำมันไฮโดรคาร์บอน เข้าใจวิถีการดำรงชีวิต ในอาหารที่มีสารปนเปื้อนนั่นๆอยู่กลไกความสามารถการเจริญเติบโตพร้อมไปกับการใช้สารปนเปื้อนหรือน้ำมันไฮโดรคาร์บอน เข้าใจในระดับพันธุศาสตร์ถึงยีนที่เกี่ยวข้องกลไกการสลายสารไฮโดรคาร์บอน รวมทั้งการศึกษาหาสภาวะแวดล้อมและอาหารเพื่อให้จุลินทรีย์นั้นๆมีความสามารถสูงสุดสู่การบำบัดรักษาและกำจัดน้ำมันไฮโดรคาร์บอนให้หมดไปหรือลดลง

จากงานวิจัยเกือบทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้กระบวนการดีไนทรีฟิเคชัน พบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้กระบวนการดีไนทรีฟิเคชันนั้นมีศักยภาพในการนำมาใช้เพื่อบำบัดและแก้ไขปัญหาสีสิ่งแวดล้อมซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของสารประกอบไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งการใช้แบคทีเรียดีไนทรีไฟเออร์นับเป็นวิธีที่สามารถช่วยกำจัดไนเตรตและไนไตรต์และสารในกลุ่มของสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนออกจากระบบได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนั้นๆ นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่า ไม่เพิ่มปัญหามลภาวะ และประหยัดพลังงาน

4.3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

4.3.1. การเก็บตัวอย่างตะกอนดิน

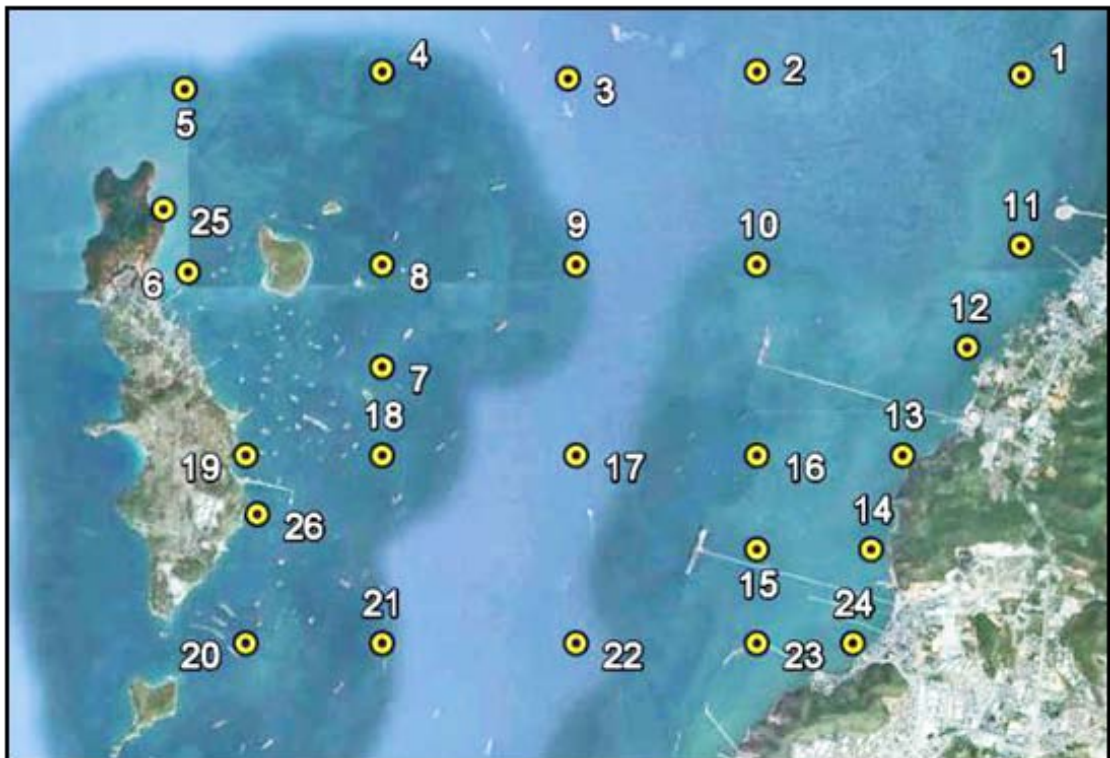
ทำการเก็บตัวอย่างตะกอนดินจากพื้นที่ในทะเลระหว่างเกาะสีชังและศรีราชา จังหวัดชลบุรี (แสดงดังภาพที่ 4.1) เกาะสีชังตั้งอยู่ที่พิกัดเส้นรุ้ง 13 องศา ถึง 12 องศาเหนือและระหว่างเส้นแวง 10 องศา 48 ลิปดา ถึง 100 องศา 51 ลิปดา ตั้งอยู่ตะวันออกบริเวณอ่าวไทยตอนใน ตรงกันข้ามกับอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี อยู่ห่างจากอำเภอศรีราชาประมาณ 12 กิโลเมตร ห่างจากจังหวัดชลบุรี ประมาณ 35 กิโลเมตรและอยู่ห่างจากกรุงเทพฯประมาณ 117 กิโลเมตร มีเนื้อที่บนเกาะรวมประมาณ 7.9 ตารางกิโลเมตร

ภาพที่ 4.2 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างตะกอนดินใต้ทะเลหรือบริเวณพื้นที่อ่าวรอบเกาะสีชัง ในบริเวณที่คาดว่าจะปนเปื้อนด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยพิกัดทางภูมิศาสตร์ที่แน่นอนแต่ละสถานี แสดงในตารางที่ 4.5

สำหรับตัวอย่างดินตะกอนที่เก็บแล้ว จะทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ก่อนนำเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพต่อไป



ภาพที่ 4.1 แสดงแผนที่เกาะสีชังและชายฝั่งทะเล



ภาพที่ 4.2 แสดงสถานีเก็บตัวอย่างบริเวณพื้นที่เกาะสีชัง-ศรีราชา จ.ชลบุรี

ตารางที่ 4.5 พิกัดทางภูมิศาสตร์ของสถานีเก็บตัวอย่าง

สถานี	ละติจูด	ลองจิจูด	ความลึกน้ำ (เมตร)
1	13°11'26.05"N	100°54'53.68"E	6.0
2	13°11'27.59"N	100°52'56.44"E	10.0
3	13°11'24.54"N	100°51'32.75"E	15.4
4	13°11'27.59"N	100°50'10.41"E	18.6
5	13°11'20.03"N	100°48'42.87"E	24.6
6	13°10'1.07"N	100°48'44.40"E	8.0
7	13°9'20.10"N	100°50'10.42"E	30.5
8	13°10'4.26"N	100°50'10.42"E	31.6
9	13°10'4.26"N	100°51'36.32"E	16.8
10	13°10'4.26"N	100°52'56.44"E	10.0
11	13°10'12.50"N	100°54'53.41"E	6.7
12	13° 9'20.7"N	100°55'33.72"E	4.5
13	13° 8'42.00"N	100°54'1.00"E	7.9
14	13° 8'1.50"N	100°53'47.00"E	8.4
15	13° 8'1.50"N	100°52'56.44"E	19.5
16	13° 8'42.00"N	100°52'56.44"E	18.3
17	13° 8'42.00"N	100°51'36.32"E	26.5
18	13° 8'42.00"N	100°50'10.42"E	17.4
19	13° 8'42.00"N	100°49'10.00"E	5.7
20	13° 7'21.00"N	100°49'10.00"E	17.4
21	13° 7'21.00"N	100°50'10.42"E	28.2
22	13° 7'21.00"N	100°51'36.32"E	25.9
23	13° 7'21.00"N	100°52'56.44"E	14.5
24	13° 7'21.00"N	100°53'39.00"E	6.2
25	13°10'28.00"N	100°48'33.91"E	3.0
26	13° 8'16.65"N	100°49'15.09"E	2.5

4.3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพหรือองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างตะกอนดิน

บันทึกลักษณะสี ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนในรูปแบบต่างๆที่พบในตะกอนดิน ดังนี้คือ ปริมาณไนโตรเจนที่พบทั้งหมด (%Total nitrogen) ปริมาณสารประกอบ NH_4^+ (mg/kg) ปริมาณสารประกอบ NO_3^- (mg/kg) โดยนำตัวอย่างตะกอนดินทุกสถานีมาตากให้แห้งในที่ร่ม จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดแล้วนำไปสกัดตามวิธีที่กำหนด โดยซังผงตะกอนใส่ขวดพลาสติกในปริมาณที่กำหนด และใส่น้ำยาสกัดเบอร์ 1 ลงไปปริมาณ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ทำปฏิกิริยากันเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองสารละลายตะกอนดินด้วยกระดาษกรอง แล้วนำของเหลวที่กรองได้ไปทำการทดสอบเพื่อหาค่าแอมโมเนียมและไนเตรด

4.3.3 การคัดแยกชนิดของจุลินทรีย์จากตะกอนดิน

นำตัวอย่างตะกอนดินปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยง PDB + 2% Yeast Extract ที่มีการเติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน คัดเลือกตัวอย่างที่มีการเจริญมาทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 45 วัน ในอาหารเลี้ยงที่มีการเติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอน นำจุลินทรีย์มาซัดลงบนอาหารแข็ง จนได้เป็นโคโลนีเดี่ยว เพื่อบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในสภาพที่มีสารประกอบ PAHs

4.3.4 การคัดแยกดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญใน PAHs

คัดแยกดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียจากตัวอย่างตะกอนดินด้วยเทคนิคการ Pour plate โดยทำการเจือจางตัวอย่างตะกอนดินด้วย 0.85% NaCl เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดส่วนใสปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารวุ้น (Nitrate Agar) ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาพไร้ออกซิเจน (ภายใน Anaerobic Chamber) เป็นเวลา 5 วัน เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตจึงทำการแยกให้เป็นไอโซเลตเดี่ยว และนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวไนเตรด (Nitrate Broth) ซึ่งมีหลอดดักแก๊ส (Durham tube) บรรจุอยู่ นำไปบ่มเป็นเวลา 7 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน (Beishir, 1996)

ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ในกระบวนการ Nitrification/Denitrification ด้วยวิธีแอลฟา-แนพธิลลามีน (alpha-naphthylamine method) (Theerachat et al., 2010) นำดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มาสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ต่อไป

4.3.5 การจำแนกชนิดจุลินทรีย์ด้วยยีน 16S rRNA

นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดกรองได้มาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณ 16S ribosomal RNA fragment ตามวิธีของ Virunanon (2008) โดยทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย Genomics DNA Purification Kit (Omega) เพื่อนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 27F และ 1492R ทำปฏิกิริยาถูกละโซโพลีเมอเรส (พีซีอาร์) โดยเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที

จากนั้นที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และในรอบสุดท้ายเพิ่มเวลาต่อไปอีก 10 นาที ทำซ้ำเป็นจำนวน 30 รอบ จากนั้นใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 1600 bp ทำบนเจลที่มีความเข้มข้นของอะกาโรส 0.8 % ในสารละลาย 1X TAE และให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์และผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Viogene's Gel Extraction System ก่อนส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท แปซิฟิกไซน์ ประเทศไทย เพื่อนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตารางข้อมูลของ NCBI (Shi and Lee, 2006) เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของแบคทีเรียที่คัดกรองได้

4.3.6 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายประกอบ PAHs

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร enrichment และ Mineral Salt Medium ที่มีการดัดแปลงโดยเติมโปแตสเซียมไนเตรดเพื่อใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจน และเติมสารประกอบ PAHs เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้สารประกอบ PAHs ที่มีวงเบนซีนตั้งแต่ 2 - 5 วงเป็นองค์ประกอบ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Naphthalene (2 วง) Phenanthrene (3 วง) Pyrene (4 วง) และ Benzo[a]pyrene (5 วง) ที่ความเข้มข้น 200 ppm นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ทำการเก็บตัวอย่างและทดสอบปริมาณสารประกอบ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

4.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

รายละเอียดของเครื่อง HPLC มีดังนี้: ใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-P HP (Shimadzu) column ขนาด 4.6 x 150 mm โดยใช้อะซิโตนไนไตรด์ (Acetonitrile; CH_3CN) และน้ำเป็น mobile phase ตามลำดับ มี $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O} = 40:60$ v/v และวิเคราะห์ด้วย UV-VIS detector อุณหภูมิของคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารประกอบ PAHs แต่ละชนิด

4.4. ผลการวิจัย

4.4.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพหรือองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างตะกอนดิน

ตัวอย่างตะกอนดินที่นำมาศึกษา มีลักษณะที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าคล้ายคลึงกัน ทั้งนี้โดยทั่วไปตะกอนดินมีลักษณะอนุภาคของดินเลน (clay) มากกว่าทราย (sand) ตะกอนมีสีเทาอ่อน บางตัวอย่างมีกลิ่นเหม็นของก๊าซไข่เน่า แต่บางตัวอย่างไม่มีกลิ่น

ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างตะกอนดินจากบริเวณเกาะสีชัง นอกจากใช้การสังเกตลักษณะสีของตะกอนด้วยตาแล้ว ได้ทำการตรวจวัด pH ด้วยเครื่อง pH Meter และตรวจสอบปริมาณแอมโมเนีย (NH_4^+-N) และไนเตรด (NO_3^--N) โดยใช้ชุดตรวจสอบดินจากโครงการพัฒนาวิชาการดิน-ปุ๋ย และสิ่งแวดล้อมภาควิชาวปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งผลของการตรวจวัด pH ปริมาณ แอมโมเนีย

(NH₄⁺-N) และไนเตรต (NO₃-N) เบื้องต้นดังแสดงในตารางที่ 4.6 โดยพบว่าปริมาณแอมโมเนียมในตะกอนดินมีปริมาณสูงที่สถานีที่ 1, 5 และ 11 (ในช่วง 6-15 ppm) ส่วนปริมาณไนเตรตนั้นพบว่ามีค่าเข้มข้นใกล้เคียงกันในทุกสถานีเก็บตัวอย่าง โดยอยู่ในช่วง 1-10 ppm ทั้งนี้ความเข้มข้นของไนเตรตยังไม่สูงมากจนเกิดอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ แต่บ่งชี้ว่าอาจมีการปนเปื้อนของของเสียในน้ำ

ตารางที่ 4.6 คุณสมบัติทางกายภาพตัวอย่างตะกอนดินของเกาะสีชังในบริเวณสถานี 1– 12

Physical Character Area	Color	pH (1:5)	NH ₄ ⁺ -N (ppm)	NO ₃ -N (ppm)
Station 1	เทาอ่อน	8.57	6-15	1-10
Station 2	เทาอ่อน	8.63	1-10	1-10
Station 3	เทาอ่อน	8.64	1-10	1-10
Station 4	เทาอ่อน	8.56	1-10	1-10
Station 5	เทาอ่อน	8.54	6-15	1-10
Station 6	เทาอ่อน	8.61	1-10	1-10
Station 7	เทาอ่อน	8.56	1-10	1-10
Station 8	เทาอ่อน	8.64	1-10	1-10
Station 9	เทาอ่อน	8.62	1-10	1-10
Station 10	เทาอ่อน	8.57	1-10	1-10
Station 11	เทาอ่อน	8.63	6-15	1-10
Station 12	เทาอ่อน	8.64	1-10	1-10

4.4.2 ผลการคัดแยกชนิดของจุลินทรีย์จากตะกอนดิน

จากการเพาะเลี้ยงเพื่อคัดแยกชนิดของจุลินทรีย์จากตะกอนดินด้วยสารละลาย PDB + 2% Yeast Extract ที่มีการเติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอนพบว่า พบการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่มีการเติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิด Naphthalene ดังนั้น จึงทำการคัดเลือกตัวอย่างที่มีการเจริญมาทำการ

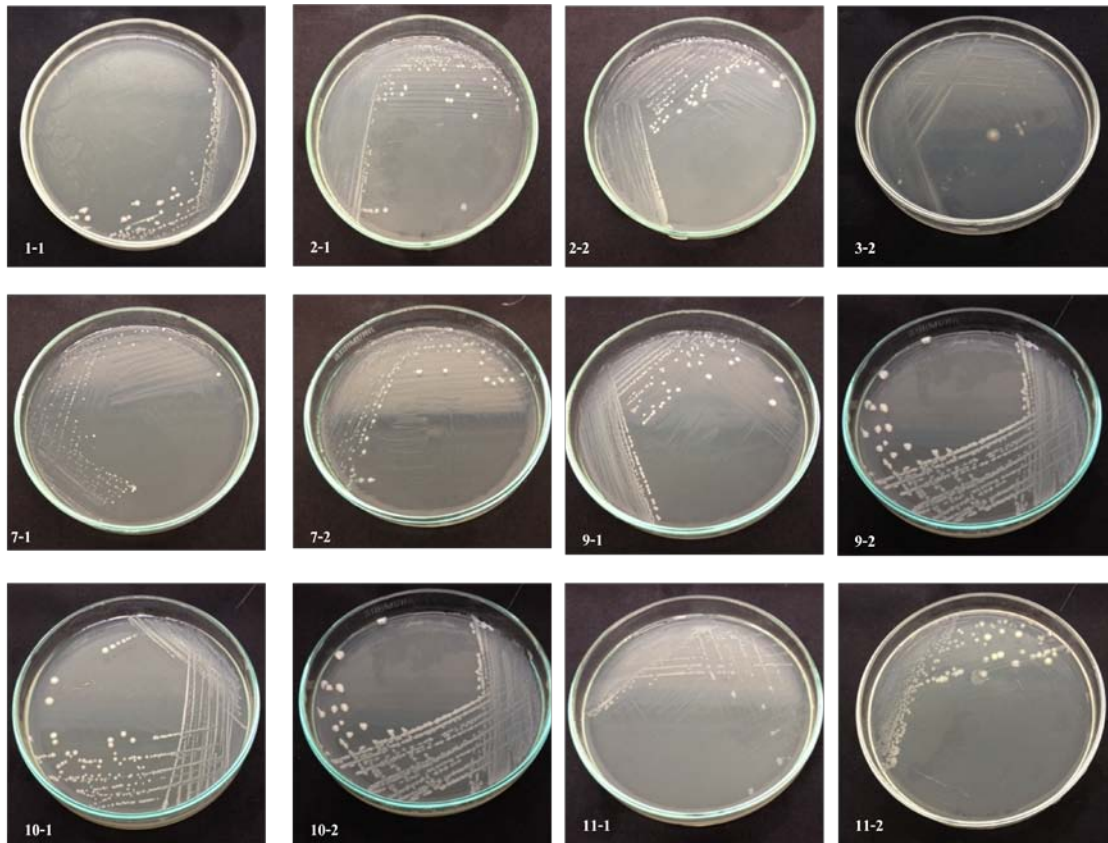
เพาะเลี้ยงต่อไปอีก 45 วัน ในอาหารเลี้ยงที่มีการเติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดเนฟทาซีน นำจุลินทรีย์มาจัดลงบนอาหารแข็ง ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ลักษณะของโคโลนีมีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 มิลลิเมตร โคโลนีเรียบเป็นมันวาว มีสีขาวนวล โดยพบโคโลนีลักษณะนี้จากตัวอย่างตะกอนดินบริเวณสถานีที่ 9



ภาพที่ 4.3 แสดงโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกจากตัวอย่างตะกอนดินสถานีที่ 9

เมื่อนำผลการตรวจวิเคราะห์หาสารประกอบไนโตรเจนจากตัวอย่างที่ 9 ซึ่งสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้นั้น พบว่า มีปริมาณสารประกอบ NH_4^+ (mg/kg) 6-15 mg/kg และปริมาณสารประกอบ NO_3^- (mg/kg) 10 mg/kg (ผลการวิเคราะห์จากภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างตะกอนจากชายฝั่งทะเลบริเวณนั้น มีกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) อยู่ เมื่อมีการสะสมของ NH_4^+ ในบริเวณที่มี NO_3^- แสดงว่า NH_4^+ มาจากกระบวนการไนตริฟิเคชัน และแสดงให้เห็นคุณภาพของตะกอนดินและน้ำในบริเวณนั้น ว่าเกิดการปนเปื้อนไนเตรดหรือสารประกอบไนโตรเจนเกิดขึ้นในระยะเวลาหนึ่ง โดยที่ปริมาณของไนเตรดมีค่าน้อยกว่าปริมาณแอมโมเนียมไอออน แสดงให้เห็นว่า ตะกอนดินไม่ได้มีการสะสมการปนเปื้อนมานานนัก การปนเปื้อนอาจเพิ่งเกิดขึ้น และในบริเวณนี้น่าจะเป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์ประเภท *Nitrosomonas* spp. และ *Nitrobacter* spp.

ทั้งนี้ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้แสดงดังภาพที่ 4.4 และจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตะกอนดินบริเวณเกาะสีชังได้ทั้งหมด 63 ไอโซเลต ได้รวบรวมแสดงในตารางที่ 4.7



ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกได้จากสถานีต่างๆ: (1-1) จากสถานีที่ 1, (2-1, 2-2) จากสถานีที่ 2, (3-2) จากสถานีที่ 3, (7-1, 7-2) จากสถานีที่ 7, (9-1, 9-2) จากสถานีที่ 9, (10-1, 10-2) จากสถานีที่ 10, และ (11-1, 11-2) จากสถานีที่ 11

ตารางที่ 4.7 จำนวนไอโซเลตที่ได้จากตะกอนดินในแต่ละสถานี

สถานี	จำนวนไอโซเลต	สถานี	จำนวนไอโซเลต
1	3	13	2
2	6	14	4
3	2	15	3
4	1	16	1
5	2	17	2
6	3	18	3
7	2	19	5
8	4	20	1
9	2	21	2
10	3	22	2
11	2	23	6
12	2	รวมทั้งหมด	63

4.4.3 การคัดแยกดีไนทริไฟอิงแบคทีเรีย

จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 63 ไอโซเลต ซึ่งเมื่อนำแต่ละไอโซเลตที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ในกระบวนการ Nitrification/Denitrification ด้วยวิธีแอลฟา-แนพทิลลามีน (alpha-naphthylamine method) จากการทดสอบ Nitrate Reduction ด้วยวิธี α -Naphthylamine test พบว่ามีไอโซเลตที่เป็น nitrate-positive strains และมีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ ทั้งสิ้น 40 ไอโซเลต จากสถานีต่างๆ โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีน้ำตาลแดง เป็นไม่มีสี ทั้งนี้ ได้รวบรวมแสดงในตารางที่ 4-8 ถึง ตารางที่ 4-11 แต่มีเพียง 8 ไอโซเลตเท่านั้น ซึ่งได้แก่ ไอโซเลต B3/1 ไอโซเลต B3/2 ไอโซเลต A2/2 ไอโซเลต A2/3 ไอโซเลต A7/1 ไอโซเลต A7/2 ไอโซเลต A9/1 และ ไอโซเลต A12/1 ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนไนเตรตไปเป็นก๊าซไนโตรเจนและจัดว่าเป็นดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียอย่างแท้จริง ดังแสดงในภาพที่ 4.5 โดยแสดงลักษณะ โคลโลนิ การเกิดแก๊ส และสีที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบด้วยวิธี α -Naphthylamine test

ตารางที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดแก๊สและ Nitrate Reducing ของแต่ละไอโซเลต

สถานี	ไอโซเลต	Gas (วัน)														Nitrate-Positive	Denitrifier
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
1 (A1)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
2 (A2)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	3	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	4	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	—
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	6	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	—
3 (A3)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	-	—
4 (A4)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
5 (A5)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
6 (A6)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	-	—
7 (A7)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√	√	√	+	√
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	+	√

ตารางที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดแก๊สและ Nitrate Reducing ของแต่ละไอโซเลต

สถานี	ไอโซเลต	Gas (วัน)														Nitrate-Positive	Denitrifier
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
8 (A8)	1	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
9 (A9)	1	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
10 (A10)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	3	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	—
11 (A11)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	2	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	—
12 (A12)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	+	√
13 (B1)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
14 (B2)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—

ตารางที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดแก๊สและ Nitrate Reducing ของแต่ละไฮโซเลต

สถานี	ไฮโซเลต	Gas (วัน)														Nitrate-Positive	Denitrifier
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
15 (B3)	1	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	2	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	+	√
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
16(B4)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
17 (B5)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
18 (B6)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
19 (B7)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 (B8)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
21 (B9)	1	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
22 (B10)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—

ตารางที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดแก๊สและ Nitrate Reducing ของแต่ละไอโซเลต

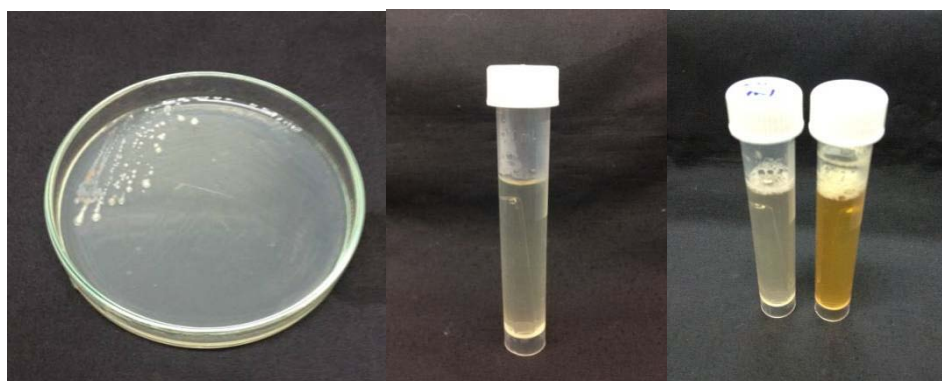
สถานี	ไอโซเลต	Gas (วัน)														Nitrate-Positive	Denitrifier
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
23 (B11)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	—

ภาพที่ 4.5 แสดงการเกิดกระบวนการdenitrificationของดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จากสถานีต่างๆ ดังนี้

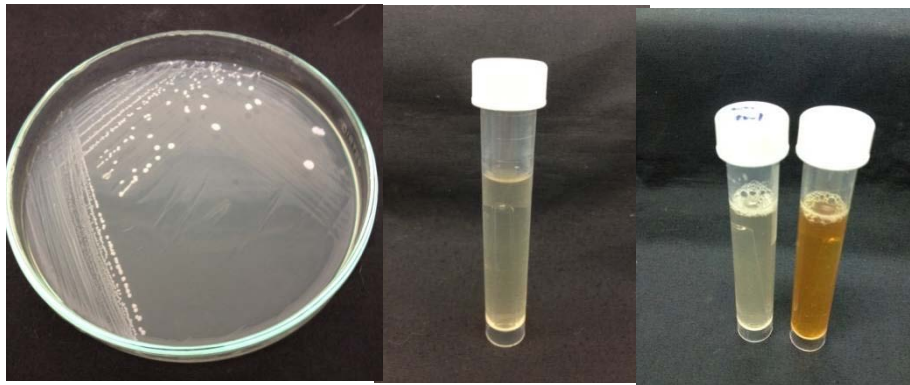
(ก) สถานี 2จากไอโซเลตที่ 2 (A2/2)



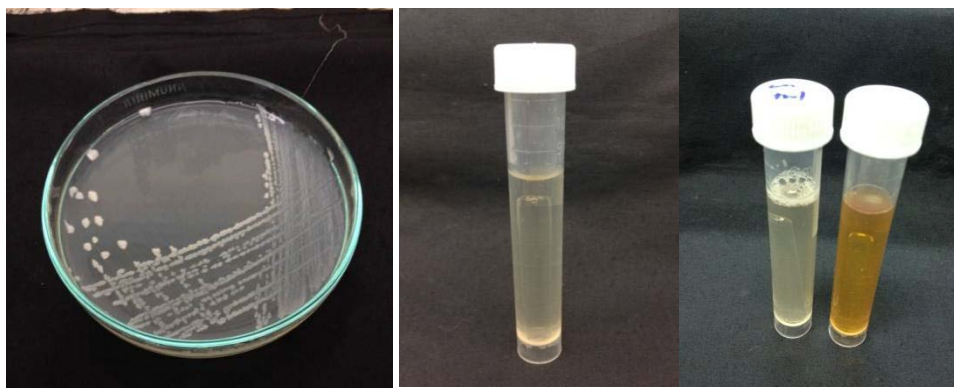
(ข) สถานี 2จากไอโซเลตที่ 3 (A2/3)



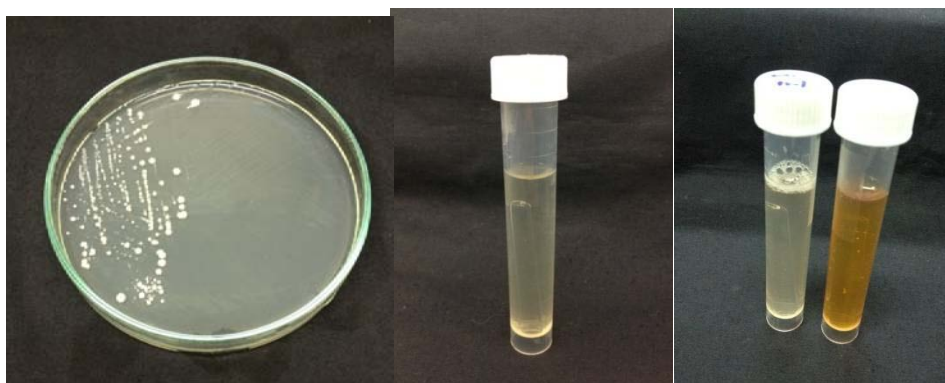
(ค) สถานี 7 จากไอโซเลตที่ 1 (A7/1)



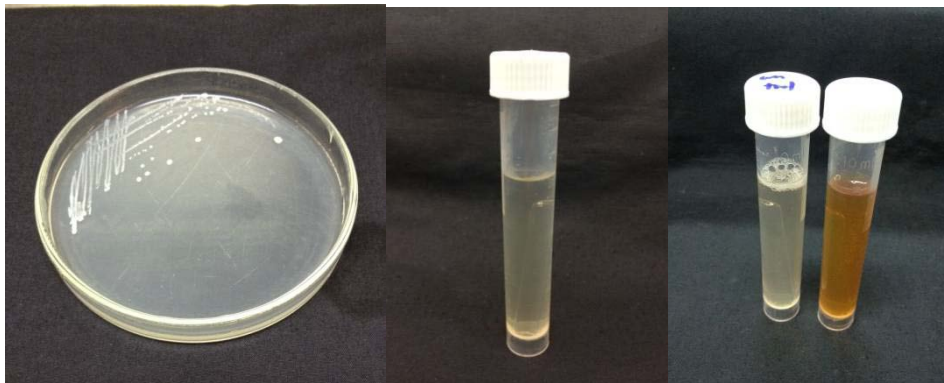
(ง) สถานี 7 จากไอโซเลตที่ 2 (A7/2)



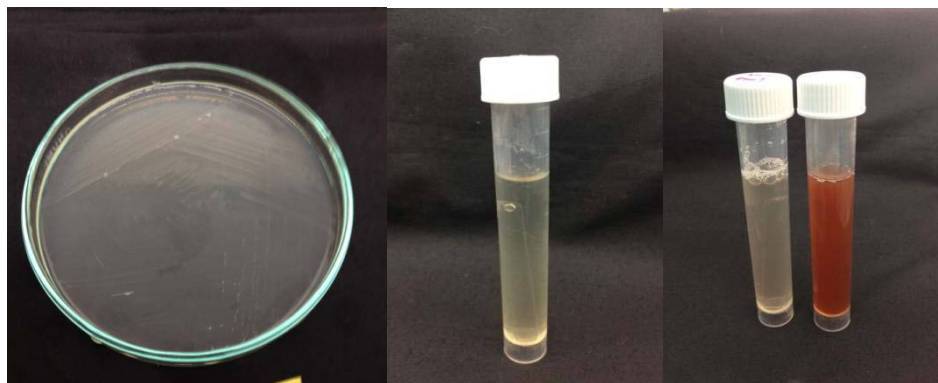
(จ) สถานี 9 จากไอโซเลตที่ 1 (A9/1)



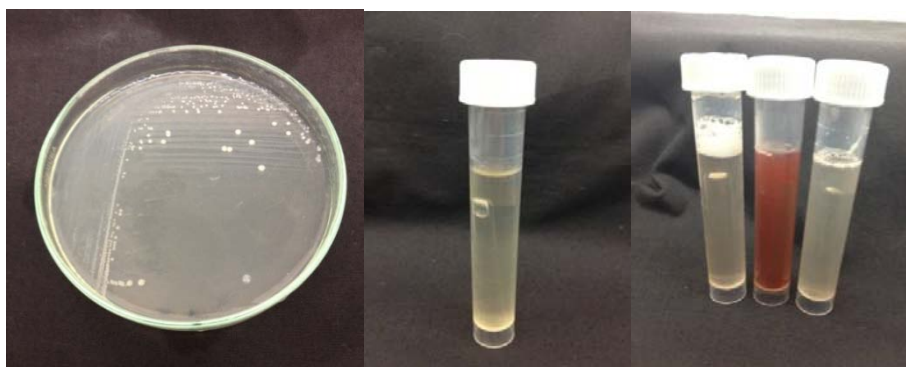
(ก) สถานี 12 จากไอโซเลตที่ 2 (A12/2)



(ข) สถานี 15 จากไอโซเลตที่ 1 (B3/1)



(ง) สถานี 15 จากไอโซเลตที่ 2 (B3/2)



ภาพที่ 4.5 (ก) - (ง) แสดงดิโนทริไฟอิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากสถานีต่างๆ โดยแสดงลักษณะโคโลนี การสร้างก๊าซและการเป็น nitrate-positive strains จากสีที่เปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบด้วยวิธี α -Naphthylamine test

เมื่อทำการรวบรวมจำนวนไอโซเลตที่เป็นดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียที่สามารถแสดงในตารางที่ 4.12
 ทั้งนี้ ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเป็นดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย จะนำไปใช้ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs
 ต่อไป

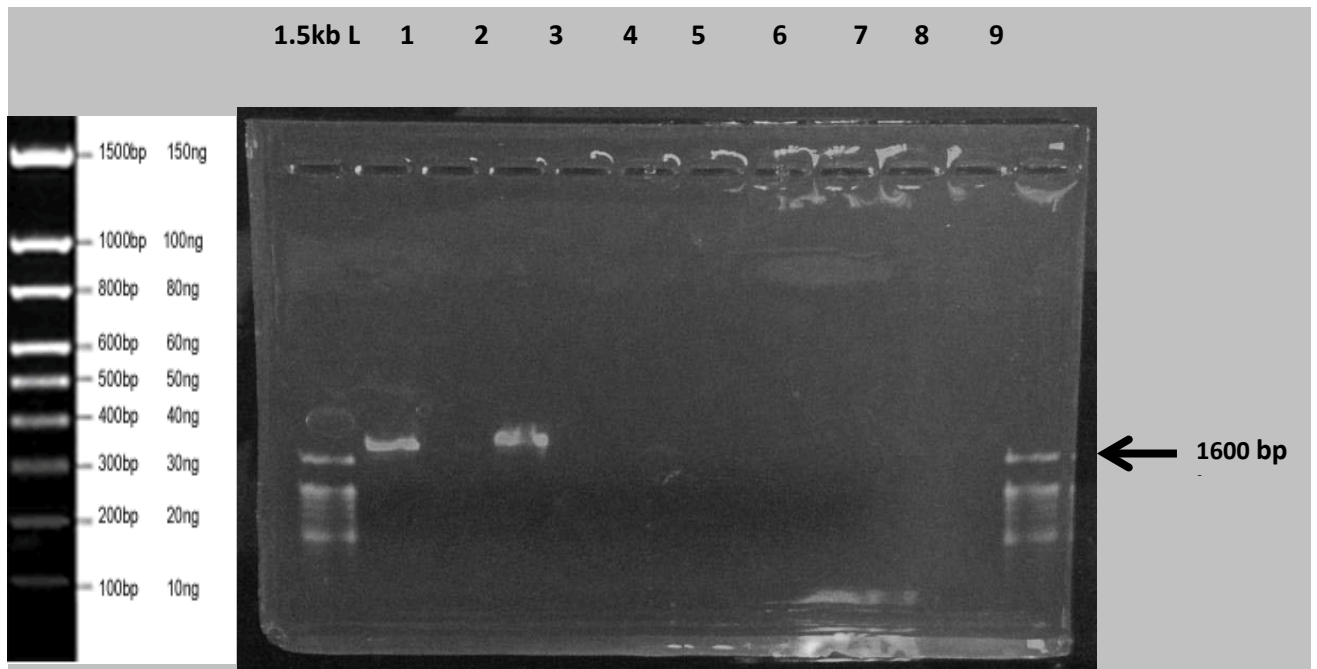
ตารางที่ 4.12 แสดงสถานีและไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเป็นดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย

สถานี	ไอโซเลต
15	B3/1
15	B3/2
2	A2/2
2	A2/3
7	A7/1
7	A7/2
9	A9/1
12	A12/2

4.4.4 ผลการบ่งชี้ชนิดจุลินทรีย์ด้วยยีน 16SrRNA

โคโลนีเดี่ยวของจุลินทรีย์ถูกนำมาสกัดจีโนมดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ 16S ribosomal DNA fragment ด้วยด้วยลำดับเบสของ 16S rDNA โดยใช้ 27F-eubac universal primer คู่กับ 1492R-eubac universal primer พบตัวอย่างชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 1600 คู่เบส ในเลนที่ 1 และ 3 ทั้งนี้แสดงตัวอย่างจาก Electrophoresis bands ในภาพที่ 4.6

จากการบ่งชี้สายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยยีน 16SrDNA ที่ได้จากการคัดแยกโดยสูตรอาหารที่มี PAHs เป็นองค์ประกอบพบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs และพบทั้งหมดเป็นแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่จำแนกได้จากตะกอนดินจำนวน 8 ชนิด ดังนี้ คือ *Ralstoniapicketti*, *Paenibacillus polymyxa*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium diolis*, *Clostridium acidosoli*, *Clostridium acidotolerans*, *Clostridium drakei* และเชื้อ *Bacillus subtilis*



ภาพที่ 4.6 แสดงดีเอ็นเอขนาด 1600 กิโลเบสของ 16S rDNA ในเลนที่ 1 คือดีเอ็นเอของจุลินทรีย์สกัดได้จาก ตะกอนดินหมายเลข 5 และในเลนที่ 3 คือดีเอ็นเอของจุลินทรีย์สกัดได้จากตะกอนดินหมายเลข 9

แต่เพื่อแยกชนิดของดีเอ็นเอในทรีไฟอิงแบคทีเรีย จึงมีการดัดแปลงสูตรอาหารที่ใช้ในการคัดแยกเพื่อให้มีความเหมาะสมกับการคัดแยกเฉพาะดีเอ็นเอในทรีไฟอิงแบคทีเรียเท่านั้น โดยปรับสูตรอาหารเป็น Nitrate broth เพื่อความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรด ก่อนการทดสอบความสามารถในการใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงในอาหารสูตร MSM mineral medium และให้ 200 ppm Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้เป็นดีเอ็นเอในทรีไฟอิงแบคทีเรีย 8 ไอโซเลต โดยความสามารถในการรีดิวซ์สารประกอบไนเตรดไปเป็น N_2 ได้ทั้งหมด และหลังจากการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนอนุรักษ์ คือ 16S rDNA แล้ว พบว่าแบคทีเรียที่พบในกลุ่มนี้ คือ *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Proteus mirabilis* และ *Enterobacter asburiae* ซึ่งทั้งหมดนี้พบในตะกอนดินได้ทะเลที่มีความลึกแตกต่างกัน เช่น *Bacillus subtilis* พบในตะกอนดินได้ทะเลที่มีความลึก 30.5 เมตร *Proteus mirabilis* พบในตะกอนดินได้ทะเลที่มีความลึก 16.8 เมตร *Enterococcus faecalis* และ *Paenibacillus macerans* พบในตะกอนดินได้ทะเลที่มีความลึก 19.5 เมตร ส่วน *Enterobacter asburiae* พบในตะกอนดินได้ทะเลที่มีความลึก 4.5 เมตร และทั้งหมดจัดเป็นแบคทีเรียไร้อากาศ (anaerobic bacteria) แสดงในตารางที่ 4.13

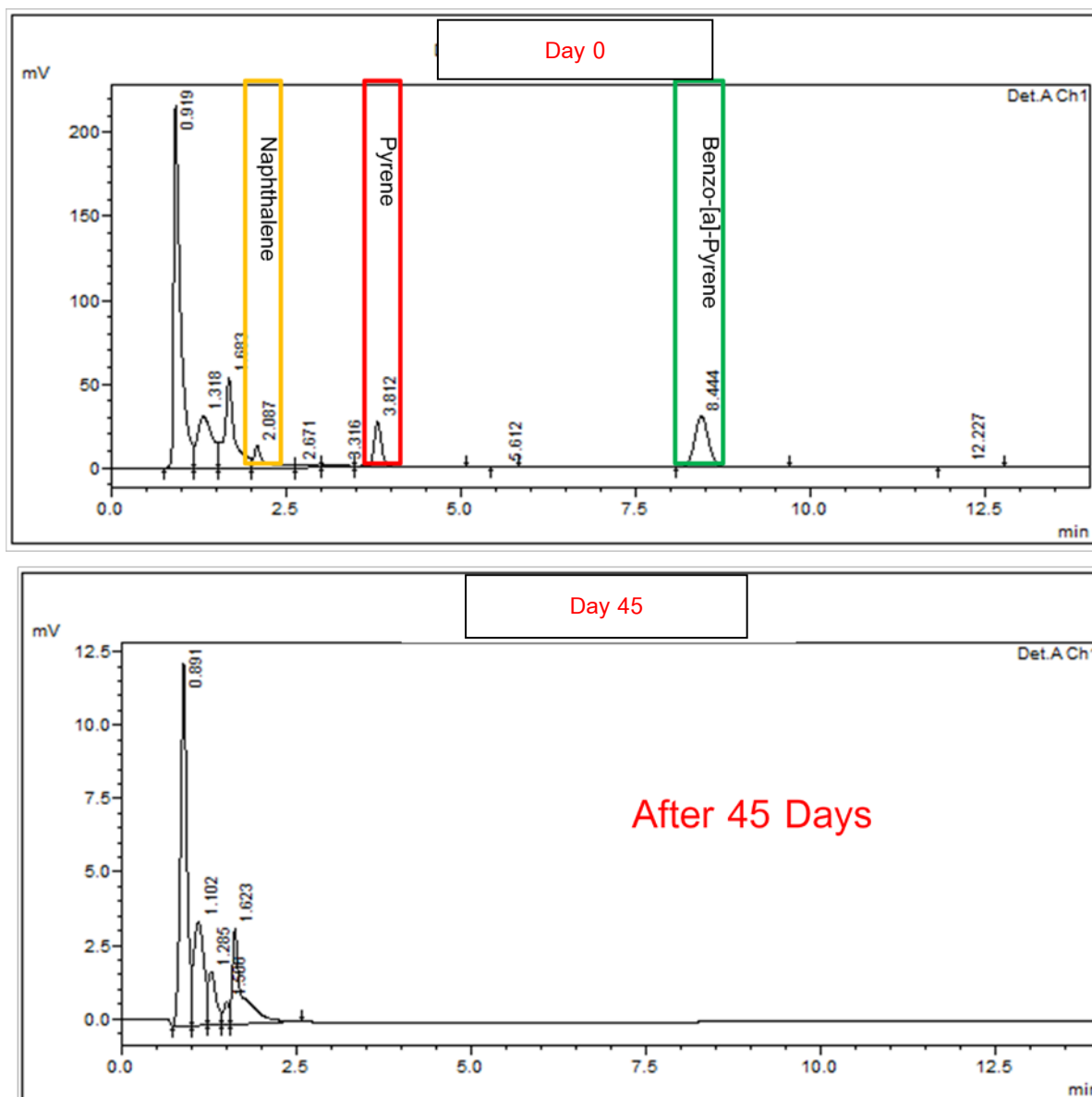
ดีเอ็นเอในทรีไฟอิงแบคทีเรียที่ได้จะถูกเก็บรักษาในสภาพที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย สารประกอบ PAHs ต่อไป

ตารางที่ 4.13 ชนิดของดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรีย ที่มีความสามารถในการใช้สารประกอบโพลีไซคลิก
แอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ ที่คัดแยกได้จากตะกอน
ใต้ทะเลจากจุดพิภักที่กำหนด

Isolation code	Sampling area	Depth (m)	Species identified	Acc.Number (GenBank)
B3/1	station 15	19.5	<i>Enterococcus faecalis</i>	JX975422.1
B3/2	station 15	19.5	<i>Paenibacillus macerans</i>	AM406669.1
A2/2	station 2	10.0	<i>Bacillus subtilis</i>	KC441812.1
A2/3	station 2	10.0	<i>Bacillus tequilensis</i>	JN999833.1
A7/1	station 7	30.5	<i>Bacillus subtilis</i>	JQ398853.1
A7/2	station 7	30.5	<i>Bacillus subtilis</i>	JQ398853.1
A9/1	station 9	16.8	<i>Proteus mirabilis</i>	KC456557.1
A12/2	station 12	4.5	<i>Enterobacter asburiae</i>	JQ659607.1

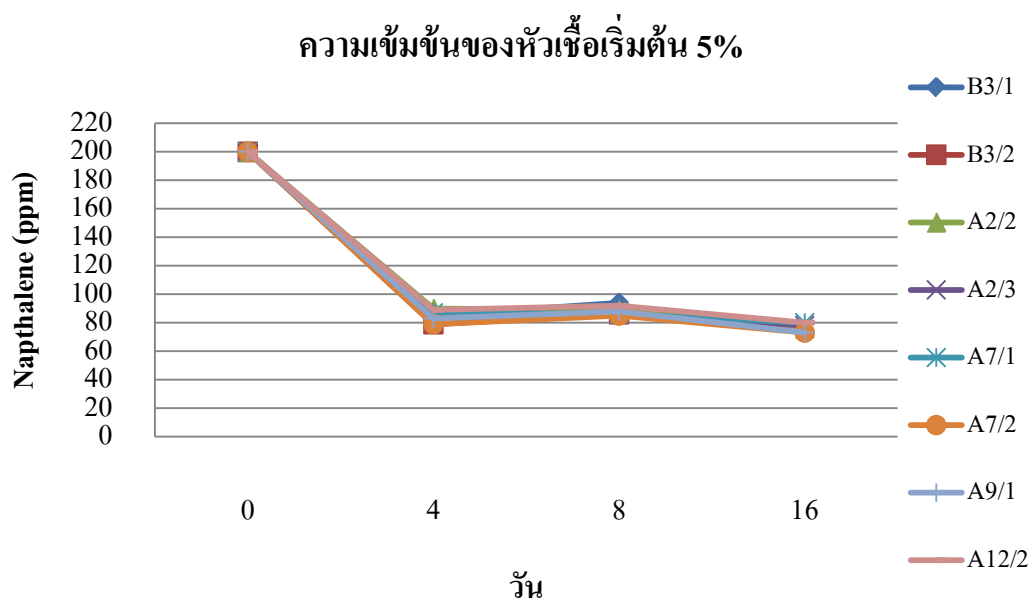
4.4.5. ความสามารถของดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรียในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

จากการทดสอบความสามารถของดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตที่แยกได้จากตะกอนดิน
จากเกาะสีชังที่มีต่อการย่อยสลายสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวน
องค์ประกอบของวงเบนซีนต่าง ๆ กัน ได้แก่ Naphthalene (2 วง), Phenanthrene (3 วง), Pyrene (4 วง), และ
Benzo[a]pyrene (5 วง) โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ในอาหารด้วยเครื่อง HPLC ที่ใช้ UV
detector พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 45 วัน ตรวจไม่พบปริมาณ PAHs เหลืออยู่ในอาหารเลย เมื่อเปรียบเทียบกับ
control ที่ไม่ใช้ดีไนทรีฟอยิ่งแบคทีเรีย ผลการวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง HPLC แสดงใน
ภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 ปริมาณPAHsที่เหลืออยู่จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องHPLC เมื่อเวลาเริ่มต้นและเมื่อเวลาผ่านไป 45 วัน

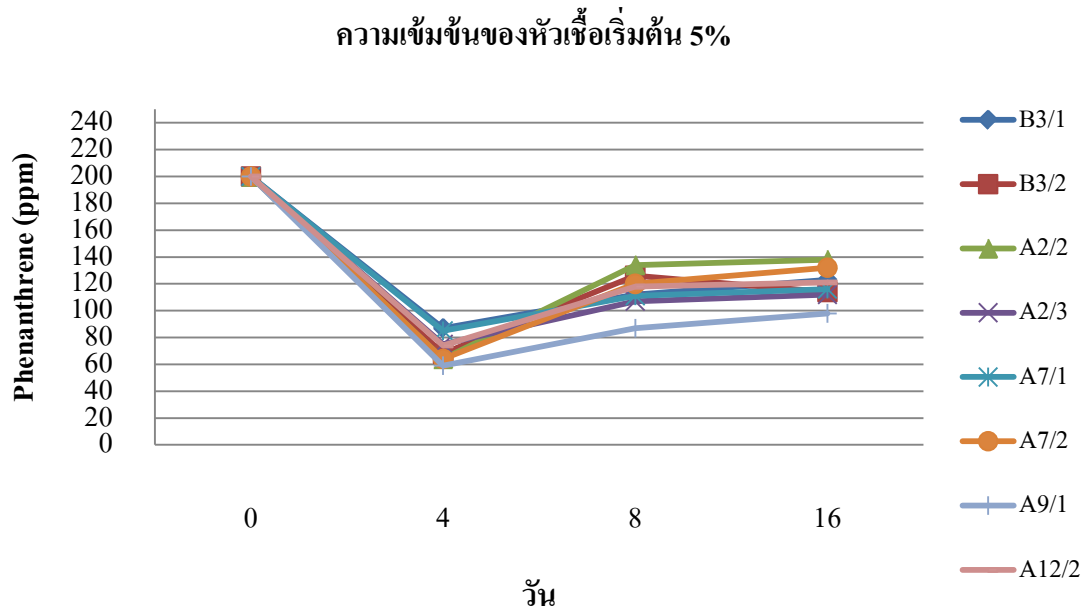
เมื่อพิจารณาความสามารถของดีโนทรีไฟอิงแบคทีเรียในการย่อยสลาย PAHs ทั้ง 4 ชนิด คือ Naphthalene (2R), Phenanthrene (3R), Pyrene (4R) และ Benzo[a]pyrene (5R) ผลการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั้ง 4 ชนิด เป็นเวลา 16 วัน โดยตรวจวิเคราะห์ปริมาณที่เหลืออยู่ของสารประกอบ PAHs ที่ทำการศึกษา ทั้งนี้สามารถแสดงในภาพที่ 4.8 เมื่อใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5% สำหรับการย่อยสลาย Naphthalene



ภาพที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Naphthalene ต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

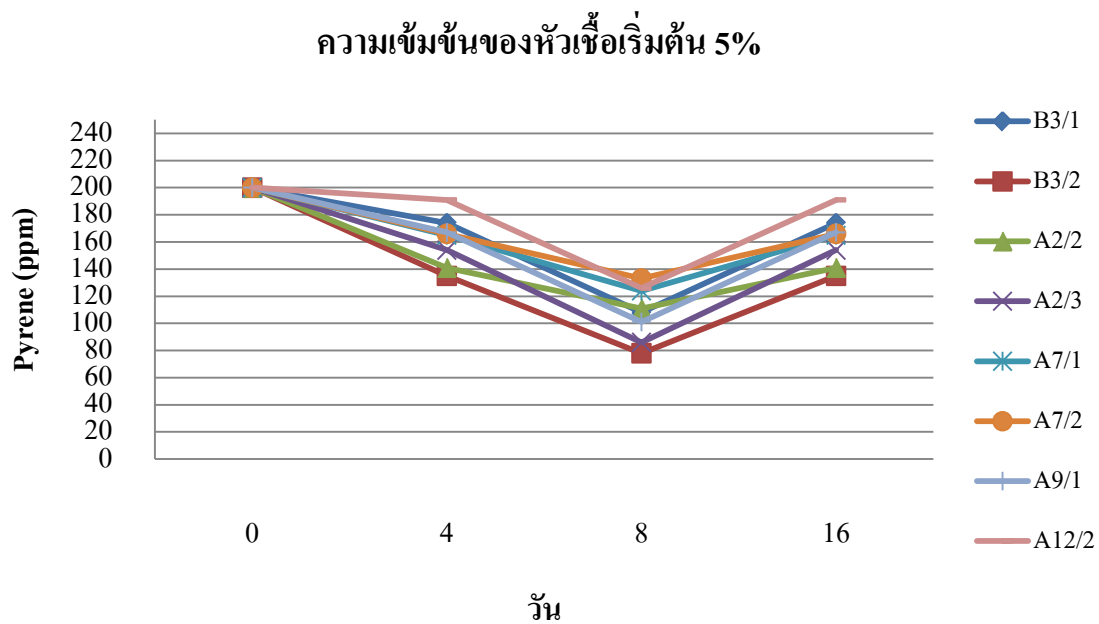
จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณของ Naphthalene เมื่อเวลาผ่านไป มีค่าลดลง โดยพบการย่อยสลายได้มากกว่า 50% ไม่ว่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียไฮโซเลตใดก็ตาม โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณการลดลงของ Naphthalene เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 5%

สำหรับผลการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ Phenanthrene เป็นเวลา 16 วัน สามารถแสดงในภาพที่ 4.9 เมื่อใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 5% โดยผลการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ Phenanthrene พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณของ Phenanthrene มีค่าลดลง โดยพบการย่อยสลายเกิดได้มากกว่า 50% ไม่ว่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียไฮโซเลตใดก็ตาม



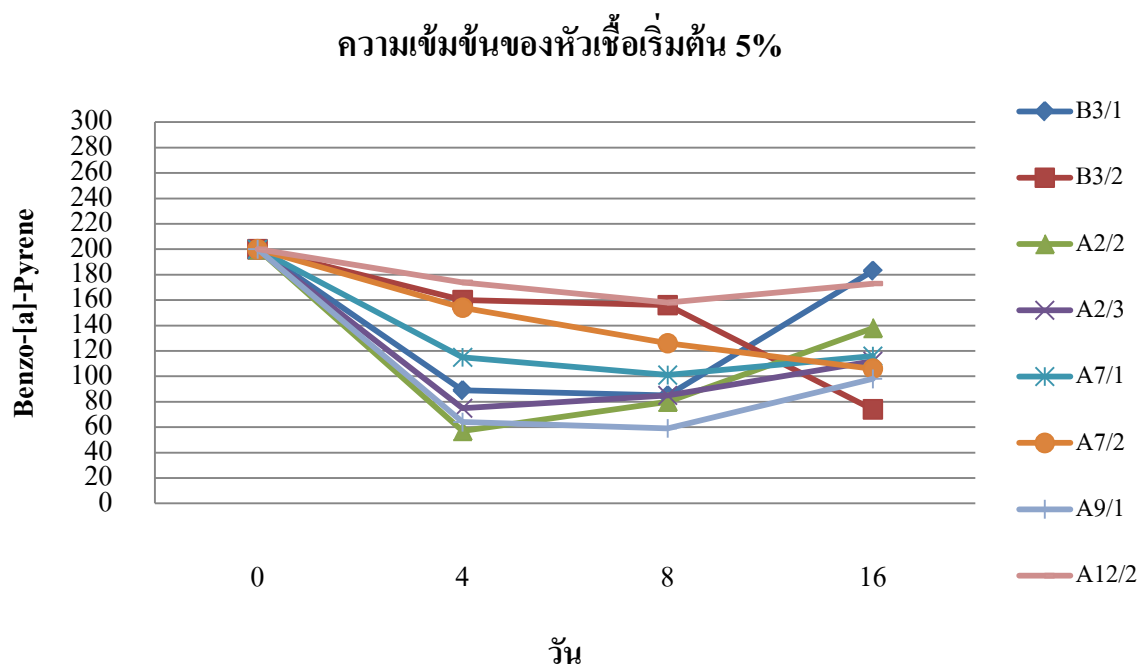
ภาพที่ 4.9 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Phenanthrene ต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

เมื่อทำการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ Pyrene (4R) พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณของ Pyrene มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อใช้ทั้ง 8 ไอโซเลต และพบบางไอโซเลตที่ย่อยสลาย Pyrene ได้อย่างดี โดยเฉพาะ ไอโซเลต B3/2 ผลการทดลองแสดงดัง ภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Pyrene ต่อเวลา เมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

สำหรับผลการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ Benzo[a]pyrene เป็นเวลา 16 วัน สามารถแสดงในภาพที่ 4.11 ผลการทดลองพบว่า ปริมาณของ Benzo[a]pyrene เมื่อเวลาผ่านไป มีค่าลดลงและปริมาณการลดลงมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อใช้เชื้อต่างชนิดกัน โดยพบการย่อยสลายได้มากกว่า 50% สำหรับปริมาณการลดลงของ Benzo[a]pyrene มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Benzo[a]pyrene ต่อเวลาเมื่อใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 5%

ดังผลการทดลองที่กล่าวแล้ว สำหรับประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั้ง 4 ชนิดคือ Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene, และ Benzo[a]pyrene เป็นเวลา 16 วัน พบสารประกอบ PAHs จะถูกย่อยสลายไปเมื่อใส่เชื้อดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียในปริมาณที่แตกต่างกัน แสดงในตารางที่ 4.14 ทั้งนี้โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่ดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย ซึ่งไม่พบการลดลงของสารประกอบ PAHs ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนองค์ประกอบของวงเบนซีนต่างๆกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะ Naphthalene ซึ่งเป็นสารประกอบ PAHs ตัวที่เล็กที่สุด ดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย สามารถย่อยสลายได้มากกว่า 60 % ส่วน pyrene พบดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียบางตัวที่สามารถย่อยสลายได้ประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 50 % ถึง 60 % คือ *E. faecalis*, *P. macerans*, *B. tequilensis*, และ *B. subtilis* สำหรับ Benzo[a]pyrene นั้นมีดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียชนิด *P. macerans* และ *P. mirabilis* ที่มีประสิทธิภาพสามารถย่อยสลายได้ 60 % และ 50 % ตามลำดับ ส่วน Phenanthrene นั้นมีดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย คือ *P. mirabilis* ที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้ 50% ส่วนดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย ตัวอื่นๆ พบความสามารถในการย่อยสลายได้น้อยกว่า 50%

ตารางที่ 4.14 ความสามารถในการใช้โพลีไซคลิกแอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนของดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียแต่ละชนิด หลังจากการบ่มในอาหารที่มี PAHs 200 ppm ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 วัน

Isolation code	Samnling area	Species	PAHs degradation ability	Amonth of PAHs elimination (nm) within 16 days in 5% inoculation
B3/1	station 15	<i>E. faecalis</i>	naphthalene	122
			phenanthrene	77
			pyrene	119
			benzo[a]pyrene	17
B3/2	station 15	<i>P. macerans</i>	naphthalene	125
			phenanthrene	86
			pyrene	122
			benzo[a]pyrene	126
A2/2	station 2	<i>B. subtilis</i>	naphthalene	124
			phenanthrene	62
			pyrene	89
			benzo[a]pyrene	62
A2/3	station 2	<i>B. tequilensis</i>	naphthalene	122
			phenanthrene	88
			pyrene	114
			benzo[a]pyrene	88
A7/1	station 7	<i>B. subtilis</i>	naphthalene	120
			phenanthrene	84
			pyrene	114
			benzo[a]pyrene	88
A7/2	station 7	<i>B. subtilis</i>	naphthalene	127
			phenanthrene	68
			pyrene	67
			benzo[a]pyrene	94

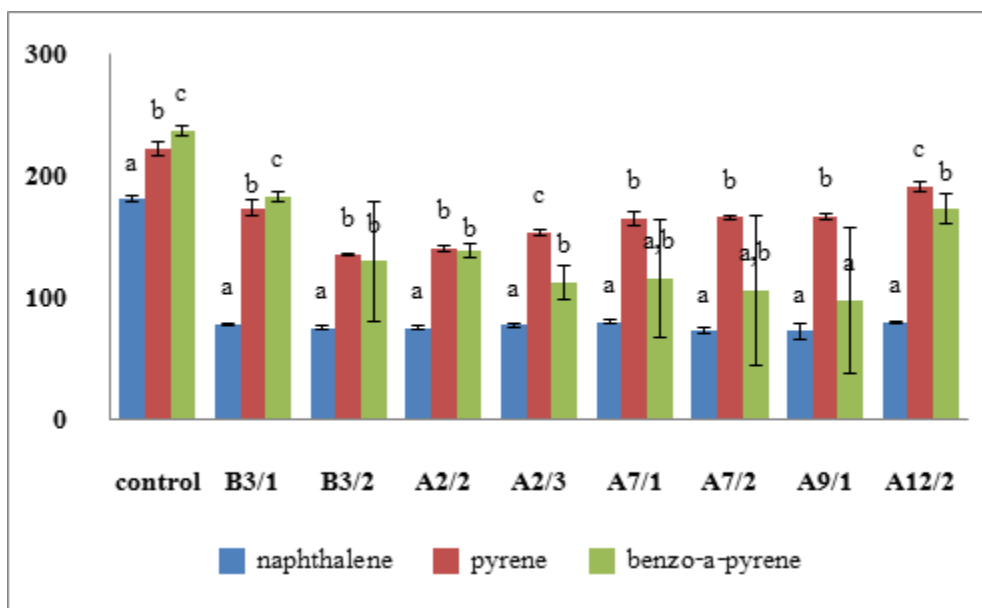
ตารางที่ 4.14 (ต่อ)

Isolation code	Samnling area	Species	PAHs degradation ability	Amonth of PAHs elimination (nm) within 16 days in 5% inoculation
A9/1	station 9	<i>P. mirabilis</i>	napthalene	127
			phenanthrene	102
			pyrene	99
			benzo[a]pyrene	102
A12/2	station 12	<i>E. asburiae</i>	napthalene	120
			phenanthrene	79
			pyrene	74
			benzo[a]pyrene	27

ตารางที่ 4.15 ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของแบคทีเรียดีไนทรีไฟอิงที่คัดแยกได้จากตะกอนดินใต้ทะเล เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MSM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที

	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ppm)		
	Naphthalene	pyrene	benzo[a]pyrene
Control	180.67 $\pm$ 2.49 ^a	222.00 $\pm$ 6.24 ^b	237.00 $\pm$ 4.58 ^c
B3/1	78.00 $\pm$ 1.00 ^a	173.67 $\pm$ 6.51 ^b	183.33 $\pm$ 4.04 ^c
B3/2	75.33 $\pm$ 1.53 ^a	135.00 $\pm$ 1.00 ^b	130.00 $\pm$ 48.54 ^b
A2/2	75.67 $\pm$ 1.15 ^a	140.67 $\pm$ 3.06 ^b	138.33 $\pm$ 5.69 ^b
A2/3	77.67 $\pm$ 2.08 ^a	154.00 $\pm$ 2.65 ^c	112.33 $\pm$ 14.15 ^b
A7/1	80.33 $\pm$ 1.53 ^a	164.67 $\pm$ 5.86 ^b	116.33 $\pm$ 48.13 ^{a,b}
A7/2	73.00 $\pm$ 2.65 ^a	166.00 $\pm$ 1.00 ^b	106.33 $\pm$ 61.86 ^{a,b}
A9/1	73.00 $\pm$ 6.08 ^a	167.33 $\pm$ 2.31 ^b	97.67 $\pm$ 59.65 ^a
A12/2	80.00 $\pm$ 1.00 ^a	191.00 $\pm$ 3.61 ^c	172.67 $\pm$ 12.01 ^b

*ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.12 เปรียบเทียบปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน ของแบคทีเรียดีไนทรีไฟอิงที่คัดแยกได้จากตะกอนดินใต้ทะเล เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MSM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที

4.5 อภิปรายและวิจารณ์ผล

ผลการวิจัยของการศึกษารั้งนี้พบว่า แบคทีเรียที่สามารถคัดแยกจากตะกอนดินใต้ทะเลมี 63 ไอโซเลต มี 8 ไอโซเลต ที่พบใน 5 สถานี (สถานีที่ 2, 7, 9, 12, 15) ซึ่งเป็นแบคทีเรีย 6 ชนิด คือ *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* และ *Enterobacter asburiae* ซึ่งทั้งหมดนี้พบในตะกอนดินใต้ทะเลที่มีความลึกแตกต่างกัน (10.0, 31.6, 16.8, 18.3 และ 5.7 เมตร ตามลำดับ) และทั้งหมดจัดเป็นแบคทีเรียไร้อากาศ (anaerobic bacteria) โดยเป็นดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลต ทั้งนี้ มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับฐานข้อมูล Genbank 96% และมีการประเมินประสิทธิภาพการย่อยสลาย 200 ppm Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถย่อยสลาย Naphthalene หลังจากการบ่มเป็นเวลา 16 วัน โดยมีความเข้มข้นของ Naphthalene ลดลง 100-120 ppm ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Lu et al., (2010) ที่พบว่าแบคทีเรียกลุ่มดีไนทรีไฟอิงแบคทีเรีย มีความสามารถในการย่อยสลายประกอบโพลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิด Naphthalene ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สำหรับแบคทีเรียดีไนทรีไฟอิงที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีที่สุดที่ได้จากการทดลองนี้คือ ไอโซเลตที่ A9/1 ซึ่งเป็นแบคทีเรีย *P. mirabilis* โดยสามารถย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ ได้แก่ Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ppm จนลดลงเหลือ 73, 98, 101 และ

98 ppm ตามลำดับ ซึ่งตรงกับรายงานของ Taoufik et al., (2004) ที่ระบุว่า *P. mirabilis* มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ชนิด Benzene Toluene และ Napthalene เป็นแหล่งคาร์บอนได้ และสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Ceyman (2012) เช่นกันที่พบว่าแบคทีเรียชนิด *Proteus* sp. มีความสามารถในการย่อยสลายประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิด Pyrene ได้ ส่วนไอโซเลตที่ B3/2 ซึ่งเป็นแบคทีเรีย *P. macerans* เช่นเดียวกันที่มีความสามารถในการลดความเข้มข้นของ 200 ppm Benzo[a]pyrene ในอาหารเหลวจาก 200 ppm ลดลงเหลือ 74 ppm

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหลายชิ้นระบุตรงกับผลการทดลองนี้ที่ว่า *B. subtilis* มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ได้ *B. subtilis* เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีอากาศ โดย Bayoumi et al., (2009) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ในตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในบริเวณโรงกลั่นน้ำมัน และพบว่ามี 6 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ แบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus firmus* APIS272, *Bacillus licheniformis* APIS473, *Bacillus subtilis* SBS26, *Burkholderia cepacia* DAFS11, *Micrococcus lylae* SBS661 และ *Pseudomonas alcaligenes* DAFS331 โดยเป็นแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus* จำนวน 3 สายพันธุ์ โดย *B. firmus* APIS272 สามารถย่อยสลาย Acenaphthylene Anthracene และ Benzo[b]fluoranthrene ได้อย่างสมบูรณ์ โดยใช้เวลา 21 วัน ภายใต้ mesophilic condition

ผลการถูกย่อยสลายของ PAHs โดยแบคทีเรียดีในทรีฟโอฟอิงจากการทดลองพบว่าจำนวนวงเบนซีนมีผลต่อการถูกย่อยสลาย โดย PAHs ที่มีองค์ประกอบเป็นจำนวนวงเบนซีนที่มากกว่าจะถูกย่อยสลายได้ช้า และเห็นได้ว่า Napthalene ที่มีจำนวนวงเบนซีน 2 วง ถูกย่อยสลายได้ดีกว่า Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene ที่มีวงเบนซีนเป็นองค์ประกอบจำนวน 3 วง 4 วง และ 5 วง ตามลำดับ สอดคล้องกับงานของ Mrozik et al., (2003) และ Oleszczuk and Baran (2003) ที่กล่าวว่าจำนวนวงเบนซีนและน้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มมากขึ้นนั้นส่งผลต่อความสามารถในการละลายน้ำและความทนทานต่อการถูกย่อยสลายของ PAHs

แต่ที่เห็นชัดเจนคือ แบคทีเรียที่มีความสามารถในการลดปริมาณ PAHs ทุกชนิดที่นำมาทดสอบสามารถเพิ่มความสามารถในการละลายของ PAHs ทุกชนิด โดยเฉพาะชนิดที่มีโครงสร้างของวงเบนซีนหลายวงเช่น 5 วง ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าว่าตะกอนของ PAHs ที่ตกตะกอนอยู่ข้างใต้ขวดหายไปหลังจากการเลี้ยงบ่มด้วยแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 8 วัน ทุกไอโซเลตแสดงความสามารถในการย่อย 200 ppm Pyrene ได้ดีที่สุด คือ 140 ppm ที่เวลา 8 วัน อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการใช้ Benzo[a]pyrene ยังไม่สามารถสรุปผลที่ชัดเจนได้ เช่น ไอโซเลต B3-1 ที่พบปริมาณ Benzo[a]pyrene ไม่คงที่ อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของแบคทีเรียเอง หรือปัญหาการละลายของ Benzo[a]pyrene ในอาหารที่ไม่สม่ำเสมอ ส่งผลให้การวิเคราะห์มีข้อจำกัดก็ว่าได้

4.6 ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ด้วยจุลินทรีย์ผสม (Mixed culture) ที่คัดแยกได้ อาจทำให้การย่อยสลายเกิดได้เร็วและมากยิ่งขึ้น
2. หากสามารถนำผลการทดลองในห้องปฏิบัติการไปประยุกต์ใช้ในพื้นที่ที่ปนเปื้อนสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน จะทำให้งานมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีปัจจัยอื่นๆอีกมาก ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบนี้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

4.7 บรรณานุกรม

- เก็จกาญจน์ สมานวิฑูริณ. 2546. การตรวจสอบยีนไนโตรรีดักเตสในดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียโดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 119 หน้า.
- กรมโรงงานอุตสาหกรรม 2545. ตำราระบบบำบัดมลพิษน้ำ พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร: สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.
- เจษฎา โพธิรัตน์ 2541. การคัดเลือกเชื้อดีไนทริไฟอิงแบคทีเรียเพื่อลดไนเตรดในน้ำ วิทยานิพนธ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธงชัย พรธนะสวัสดิ์ 2554. การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร: สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.
- สมศักดิ์ วัณ. 2524. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 193 หน้า
- สิรินันท์ ศรีดำ 2552. การคัดเลือกแบคทีเรียดีไนทริไฟอิงที่มีประสิทธิภาพเพื่อการบำบัดไนเตรดในน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง
- แหล่งข้อมูล: <http://www.pt.tsu.ac.th/rdi/ConAll/POSTER19/P17.pdf> (2 มิถุนายน 2554)
- Bayoumi, R. A. 2009. Bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy oil contaminated soil, J. Appl. Sci. Res, 5(2): 197-211.
- Beishir, L., 1996. Microbiology I practice: A self-instructional laboratory course, 6th ed, Harper Collins College Publisher, New York, pp 318-319.
- Bitton, G. 1999. Wastewater Microbiology, 2nd ed, New York: Wiley-Liss, Inc.
- Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A., and Takada, H., 2006. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand, Marine Pollution Bulletin, 52: 942-956.
- Bradley, P.M., Aelion, C.M. and Vroblecky, D.A., 1992. Influence of environmental factors on denitrification in sediment contaminated with JP-4 Jet Fuel, Ground Water, 30: 843-848.

- Ceyman, N., 2012. Biodegradation of pyrene by a newly isolated *Proteus vulgaris*, Scientific Research and Essay, 7: 66-77.
- Coates, J. D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P., and Lovley, D. R. 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkane in petroleum-contaminated marine harbor sediment, Applied and Environmental Microbiology, 97: 3589-3593
- Delwiche, C.C. 1981. Denitrification, Nitrification and Atmospheric Nitrous Oxide, New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Fukui, M., Harms, G., Rabus, R., Schramm, A., Widdel, F., Zengler, K., Boreham C., and Wilkes, H. 1999. Anaerobic degradation of oil hydrocarbons by sulfate-reducing and nitrate-reducing bacteria, Microbial Biosystems (Online): New Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology Bel.
- Available at: <http://plato.acadiau.ca/isme/Symposium12/fukui.PDF> (June 3, 2011).
- Hall, J. B. 1978. Nitrate-reducing bacteria, pp. 296-298. Cited in Schlessinger, D., ed. 1978. Microbiology, USA: American society for microbiology.
- Haner, A., Hohner, P., and Zeyer, J. 1995. Degradation of p-xylene by a denitrifying enrichment culture, Applied and Environmental Microbiology, 61(8): 3185-3188.
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., and Shutsubo, K. 1999. Petroleum Biodegradation in Marine Environments, Journal of Molecular Microbiology Biotechnology, 1: 63-70.
- Harvey, R.G. 1997. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, Wiley-VCH, Inc, New York, USA. p 667.
- Head, I. M., and Swannell, R. P. J., 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats, Current Opinion in Biotechnology, 10: 234-239.
- Kanary, R. A., and Harayama, S. 2000. Minireview: Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon by bacteria, Journal of Bacteriology, 182: 2059-2067.
- Lu, X., Zhang, T., Fang, H. H-P., Leung, K. M. Y., and Zhang, G. 2010. Biodegradation of Naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria, International Biodeterioration & Biodegradation, 65: 204-211.
- Mille, G., Asia, L., Guillianio, M., Malleret, L., and Doumeng, P. 2007. Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediteranean Sea (Gulf of Fos area, France), Marine Pollution Bulletin, 54(5): 566- 575.
- Mrozik, A., Piotrowska, Z., and Labuzek, S. 2003. Review Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons, Polish Journal of Environmental Studies, 12: 15-25.
- Oleszczuk, P., and Baran, S. 2003. Degradation of Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil Polluted with Aircraft Fuel, Polish Journal of Environmental Studies, 12: 431-437.

- Payne, W.J. 1973. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms, *Bacteriology Review*, 37: 409-452.
- Rakhimova, E.R., Osipova, A.L. and Zaripova, S.K. 2004. Purification of soil from oil pollutants with the use of denitrifying hydrocarbon-oxidizing microorganisms, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40: 563–567.
- Roger, K. 1982. Denitrification, *Microbiological Reviews*, 46: 43-70.
- Shi, H.P. and Lee, C.M. 2006. Combining anoxic denitrifying ability with aerobic–anoxic phosphorus-removal examinations to screen denitrifying phosphorus-removing bacteria, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 57: 121–128.
- Shuttleworth, K.L., and Cerniglia, C.E. 1995. Environmental aspects of PAH biodegradation, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 54: 291-302.
- Theerachat, M., Virunanon, C., Chulalaksananukul, S., Sinbuathong N. and Chulalaksananukul, W., 2011. *NirK* and *nirS* nitrite reductase genes from non-agricultural forest soil bacteria in Thailand, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 27: 999-1003.
- Taoufik, J., Zeroual, Y., Moutaouakkil, A., Moussaid, S., Dzairi, F. Z., Talbi, M., Hammoumi, A., Belghmi, K., Lee, K., Loutfi, M., and Blaghen, M., 2004. Aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacteria (*Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp.) in fluidized bed bioreactor, *Annals of Microbiol*, 54(2): 189-200.
- Virunanon, C., Chantaroopamai, S., Denduangbaripant, J., and Chulalaksananukul, W., 2008. Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract, *Anaerobe*, 14(2): 109-117.

ภาคผนวก

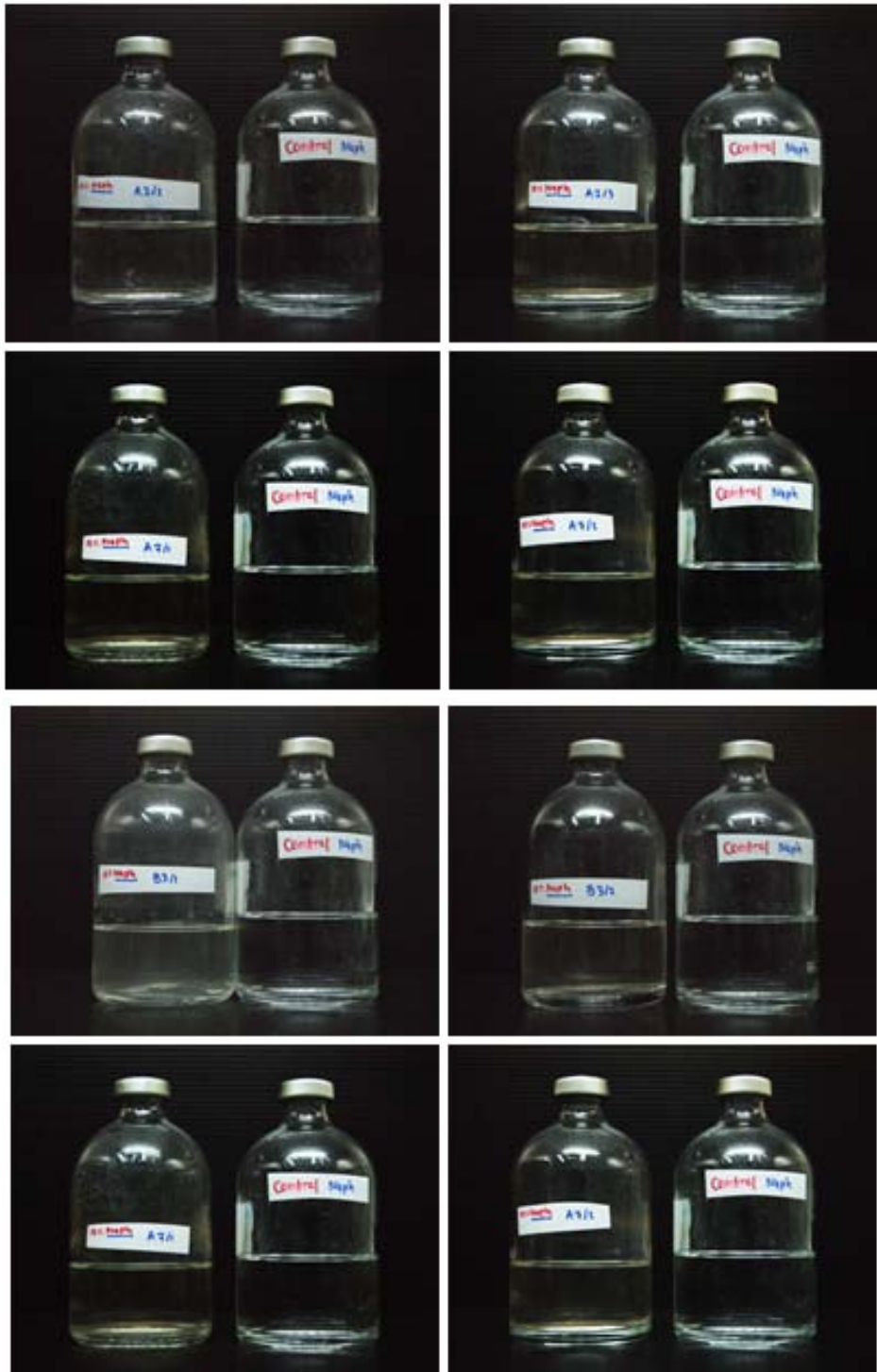
ภาคผนวก ก. ความสามารถในการละลายของสารประกอบ PAHs

สารประกอบ PAHs ทั้ง 4 ชนิด คือ Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene สามารถละลายน้ำได้ค่อนข้างน้อย จึงเกิดตะกอนที่ก้นภาชนะในอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงดังภาพที่ ก-1

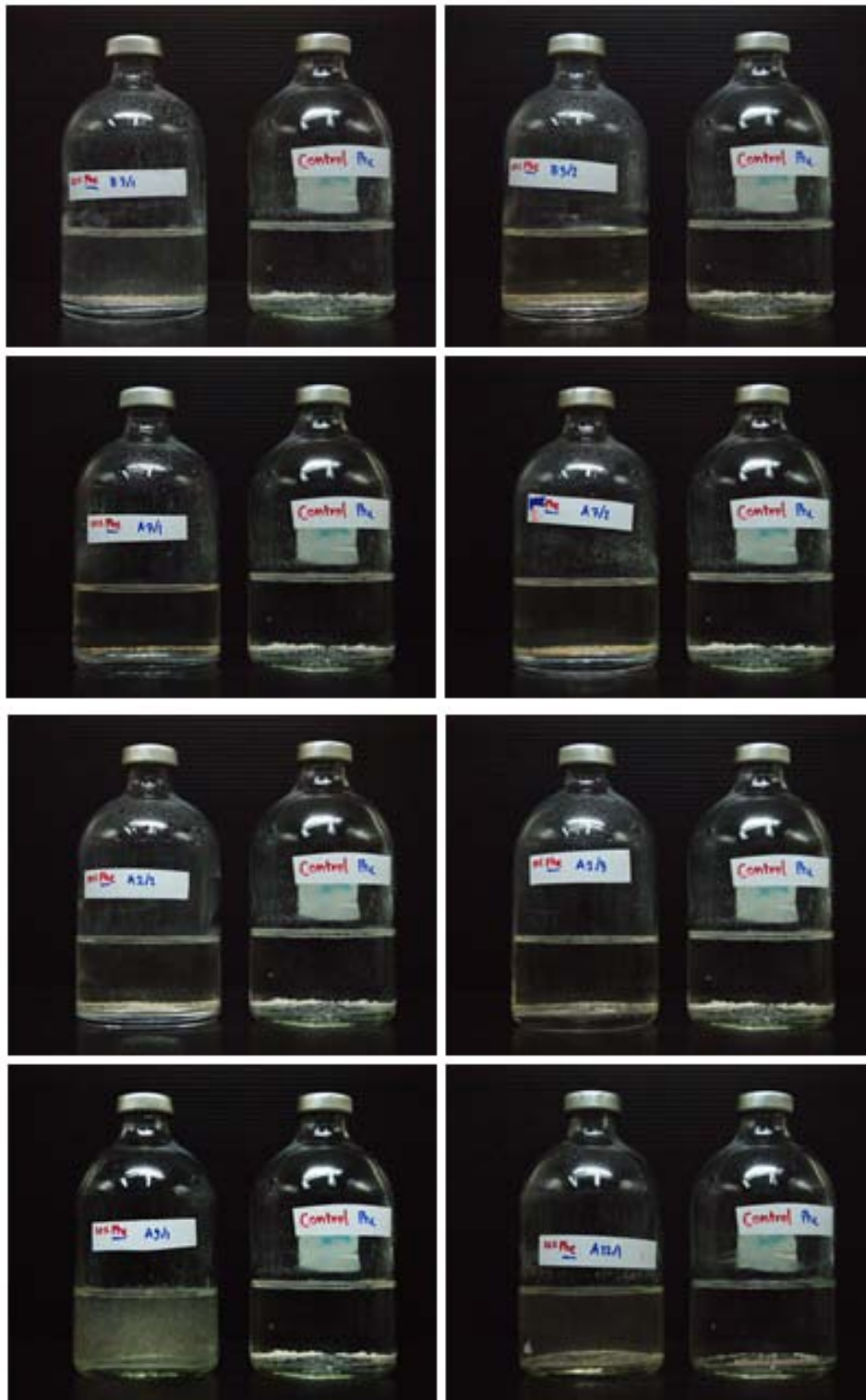
การละลายของ PAHs ทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 200 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ แสดงดังภาพที่ 4.12 ถึง 4.16



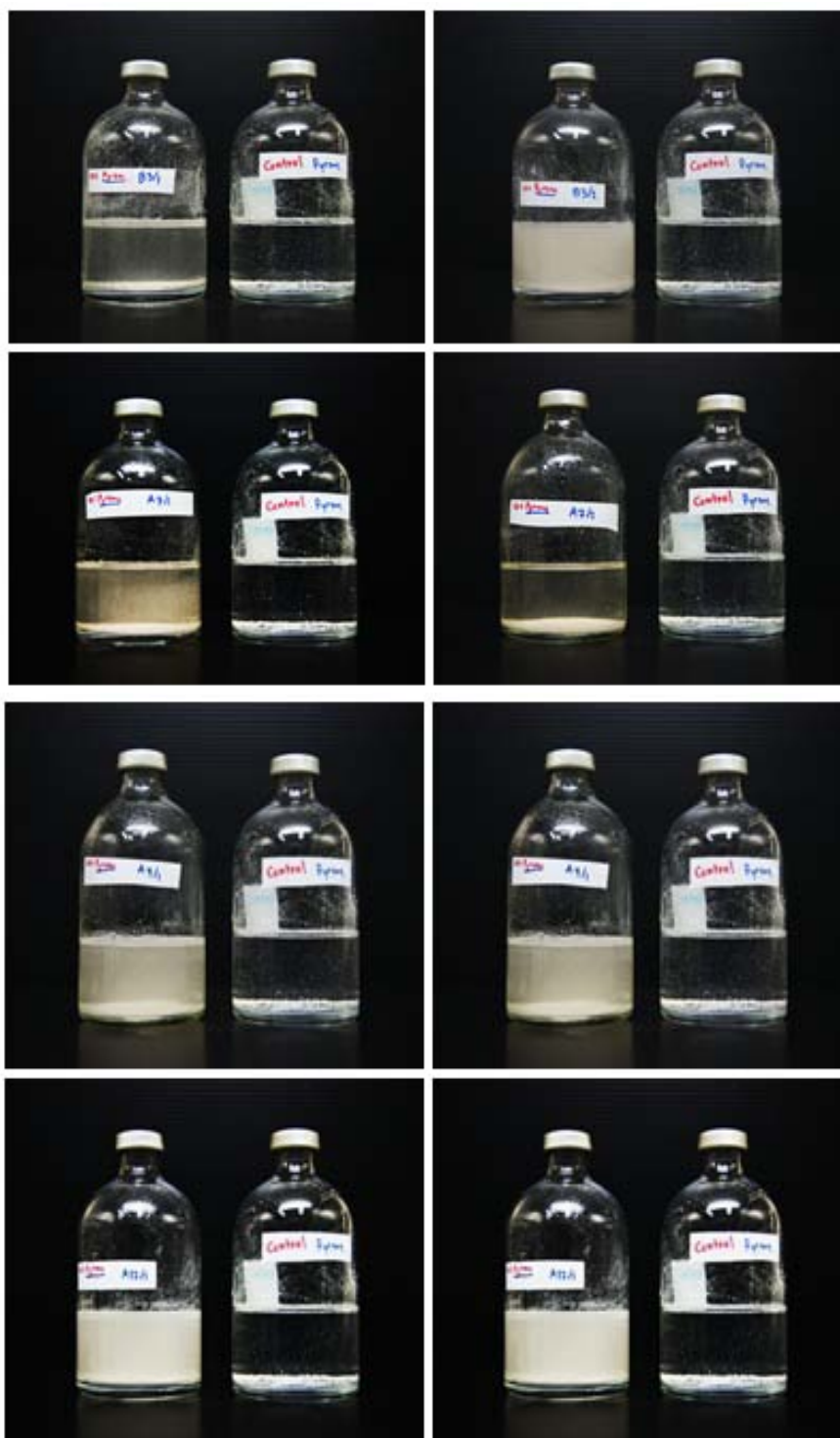
ภาพที่ 4.13 ความสามารถในการละลายของ PAHs ทั้ง 4 ชนิดคือ Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene ที่ความเข้มข้น 200 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 4.14 สภาพการละลายของ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนคือ Naphthalene ที่ความเข้มข้น 200 ppm เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% (ซ่าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ (ขวา) เป็นเวลา 8 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.15 สภาพการละลายของ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอน คือ Phenanthrene ที่ความเข้มข้น 200 ppm เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ (ขวา) เป็นเวลา 8 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.16 สภาพการละลายของ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนคือ Pyrene ที่ความเข้มข้น 200 ppm เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% (ซ้าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ (ขวา) เป็นเวลา 8 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.17 สภาพการละลายของ PAHs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนคือ Benzo[a]pyrene ที่ความเข้มข้น 200 ppm เมื่อมีการลงเชื้อที่ความเข้มข้น 5% (ซ่าย) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เชื้อ (ขาว) เป็นเวลา 8 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข. ผลงานทางวิชาการของโครงการที่เผยแพร่แล้ว

1. เสนอผลงานเรื่อง **Screening of Anaerobic Bacteria for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degradation from Marine Sediment** ตีพิมพ์ใน International Proceeding of the 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Renewable Energy and Global Care”, November 2012. Number P-II-04 234.

The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology
“Renewable Energy and Global Care”

P-II-04

Screening of anaerobic Bacteria for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation from marine sediment

Jiraporn Puangkeaw¹, Suphang Chulalaksananukul², Gullaya Wattayakorn³ and Chompunuch Virunanon⁴

¹ Biotechnology Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand

² Chemical Engineering Department Faculty of Engineering, Mahidol University

³ Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand

⁴ Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand

⁵ Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are organic compounds which considered of two or more benzene rings which are potentially to be hazardous substances. They are common pollutants that effect human health by its characteristics of toxicity, mutagenicity and carcinogenicity. PAHs usually contaminated in the environment from human activities. They are usually found in fossil fuel, crude oil, coal, used motor oil, soot smoke from incomplete combustion, oil drilling rig capsize, or even wastewater from factories and in various complex mixtures of hazardous chemicals. PAHs can persist in the environment for very long periods of time due to their stability, high affinity to the sediment, high melting and boiling point, low volatility and low aqueous solubility. Contamination of PAHs in marine sediment effect ecosystem especially benthic organism, include decreased benthic invertebrate abundance, diversity, growth, physiological and behavioural changes. This research was proposed to screen for PAHs degrading bacteria from Sichang marine sediment. From 11 sampling areas an anaerobic Naphthalene degraded bacteria was isolated in 200 ppm PAHs modified media. Identification of bacteria was performed by using 16S rRNA gene sequence comparison then using BLASTn to search the bacterial database and identifying the species that closely matches their sequence. The PAH degrading anaerobe isolated was identified to be *Clostridium bartlettii*. Finally, determination of PAHs degradation was performed by 2-rings (Naphthalene) using HPLC test which shown that 48.98 ppm of Naphthalene can be eliminated after incubated *C. bartlettii* with initial 171.79 ppm naphthalene for 8 days.

Keywords: anaerobic bacteria, PAHs degradation, 16S rRNA gene analysis, marine sediment

Introduction and Objective

Polycyclic aromatic hydrocarbons are usually known as PAHs. These compounds consist of two or more benzene rings (Figure 1.) with potential to be hazardous substances. Many of the constituents of PAHs are not only carcinogenic and mutagenic compounds, but they are also potentially to be immunotoxicant. There have even been reports of their impacts on critical habitats such as the benthic ecosystems, which may ultimately get into the marine food chain and finally effects human health. The results depend on the

concentration of PAHs and the type and extent of exposure (Vincent, 2009). The distribution of PAHs in the environment is extensive and varied in structure. PAHs can be found in soil/dust, air, water, food or household products which are produced during the industrial process, petroleum spills, and incomplete combustion (SA Health, 2009). PAHs can persist in the environment for long time due to their properties such as high melting and boiling point, low volatility, low solubility and high affinity to the sediment.

Nowadays, PAHs contamination is increasing which leads to environmental concern. PAHs may be treated using various methods and applications via physical treatment such as thermal or chemical process (Piskonen and Itävaara, 2004). Application of microorganisms for bioremediation of PAH-contaminated environment seems to be an attractive technology because they are more specific, effective, economic and more environmental friendly. The purpose of this study was to isolate potentially PAH-degrading bacteria from the marine sediment. This may be useful for preliminary studies and understanding in PAHs degrading by environmental microorganisms.

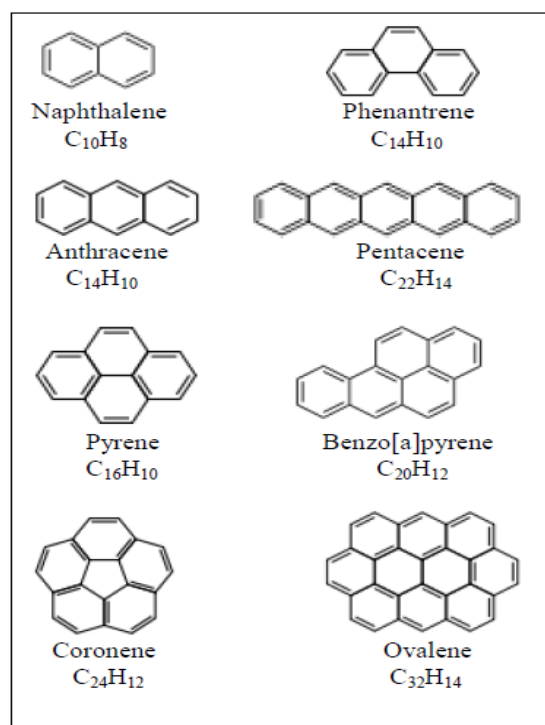


Figure 1. PAHs representatives and their chemical structures

Materials and Methods

2.1 Sediment Sample Collections

Sediment sample were collected from marine sediment around Koh Sichang, Chonburi province, Thailand. Eleven sediment samples were obtained from Aquatic Resources Research Institute (ARRI),

Chulalongkorn University. All samples were stored at 4°C until use.

2.2 Bacterial Isolation

To select PAHs-degrading bacteria, the PAHs-tolerant bacteria were isolated from marine sediment by inoculated 1 g of sample into PAHs modified media (Potato Dextrose Media plus 2% yeast extract with 0.2% Naphthalene) by spread plate method. The plates were incubated at 30 °C under anaerobic condition (or limited oxygen) in the anaerobic chamber (Bactron, Sheldon). Bacteria were isolated from the agar plates and prepared to be single colony by using streak plate method.

2.3 Species identification by 16S rRNA gene amplification and sequencing

Bacterial DNA extraction was performed and the extracted DNA was used in PCR experiments. About 1.6 kb fragments of 16S ribosomal RNA gene were amplified by PCR technique with Taq polymerase and primers Eubac 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

PCR amplification was incubated for 3 min at 94 °C and then subjected to 25 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and primer extension at 72 °C for 2 min. The tubes were then incubated for 10 min at 72 °C. PCR products were separated on 0.8% agarose gel electrophoresis. PCR products were purified by DNA purification kit (omega, USA) before 16S rRNA gene sequencing by an automated sequencer (Pacific Science Co., Ltd., Thailand). Sequence were compared to sequence in the RDP using BLASTn (Virunanon *et al.*, 2008).

2.4 Naphthalene degradation test

PAHs degradation test were performed by using cultures in serum bottles under anaerobic conditions. PAHs modified media with no Naphthalene solution was prepare then N_2 gas was always added into the bottles of media and capped the bottles with 20 mm butyl rubber stoppers. After autoclaved, steriled media were supplemented with a filter-sterilized 0.2% (wt/vol) solution of Naphthalene. Inoculation, the bottles were incubated at 37 °C for 7 days with control without microorganism inoculation. The test bottles were sampled periodically with a

syringe for determination of PAHs. Samples were analyzed by Scientific and Technological Research Equipment Centre by using HPLC. Samples were transferred to an HPLC vial insert for analysis on an HPLC fitted with Inertsil ODS-P HP (Shimadzu) column size 4.8 x 150 mm and FL detector. The mobile phase was CH₃CN : H₂O = 40:60 v/v.

Results

PAHs degrading bacteria can be isolated from marine sediment under anaerobic

condition. Isolates Nap1 and Nap9 were identified by partial sequencing of the PCR amplified 16S rRNA gene. The obtained sequences were compared to known sequences.

Bacteria identification was performed by using 16S rRNA gene sequence analysis and BLAST to find relatively similar nucleotide sequences in GenBank database. Results by BLASTn revealed that both isolates are 96% similar to *Clostridium bartlettii* as showed in Table1.

Table 1. Similarity percentage of 16S rRNA gene sequences for the selected isolates compared to those obtained from database

Isolates	Acc. Num.	Bacteria / Similarity percentage
Nap1 Nap9	JQ782209	<i>Clostridium bartlettii</i> / 96%

200 ppm Naphthalene (200 mg/L) was supplemented in medium to test PAHs degradation by bacterial isolates. Initially, the naphthalene concentration was detected at about 171.79 ppm on day 0 by HPLC. Some of naphthalene were lost because some part of naphthalene can be adhered to the inside walls of the serum bottles or the stoppers. The

results of the control experiments without inoculation of microorganism indicated that no significant loss of naphthalene occurred due to the process within 8 days. After incubation, Naphthalene can be eliminated for 48.98 ppm by *C. bartlettii* with initial 171.79 ppm Naphthalene for 8 days (Figure 2).

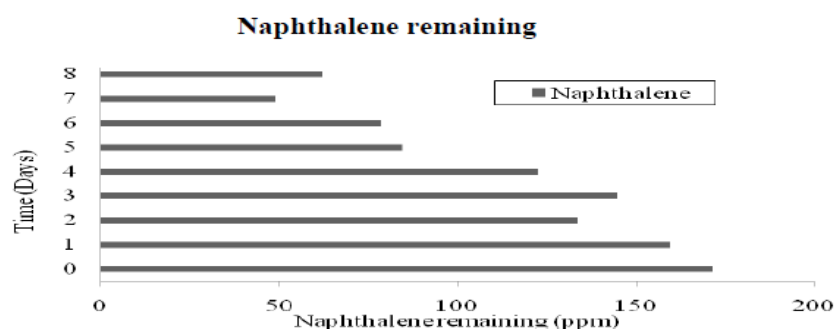


Figure 2. Naphthalene remaining on various times

Discussions

PAHs are very stable compounds so they can remain in the environment for a long time. They can cause environmental pollution as they accumulated in the surrounding sediment.

Various physical and chemical applications are currently employed to remediate the problems caused by PAHs pollution. Microbial degradation of PAHs is challenged idea with more specificity and strongly influenced. In addition, only a few microorganisms reported

ability to degrade PAHs especially higher ring contain PAHs. In this research, the isolates of Nap1 and Nap9 were related to *C. bartlettii*. This results agreed with report of Yuan et al. (2007) that some *Clostridium* spp. found in mangrove soil has capability to degrade PAHs.

In this research, degradation of naphthalene can be detected within 8-10 days. This may related to the structure of naphthalene that contain 2 benzene rings which is not as complicate as 3 or 4 rings hydrocarbon compound. The degradation of PAHs with higher number of rings are slower than those with lower number of rings (Lors *et al.*, 2010). Most of bioremediation of PAHs are based on enhancing microbial activity such as addition of nutrients and use PAHs as a sole carbon source in media. Rate of biodegradation depends on bacteria strains that were selected from PAHs contaminated sites and quantities of PAHs observed in contaminated sites.

Acknowledgment

This research granted by The National Research Council of Thailand (NRCT). Marine sediment samples were gifted from the Aquatic Resources Research Institute (ARRI), Chulalongkorn University.

References

1. Department of Health, Government of South Australia. 2009. Available at: <http://www.health.sa.gov.au/pehs/PDF-files/ph-factsheet-PAHs-health.pdf> [September 10, 2012].
2. Lors C, Ryngaert A, Perie F, Diels L, Damidot D. Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. *Chemosphere*. 2010; 81: 1263-1271.
3. Piskonen R, Itävaara M. Evaluation of chemical pretreatment of contaminated soil for improved PAH bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; 65(5):627-34.
4. Vincent M. Microbial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oily sludge wastes. Iowa State, CE 521. 2009.
5. Virunanon C, Chantaroopamai S, Denduangbaripant, J, Chulalaksananukul W. Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract. *Anaerobe*. 2008; 14(2): 109-117.
6. Yuan SY, Chang BV. Anaerobic degradation of five polycyclic aromatic hydrocarbons from river sediment in Taiwan. *J Environ. Sci Health B*. 2007; 42: 63-69.

2. เสนอผลงานรูปแบบ poster เรื่อง **The screening of denitrifying bacteria from marine sediment for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation** ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The First Asian Marine Biology Symposium in Phuket, Thailand, December 13 -17, 2012.

The screening of denitrifying bacteria from marine sediment for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation

Abstract

This research presented the ability of denitrifying bacteria, collected from marine sediments around Sichang Island, Chonburi province, for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. The result found that 8 isolations of denitrifying bacteria were obtained from total of 40 bacterial isolations screened from 23 of marine sediments. These isolations were identified by 16 s RNA and indicated that one of them was *Bacillus subtilis* species. This isolation was performed under the anoxic condition to degrade of 200 ppm of naphthalene in liquid media. The result was successfully degradation of PAH by denitrification process.

Introduction

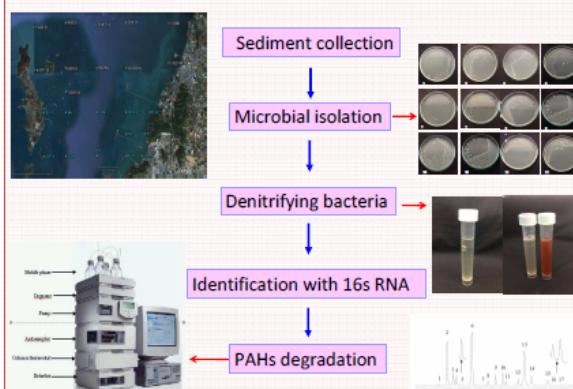
Polycyclic aromatic hydrocarbons are usually known as PAHs. They are generated from the incomplete combustion of fossil fuel. These compounds consist of two or more benzene rings as shown in Figure 1. PAHs have been classified as potential carcinogenic substances by USEPA.

PAHs		PAHs	
Naphthalene		<u>Pyrene</u>	
<u>Anthracene</u>		<u>Pentacene</u>	
<u>Phenanthrene</u>		<u>Benzofluoranthene</u>	
<u>Fluoranthene</u>		<u>Coronene</u>	
Chrysene		<u>Benzo[a]pyrene</u>	
<u>Triphenylene</u>		<u>Coronene</u>	
		<u>Ovalene</u>	

Figure 1. PAHs and their chemical representative structures

PAHs may be treated using various methods via physical treatment, chemical process, including of biological remediation. Biodegradation of PAH by applying microorganisms has been an attractive technology because it is more specific, economic than the other two methods, as well as it plays an advantage for environmental performance.

Materials and Methods



Result and Discussion

Microbial isolation

Total bacterial isolations including of denitrifying bacteria were addressed in Table1.

Table 1. Number of bacterial isolations achievement

Sediment sample	Number of bacterial isolations		
	Total isolates	Gas generation	Denitrifying bacteria
23	63	16	8



Figure 3 Molecular identification with 16S RNA sequencing

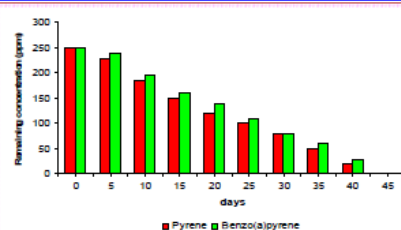


Figure 2 Benzo(a)pyrene and Pyrene degradation by *B. subtilis*

PAHs degradation

The degradation of PAHs (4R and 5R) was completed within 45 days of incubation as showed in figure 2.

Molecular identification

Bacteria identification performed by 16S rRNA gene sequence analysis and BLAST the nucleotide sequences to GenBank database for its relative similarity. The result was revealed the 96% similarity to *Bacillus subtilis* as showed in Figure3.

Acknowledgment

This research was financially supported by The National Research Council of Thailand (NRCT).

PROGRAM AND ABSTRACTS

The 1st Asian Marine Biology Symposium

13th-17th December 2012

Cape Panwa Hotel
Phuket, Thailand

Organized by:
Department of Marine Science
Faculty of Fisheries, Kasetsart University

The Japanese Association of Benthology
The Japanese Plankton Society

K-Benthos



P6-7 The screening of denitrifying bacteria from marine sediment for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation

Jiraporn Puangkaew¹⁾, Gullaya Wattayakorn^{2, 3)}, Chompunuch Virunanon⁴⁾, and *Suphang Chulalaksananukul⁵⁾

1) Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand

2) Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand

3) Aquatic Resources Research Institute (ARRI), Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

4) Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand

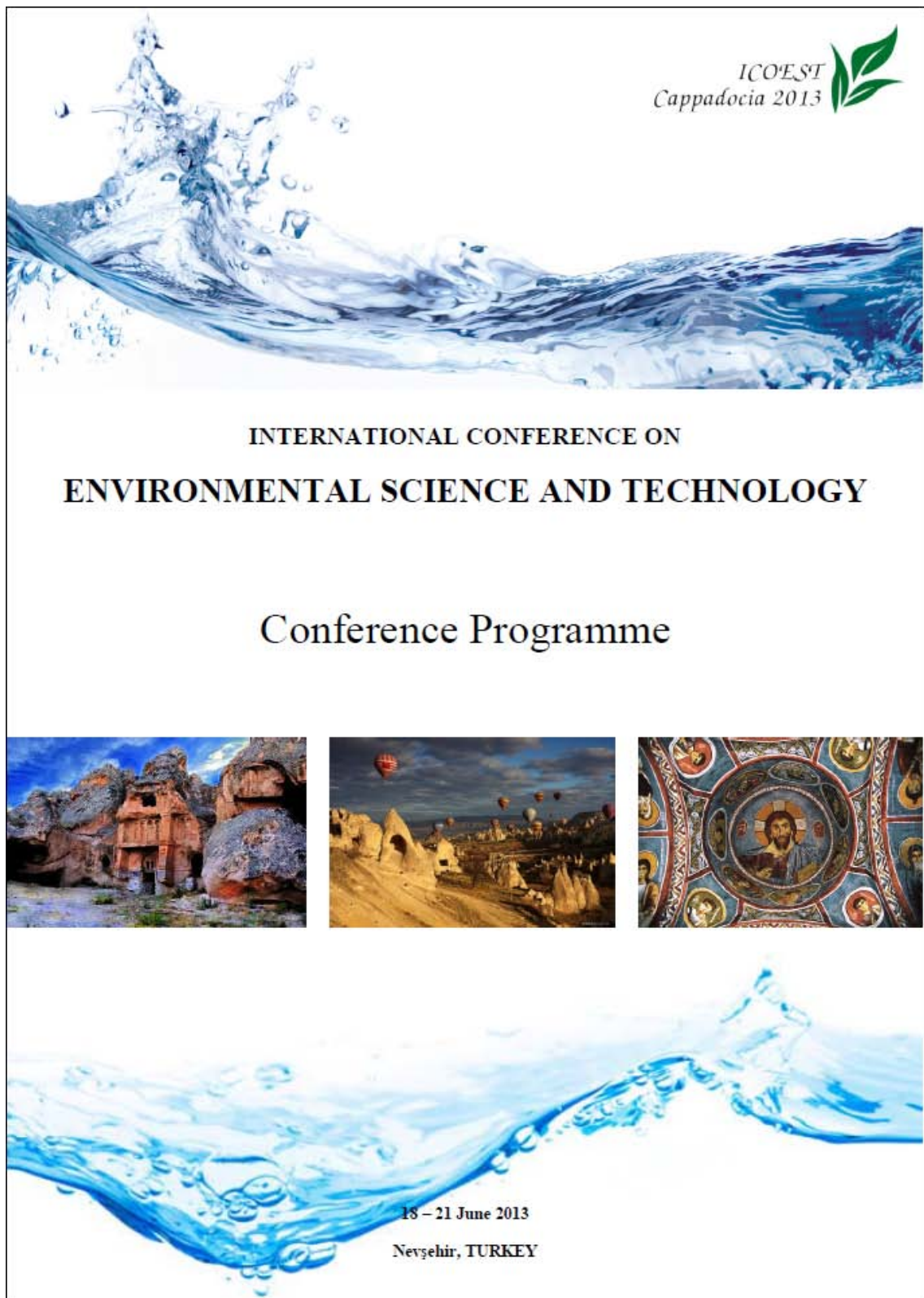
5) Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Mahidol University, Nakornpathom, 73170, Thailand

Abstract: This research presented the ability of denitrifying bacteria for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. The experiments were started from the collection of marine sediments from Sichang Island, Chonburi province and screened for the existing of denitrifying bacteria. After that, they were applied for remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination. The result found that 8 isolations of denitrifying bacteria were obtained from total of 40 bacterial isolations screened from 23 of marine sediments. These isolations were identified by 16 s RNA and indicated that one of them was *Bacillus subtilis* species. This isolation was further incubated under the anoxic condition to degrade of 200 ppm of naphthalene in liquid media. The result showed the successfully biodegradation of PAH by denitrification process.

Keywords: denitrifying bacteria, marine sediment, polycyclic aromatic hydrocarbon

*Presenter: E mail: suphang.chu@mahidol.ac.th

3. เสนอผลงานทางวิชาการ เรื่อง **Biodegradation of Benzo(a)pyrene by Marine Denitrifying Bacteria** นำเสนอในรูปแบบ oral presentation ในการประชุม International Conference on Environmental Science and Technology, ICOEST'2013 – CAPPADOCIA Urgup, Turkey, June 18-21, 2013



Biodegradation of Benzo(a)pyrene by Marine Denitrifying Bacteria

Jiraporn Puangkaew¹, Gullaya Wattayakorn^{2,3}, Chompunuch Virunanon⁴, Warawut Chulalaksananukul^{3,4,5} and Suphang Chulalaksananukul^{*6}

¹) Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, THAILAND.

²) Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, THAILAND.

(E- mail:gullaya@gmail.com)

³) Aquatic Resources Research Institute (ARRI), Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, THAILAND.

⁴) Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, THAILAND.

(E- mail:chompunuch.v@chula.ac.th)

⁵) Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

(E- mail: warawut.c@chula.ac.th)

⁶) Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Mahidol University, Nakornpathom, 73170, THAILAND.

(* Corresponding Author E- mail: suphang.chu@mahidol.ac.th)

ABSTRACT

This research presented the successfully ability of denitrifying bacteria for degradation of benzo(a)pyrene , a five fused ring of polycyclic aromatic hydrocarbons. The experiments were started from the collection of marine sediments from Chonburi province, Thailand. Then, these sediments were screened for the existing of denitrifying bacteria by nitrate reduction ability to alpha-naphthylamine. The result found that 8 isolations of denitrifying bacteria were achieved from total of 40 bacterial isolations screened from 23 of marine sediments. These selected denitrifying bacteria were further applied to degrade of 200 ppm of initially concentration of benzo(a)pyrene contamination in liquid media. The remediation process was incubated under the anoxic condition for more than 50 days. The result showed the complete biodegradation of benzo(a)pyrene by denitrification process within 45 days. Finally, the obtained denitrifying bacteria isolations were genetically identified by 16 s RNA and result was indicated that one of them was *Bacillus subtilis* specie.

Keywords: Alpha-naphthylamine, Benzo(a)pyrene, Denitrifying bacteria, Marine sediment, Polycyclic aromatic hydrocarbon.

1. INTRODUCTION

Environmental pollution with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) has attracted much attention in last decades because of their genotoxic and carcinogenic potential for mammals

[1]. Benzo(a)pyrene (BaP) is one of the high molecular weight, 5 ring-PAHs which is listed as one of the priority pollutants classified as a carcinogen by the US Environmental Protection Agency and an Agency for Toxic Substances and Disease Registry and BaP is ranked at the number 9 from 275 substances priority list [2]. The toxicity of BaP is highly concerned because of its ability to accumulate in animal tissues, to cause cancer and hormone disruption as well as its potential to affect the reproduction. Moreover, BaP was found to depress immune function [3, 4].

The principle natural sources of BaP are forest fires, volcanic eruption, pest fires and burning of crude oil. While anthropogenic sources include the incomplete combustion of coal, oil, gas, wood, rubbish and other organic substances, incinerator, vehicle exhausts and cigarette [1, 5]. BaP has been reported to derive from gasoline automobile accounted for 98%. [6].

PAHs may be treated using various methods and applications via physical treatment such as thermal or chemical process [7]. The recalcitrant natures of PAHs, attributed in part to the strong absorption of PAHs molecule to soil organic matter and in part to their low solubility, make them less amenable to microbial degradation [5, 8]. However, compared to other processes whereby these compounds are removed from the environment, the microbial degradation plays a major role in the remediation of contaminated sites [1, 5, 9]. The natural presence of PAHs in the environment allows many microorganisms to adapt to exploit this naturally-occurring as the potential growth substrate. Thus, many bacterial, fungal, and algal strains have been shown to utilize wide varieties of PAHs containing from three to five aromatic rings [1, 9, 10]. The application of microorganisms for bioremediation of PAH-contaminated environment seems to be an attractive technology because they are more specific, effective, economic and more environmental friendly. Biodegradation in marine environment was also described attractively [11, 12].

In 1988, Heitkamp and Cerniglia published the first study on the isolation of bacteria capable of extensive degradation of PAHs containing four aromatic rings [13]. Muller *et al.* (1989) demonstrated for the first time that the utilization of a PAH containing four or more aromatic rings as a sole source of carbon and energy by bacteria was possible [14]. Biodegradation of BaP by some interesting bacteria was disclosed [15, 16]. Bioremediation of BaP in soil is reported to have half-lives of 50 days to about 8.2 years [17].

Denitrification process is a process that involves a stepwise reduction of nitrogen oxides as nitrate and producing nitric oxide (NO), nitrous oxide (N₂O), and finally to primarily molecular nitrogen gas (N₂). With seriously, for any of nitrous oxide and nitric oxide releasing could contribute to global warming and to the destruction of stratospheric ozone [18]. Denitrification is a major importance process that denitrifying bacteria responses to environmental conditions by the cycling of nitrogen gas back to the atmosphere. These denitrifying bacteria utilize nitrate (NO₃⁻), nitrite (NO₂⁻), nitric oxide (NO), and nitrous oxide (N₂O) as terminal electron acceptors in anaerobic respiration [19, 20].

In this study, denitrifying bacteria from marine sediments exposed to petroleum contamination were isolated and then screened for nitrate reduction of alpha-naphthylamine. After that, the ability of these bacteria to degrade benzo(a)pyrene were performed under anaerobic condition for about 50 days. The selected isolation was further genetically identification of their species by 16 sRNA for the application to environmental performance.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Collection of marine sediments

Marine sediments were collected from the stations located between Sichang Island and the territorial site of Chonburi province, Thailand. Koh Sichang is an island located 12 km. Away from the western shore of Siracha district, Chonburi province. These area are usually contaminated with anthropogenic activities, including from the petroleum trans-shipment activity occurred within the gulf of Thailand. The stations was located between the latitudes of 13°11'27.59"N to 13°7'21.00" N and with the longitudes of 100° 48' 42.87"E to 100° 54'56.44" E as shown in Fig. 1.

All samples were well stored at 4°C until use.

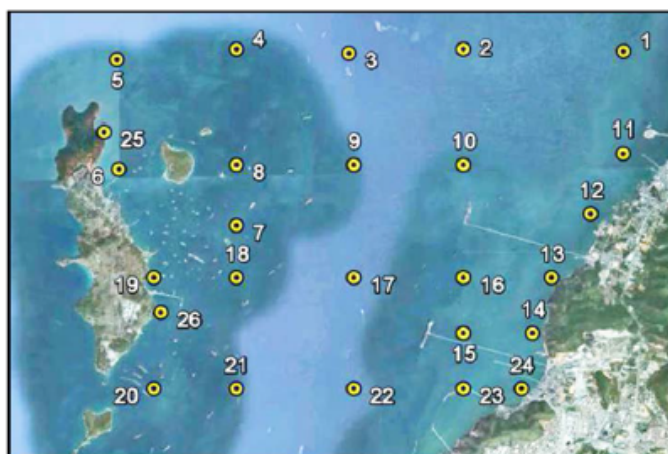


Figure1. The sampling stations around Sichang Island, Chonburi province, Thailand.

2.2 Bacterial isolation and screening for potent BaP degrader

Bacteria were isolated from marine sediments exposed to petroleum contamination. The toleration to BaP of bacterial isolations were selected on solid media using spread plate method by inoculated 1 g of marine sediment into PAHs modified media (Potato Dextrose Media supplemented with 2% of yeast extract and added of 0.2% of Benzo(a)pyrene). All plates were incubated at 30 °C under anaerobic condition (or limited oxygen) in the anaerobic chamber (Bactron, Sheldon). The potential BaP-degrader(s) was selected depending on their growths compared to that of the control. Then, the selected strain(s) was sub-cultured using streak plate method and test for BaP degradation [21].

2.3 Screening for Denitrifying Bacteria

All potential BaP-degraders were further tested for denitrifying bacteria by transferring to nitrate broth with durham tube. These tubes were incubated at 30°C for 14 days to test for denitrification. One millilitre of each culture was transferred into a micro-centrifuge tube and analyzed for their denitrification potential using the alpha-naphthylamine method described by Wistreich and Lechtman in 1988 [22]. Denitrifying bacteria was selected and cultivated anaerobically in nutrient broth (Difco) at 30° C and stored in 15% glycerol at - 80°C. The

identification of denitrifying bacteria was performed by API kit (BioMerieux)

2.4 Ability to reduce nitrate and nitrite

Denitrifying bacteria were cultivated in nutrient broth at 30°C for 18-24 hours. One ml of cell suspension were transferred to 250 ml. Erlenmeyer flask containing 150 ml nitrate broth and then on rotary shaker at 30°C for 14 days. Nitrate and nitrite were measured at 0, 3, 7, 10, 14 days by nitrate-nitrogen and nitrite-nitrogen test kit (HACH, USA), respectively.

2.5 Biodegradation of benzo(a) pyrene

The selected strain(s) was tested for their abilities and their degradation of BaP when grown on liquid media in serum bottles under anaerobic conditions. The experiments were carried out from the prepared pure PAHs modified media solution. After that, filled media into the serum bottles and purged with N₂ gas. The bottles were immediately capped with 20 mm butyl rubber stoppers. After autoclaved, these sterilization media were added with a 0.2 % (w/v) of sterilized solution of benzo(a)pyrene and 5% of inoculums. The bottles were incubated at 37 °C for 7 days compared with the control that without adding any inoculation. The bottled media were sampled periodically with a syringe for determination of the reduction of BaP using HPLC. The control was performed in order to compensate for the photo-oxidation, if any.

2.6. Analysis of benzo(a)pyrene

The extracted benzo(a)pyrene was analyzed using reverse phase HPLC (Shimadzu) equipped with a fluorescence detector and C18 column (Inertsil ODS-P HP column, 150mm x 4.8mm) using acetonitrile: water at a ratio of 40:60 (v/v) as the mobile phase at a flow rate of 1ml/min. All measurements are the means of six replicates.

2.7 Species identification by 16S rRNA gene sequencing

Bacterial DNA extraction was performed using the PCR experiments. About 1.6 kb fragments of 16S ribosomal RNA gene were amplified by PCR technique with Taq DNA polymerase and primers Eubac 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

PCR amplification was incubated, in thermal cycles, for 3 min at 94 °C and followed by 25 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and primer extension at 72 °C for 2 min. The tubes were then incubated for 10 min at 72 °C. PCR products were separated on 0.8% agarose gel electrophoresis. PCR products were purified by DNA purification kit (omega, USA) before 16S rRNA gene was sequenced by an automated sequencer (Pacific Science Co., Ltd., Thailand). Sequencing was compared to sequence in the RDP using BLASTn [23, 24].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Isolation and ability to reduce nitrate and nitrite of denitrifying bacteria

Total sixty three isolates were obtained from twenty three of marine sediments. All these isolations were analysis for denitrification process. Thirty eight isolates were found to reduce

the colour of alpha-naphthylamine, while sixteen isolates were found to produce gas in Durham tube. Among of these two groups of bacteria, there are only eight isolates that produced gas in Durham tube, as well as, gave colourless solution in the same time. According to the method described by Wistreich and Lechtman (1988) confirmed that they are denitrifying bacteria as summarized in table 1. Eight denitrifiers were further identified by biochemical testing with API test kit. The results illustrated eight isolates of denitrifiers was *Bacillus subtilis* as the dominant denitrifier specie [22].

Table 1 The obtained bacterial isolations from marine sediments and classified into four different types

Marine sediment samples	Bacterial isolations			
	Total isolations	Nitrate reduction bacteria	Gas generation bacteria	Denitrifying bacteria
23	63	38	16	8

The classification of bacterial isolations for their ability to reduce nitrate using nitrate broth as substrate was summarized in Table 2. The results showed that 30 isolates could reduce nitrate in nitrate broth called nitrate reducing bacteria. Eight isolations generated gas but could not reduce nitrate. These bacteria were probably either sulphate reducing bacteria which reduced sulphate to be hydrogen sulphide gas or they were methane formation bacteria which digested carbon source (PAHs) to be a methane gas. For the eight denitrifying bacteria or denitrifier isolations, four isolations were found to reduce nitrate rapidly and did not show any accumulation of nitrite. The other four isolates were found to have the accumulation of nitrite and also to reduce nitrate slowly. All nitrate and nitrite were reduced to be nitrogen gas [24].

Table 2 The bacterial ability to reduce nitrate in denitrification process

Number of bacterial isolations	Ability to reduce nitrate	Nitrite accumulation	Gas generation
30	Yes	Yes	No
8	No	-	Yes
4	High	No	Yes
4	Low	No	Yes

3.3 Biodegradation of benzo(a)pyrene

The substrate depletion kinetics revealed in this study are similar to the classical pattern of benzo(a)pyrene degradation. The results revealed in Figure 2 that the degradation was not occurred at the first five days of incubation. The degradation was represented the slowly rate at the early stages of incubation. The rapidly increased in degradation rate was observed after 10 days passed and the same rate was continued until 45 days of incubation. The completed

degradation of benzo(a)pyrene was achieved with the noticeably concentration of benzo(a)pyrene in liquid media was undetectable. The disappeared of benzo(a)pyrene in the solution was also observed (The image was not presented).

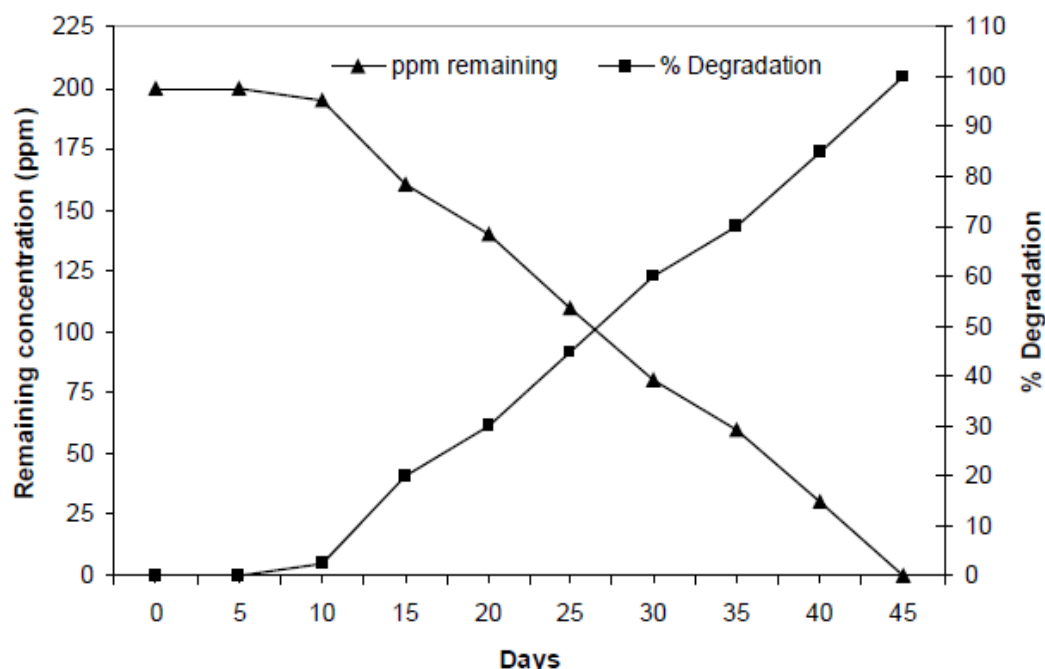


Figure 2 The remaining concentration and biodegradation of benzo(a)pyrene under denitrification process of *Bacillus subtilis* specie.

The impact of denitrification on remediation coupled with bio-treatment of PAHs was obviously reported. In this study, even of the biodegradation of benzo(a)pyrene was clearly observed after 45 days of incubation under denitrification condition, the biomass was not significantly increased. This phenomenon was previously noted that degradation of PAHs of four or more rings generally did not result in a remarkable increase in the biomass yield of the microbial consortia used, suggesting that these compounds were not preferentially used as a biosynthetic carbon source, but mostly as an energy source [19].

3.4 Molecular identification

PAHs degradeing bacteria isolated from marine sediment under anaerobic condition was further performed to know the species. Bacteria identification performed by 16S rRNA gene sequence analysis and BLASTS the nucleotide sequences to GenBank database for its relative similarity. The result was revealed that both bacterial isolations in this study related to 96% similarity to *Bacillus subtilis*. Gel electrophoresis of PCR amplification of DNA fragment at 1.6 kb was observed as showed in Figure3.

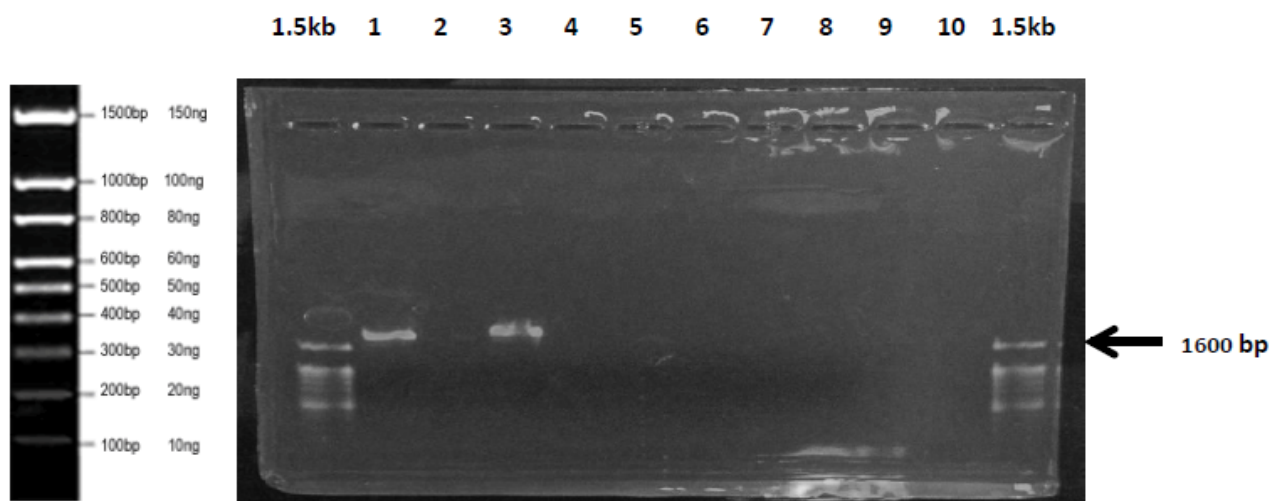


Figure 3 PCR amplification of DNA fragment of 1.6 kb of 16 s rDNA identification. Lane 1 and lane 3 was the amplified DNA of bacterial isolations of this research.

3.5 *Bacillus subtilis* and Benzo(a)pyrene degradation

In this study, the bacterial obtained for degradation of benzo(a)pyrene was *Bacillus subtilis* species. Correspondingly to the results above, the tolerance and a marked ability of *Bacillus subtilis* sp. to degrade high concentrations of benzo(a)pyrene up to 200 ppm (0.8mM) of benzo(a)pyrene in an anaerobic condition was investigated over 50 days at ambient temperature (approximately 30 C in a PAHs modified medium). It was shown that *Bacillus subtilis* could survive at higher concentrations of benzo(a)pyrene. The degradation rate of benzo(a)pyrene was not occurred in the first 10 days of incubation as the concentration of benzo(a)pyrene was not decreased. But after that the degradation rate was rapidly increased as the concentration of benzo(a)pyrene was continuously decreased (Fig.2). Until 45 days of incubation, the biodegradation of benzo(a)pyrene was completed as shown on the undetectable amount of benzo(a)pyrene in the solution.

Benzo(a)pyrene degradation by *Bacillus subtilis* was previously reported. Hunter *et al.* (2005) reported the first time of *Bacillus subtilis* as bacterial strain to degrade 33 ug/ ml of pyrene and/ or benzo(a)pyrene at 30° C for 4 days of incubation and *Bacillus subtilis* could transform 40% of pyrene and 50% of benzo(a)pyrene [25]. Lily *et al.*, (2009) studied with the new species of *Bacillus subtilis* to degrade of 50 ug/ ml of benzo(a)pyrene in BSM medium and it showed ability to survive up to 40 days and peak growth was on 7 days of incubation. The degradation was started from 24 hours and the maximum achievement of degradation was 84.66% within 28 days [26]. Even at a higher concentration of benzo(a)pyrene (500 mg/L in mineral salts medium), it was observed that *Bacillus subtilis* could utilize benzo(a)pyrene as the sole source of carbon and finally reach 58.98 % degradation of the initial amount of benzo(a)pyrene after 35 days of incubation [27]. This indicates a good benzo(a)pyrene degradation ability of *Bacillus subtilis* when compared with other benzo(a)pyrene-degrading bacteria. For instance, benzo(a)pyrene degradation studies using bacterial consortium of *Ochrobactrum* sp. *Stenotrophomonas maltophilia* and *Pseudomonas fluorescens* were generally carried out at a lower range of benzo(a)pyrene concentrations (10 mg/l) [28]

In the other hand, the report of degradation of benzo(a)pyrene under thermophilic condition by *Bacillus subtilis* (Strain BUM) was also examined by Zhao and Wong, (2010) that the degradation of 250 mg/l of benzo(a)pyrene was occurred within 30 days of incubation

regarding of phenanthrene was existed. The percentage of degradation was corresponding to the concentration of phenanthrene. The degradation rate was constant with a value of 12.3 mg/l/day in aqueous solution at a maximum 63.6% degrading [29].

At the evidence of absence of oxygen (anaerobic condition), *Bacillus subtilis* was able to oxidising complex organic carbon as PAHs by using nitrate as electron acceptor. This is an effective low cost treatment on biodegradation of PAHs. As there has been an illustrative report of many bacterial consortium in soil bioremediation of PAHs [30, 31, 32], the results of this study demonstrating a relatively high benzo(a)pyrene biodegradability and tolerance of suggested a potential use of *Bacillus subtilis* in bioremediation of soil contaminated with benzo(a)pyrene.

4. CONCLUSION

Denitrifying bacteria achievement isolated from marine sediment was *Bacillus subtilis* in majority. A *Bacillus subtilis* had the ability to degrade benzo(a)pyrene with a complete degradation efficiency of the initial amount of 200 mg/l supplied over 45 days of incubation at 30° C. *Bacillus subtilis* was successfully biodegradation of benzo(a)pyrene but failed to increased biomass production. Nonetheless, due to the significant ability of *Bacillus subtilis* to degrade benzo(a)pyrene up to 0.8 mM, the potential use of this isolated bacterial in soil remediation has been suggested. The studies on its biodegradation mechanisms as well as benzo(a)pyrene biodegradation were also crucial to find out.

This research gives not only the valuable data of the potential application of denitrifying bacteria to remove PAHs, but also can be able to apply for excess nitrogen in waste water treatment, as well. Further comprehensive study of the relationships among qualitative and quantitative microbial community will help in the design of advanced abatement and management for qualify environmental performance.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to express gratefully acknowledge to The National Research Council of Thailand (NRCT) for the financial supporting of this research.

REFERENCES

- [1] J.V. Pothuluri, and C.E. Cerniglia, Current aspects on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation processes, in Bioremediation: Principles and practice volume III, ed. Sikdar S.K., and Irvine R.L., Lancaster USA, Technomic Publishing Company, Inc., 1998. pp. 461-520.
- [2] ATSDR, 2011. Substances Priority List
URL-<http://www.atsdr.cdc.gov> (Accessed: January, 2013)
- [3] R.J. Irwin, M.V. Monwerik, L. Stevens, M.D. Seese, and W. Basham, 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia: Benzo(a)pyrene (BaP) entry

- [4] J.F. McCarthy, L.W. Burrus, and V.R. Tolbert, 2003. Bioaccumulation of benzo(a)pyrene from sediment by fathead minnows: effects of organic content, resuspension and metabolism. *Archived Environmental Contamination and Toxicology*. 45: 364-370.
- [5] C.E. Cerniglia, 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Biodegradation*. 3:351-368.
- [6] R. Harkov, A. Greenberg, F. Darack, J.M. Dalsey, and P.J. Lioy, 1984. Summer time variations in polyaromatic hydrocarbon at four sites in New Jersey, *Environmental Science and Technology*. 18: 287-291.
- [7] R. Piskonen, and M. Itävaara, 2004. Evaluation of chemical pretreatment of contaminated soil for improved PAH bioremediation. *Applied Microbiology Biotechnology*. 65(5) 627-634.
- [8] S.W. Rogers, S.K. Ong, B.H. Kjartanson, J. Golchin, and G.A. Stenback, 2002. Natural attenuation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sites: review, *Practical Period of Hazardous Toxicology Radioactive Waste Management*. 6(3)141-155.
- [9] D.T. Gibson, Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: in *Microorganisms to combat pollution*, ed. Rosenberg E., Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1993. pp. 57-66.
- [10] S.Y. Yuan, and B.V. Chang, 2007. Anaerobic degradation of five polycyclic aromatic hydrocarbons from river sediment in Taiwan. *Journal of Environmental Science Health B*. 42: 63-69.
- [11] S. Harayama, H. Kishira, Y. Kasai, and K. Shutsubo, 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology*. 1: 63-70.
- [12] I.M. Head, and R. P. J. Swannell, 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnology*. 10: 234-239.
- [13] M.A. Heitkamp, C.E. Cerniglia, 1988. Mineralisation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below and oil field. *Applied Environmental Microbiology*. 54: 1612-1614.
- [14] J.G. Muller, P.J. Chapman, P.H. Pritchard, 1989. Creosote contaminated sites. *Environmental Science and Technology*. 23: 1197-1201.
- [15] A.L. Juhasz, and R. Naidu, 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon: a review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 45: 57-88.
- [16] R.A. Kanary, and S. Harayama, 2000. Minireview: Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon by bacteria. *Journal of Bacteriology*. 182: 2059-2067.
- [17] G. Gramss, K-D. Voigt, and B. Kirsche, 1999. Degradation of polycyclic aromatic

hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodegradation*.10(1) 51-62.

- [18] C. C. Delwiche, Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1981.
- [19] K. Roger, 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews* 46: 43-70.
- [20] R.W. Ye, B.A. Averill, and J.M. Tiedje, 1994. Denitrification: production and consumption of nitric oxide. *Applied Environmental Microbiology*. 60: 1053-1058.
- [21] B. Song, N. J. Palleroni, and M. M. Häggblom, 2000. Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soil and sediments. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 3446-3453.
- [22] G.A. Wistreich, and M.D. Lechtman, Laboratory exercises in microbiology. 6th ed. New York: Macmillan Publishing Company, 1988.
- [23] C. Virunanon, S. Chantaroopamai, J. Denduangbaripantand, and W. Chulalaksananukul, 2008. Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract. *Anaerobe*. 14(2)109-117.
- [24] M. Theerachat, C. Virunanon, S. Chulalaksananukul, N. Sinbuathong, and W. Chulalaksananukul, 2011. *Nir K* and *nir S* nitrite reductase genes from non-agricultural forest soil bacteria in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27: 999-1003.
- [25] R.D. Hunter, S.I.N. Ekunwe, D.E Dodor, H-M Hwang, and L. Ekunwe, 2005. *Bacillus subtilis* is a potential degrader of pyrene and benzo(a)pyrene. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2(2)267- 271.
- [26] M.K. Lily, A. Bahuguna, K. Dangwal, and V. Gang, 2009. Degradation of benzo(a)pyrene by a novel strain *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC9447). *Bazilian Journal of Microbiology*. 40: 884- 892.
- [27] R. Mohandass, P. Rout, S. Jiwal, and C. Sasikala, 2012. Biodegradation of Benzo(a)pyrene by The mixed culture of *Bacillus cereus* and *Bacillus vireti* isolated from the petrochemical industry. *Journal of Environmental Biology*. 33(6)985- 989.
- [28] Y.R. Luo, Y. Tian, X. Huang, C. Yan, H.S. Hong, G.H Lin, and T.L. Zheng, 2009. Analysis of community structure of a microbial consortium capable of degrading benzo(a)pyrene by DGGE. *Marine Pollution Bullitin*. 58: 1159- 1163.
- [29] Z. Zhao, and J. W-C. Wong, 2010. Rapid biodegradation of benzo(a)pyrene by *Bacillus subtilis* BUM under thermophylic condition. *Environmental Engineering Science*. 27(11)939- 945.
- [30] A. R. Johnsen, L.Y. Wick, and H. Harms, 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*. 133: 71-84.

- [31] X. Li, X. Lin., P. Li, W. Liu, L. Wang, F. Ma, and K.S. Chukwaku, 2009. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil by microbial consortium during incubation. *Journal of Hazardous Material*. 172: 601-605.
- [32] X. Lu, T. Zhang, H. H-P. Fang, K. M. Y. Leung, and G. Zhang, 2010. Biodegradation of naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65: 204-211.

แบบสรุปผลการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ชื่อโครงการ การพัฒนาองค์ความรู้เพื่อการจัดการปัญหาภาวะมลพิษในทะเลและอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณหมู่เกาะสิขัง (ปีที่ 2)
Knowledge Management for Marine Pollution Abatement and Biodiversity Conservation around Sichang Islands (2nd Year)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2554...จำนวนเงิน 2,205,000.- บาท (สองล้านสองแสนห้าพันบาท)
ระยะเวลาทำการวิจัย...18...เดือน ตั้งแต่วันที่ 15 ธันวาคม 2554 ถึงวันที่ 15 มิถุนายน 2556...

ผู้วิจัย		โทรศัพท์	โทรสาร
รศ. ดร. กัลยา วัฒนากร	ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	02-218-5409	02-255-0780
รศ. ดร. วรวิทย์ จุฬาลักษณ์นากุล	ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	02-218-5482	02-218-5482
ผศ.ดร.สุภางค์ จุฬาลักษณ์นากุล	ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	02-889-2138	02-441-9731
ดร. ชมกฤษ วิรุณานนท์	ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	02-218-5484	02-252-8979
ดร. รุ่งทิวา เปี่ยมทองคำ	หน่วยปฏิบัติการวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	02-218-5482	02-218-5482

1. ความเป็นมา/ปัญหาในการวิจัย

การศึกษาวิจัยเรื่อง “การพัฒนาองค์ความรู้เพื่อการจัดการปัญหาภาวะมลพิษในทะเลและอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณหมู่เกาะสิขัง” ในปี 2 เป็นการวิจัยต่อยอดในเชิงการหา

แหล่งที่มาของมลสารกลุ่มโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของสารพิษอินทรีย์ที่มีความคงทน (Persistent Organic Pollutants, POPs) มีองค์ประกอบของไฮโดรเจนและคาร์บอน เกี่ยวกันเป็นลักษณะวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 2-6 วง สารกลุ่มนี้มีความเป็นพิษและเป็นสารก่อมะเร็ง โดยสารเหล่านี้สามารถเกิดได้จากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้จากเครื่องยนต์ อากาศเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม และสาร PAHs ที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ เช่น ไฟไหม้ป่า สารกลุ่มนี้บางประเภทสลายตัวยากและสามารถตกค้างสะสมในตะกอนดินในทะเล เช่น บริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลศรีราชาและเกาะสีชัง จ.ชลบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่จอดเรือทอดสมอที่มีการจอดเรือสินค้าขนาดใหญ่และเรือบรรทุกน้ำมันมาเป็นระยะเวลายาวนาน มีการขนถ่ายน้ำมันแบบเทกองจากเรือใหญ่เพื่อนำต่อไปยังแหล่งใช้ ซึ่งกิจกรรมดังกล่าวก่อให้เกิดการฟุ้งกระจายของฝุ่นละอองน้ำมัน ซึ่งเมื่อฝุ่นน้ำมันตกสู่พื้นผิวน้ำทะเลจะถูกดูดซับบนสารแขวนลอยและจมตัวลงสะสมในตะกอนดินพื้นท้องทะเล PAHs ทั้งในน้ำมันและน้ำมันจะส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศทางทะเลและสัตว์น้ำ ตลอดจนคุณภาพชีวิตของชุมชนบนเกาะสีชัง เนื่องจากเป็น PAHs หลายตัวเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenic) ตัวอย่าง เช่น เบนโซ[เอ]แอนทราซีน ไครซีน เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน เบนโซ[เอเอช]ไพรีน เบนโซ[จีเอช]เพอร์ลิน และเป็นสารก่อการกลายพันธุ์(mutagenic) ด้วย ดังนั้นองค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (US.EPA) จึงได้กำหนดให้ PAHs จำนวน 16 ชนิดเป็นสารพิษอันตรายที่ควรได้รับความสำคัญในการศึกษาเป็นอันดับต้นๆ เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำทั่วไปและมีผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ถ้าบริโภคสัตว์น้ำที่มีการปนเปื้อนสาร PAHs เป็นระยะเวลาเวลานาน เพราะ PAHs สามารถถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหารได้ เมื่อ PAHs ได้สะสมเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารย่อมส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆในห่วงโซ่อาหารและส่งผลกระทบต่อมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคอันดับสุดท้าย ซึ่งข้อมูลต่างๆที่ได้รับจากงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนบริหารจัดการสิ่งแวดล้อม กำหนดแนวทางการควบคุม และป้องกันปัญหามลพิษเกี่ยวกับสาร PAHs บริเวณพื้นที่จอดเรือทอดสมอเกาะสีชัง จ.ชลบุรีต่อไป

วัตถุประสงค์ที่สำคัญอีกประการหนึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จุลินทรีย์เพื่อการจัดการปัญหาภาวะมลพิษในทะเลและพื้นฟูทรัพยากรชายฝั่งทะเลในธรรมชาติอย่างมีสมดุล โดยมุ่งเน้นการย่อยสลายสารกลุ่มโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยจุลินทรีย์กลุ่มไลโปไลติกซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำมันและไขมันได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ไลเปส ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ประเภท Triacylglycerol acylhydrolase ทำหน้าที่ในการเร่งการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลน้ำมันและไขมัน และด้วยความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่หลากหลายจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลายอุตสาหกรรม ตลอดจนการนำมาใช้ในกระบวนการกำจัดน้ำเสีย อย่างไรก็ตามพบว่ายีสต์นี้สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของออกซิโดรีดักเตสทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมไฮโดรเจน ออกซิเจน หรืออิเล็กตรอน จากสารประกอบหนึ่งไปยังสารประกอบอื่น เอนไซม์แลคเคสจะเข้าไปเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาและมีความสามารถในการใช้สับสเตรทได้หลากหลายชนิด โดยข้อดีของ

การใช้เอนไซม์แลคเคสเป็นตัวเร่งที่เหนือกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาอนินทรีย์ ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจง และอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง ไม่เป็นพิษ มีความสามารถในการละลายน้ำ สามารถทำซ้ำได้ ปฏิกิริยาเกิดได้ภายใต้สภาวะการทดลอง เช่น พีเอชของสารละลาย อุณหภูมิ และความดันที่ไม่รุนแรง ที่สามารถพบได้ในดินบริเวณชายฝั่งทะเลทั่วไป สำหรับดินตะกอนในทะเลบริเวณที่มีออกซิเจนต่ำหรือไร้ออกซิเจนซึ่งยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและแลคเคสอาจไม่สามารถย่อยสลายคราบน้ำมันได้ดี พบว่ามีแบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์ที่มีความสามารถในการใช้สารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตได้เช่นกันในสภาวะดังกล่าวได้ งานวิจัยนี้จึงสนใจนำไลโปไลติกยีสต์และแบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์มาใช้ประโยชน์ในการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารกลุ่มโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินตะกอนชายฝั่งที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันในสถานการณ์แตกต่างกัน คือในสภาวะที่มีออกซิเจนและในสภาวะไร้ออกซิเจน เพื่อช่วยในการลดปัญหาภาวะมลพิษทางทะเลด้านน้ำมัน ฟันฟูสภาพแวดล้อมในทะเลให้ดีขึ้น และอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณเกาะสี่ช้างและศรีราชาให้ยั่งยืนสืบต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. วิเคราะห์ชนิด ปริมาณ การกระจายและแหล่งกำเนิดของโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตะกอนดินชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะสี่ช้างและศรีราชา จ.ชลบุรี
2. ทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนของแลคเคสจากไลโปไลติกยีสต์ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และในตัวอย่างตะกอนดินจากพื้นที่ศึกษา
3. ทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ

3. ระเบียบวิธีการวิจัย

แผนงานวิจัย เรื่อง “การพัฒนาศักยภาพความรู้เพื่อการจัดการปัญหาภาวะมลพิษในทะเลและอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณหมู่เกาะสี่ช้าง (ปีที่ 2)” ประกอบด้วยโครงการวิจัยย่อย 3 โครงการ ดังนี้

1. แหล่งกำเนิดและการกระจายของโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินตะกอนชายฝั่งบริเวณเกาะสี่ช้างและศรีราชา จ.ชลบุรี
2. การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยไลโปไลติกยีสต์
3. การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์

โดยในแต่ละโครงการย่อยมีหัวหน้าโครงการและผู้ร่วมวิจัยรับผิดชอบในการดำเนินงานโครงการให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้

4. ผลของการดำเนินโครงการวิจัย

ผลของการดำเนินการวิจัยของโครงการวิจัยย่อยแต่ละโครงการ สามารถสรุปผลได้ดังต่อไปนี้

4.1 โครงการย่อยที่ 1 แหล่งกำเนิดและการกระจายของโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินตะกอนชายฝั่งบริเวณเกาะสีชังและศรีราชา จ.ชลบุรี

วัตถุประสงค์ของโครงการ:

1. วิเคราะห์ชนิด ปริมาณ และการกระจายของสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างตะกอนชายฝั่งระหว่างเกาะสีชังและศรีราชา จ.ชลบุรี
2. วิเคราะห์แหล่งกำเนิดของโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตะกอนดินในบริเวณพื้นที่ศึกษา

ผลของการศึกษา:

การศึกษาองค์ประกอบและแหล่งที่มาของ PAHs ในตะกอนดินผิวหน้าจำนวน 26 ตัวอย่างจากทะเลชายฝั่งระหว่างศรีราชา-เกาะสีชังด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี(GC-FID) พบความเข้มข้นรวมของ PAHs 16 ชนิดตามรายชื่อของ US EPA อยู่ในช่วง 65.2-18,970 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยมีความเข้มข้นเฉลี่ย 282 นาโนกรัม/กรัม ตัวอย่างตะกอนดินที่มีความเข้มข้นของ PAHs สูงที่สุดพบที่บริเวณท่าเรือพาณิชย์ทางตอนใต้ของเกาะสีชัง) ระดับของ PAHs ที่ตรวจพบบ่งชี้การปนเปื้อนในระดับปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับ PAHs ที่พบในตะกอนดินบริเวณชายฝั่งทะเลอื่นของโลก PAHs ที่มีจำนวนวงแหวนเบนซีน 4-6 วงมีสัดส่วนสูงโดยเฉลี่ย 87% ของ PAHs รวม โดยทั่วไปพบ Dibenz[a,h]anthracene Benzo[b]fluoranthene Benzo[ghi]perylene Benzo[a]pyrene และ Fluoranthene ในปริมาณสูงกว่า PAHs ตัวอื่นเกือบทุกตัวอย่าง

สาเหตุการปนเปื้อนของสาร PAHs ในตัวอย่างตะกอนดิน พบว่าส่วนใหญ่มีที่มาจาก การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของอินทรีย์สารธรรมชาติเช่นการเผาหญ้า/พืชล้มลุกต่างๆ และการเผาไหม้จากชุมชน เช่น การเผาถ่านหรือขยะในบริเวณใกล้เคียง รวมทั้งการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลของเรือข้ามฟาก เรือประมงชายฝั่ง ตลอดจนเรือบรรทุกสินค้าขนาดใหญ่ที่มีอยู่อย่างหนาแน่นในบริเวณศึกษา รวมทั้งกิจกรรมด้านอุตสาหกรรมต่างๆ และการขนถ่ายถ่านหิน ซึ่งปล่อยสาร PAHs ออกสู่สิ่งแวดล้อมทางทะเล และมีอากาศเป็นตัวกลางในการพัดพา PAHs ไปไปสู่แหล่งอื่น นอกจากนี้ PAHs บางส่วนมีที่มาจาก การปล่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของเรือลงสู่ทะเล การรั่วไหลของน้ำมันเรือ การปล่อยน้ำทิ้งที่มีคราบน้ำมันลงสู่ทะเล การรั่วไหลของคลังน้ำมันเรือ การขนส่งน้ำมัน การล้างถังน้ำมัน การถ่ายน้ำมันหรือ น้ำมันเครื่อง การเกิดอุบัติเหตุทางเรือทำให้เกิดการรั่วไหลของน้ำมัน น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม

หรือโรงกลั่นน้ำมัน และกิจกรรมการซ่อมเรือ เป็นต้น การวิเคราะห์อัตราส่วนองค์ประกอบระหว่าง PAHs ที่ใช้บ่งชี้แหล่งกำเนิดพบว่า PAHs ในตะกอนดินผิวหน้าบริเวณนี้ส่วนใหญ่มีแหล่งที่มาหลักจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ โดยมีบางสถานที่ที่พบ PAHs มีแหล่งที่มาทั้งจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมและจากการเผาไหม้ การตรวจพบ PAHs หลายชนิดที่สามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้ในตะกอนในพื้นที่ศึกษา บ่งชี้ว่าตะกอนเหล่านี้เป็นตะกอนที่มีพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งควรมีการตรวจติดตามต่อไปพร้อมกับกระบวนการจัดการชายฝั่งที่มีประสิทธิภาพ เพื่อลดผลกระทบทางด้านลบต่อระบบนิเวศชายฝั่งและความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์

4.2 โครงการย่อยที่ 2 การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยไลโปไลติกยีสต์

วัตถุประสงค์ของโครงการ:

1. ศึกษาการเจริญของไลโปไลติกยีสต์เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการย่อยสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน
2. ทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆของไลโปไลติกยีสต์ในระดับห้องปฏิบัติการ
3. ทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการย่อยสลายโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนกับตัวอย่างดินที่ถูกปนเปื้อนด้วยโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

ผลของการศึกษา:

การทดลองดำเนินการโดยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *A. pullulans* พบการเจริญเติบโตของยีสต์ *A. pullulans* อย่างรวดเร็วในระยะเพิ่มจำนวน (Log phase) ที่ช่วงเวลา 0-48 ชั่วโมงแรก และเข้าสู่ช่วงการเจริญเติบโตแบบคงที่ (Stationary phase) ที่ชั่วโมงที่ 48-60 โดยมีปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ 310.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 48 โดยอยู่ในช่วงสุดท้ายของ Log phase และเริ่มคงที่ตามอัตราการเจริญที่คงที่ ชั่วโมงที่ 72 มีค่ากิจกรรมของไลเปสที่ 7.336 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงเมื่อวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปสจากเชื้อยีสต์ *A. pullulans* พบว่าในชั่วโมงที่ 60 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 769.16 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีนดังนั้นที่ชั่วโมงที่ 60 จึงเหมาะสมที่สุดที่จะนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์

เมื่อนำแลกเคสจากไลโปไลติกยีสต์ความเข้มข้น 711 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มาทดสอบการย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในระดับห้องปฏิบัติการ แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง พบว่าแลกเคสจากไลโปไลติกยีสต์จากเกาะสิขัง สามารถย่อยสลาย Naphthalene Anthracene Pyrene และ Benzo[a]pyrene ได้ 24.35, 38.16, 25.38 และ 45.33 % ตามลำดับ ภายใน 48 ชั่วโมง เนื่องจากแลกเคสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductase) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยา โดยให้อิเล็กตรอนและ

มีโมเลกุลออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ออกซิเจนที่ได้รับอิเล็กตรอนจะรวมกับโปรตอนที่มีอยู่ในสารละลายกลายเป็นน้ำ ดังนั้นแลคเคสสามารถใช้สับสเตรทประเภทสารในกลุ่มโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้ (Octavio และคณะ, 2006) และการทดสอบความสามารถในย่อยสลายสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างดินด้วยแลคเคสจากยีสต์ *A. pullulans* พบว่าปริมาณ Naphthalene ลดลง 51.34 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ Anthracene ลดลง 85.06 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 9 วัน ถึงแม้ว่าสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจะยึดเกาะกับอนุภาคของดินหรือดินตะกอนได้ดีก็ตาม งานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันที่มีสารพิษโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนปนอยู่ เพื่อสิ่งแวดล้อมที่ดีและลดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์

4.3 โครงการย่อยที่ 3 การย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนด้วยแบคทีเรียดีไนทรีไฟเออร์

วัตถุประสงค์ของโครงการ:

คัดแยกแบคทีเรียดีไนทรีไฟเออร์จากตะกอนดินที่มีคุณสมบัติในการกำจัดสารประกอบประเภทโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสภาวะไร้ออกซิเจน

ผลของการศึกษา:

ผลการวิจัยการคัดแยกจุลินทรีย์ชนิดดีไนทรีไฟเออร์จากดินตะกอนใต้ทะเลบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรีจำนวน 26 ตัวอย่าง พบจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีส่วนประกอบของ PAHs (Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene) ความเข้มข้น 200 ppm ในสภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งถูกคัดแยกมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ 16S rDNA รวมถึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บน 16S rDNA เพื่อระบุชนิด และทำการทดสอบทางชีวเคมี ผลการวิจัยพบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถคัดแยกจากตะกอนดินใต้ทะเลมี 63 ไอโซเลต มี 8 ไอโซเลตที่พบใน 5 สถานี (สถานีที่ 2, 7, 9, 12, 15) คือ *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Proteus mirabilis* และ *Enterobacter asburiae* จัดเป็นดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลต โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับฐานข้อมูล Genbank 96% และมีการประเมินประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั้ง 4 ชนิดคือ Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene และ Benzo[a]pyrene ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 16 วัน จุลินทรีย์ทั้ง 8 ไอโซเลตสามารถย่อยสลาย สารประกอบ PAHs ที่มีจำนวนวงเบนซีนต่างกัน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 ppm ได้ ในปริมาณที่แตกต่างกันเมื่อใส่เชื้อดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรีย ทั้งนี้โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่ดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรีย ซึ่งไม่พบการลดลงของสารประกอบ PAHs ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนวงประกอบของวงเบนซีนต่างกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะ Naphthalene ซึ่งเป็นสารประกอบ PAHs ตัวที่เล็กที่สุด ดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียทุกตัวสามารถย่อยสลายได้มากกว่า 60% ส่วน Pyrene พบดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียบางตัวที่สามารถย่อยสลายได้ประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 50% ถึง 60% คือ *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus tequilensis*, และ *Bacillus subtilis* สำหรับ Benzo[a]pyrene นั้นมีดีไนทรีไฟเออร์แบคทีเรียชนิด *Proteus mirabilis* และ *Paenibacillus macerans* ที่

มีประสิทธิภาพสามารถย่อยสลายได้ 50% และ 60%ตามลำดับ ส่วน Phenanthrene นั้นมีดีในทรีไฟอิงแบคทีเรีย คือ *Proteus mirabilis* ที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้ 50% ส่วนดีในทรีไฟอิงแบคทีเรียตัวอื่นๆ พบความสามารถในการย่อยสลายได้น้อยกว่า 50%

5. สรุปภาพรวมของแผนงาน

การศึกษาวิจัยเรื่อง “การพัฒนาคำความรู้เพื่อการจัดการปัญหาภาวะมลพิษในทะเลและอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณหมู่เกาะสีชัง (ปีที่ 2)” ประกอบด้วยการศึกษาสองด้าน คือ ส่วนแรกเป็นการศึกษาวิจัยด้านแหล่งกำเนิดและการกระจายของโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดินตะกอนชายฝั่งบริเวณที่จอตทอดสมอบริเวณเกาะสีชังและศรีราชา จ.ชลบุรี ส่วนที่สอง เป็นการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยไลโปไลติกยีสต์และแบคทีเรียชนิดดีในทรีไฟเออร์ โดยมีกลยุทธ์ของแผนงานวิจัยดังไคอะแกรมข้างล่าง



ภาพที่ 5.1 แสดงภาพรวมและตัวชี้วัดของแผนงานวิจัย

ทั้งนี้ แผนงานวิจัย เรื่อง “การพัฒนาองค์ความรู้เพื่อการจัดการปัญหาภาวะมลพิษในทะเลและอนุรักษความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณเกาะสีชัง และศรีราชา จ.ชลบุรี” ปีที่ 2 ได้มีการดำเนินงานในส่วนของการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ด้วย โดยสนับสนุนให้อาจารย์ นักวิจัยของคณะวิทยาศาสตร์และนักวิจัยในหน่วยงานสนับสนุนซึ่งเพิ่งสำเร็จการศึกษาได้เข้าร่วมทำการวิจัยในฐานะผู้ร่วมงานในโครงการวิจัย เป็นการสะสมความเชี่ยวชาญด้านการศึกษาลิงแวดล้อมทางทะเลและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องตามแผนการสร้างนักวิจัยของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้ในแต่ละโครงการวิจัยยังมีการสร้างนักวิจัยและ/หรือผู้ช่วยนักวิจัยในระดับปริญญาโทหรือนิสิตปริญญาเอกเป็นการเปิดโอกาสให้บัณฑิตที่เพิ่งสำเร็จการศึกษาได้มีประสบการณ์ในการดำเนินการวิจัย

5.1. ผลผลิต (Output) ที่ได้เมื่อแผนงานเสร็จสิ้นประกอบด้วย

- ผลงานวิชาการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติหรือระดับชาติ และ/หรือการเผยแพร่ผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติหรือระดับชาติ 9 เรื่อง: โครงการที่ 1 (4 เรื่อง) โครงการที่ 2 (2 เรื่อง) และโครงการที่ 3 (3 เรื่อง)
- เว็บไซต์เกี่ยวกับการปนเปื้อนของสาร PAHs ในตะกอนดินบริเวณทะเลชายฝั่งระหว่างเกาะสีชังและศรีราชา สายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์ที่มีความสามารถในการใช้สารไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน <http://sichang.webatu.com/> ซึ่งเป็นแหล่งให้ความรู้แก่บุคคลทั่วไป
- สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาวะที่มีออกซิเจน และสภาวะไร้ออกซิเจน (โครงการที่ 2 และ 3)
- นักวิจัยรุ่นใหม่ซึ่งเป็นนิสิตระดับปริญญาโท/เอก โดยทำงานเป็นผู้ช่วยนักวิจัยในแต่ละโครงการย่อย ทำให้นิสิตได้มีประสบการณ์ในการดำเนินการวิจัยของตนเองต่อไป โดยในแผนงานนี้มีจำนวน 4 คน ดังนี้
 1. นางสาวรัตนศิริินทร์ ทรัพย์เจริญ (นิสิตปริญญาเอกหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต)
 2. นายฉัตร บุญเพิ่ม (นิสิตปริญญาโทหลักสูตรสหสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
 3. นางสาวพัชราภรณ์ การงาน (นิสิตปริญญาโทหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ)
 4. นางสาวจิราพร พวงแก้ว (นิสิตปริญญาโทหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ)

5.2. ผลลัพธ์ (Outcome) ที่ได้จากแผนงานวิจัยนี้ ได้แก่

- องค์ความรู้ด้านสิ่งแวดล้อมและมลภาวะทางทะเลบริเวณเกาะสีชังและทะเลใกล้เคียงซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งอ้างอิงสำหรับนิสิต นักศึกษาในสถาบันการศึกษาตั้งแต่ระดับมัธยมถึงระดับอุดมศึกษา
- ทราบถึงปริมาณการปนเปื้อนของมลสาร PAHs ที่สะสมอยู่ในตะกอนดิน และการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพสารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- มีความรู้จากการศึกษาครั้งนี้ไปบูรณาการเพื่อออกมาตรการหรือข้อกำหนดเพื่อลดผลกระทบ หรือป้องกันสภาพมลภาวะของทะเล
- มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมัน/สารโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

5.3. หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

หน่วยงานที่เกี่ยวข้องที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น

1. อำเภอศรีราชาและอำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี
2. กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
3. กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
4. กรมการขนส่งทางน้ำ และพาณิชยนาวี กระทรวงคมนาคม
5. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
6. สำนักงานนโยบาย และแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
7. มหาวิทยาลัย

ประวัติและผลงานคณะผู้วิจัย

โครงการย่อยที่ 1

1. หัวหน้าหัวหน้าโครงการ

รศ.ดร.กัลยา วัฒนากร

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2185409 โทรสาร 02-2550780

E-mail: gullaya.w@chula.ac.th, gullaya@gmail.com

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (วิทยาศาสตร์ทางทะเล) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

M.S. (Environmental Engineering and Management) สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT)

Ph.D. (Chemical Oceanography), VIMS, College of William and Mary, Virginia, U.S.A.

ประสบการณ์วิจัย

Marine and estuarine pollution (oil, petroleum hydrocarbons, organochlorines), Mangrove chemistry, Nutrient dynamics in estuary

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ (ย้อนหลัง 5 ปี)

1. Boonyatumanond, R., **G. Wattayakorn**, A. Amano, Y. Inouchi, and H. Takada. 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.
2. Harino, H., M. Ohji, **G. Wattayakorn**, K. Adulyanukosol, T. Arai and N. Miyazaki. 2007a. Accumulation of Organotin Compounds in Tissues and Organs of Stranded Whales Along the Coasts of Thailand. Arch. Environ. Contam Toxicol, 53,119-125.
3. Harino, H., M. Ohji, **G. Wattayakorn**, K. Adulyanukosol, T. Arai and N. Miyazaki. 2007b. Concentrations of Organotin Compounds in Tissues and Organs of Dugongs from Thai Coastal Waters. Arch Environ Contam Toxicol, 53, 495–502
4. Boonyatumanond, R., M. Murakami, **G. Wattayakorn**, A. Togo A. and H. Takada. 2007. Sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in street dust in a tropical Asian mega-city, Bangkok, Thailand. Science of the Total Environment, 384: 420–432.
5. Taniguchi, M., T. Ishitobi, W.C. Burnett, **G. Wattayakorn**. 2007. Evaluating ground water - sea water interactions via resistivity and seepage meters, Ground Water, 45(6): 729-735.

6. Umezawa, Y. T. Ishitobi, S. Rungsupha, S. Onodera, T. Yamanaka, C. Yosimizu, I. Tayasu, T. Nagata, **G. Wattayakorn** and M. Taniguchi, 2007. Evaluation of fresh groundwater contributions to the nutrient dynamics at shallow subtidal areas adjacent to metro-Bangkok. Proc. of Symposium HS1001 at IUGG2007, Perugia, July 2007. IAHS Publ. 312, pp.169-179.
7. **Wattayakorn, G.** K. Adulyanukosol and N. Miyazaki 2007. Organochlorine concentrations in blubber and liver tissue of pantropical spotted dolphin (*Stenella attenuata*) from the west coast of Thailand. Paper presented at LIPI-JSPS International Seminar on Coastal Marine Science, Yogyakarta, Indonesia. 3-5 August, 2007.
8. Fukami, K., Y. Tateda, K. Kurosawa, Y. Suzuki, Y. Ikeda, S. Sugioka and **G. Wattayakorn**. 2007. Carbon Flux as Microbial Biomass for Evaluating Potential CO₂ Fixation in Mangrove Ecosystems. In: Takeda et al. (Eds), Greenhouse Gas and Carbon Balances in Mangrove Coastal Ecosystems, Gendaitosho Co., Ltd. ISBN978-4-906666-94-2, 272 pages.
9. Harino, H., M. Ohji, **G. Wattayakorn**, K. Adulyanukosol, T. Arai and N. Miyazaki. 2008. Accumulation of Organotin Compounds in Tissues and Organs of Dolphins from the Coasts of Thailand. Arch Environ Contam Toxicol, 54: 145-153.
10. Taniguchi, M., W.C. Burnett, H. Dulaiova, F. Siringan, J. M. Foronda, **G. Wattayakorn**, S. Rungsupha, E.A. Kontar, and T. Ishitobi. 2008. Groundwater Discharge as an Important Land-Sea Pathway in Manila Bay, Philippines. Journal of Coastal Research, 24, 1A, pp.15-24.
11. Harino, H., T. Arai., M. Ohji, A. Ismail, **G. Wattayakorn** and N. Miyazaki. 2008. Occurrence of Antifouling Biocides in Southeast Asia: Malaysia, Thailand and Vietnam. In: The ASEAN Conference "Conservation on the Coastal Environment", Eds. M. Miyazaki and G. Wattayakorn, Shinjusha Co., Ltd., Japan, 91-111.
12. **Wattayakorn, G.** 2008. Tributyltin contamination in coastal waters of Thailand. Paper presented at 7th IOC-WESTPAC Symposium on 'Natural hazards & changing marine environment in the Western Pacific', 21-25 May 2008, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.
13. **Wattayakorn, G.** 2008. Status of butyltin contamination in Thailand coastal waters. Coastal Marine Science 32(1): 82-87.
14. Burnett, W., R. Peterson, M. Taniguchi, **G. Wattayakorn**, S. Chanyotha, and F. Siringan, 2009. Importance of groundwater discharge in developing urban centers of Southeast Asia. In: Taniguchi et al. (eds), From Headwaters to the Ocean, Taylor & Francis Group, London, ISBN 978-0-415-47279-1, pp.289-294.

15. Burnett, W., S. Chanyotha, **G. Wattayakorn**, M. Taniguchi, Y. Umezawa, and T. Ishitobi, 2009. Underground sources of nutrient contamination to surface waters in Bangkok, Thailand. *Science of the Total Environment*, 407, 3198-3207.
16. Siriporn, P., **G. Wattayakorn**, S. Angsupanich, W. Baeyens and M. Leermakers, 2009. Distribution of trace elements in sediments and biota of Songkhla Lake, Southern Thailand. *Water Air Soil Pollution*, DOI 10.1007/s11270-009-0093-x.
17. Pansamut, S. and **G. Wattayakorn**. 2009. Determination of arsenic in water and sediment from Thailand using inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Environmental Research and Development*, vol. 3, no.3, 607-613.
18. Pansamut, S. and **G. Wattayakorn**. 2010. Arsenic Contamination in Water from Suphanburi Province, Thailand. *J. of Environmental Research and Development*, Vol.4, No.3, 678-686.
19. **Wattayakorn, G.** and S. Rungsupa. 2010. Ambient concentrations of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in selected Thai estuarine sediments and mussels. *Coastal Marine Science* 34(1): 181-185.
20. Vitisant, T., **G. Wattayakorn**, S. Chulalaksanankul and W.Chulalaksanankul. 2010. Production and characterization of yeast lipase isolated from soils around Sichang Island. *Proc.16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology*, Bangkok, Thailand. pp. 480-482.
21. Sangmanee, C., **G. Wattayakorn** and P. Sojisuporn. 2011. Quantifying discharge and suspended sediment loads of the Bangpakong River, Thailand, under different future climate scenarios. *Proc. The 2nd National Carbon Neutral Conference on Climate Change and Green Economy: Pathway to Response*, 18-19 August 2011, Impact Convention Center, Nontaburi, Thailand.
22. Sangmanee, C., **G. Wattayakorn** and P. Sojisuporn, 2011. "Simulating changes in discharge and suspended sediment loads of the Bangpakong River, Thailand, driven by future climate change". Paper presented at the Fourth International Fisheries Conference: Climate Change Impact on Aquatic Resources and Fisheries, 1 - 2 December 2011, Maejo University, Chiang Mai, Thailand.
23. Sojisuporn,P., C. Sangmanee and **G. Wattayakorn**, 2011. "Recent estimate of sea level rise in the Gulf of Thailand". Paper presented at the Fourth International Fisheries Conference:

Climate Change Impact on Aquatic Resources and Fisheries, 1 - 2 December 2011, Maejo University, Chiang Mai, Thailand.

24. Buathong, P., **G. Wattayakorn**, R. Piamtongkam and W. Chulalaksananukul, 2011. "Effects of climate change on *Vibrio parahaemolyticus* population". Paper presented at the Fourth International Fisheries Conference: Climate Change Impact on Aquatic Resources and Fisheries, 1 - 2 December 2011, Maejo University, Chiang Mai, Thailand.

25. **Wattayakorn, G.** and S. Rungsupa. 2012. Petroleum hydrocarbon residues in the marine environment of Koh Sichang-Sriracha, Thailand. Coastal Marine Science, 35(1), 122-128.

26. **Wattayakorn, G.** 2012. Petroleum pollution in the Gulf of Thailand: A historical review. Coastal Marine Science, 35(1), 234-245.

27. Jiraporn Puangkaew, Suphang Chulalaksananukul, **Gullaya Wattayakorn** and Chompunuch Virunanon, 2012. Screening of anaerobic bacteria for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation from marine sediment. Proc. 24th International Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "Renewable Energy and Global Care", November 2012. Number P-II-04 234.

28. Jiraporn Puangkaew, **Gullaya Wattayakorn**, Chompunuch Virunanon and Suphang Chulalaksananukul, 2012. Screening of denitrifying bacteria from marine sediment for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. Proc. the First Asian Marine Biology Symposium in Phuket, Thailand, December 13 -17, 2012.

29. กัลยา วัฒยากร และคณะ 2549. การสะสมของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและโลหะหนักในสัตว์ทะเลเลี้ยงลูกด้วยนมในน่านน้ำไทย: พะยูนและโลมา ทำเนียบผลการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีที่ 14 ฉบับที่ 14 หน้า 13-15.

30. สมภพ รุ่งสุภา และ กัลยา วัฒยากร 2551. การปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง จ.ชลบุรี เสนอในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ทางทะเล พ.ศ.2551 ณ โรงแรมเมโทรโพล จังหวัดภูเก็ต กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง

31. ชนธร วิทิตสานต์ เอนก โสภณ สุภางค์ จุฬาลักษณ์นกุล กัลยา วัฒยากร และวรวิณี จุฬาลักษณ์นกุล 2553. การคัดแยกและการผลิตไบโเพสของจุลินทรีย์ไลโปไลติกจากดินบนเกาะสีชัง วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ปีที่ 28 ฉบับที่ 1 หน้า 51-58.

โครงการย่อยที่ 2

1. หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร.วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์-โทรสาร 02-2185482

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (พันธุศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2523

วท.ม. (พฤกษศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2527

D.E.A. (Microbiology) INSA, Toulouse, France, พ.ศ. 2533

Ph.D. (Microbiology-Biotechnology) INSA, Toulouse, France, พ.ศ. 2537

ประสบการณ์วิจัย

พันธุศาสตร์ จุลินทรีย์ เทคโนโลยีชีวภาพ

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ (ย้อนหลัง 5 ปี)

1. Chokchaichamnankit, P., **Chulalaksananukul, W.**, Phengkklai, C., Anamthawat-Jónsson, K., 2007. Karyotypes of some species of *Castanopsis*, *Lithocarpus* and *Quercus* (Fagaceae) from Khun Mae Kuong Forest in Chiang Mai province, northern Thailand. *Thai Forest Bulletin* (Botany) 35: 38-44.
2. Chokchaichamnankit, P., Anamthawat-Jonsson, K., **Chulalaksananukul, W.**, 2007. Chromosomal mapping of 18S-25S and 5S ribosomal genes on 15 species of Fagaceae from northern Thailand. *Silvae Genetica* (J. D. Sauerländer's Verlag) 57: 5-13.
3. Suwannarangsee, S., Moulis, C., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., and **Chulalaksananukul, W.**, 2007. Search for dextranase minimal motif involved in dextran binding. *FEBS letter* 581: 4675-4680.
4. Chokchaichamnankit, P., **Chulalaksananukul, W.**, Phengkklai, C., Anamthawat-Jónsson, K., 2008. Species and genetic diversity of Fagaceae in Chiang Mai, northern Thailand, based on ISSR markers. *Journal of Tropical Forest Science* (Forest Research Institute Malaysia) 20: 8-18.
5. Virunanon, C., Chantaroopamai, S., and **Chulalaksananukul, W.**, 2008. Solventogenic-cellulolytic Clostridia from 4-step-screening process in Agricultural Waste and Cow Intestinal Tract. *Anaerobes*. 14 (4), pp. 250.

6. Winayanuwattikun, P., Kaewpiboon, C., Piriyakananon, K., Tantong, S., Thakernkarnkit, W., **Chulalaksananukul, W.** and Yongvanich, T., 2008. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. *Biomass and Bioenergy* 32 (12), pp. 1279-1286.
7. Surisa Suwannarangsee, Doo-Byoung Oh, Jeong-Woo Seo, Chul Ho Kim Sang Ki Rhee, Hyun AhKang, **Warawut Chulalaksananukul** and Ohsuk Kwon, 2010. Characterization of alcohol dehydrogenase 1 of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 88: 497-507.
8. Monnat Theerachat, Chompunuch Virunanon, Suphang Chulalaksananukul, Nusara Sinbuathong, and **Warawut Chulalaksananukul**. Nirk and NirS nitrite reductase genes of non-agriculture forest soil in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. (in press)
9. Chompunuch Virunanon, Chanika Ouephanit, and **Warawut Chulalaksananukul**. Butanol: Properties, Engineering and Applications. Review Article. Nova Science Publishers, Inc. 400 Oser Avenue, Suite 1600 Hauppauge, NY 11788. (in press)

บทความเผยแพร่ในการประชุมทางวิชาการ

1. Suwannarangsee, S., Moulis, C., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., and **Chulalaksananukul, W.** 2007. Search for dextranucrase minimal motif involved in dextran binding. *FEBS letter* Volume 581, Issue 24, 2 October 2007, Pages 4675-4680.
2. Virunanon, C., Croux, C., Sabathe, F., Lopez, F., Girbal, L., Soucaille, P. and **Chulalaksananukul, W.** 2007. Two major cellulases of the *Clostridium acetobutylicum* cellulosome are active on crystalline cellulose. 12th Biological Sciences Graduate Congress 17-19 December 2007. University of Malaya. Malaysia. p. 75.
3. Piamtongkam, R. and **Chulalaksananukul, W.** 2007. Biodiesel production from triolein and methanol catalyzed by immobilized lipases. 12th Biological Sciences Graduate Congress 17-19 December 2007. University of Malaya. Malaysia. p. 92.
4. Suwannarangsee, S., Moulis, C., Remaud-Simeon, M., and **Chulalaksananukul, W.** 2007. Engineering of new affinity tag for protein purification onto dextran supports (Sephacryl® S300HR). 12th Biological Sciences Graduate Congress 17-19 December 2007. University of Malaya. Malaysia. p. 113.

5. Theerachat, M., Piapukiew, J. and **Chulalaksananukul, W.** 2007. *NirK* and *NirS* Genes sequencing of denitrifiers screened from the area of the Plant Germplasm Royal Initiation Project in Kanchanuburi Province Thailand. 12th Biological Sciences Graduate Congress 17-19 December 2007. University of Malaya. Malaysia. p. 240.
6. Boonvitthaya, N., Winayanuwattikun, P., Piapukiew, J. and **Chulalaksananukul, W.** 2007. Cloning and Expression of *Fusarium solani* NAN103 Lipase in *Pichia pastoris*. 12th Biological Sciences Graduate Congress 17-19 December 2007. University of Malaya. Malaysia. p. 241.
7. Piamtongkam, R., Sujjapunroj, M., Chulalaksananukul, S. and **Chulalaksananukul, W.** 2010. Continuous biodiesel production from refined palm oil by Novozyme 435. 10th Conference on Clean Energy, 15-17 September 2010. Famagusta, North Cyprus. p. 208.
8. Piamtongkam, R., Jutapak, V., Chulalaksananukul, S. and **Chulalaksananukul, W.** 2010. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* for biodiesel production by transesterification. 10th Conference on Clean Energy, 15-17 September 2010. Famagusta, North Cyprus. p. 209.
9. Vitisant, T., G. Wattayakorn, S. Chulalaksananukul and **W.Chulalaksananukul.** 2010. Production and characterization of yeast lipase isolated from soils around Sichang Island. Proc.16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology, Bangkok, Thailand. pp. 480-482.
10. Buathong, P., G. Wattayakorn, R. Piamtongkam and **W. Chulalaksananukul,** 2011. "Effects of climate change on *Vibrio parahaemolyticus* population". Paper presented at the Fourth International Fisheries Conference: Climate Change Impact on Aquatic Resources and Fisheries, 1 - 2 December 2011, Maejo University, Chiang Mai, Thailand.

2. ผู้ร่วมโครงการ

ดร. รุ่งทิวา เปี่ยมทองคำ

หน่วยปฏิบัติการวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2185482

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (ชีวเคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2544

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2548

Ph.D. (Microbial and Enzymatic Engineering) INSA, Toulouse, France, พ.ศ. 2553

ประสบการณ์วิจัย

ชีวเคมี จุลินทรีย์ เทคโนโลยีชีวภาพ

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

1. Lozano, P., **Piamtongkam, R.**, Kohns, K., De Diego, T., Vaultier, M. and Iborra, J.L. 2007 Ionic liquids improve citronellyl ester synthesis catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in solvent-free media. *Green Chem.*; 9, 780-784.
2. Lozano, P., García-Verdugo, E., **Piamtongkam, R.**, Karbass, N., De Diego, M., Burguete, I., Santiago V. Luis Vaultier, M. and Iborra, J.L. 2007. Bioreactors Based on Monolith-Supported Ionic Liquid Phase for Enzyme Catalysis in Supercritical Carbon Dioxide. *Advance Synthesis and Catalysis*. 349; 7, 1077-1084.
3. Cambon, E., **Piamtongkam, R.**, Bordes, F., Duquesne, S., André, I. and Marty, A. 2010. Rationally engineered double substituted variants of *Yarrowia lipolytica* lipase with enhanced activity coupled with highly inverted enantioselectivity towards 2-bromo phenyl acetic acid esters. *Biotechnology and Bioengineering*. 106; 6, 852-9.
4. Cambon, E., **Piamtongkam, R.**, Bordes, F., Duquesne, S., Laguerre, S., Nicaud, J.M. and Marty, A. 2010. A new *Yarrowia lipolytica* expression system: an efficient tool for rapid and reliable kinetic analysis of improved enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 47;3, 91-96.
5. **Piamtongkam, R.**, Duquesne, S., Barbe, S., André, I. Chulalaksananukul, W. and Marty, A. 2010. A single amino acid located in the substrate binding site of *Candida rugosa* lipases Lip1, Lip3 and Lip4, directs their enantioselectivity towards 2-bromo phenyl acetic acid octyl esters. *Tetrahedron: Asymmetry*. (Submitted)

บทความเผยแพร่ในการประชุมทางวิชาการ

1. **Piamtongkam, R.** and Chulalaksananukul, W. 2007. Biodiesel production from triolein and methanol catalyzed by immobilized lipases. 12th Biological Sciences Graduate Congress 17-19 December 2007. University of Malaya. Malaysia. p. 92.
2. **Piamtongkam, R.**, Sujjapunroj, M., Chulalaksananukul, S. and Chulalaksananukul, W. 2010. Continuous biodiesel production from refined palm oil by Novozyme 435. 10th Conference on Clean Energy, 15-17 September 2010. Famagusta, North Cyprus. p. 208.

3. **Piamtongkam, R.**, Jutapak, V., Chulalaksananukul, S. and Chulalaksananukul, W. 2010. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* for biodiesel production by transesterification. 10th Conference on Clean Energy, 15-17 September 2010. Famagusta, North Cyprus. p. 209.

โครงการย่อยที่ 3

1. หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร.สุภางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

โทรศัพท์ 02-8892138 E-mail: egscl@mahidol.ac.th

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (เคมีวิเคราะห์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Diplome d'Etude Approfondie (DEA) (Microbiology-Biotechnology) INSA, Toulouse, France

วท.ด (สหสาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม หลักสูตรนานาชาติ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประสบการณ์วิจัย

วิศวกรรมเคมี สิ่งแวดล้อม เอนไซม์

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ (ย้อนหลัง 5 ปี)

1. **Chulalaksananukul S.**, Gadd G.M., Sangvanich P., Sihanonth P., Piapukiew J., and Vangnai A.S. 2006. Biodegradation of Benzo(a)pyrene by a Newly Isolated *Fusarium* sp. FEMS Microbiology Letters. Vol. 262, Issue 1, pp 99-106.
2. Sinbuathong N., **Chulalaksananukul S.**, Sirirote P., and Sillapacharoenkul B. 2008. Comparisons of the Methane Production Yield Coefficient from Anaerobic Microbial Assemblages in the Anaerobic Treatment of Wastewater. Journal of Agricultural Machinery Science. Vol. 4, No.3, pp. 269-272.
3. Nusara Sinbuathong, **Suphang Chulalaksananukul**, Pramote Sirirote, Roj Khun-anake, Liengcharernsit W Khaodhiar S., Boonsong Sillapacharoenkul and Watts DJ. 2009. Kinetic comparison of microbial assemblages for the anaerobic treatment of wastewater with high sulfate and heavy metal contents. Journal of Environmental Biology. 30(1) Sp. Iss. SI: 11-15.
4. Monnat Theerachai, Chompunuch Virunanon, **Suphang Chulalaksananukul**, Nusara Sinbuathong and Warawut Chulalaksananukul. 2010. *NirK* and *nirS* Nitrite reductase genes from non-agricultural forest soil bacteria in Thailand. World Journal of Microbiology & Biotechnology. (Article in press).

บทความเผยแพร่ในการประชุมทางวิชาการ

1. Sinbuathong N., **Chulalaksananukul S.**, Watts D.J., Sirirote P., Liengcharernsit W., Khoadhiar S., Sillapacharoenkul B. 2007. Potential Effectiveness of Anaerobic Microbial Assemblages from Coastal Sediment for the Treatment of Wastewater. International Conference on New Horizons in Biotechnology (NHBT- 2007). November 26- 29, 2007. Trivandrum, India.
2. Sinbuathong N., **Chulalaksananukul S.**, Sirirote P., and Sillapacharoenkul B. 2008. Comparisons of the Methane Production Yield Coefficient from Anaerobic Microbial Assemblages in the Anaerobic Treatment of Wastewater. The 10th International Congress on Mechanization and Energy in Agriculture. October 14-17, 2008. Antalya, Turkey.
3. Sinbuathong N., **Chulalaksananukul S.**, Sirirote P., Khun-anake R., and Sillapacharoenkul B. 2008. Kinetics of Anaerobic Microbial Assemblages from Acidic Sulfate Soil. Joint Conference of the 6th International Acid Sulfate Soil Conference and the Acid Rock Drainage Symposium (6ASSARD). September 16-20, 2008. Guangzhou, China.
4. Nusara Sinbuathong, **Suphang Chulalaksananukul**, Pramote Sirirote, Boonsong Sillapacharoenku. 2009. Optimum organic loading rate for semi-continuous operation of an anaerobic process for biogas production from *Jatropha curcus* seed cake. Proceedings of the 10th Global Conference on Global Warming 2009, July 5-9, 2009. Turkey.
5. Wansa Payomhom, Possanun Choosit, Phenpimuk Supreeyasonthorn, **Suphang Chulalaksananukul**, and Phumin Kirawanich 2010. Influence of Pulsed Electric Field on Enhancement of Biodiesel Production Efficiency. International Technical Conference of IEEE Region 10 (TENCON2010). November 21- 24, 2010. Fukuoka, Japan.
6. Rungtiwa Piamtongkam, Vanpisek Jutapuk, **Suphang Chulalaksananukul**, Tikamporn Yongvanich, and Warawut Chulalaksananukul. 2010. Hydrolysis and Transesterification of Palm Oil Catalysed by Immobilized *Candida rugosa* Lipase. TSB 2010, International Conference on Biotechnology for Healthy Living, Prince of Songkla University, Trang Campus. October 20- 22, 2010. Trang, Thailand.
7. Rungtiwa Piamtongkam, Marisa Sajjapunroj, **Suphang Chulalaksananukul** and Warawut Chulalaksananukul. 2010. Continuous Biodiesel Production from Refined Palm Oil by Novozym 435. 10th International Conference on Clean Energy (ICCE-2010). September 15-17, 2010. Famagusta, North Cyprus.
8. **Suphang Chulalaksananukul**, Nusara Sinbuathong, and Warawut Chulalaksananukul. 2010. Biogas Production through Anaerobic Digestion from Cannery Industrial Fruit Wasted. 10th International Conference on Clean Energy (ICCE2010). September 15-17, 2010. Fumagusta, North Cyprus.
9. Rungtiwa Piamtongkam, Vanpisek Jutapak, **Suphang Chulalaksananukul** and Warawut Chulalaksananukul. 2010. Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* for Biodiesel Production by Transesterification. 10th International Conference on Clean Energy (ICCE-2010). September 15-17, 2010. Famagusta, North Cyprus.

10. Piyapha Hirunpatrawong, Wipada Siri-anusornsak, **Suphang Chulalaksananukul**, and Warawut Chulalaksananukul. 2010. Anaerobic Digester for Biogas Production from Cow Dung and Cassava. The 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference. March 4-6, 2010. Nong Khai, Thailand.
11. Wipada Siri-anusornsak, Piyapha Hirunpatrawong, **Suphang Chulalaksananukul**, and Warawut Chulalaksananukul. 2010. Biogas Production from Cassava Mixed with Cow Dung in Single Stage Anaerobic Digester. The 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference. March 4-6, 2010. Nong Khai, Thailand.
12. Vitisant, T., G. Wattayakorn, **S. Chulalaksananukul** and W.Chulalaksananukul. 2010. Production and characterization of yeast lipase isolated from soils around Sichang Island. Proc.16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology, Bangkok, Thailand. pp. 480-482.
13. Jiraporn Puangkaew, **Suphang Chulalaksananukul**, Gullaya Wattayakorn and Chompunuch Virunanon, 2012. Screening of anaerobic bacteria for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation from marine sediment. Proc. 24th International Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Renewable Energy and Global Care”, November 2012. Number P-II-04 234.
14. Jiraporn Puangkaew, Gullaya Wattayakorn, Chompunuch Virunanon and **Suphang Chulalaksananukul**, 2012. Screening of denitrifying bacteria from marine sediment for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. Proc. the First Asian Marine Biology Symposium in Phuket, Thailand, December 13 -17, 2012.
15. สุชาติน พันธ์เทียมสกุล อรอนงค์ กุ่มพุด และ **สุภาพค์ จุฬาลักษณ์นกุล** 2551 การสกัดไลเปสจากเศษและเปลือกผลไม้เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล นิทรรศการงานแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญาตรี สกว ครั้งที่ 6: IRPUS51 ระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2551 สยามพารากอน กรุงเทพมหานคร (รางวัลชนะเลิศ อันดับหนึ่ง ประเภท Professional Vote หมวด พลังงาน/ สิ่งแวดล้อม)
16. เรวัต แซ่ลิ้ม นิดารัตน์ สีหนู และ**สุภาพค์ จุฬาลักษณ์นกุล** 2551 การผลิตก๊าซชีวภาพจากเศษและเปลือกผลไม้ของโรงงานผลไม้กระป๋อง นิทรรศการงานแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญาตรี สกว ครั้งที่ 6: IRPUS51 ระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2551 สยามพารากอน กรุงเทพมหานคร (รางวัลชนะเลิศ อันดับสอง ประเภท Professional Vote หมวด พลังงาน/ สิ่งแวดล้อม)
17. มาริสา สักพันโรจน์ **สุภาพค์ จุฬาลักษณ์นกุล** และ วรวิติ จุฬาลักษณ์นกุล 2552 การผลิตไบโอดีเซลแบบต่อเนื่องจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์โดยโนโวไซม์ 435 ในระบบที่ใช้ *t*-butanol เป็นตัวทำละลาย การประชุมวิชาการและแสดงผลงานทางวิชาการพระจอมเกล้าลาดกระบังประจำปี 2552 ระหว่างวันที่ 31 สิงหาคม- 2 กันยายน 2552 กรุงเทพมหานคร
18. วินิต ทังสมบัติ สุชีรา เลิศศิริวรกุล และ**สุภาพค์ จุฬาลักษณ์นกุล** 2552 การสกัดสีและสารกลุ่มแคโรทีนอยด์จากดินฟอกสีน้ำมันที่ใช้แล้วด้วยตัวทำละลายผสม นิทรรศการงานแสดงผล

งานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญาตรี สกว ครั้งที่ 7: IRPUS52 (งานวิจัย สร้างปัญญา พัฒนา ประเทศ) ระหว่างวันที่ 26-29 มีนาคม 2552 สยามพารากอน กรุงเทพมหานคร

19. มาริสา สัจพันธุ์ สุธางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล และ วรวิภา จุฬาลักษณ์านุกูล 2552 การผลิตไบโอดีเซลแบบต่อเนื่องจากน้ำมันปาล์มโดยโนโวไซม์ 435 ในระบบที่ใช้ตัวทำละลายแบบผสม การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 (เกษตรนำไทย: อาหารและพลังงานทดแทนสู่สมดุลอย่างยั่งยืน) ระหว่างวันที่ 17-20 มีนาคม 2552 กรุงเทพมหานคร

20. ธนธร วิทิตสานต์ เอนก โสภณ สุธางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล กัลยา วัฒนากร และวรวิภา จุฬาลักษณ์านุกูล 2553 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ไลโปไลติกบนเกาะสีชัง งานประชุมทางวิชาการประจำปี 2553 สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ระหว่างวันที่ 26- 27 พฤษภาคม 2553 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่

21. ปิยะภา หิรัญพัทรวงศ์ วิภาดา ศิริอนุสรณ์ศักดิ์ สุธางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล และวรวิภา จุฬาลักษณ์านุกูล 2553 ผลของปริมาณมูลโคและยูเรียในการผลิตก๊าซชีวภาพร่วมกับมันสำปะหลัง การประชุมทางวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 11 วันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2553 มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น

22. วิภาดา ศิริอนุสรณ์ศักดิ์ ปิยะภา หิรัญพัทรวงศ์ สุธางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล และวรวิภา จุฬาลักษณ์านุกูล 2553 การหาความเข้มข้นยูเรียที่เหมาะสมในมันสำปะหลังร่วมกับมูลโคเพื่อการผลิตก๊าซชีวภาพ การประชุมทางวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 11 วันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2553 มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น

23. ปิยะภา หิรัญพัทรวงศ์ วิภาดา ศิริอนุสรณ์ศักดิ์ สุธางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล และวรวิภา จุฬาลักษณ์านุกูล 2553 การคัดเลือกและการเตรียมมันสำปะหลังเพื่อการสังเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้ในการผลิตก๊าซชีวภาพ การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยสร้างสรรค์: ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 3 ระหว่างวันที่ 28-29 มกราคม 2553 มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม

24. วิภาดา ศิริอนุสรณ์ศักดิ์ สุธางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล และวรวิภา จุฬาลักษณ์านุกูล 2553 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในมันสำปะหลังที่ผ่านการเติมมูลโคและยูเรียเพื่อการผลิตก๊าซชีวภาพ การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยสร้างสรรค์ ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 3 ระหว่างวันที่ 28-29 มกราคม 2553 มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม

สิทธิบัตร

- การผลิตกรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* และสายพันธุ์กลาย CU22. เลขที่คำขอ 0801001111. ยื่นขอเมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2551.

2. ผู้ร่วมโครงการ

ดร. ชมกฤษ วรรณานนท์

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์-โทรสาร 02-2185484

ประวัติการศึกษา

วท.บ. เกียรตินิยมอันดับ 2 (พันธุศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2545

วท.ค. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2551

ประสบการณ์วิจัย

พันธูศาสตร์ของจุลินทรีย์ เอนไซม์วิทยา แอนแอโรบัส

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

1. **Virunanon, C.**, Chantaroopamai, S., Dendoungbaripant, J., and Chulalaksananukul, W. 2008. Solventogenic-cellulolytic Clostridia from 4-step-screening process in Agricultural Waste and Cow Intestinal Tract. *Anaerobe*.14: 109-117.
2. **Chompunuch Virunanon**, Christian Croux, Philippe Soucaille, and Warawut Chulalaksananukul. 2008. Gene-disruption process for cellulosome modification in *C. acetobutylicum* ATCC824. MIE Bioforum 2008 proceeding.
3. **Chompunuch Virunanon**, Christian Croux, Philippe Soucaille, and Warawut Chulalaksananukul. 2008. Improved *C. acetobutylicum* Family48 Cellulase Activity by Chimera Protein Expressed in *E. coli*. MIE Bioforum 2008 proceeding.
4. Monnat Theerachat, **Chompunuch Virunanon**, Jittra Piapukiew, Suphang Chulalaksananukul, Nussara Sinbuathong, and Warawut Chulalaksananukul. *NirK* and *nirS* Nitrite Reductase Genes of non-agricultural forest soil in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. (accepted/in press)
5. **Chompunuch Virunanon**, Chanika Ouephanit, Vorakan Burapatana, and Warawut Chulalaksananukul. Bioethanol Production from Starch Industrial Waste in Thailand. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. (submitted)
6. **Chompunuch Virunanon**, Chanika Ouephanit, Warawut Chulalaksananukul. International review article "Butanol, Properties, Engineering and Applications" ในหนังสือ "Chemistry Research Update" สำนักพิมพ์ Nova Publisher, NY, USA.
7. **ชมภูนุช วิรุณานนท์ และ วรวุฒิ จุฬาลักษณ์นากุล**. 2009. เชลลูลูโลโซม: กุญแจสำคัญสู่การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. ปีที่ 25 ฉบับที่ 2*.
8. **ชมภูนุช วิรุณานนท์ และ วรวุฒิ จุฬาลักษณ์นากุล**. 2010. จีวสารสนเทศ: ประโยชน์ในงานวิจัยทางชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา*. (accepted).

บทความเผยแพร่ในการประชุมทางวิชาการ

1. **Virunanon, C.** Croux, C., Soucaille, P., Chulalaksananukul, W. 2007. Optimization of 2, 2-Bicinchoninic acid methods for reducing-sugar detection in anaerobic cellulase activity assay. International Conference on New Horizons in Biotechnology (NHBT-2007), NIST, Trivandrum, India, November 26-29.
2. **Chompunuch Virunanon**, Christian Croux, Fabrice Sabathé, Frédéric Lopez, Laurence Girbal' Philippe Soucaille, and Chulalaksananukul, W. 2007. Two of the three major cellulases of the cellulosome of *Clostridium acetobutylicum* are active on crystalline

cellulose. 12th Biological Sciences Graduate Congress (BSGC) “Science Empowering Life”, University of Malaya, Malaysia, December 17-19.

3. **Chompunuch Virunanon**, Christian Croux, Philippe Soucaille, and Warawut Chulalaksananukul. 2008. Gene-disruption process for cellosome modification in *C. acetobutylicum* ATCC824. Biotechnology of Lignocellulose Degradation, Biomass Utilization and Biorefinery, Shima Spain Mura, Shima-Isobe, Japan, September 1-5.
4. Chanika Ouephanit, **Chompunuch Virunanon**, Vorakan Burapatana, Warawut Chulalaksananukul. 2009. Butanol and Ethanol Production from Tapioca-starch Waste Water by Clostridia strains from 16SrDNA identification in Thailand. Genetics for National Energy Crisis 2009 Proceeding.
5. **Chompunuch Virunanon**, Warawut Chulalaksananukul, and Philippe Soucaille. 2010. Nucleotide sequence and structure of CelC-Lic-16 homologous, a $\beta(1,3)$ -glucan hydrolase from marine algae isolated *Clostridium* sp. L2-50. International proceeding ในการประชุมวิชาการ International Conference on Biotechnology for Healthy Living. (submitted)
6. Chanika Ouephanit, **Chompunuch Virunanon**, Warawut Chulalaksananukul. 2010. Factor effecting butanol production of *Clostridium* sp. National proceeding ในการประชุมวิชาการ Thailand research symposium 2010.
7. Phanthipa Songsermpanit, **Chompunuch Virunanon**, Vorakan Burapatana and Warawut Chulalaksananukul. 2010. Anaerobic bacteria from cow dung for biofuels applications. International proceeding ในการประชุมวิชาการ International Conference on Biotechnology for Healthy Living. (submitted)
8. Chanika Ouephanit, **Chompunuch Virunanon**, Vorakan Burapatana, Warawut Chulalaksananukul. 2010. Biobutanol production from tapioca starch wastewater by *Clostridium* sp. International proceeding ในการประชุมวิชาการ International Conference on Biotechnology for Healthy Living. (submitted)
9. Jiraporn Puangkaew, Suphang Chulalaksananukul, Gullaya Wattayakorn and **Chompunuch Virunanon**, 2012. Screening of anaerobic bacteria for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation from marine sediment. Proc. 24th International Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Renewable Energy and Global Care”, November 2012. Number P-II-04 234.
10. Jiraporn Puangkaew, Gullaya Wattayakorn, **Chompunuch Virunanon** and Suphang Chulalaksananukul, 2012. Screening of denitrifying bacteria from marine sediment for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. Proc. the First Asian Marine Biology Symposium in Phuket, Thailand, December 13 -17, 2012.