

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัยเชิงลึก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (โครงการนำร่อง)
เรื่อง
เส้นทางและการบำบัดสารมลพิษและจุลมลสารที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมและพื้นที่การเกษตร
ประจำปีงบประมาณ 2553

สิ่งที่ส่งมาด้วย 1. รายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย จำนวน 10 ชุด
 2. แผ่น CD

ชื่อผู้วิจัย	รศ. ดร. อลิสา วังโน	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
	ผศ. ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว	ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
	ผศ. ดร. นัยนันท์ อริยกานนท์	ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์
	ผศ. ดร. วรงค์ ปวรอาจารย์	ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์
	ดร. ตะวัน ลิ้มปิยากร	ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์
	ดร. พิสุทธิ เพ็ชรมนกุล	ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์
	ดร. เสาวรัตน์ จันทะโร	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
	ดร. ปกรณ์ วินะขานุวัตินุณ	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
	ดร. รุ่งกานต์ นุ้ยสินธุ์	ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์

โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) เส้นทางและการบำบัดสารมลพิษและจุลมลสารที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม
 และพื้นที่การเกษตร


(ภาษาอังกฤษ) Fate and remediation of toxic pollutants and micropollutants contaminated in
 environment and agricultural area

สาขา Food and Water Cluster

ได้รับเงินอุดหนุนโครงการวิจัย	ปีงบประมาณ 2553	โครงการ 1 ปี
จำนวนเงินทั้งสิ้น	300,000 บาท	
ได้รับอนุมัติเงินทุนงวดแรก จำนวน	210,000 บาท	
ได้รับอนุมัติเงินทุนงวดที่สอง จำนวน	90,000 บาท	

รายงานครั้งนี้เป็นรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2553 ถึง เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2554

วันที่ส่งรายงาน 4 พฤษภาคม พ.ศ. 2554

ลงชื่อผู้วิจัยหลัก 

(รองศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วังไฉ)

เฉพาะเจ้าหน้าที่

วันที่ได้รับรายงาน

วันที่ส่งไปยังคณะกรรมการ.....

วันที่ตอบรับจากคณะกรรมการ

วันที่ส่งกองคลัง

วันที่ได้รับอนุมัติ

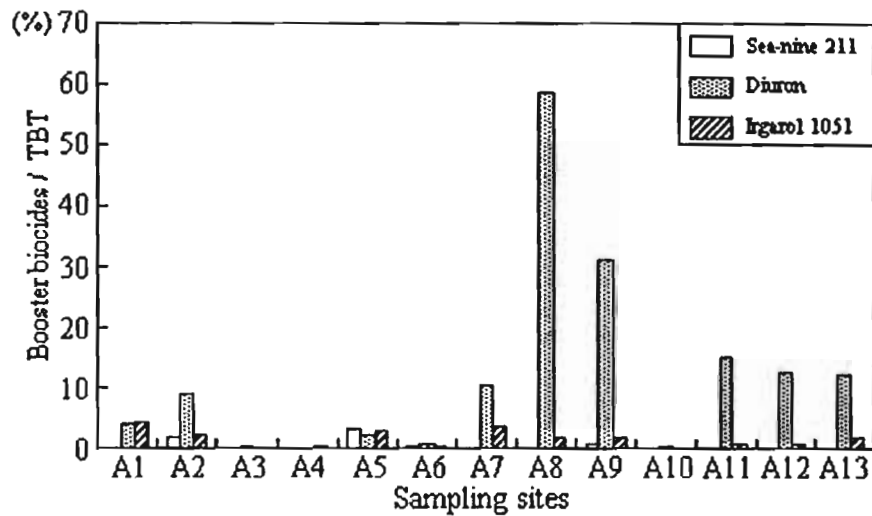
หมายเหตุ

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) เส้นทางและการบำบัดสารมลพิษและจุลมลสารที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม
และพื้นที่การเกษตร
(ภาษาอังกฤษ) Fate and remediation of toxic pollutants and micropollutants contaminated in
environment and agricultural area

1. คำนำ (ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย)

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่กำลังมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วเพื่อก้าวเข้าสู่การเป็นประเทศกึ่งอุตสาหกรรม ดังนั้นการสร้างเสริมความแข็งแกร่งทางด้านความรู้และเทคโนโลยีต่างๆ ในระบบการผลิตทั้งในภาคการเกษตรและภาคอุตสาหกรรมจึงมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาประเทศไทยให้มีความมั่นคงทางด้านเศรษฐกิจและมีศักยภาพต่อการแข่งขันในระดับโลก อย่างไรก็ตาม การสร้างเสริมความแข็งแกร่งทางด้านความรู้และเทคโนโลยีด้านการเพิ่มผลผลิตดังกล่าวจำเป็นต้องดำเนินการควบคู่กับการจัดการสิ่งแวดล้อมทั้งในภาคการเกษตรและอุตสาหกรรมอย่างเหมาะสม ทั้งนี้เพื่อรักษาและพัฒนาคุณภาพสิ่งแวดล้อมที่ดี รวมทั้งบำบัดฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ เพื่อยกระดับคุณภาพชีวิตของประชาชนในประเทศ เพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน อีกทั้งเพื่อลดปัญหาการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศเนื่องจากมาตรการทางด้านสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ รวมทั้งการพัฒนาผลงานวิจัยสู่การประยุกต์ใช้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาประเทศแบบยั่งยืน

ดังที่กล่าวข้างต้นแล้วว่า ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม-กึ่งอุตสาหกรรม ซึ่งมีการใช้สารเคมีเป็นจำนวนมาก ในการทำการเกษตรกรรมและภาคอุตสาหกรรม ตัวอย่างสารเคมีเกษตรที่มีการใช้สูง ได้แก่ สารปราบศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มีโครงสร้างทางเคมีจำพวกฮาโลเจเนตไฮโดรคาร์บอน (Halogenated hydrocarbon) ซึ่งอาจถูกจัดอยู่ในกลุ่มของสารจำพวกออร์แกโนฟอสเฟต (Organophosphate) ออร์แกโนคลอรีน (Organochlorine) เป็นต้น สารเหล่านี้มีการใช้มากเป็นอันดับต้นๆ ของประเทศไทย นอกจากนั้นแล้ว สารเคมีประเภทเดียวกันนี้ยังมีการใช้มากในกระบวนการผลิตสารเคมีบางประเภทที่ใช้ในภาคอุตสาหกรรม เช่น สี ย้อม เครื่องสำอาง เป็นต้น การใช้สารเคมีเกษตรในกลุ่มนี้เป็นปริมาณมากและอย่างต่อเนื่องทั้งในประเทศไทยและทั่วโลกก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากความเป็นพิษและความคงทนของสาร รวมทั้งการแตกตัวของสารเหล่านี้และเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารอนุพันธ์ซึ่งอาจมีความเป็นพิษสูงกว่าและมีความคงทนในสิ่งแวดล้อมสูงกว่าสารตั้งต้น การปนเปื้อนตกค้างของสารพิษเหล่านี้ในดิน แม่น้ำ และน้ำบาดาลก่อให้เกิดภาวะมลพิษและเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างการตกค้างของสารปราบศัตรูพืชไดยูรอนในสิ่งแวดล้อมในประเทศไทย



Proportions of booster biocides for TBT in sediment from the coastal area of Thailand

ภาพที่ 1 รายงานการตกค้างของสารปราบวัชพืชไคบูยอนในดินตะกอน (Sediment) และหอยในประเทศไทย
ที่มา [1-2]

นอกจากนั้นแล้ว จากการพัฒนาเทคนิคกระบวนการวัด การแยกและระบุชนิดของสารเคมีตกค้างปริมาณน้อยหรือเรียกว่า “จุลมลสาร” (micropollutant) ในสิ่งแวดล้อม ทำให้สามารถตรวจวัดสารเคมีตกค้างที่มีระดับความเข้มข้นต่ำกว่าหนึ่งในล้านล้านส่วน (part per trillion (ppt); ng/L) ได้ ดังนั้นจึงทำให้พบว่าในความเป็นจริงแล้วยังมีการตกค้างของจุลมลสารชนิดใหม่หลายชนิดในอาหาร เนื้อเยื่อ น้มนม และสิ่งแวดล้อม ซึ่งครอบคลุมแหล่งน้ำต่างๆ ทั้งแหล่งน้ำผิวดินและใต้ดิน รวมถึงระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน และอุตสาหกรรม ดิน และอากาศ โดยจุลมลสารชนิดใหม่เหล่านี้สามารถแพร่กระจายลงสู่สิ่งแวดล้อมผ่านจากกิจกรรมในบ้านเรือน อุตสาหกรรม และเกษตรกรรม ยกตัวอย่างเช่นผลิตภัณฑ์ประเภทยาและสารเคมีสำหรับชีวิตประจำวันสามารถแพร่กระจายเข้าสู่แหล่งน้ำผ่านน้ำเสียชุมชน สารเร่งการเจริญเติบโต ยา และ วัคซีนในการเลี้ยงปศุสัตว์สามารถแพร่กระจายเข้าสู่ดินและแหล่งน้ำในพื้นที่เกษตรกรรมผ่านกระบวนการจัดการมูลสัตว์ นอกจากนี้ในภาคอุตสาหกรรมมีการใช้สารเคมีหลายชนิด เช่น สารลดแรงตึงผิว และสารป้องกันการจุดติดไฟ ซึ่งสารเคมีเหล่านี้แพร่กระจายเป็นจุลมลสารที่คงทนในระบบสิ่งแวดล้อมเป็นระยะเวลายาวนาน จุลมลสารสามารถแบ่งออกได้เป็นหลายประเภทตามลักษณะการใช้งานของสารเคมีดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย ยาปฏิชีวนะสำหรับมนุษย์และสัตว์ (Human and veterinary antibiotics) ฮอร์โมนเพศและสเตียรอยด์ (Sex and steroidal hormones) สารเคมีสำหรับบ้านเรือนและอุตสาหกรรม (Household and industrial chemicals) ยาชนิดต่างๆ (Human pharmaceuticals)

ตารางที่ 1 ชนิดของจุลสารที่สำคัญ

ยาปฏิชีวนะสำหรับมนุษย์และสัตว์ (Human and veterinary antibiotics)		ยา (Human Pharmaceuticals)	
<p>Tetracyclines Chlortetracycline Doxycycline, Oxytetracycline, Tetracycline</p> <p>Fluoroquinolones Ciprofloxacin Enrofloxacin, Norfloxacin, Sarafloxacin</p> <p>Macrolides Erythromycin-H₂O Roxithromycin, Tylosin</p>	<p>Sulfonamides Sulfachlorpyridazine Sulfadimethoxine, Sulfamerazine Sulfamethazine, Sulfamethiazole Sulfamethoxazole, Sulfathiazole</p> <p>Other Antibiotics Carbadox Lincomycin, Trimethoprim, Virginiamycin</p>	<p>Prescription Cimetidine, Dehydronifedipine, Digoxin, Digoxigenin, Diltiazem, Fluoxetine, Gemfibrozil, Metformin, Paroxetine, Ranitidine, Salbutamol, Warfarin</p>	<p>Non-Prescription Ibuprofen, Acetaminophen, Codeine, Caffeine, Cotinine, 1,7-dimethylxanthine</p>
ฮอร์โมนเพศและสเตียรอยด์ (Sex and steroidal hormones)			
<p>Biogenics 17β-Estradiol (E2), 17β-Estradiol (E1), Estrone, Estriol, Testosterone, Progesterone, cis-Androsterone</p>		<p>Pharmaceuticals 17β-Ethinylestradiol, Mestranol, 19-norethisterone, Equilenin, Equilin</p>	<p>Sterols Cholesterol, 3β-Coprostanol, Stigmastanol</p>
สารเคมีสำหรับบ้านเรือนและอุตสาหกรรม (Household and industrial chemicals)			
<p>Insecticides Carbaryl, Chlorpyrifos cis-Chlordane, Diazinon, Dieldrin Lindane, Methyl parathion N,N-Diethyltoluamide</p> <p>Antioxidants Butylatedhydroxyanisole, Butylatedhydroxytoluene, 2,6-di-tert-butylphenol, 2,6-di-tert-butyl-p-benzoquinone, 5-methyl-1H-benzotriazole</p>	<p>PAHs Anthracene, Pyrene, Fluoranthene, Benzo(a)pyrene Naphthalene, Phenanthrene</p> <p>Fire Retardants tri(2-chloroethyl)-phosphate tri(dichlorisopropyl)-phosphate</p>	<p>Plasticizers Diethylphthalate, bis(2-ethylhexyl)adipate ethanol-2-butoxyphosphate bis(2-ethylhexyl)phthalate Triphenyl phosphate</p> <p>Others Acetophenone, phenol, bisphenol-A, p-cresol 1,2-dichlorobenzene, Triclosan Phthalic anhydride, Tetrachloroethylene</p>	<p>Surfactant Derivatives Nonylphenol- monoethoxylate, Nonylphenol diethoxylate, Octylphenol-monoethoxylate, Octylphenol-diethoxylate, p-Nonylphenol</p>

ที่มา USGS (2008)

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา มีการตรวจพบการตกค้างของจุลสารชนิดใหม่หลายชนิดทั้งในสิ่งแวดล้อมเมืองและพื้นที่เกษตรกรรม สารเคมีที่พบมาก ได้แก่ N,N-diethyltoluamide, (DEET, insect repellent), bisphenol-A (plasticizer), tri(2-chloroethyl) phosphate (flame retardant), cotinine (nicotine metabolite), sulfamethoxazole (antibiotic), cholesterol, metolachlor (herbicide), 4-octylphenol monoethoxylate (surfactant metabolite), β -sitosterol (natural plant sterol) และ 1,7-dimethylxanthine (caffeine metabolite) เป็นต้น ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของจุลสารชนิดใหม่จะอยู่ในระดับต่ำมากและสารบางชนิดยังไม่มีการควบคุมตามกฎหมาย แต่จุลสารเหล่านี้สามารถส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน์และสุขภาพของมนุษย์ได้ จากงานวิจัยในอดีตพบว่าสารยับยั้งแบคทีเรีย Triclosan สามารถลดการตอบสนองของกบ [3] สาร Diclofenac ซึ่งเป็นสารป้องกันการจุดติดไฟส่งผลให้เกิดการลดลงของจำนวนประชากร

อีแร้งในเอเชียใต้ [4] นอกจากนี้ยังพบการแพร่กระจายของสารเคมีที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมน Estrogen หลายชนิดในน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพศของปลา [5] และเกิดภาวะสองเพศในปลาตัวผู้ในพื้นที่ลุ่มน้ำสี่แห่งทางตอนใต้ของสหรัฐอเมริกาที่มีการปนเปื้อนของสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (Endocrine Disrupting Compounds; EDCs) [6] จากปัญหาการตกค้างของจุลมลสารและอันตรายจากสารดังกล่าว หากไม่มีการศึกษาวิจัยแนวทางจัดการจุลมลสารเหล่านี้อย่างชัดเจนในอนาคตอาจส่งผลให้เกิดปัญหาทั้งต่อระบบนิเวศน์และสุขภาพมนุษย์และคุณภาพสิ่งแวดล้อมตามมาอีกมากมายจากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นนี้ การปนเปื้อนตกค้างของสารปราบศัตรูพืชและสารอนุพันธ์จากภาคการเกษตร รวมทั้งการตกค้างของจุลมลสารต่างๆ จากกิจกรรมในบ้านเรือน กิจกรรมการแพทย์ อุตสาหกรรม และการเกษตรกรรม ในสิ่งแวดล้อมจะก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากความเป็นพิษและความคงทนของสาร การปนเปื้อนตกค้างของสารพิษเหล่านี้ในดิน แม่น้ำ และน้ำบาดาลก่อให้เกิดภาวะมลพิษและเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อม อีกทั้ง การปนเปื้อนตกค้างของสารต่างๆ ดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อ การส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และจัดเป็นอุปสรรคต่อการค้าระหว่างประเทศอีกด้วย ดังนั้นการบำบัดสารตกค้างเป็นพิษเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อมจึงจัดว่ามีความสำคัญต่อสุขอนามัยและความปลอดภัยของประชาชน รวมทั้งต่อเศรษฐกิจการส่งออกของประเทศ

จากอดีตถึงปัจจุบันการบำบัดสารพิษที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมโดยส่วนใหญ่จะถูกกำจัดโดยการเผา (Incineration) หรือการฝังกลบ (Landfill) อย่างไรก็ตามการเผาสารพิษและขยะอันตรายเหล่านี้ที่อุณหภูมิสูงอาจก่อให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ยิ่งขึ้น อีกทั้งอาจก่อให้เกิดภาวะมลพิษทางอากาศตามมา ดังนั้นการใช้วิธีการเผาสารพิษและขยะอันตรายจึงเป็นหัวข้อถกเถียงถึงความเหมาะสมในการบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อม ในทำนองเดียวกัน การฝังกลบสารพิษและขยะอันตรายเป็นวิธีที่ใช้พื้นที่เป็นบริเวณกว้าง และต้องการการควบคุมดูแลที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้เกิดการรั่วไหลของของเหลวสารชะกาด (Leachate) ที่เป็นพิษออกมาอีก จากเหตุผลดังกล่าวการบำบัดสารพิษและจุลมลสารที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมควรดำเนินการด้วยกระบวนการทางกายภาพ และ/หรือทางเคมีโดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี (Chemical catalyst) ที่มีความเหมาะสมและที่มีปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรงนัก นอกจากนั้นแล้ว การบำบัดสารพิษและจุลมลสารเหล่านี้ยังสามารถกระทำด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยอาศัยความสามารถของตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ (Biocatalyst) ซึ่งได้แก่ จุลินทรีย์ พืช และ/หรือเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารพิษตกค้างให้หมดไป ซึ่งจัดเป็นทางเลือกที่มีความปลอดภัยต่อสุขอนามัยของประชาชนในสิ่งแวดล้อมดังกล่าว อีกทั้งจัดเป็นระบบการบำบัดสารพิษที่มีความยั่งยืน ดังจะเห็นได้จากการที่ประเทศต่างๆ ทั่วโลกได้มีการศึกษาและวิจัยอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับการใช้เชื้อจุลินทรีย์และเอนไซม์ในการย่อยสลายสารพิษ และการใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดขยะหรือน้ำเสีย รวมทั้งการวิจัยพัฒนากระบวนการทางชีวภาพ (Biological process) ในการบำบัดสารพิษที่ปนเปื้อนตกค้างในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน น้ำ

ภาคตะกอน อากาศ สำหรับในประเทศไทยนั้น สมเด็จพระเจ้าลูกเธอ เจ้าฟ้าจุฬาภรณวลัยลักษณ์ อัครราชกุมารี ได้สังเกตเห็นความสำคัญของการวิจัยและพัฒนาด้านเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม และได้ทรงตีพิมพ์บทความดังกล่าวภายใต้หัวข้อ Environmental biotechnology for developing countries: needs and priorities ใน Journal of Industrial and Microbiological Biotechnology (2005) 32, 492-495 [7].

องค์ความรู้ใหม่ที่คาดว่าจะได้และผลกระทบขององค์ความรู้นั้นต่อความก้าวหน้าในสาขาวิจัย – สำหรับการศึกษาวิจัยด้านการบำบัดสารพิษตกค้างด้วยวิธีทางกายภาพ-เคมี และชีวภาพนั้น ห้องปฏิบัติการในประเทศต่างๆ ทั่วโลกได้ดำเนินการมาแล้วกว่า 30 ปี อย่างไรก็ตาม การดำเนินการวิจัยในด้านนี้ยังคงมีการดำเนินการอย่างต่อเนื่องและเพิ่มขึ้น เนื่องจากมนุษย์ยังคงมีอัตราการสังเคราะห์และการใช้สารซีโนไบโอติก (xenobiotics) ชนิดต่างๆ และชนิดใหม่อย่างต่อเนื่อง รวมทั้งการตรวจพบจุลสารชนิดใหม่ๆ ที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเกิดจากกิจกรรมทางการเกษตรและอุตสาหกรรมที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมาก ส่งผลให้มีการตกค้างและคงทน (persistence) ของสารพิษดังกล่าวในสิ่งแวดล้อม นอกเหนือจากนั้น การศึกษาวิจัยด้านการบำบัดสารพิษตกค้างโดยเฉพาะอย่างยิ่งด้วยวิธีทางชีวภาพในประเทศต่างๆ และทวีปต่างๆ มีเอกลักษณ์และมีความแตกต่างกัน โดยขึ้นกับ 1) ชนิดของสารเคมีที่มีการใช้มากในประเทศดังกล่าวและชนิดของสารตกค้างที่เป็นปัญหาต่อประเทศนั้นๆ 2) ลักษณะสมบัติ (ทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ) ของบริเวณ (ขึ้นกับภูมิประเทศและภูมิอากาศ) ที่มีการตกค้างของสารพิษที่จะต้องมีการบำบัด ทั้งนี้ลักษณะสมบัติของสิ่งแวดล้อมนี้จะมีผลกระทบอย่างสูงต่อประสิทธิภาพและความสำเร็จของการบำบัดสารพิษตกค้างเป้าหมายด้วยสาเหตุทั้งสองประการนี้จึงทำให้การดำเนินการวิจัยด้านการบำบัดสารพิษตกค้าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้วยวิธีทางชีวภาพนั้นในส่วนต่างๆ ของโลกมีความแตกต่างกัน ดังนั้นองค์ความรู้ที่เกิดขึ้นจากงานวิจัยในประเทศไทยรวมทั้งประเทศในแถบเอเชียจึงมีความเป็นเอกลักษณ์และสร้างความก้าวหน้าให้กับสาขาวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยเป็นประเทศที่จัดได้ว่ามีการใช้สารเคมีการเกษตรหลากหลายชนิด โดยเฉพาะการใช้สารปราบศัตรูพืชที่สูงมากเป็นอันดับต้นของโลก [8-9] รวมทั้งการใช้ยาปฏิชีวนะสำหรับมนุษย์และสัตว์ สารที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนและสเตียรอยด์ (ตารางที่ 1) ซึ่งส่งผลให้มีการตกค้างและปนเปื้อนของสารปราบศัตรูพืชและจุลสารเหล่านี้ในดินและแหล่งน้ำในพื้นที่การเกษตร รวมทั้งส่งผลให้มีการปนเปื้อนตกค้างของสารเหล่านี้ในอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร [8, 10-11] การตกค้างของสารพิษหลากหลายชนิดเหล่านี้เป็นระยะเวลายาวนานในสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้กลุ่มจุลินทรีย์ในดินและน้ำในเขตร้อนชื้นของประเทศไทยมีการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ ส่งผลให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง จึงทำให้จุลินทรีย์ที่พบในประเทศไทยมีลักษณะสมบัติและวิถีเมแทบอลิซึมที่แตกต่างจากลักษณะดังกล่าวของจุลินทรีย์ในกลุ่มสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งเป็นผลมาจากภาวะเครียดด้วยสารเคมีเป็นพิษ (Chemical stress) เป็นผลให้มีการเหนี่ยวนำให้มีการควบคุมของวิถีเมแทบอลิซึม (Metabolic regulation) และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารพิษ (Regulation of degradative genes) ที่แตกต่างออกไป [12] ตัวอย่าง เช่น แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารคลอโรแอนนิลีนซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของสารปราบศัตรูพืชที่คัดแยกโดยคณะผู้วิจัยในต่างประเทศจะมีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษดังกล่าวเมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีบางชนิดเท่านั้น [9,

10] ลักษณะสมบัตินี้มีความแตกต่างจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารคลอโรแอนนิลินที่คัดแยกได้จากดินในประเทศไทย [11] ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษตั้งต้นได้มากกว่าโดยไม่ต้องมีการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีอื่น ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง และในปัจจุบันคณะผู้วิจัยอยู่ในระหว่างการศึกษาวิจัยเชิงลึก โดยศึกษาลำดับเบสของยีน การแสดงออก และการควบคุมการแสดงออกของยีนคลัสเตอร์ดังกล่าว ซึ่งผลจากการวิจัยนี้จัดเป็นองค์ความรู้ใหม่และจะเป็นผลงานที่สามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้ นอกจากนี้ ผลการวิจัยดังกล่าวจะเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการควบคุมการแสดงออกของแบคทีเรียเมื่อมีการประยุกต์ใช้ในการบำบัดสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมจริงแบบ Bioaugmentation ต่อไป

นอกเหนือจากที่ได้กล่าวมาแล้ว โครงการวิจัยนี้มีความมุ่งมั่นที่จะดำเนินการวิจัยเพื่อเป้าหมายที่มีความสอดคล้องกับแผนยุทธศาสตร์การวิจัยของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในการเป็นแหล่งความรู้และแหล่งอ้างอิงของแผ่นดิน เป็นผู้นำทางปัญญาเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน โดยคณะผู้วิจัยเป็นการบูรณาการของกลุ่มนักวิจัยจากหลายศาสตร์ทั้งจากภาควิชาต่างๆ ของคณะวิทยาศาสตร์และคณะวิศวกรรมศาสตร์มาทำวิจัยร่วมกันเพื่อศึกษาปัญหาวิจัยแบบมุ่งเป้า โดยมีภารกิจเป้าหมายสอดคล้องกับคลัสเตอร์วิจัย “อาหารและน้ำ” โครงการวิจัยนี้เป็น โครงการวิจัยเพื่อแก้ปัญหาการตกค้างของสารพิษในอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร มุ่งเน้นการแก้ปัญหาที่แหล่งกำเนิด และดำเนินการศึกษาวิจัยแบบครบวงจร โดยจะดำเนินการศึกษาวิจัยความเป็นไป การเคลื่อนที่ และการตกค้างของสารพิษและจุลมลสารในพื้นที่การเกษตรและระบบสิ่งแวดล้อมต่างๆ จากนั้นศึกษาวิจัยพื้นฐานและวิจัยเชิงลึกด้านกลไกการย่อยสลายสารพิษดังกล่าวด้วยกระบวนการทางชีวภาพและกระบวนการทางกายภาพและเคมีเพื่อสร้างองค์ความรู้พื้นฐานเพื่อเป็นรากฐานของการพัฒนาอย่างยั่งยืน อีกทั้งจะมีการศึกษาวิจัยเชิงประยุกต์โดยการพัฒนาเทคโนโลยีการบำบัดสารพิษและจุลมลสารเพื่อเป็นองค์ความรู้เชิงประยุกต์ในการจัดการสิ่งแวดล้อมทั้งในภาคการเกษตรและอุตสาหกรรมอย่างเหมาะสม ทั้งนี้เพื่อรักษา และพัฒนาคุณภาพสิ่งแวดล้อมที่ดี รวมทั้งบำบัดฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ เพื่อยกระดับคุณภาพชีวิตของประชาชนในประเทศ เพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน อีกทั้งเพื่อลดปัญหาการกีดกันทางการค้าของผลิตภัณฑ์การเกษตรระหว่างประเทศเนื่องจากมาตรการทางด้านสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ดังนั้นผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้จะได้องค์ความรู้พื้นฐานใหม่ และองค์ความรู้เชิงประยุกต์เพื่อการพัฒนาประยุกต์ใช้ต่อไป จึงจัดได้ว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาประเทศแบบยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิงภาษาไทย

เอกสารการอบรม เรื่อง Agricultural Chemical Residue Analysis in Foods According to Japanese Regulations (2552)

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ

เอกสารเรื่อง “วันนี้ลูกของคุณกินยาพิษหรือเปล่า” ของโครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งแก่เกษตรกรด้านการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชแบบผสมผสาน โครงการความร่วมมือระหว่างรัฐบาลไทยและรัฐบาลเดนมาร์ก (DANIDA, 2003)

เอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษ

1. Harino, H., et al., *Occurrence of antifouling biocides in sediment and green mussels from Thailand*. Arch Environ Contam Toxicol, 2006. **51**(3): p. 400-7.
2. Harino, H., et al., *Concentrations of antifouling biocides in sediment and mussel samples collected from Otsuchi bay, Japan*. Arch Environ Contam Toxicol, 2007. **52**(2): p. 179-88.
3. Fraker, S.L. and G.R. Smith, *Direct and interactive effects of ecologically relevant concentrations of organic wastewater contaminants on Rana pipiens tadpoles*. Environmental Toxicology, 2004. **19**: p. 250-256.
4. Oaks, J.L., et al., *Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan*. Nature, 2004. **427**(6975): p. 630-3.
5. Vajda, A.M., et al., *Reproductive disruption in fish downstream from an estrogenic wastewater effluent*. Environ Sci Technol, 2008. **42**(9): p. 3407-14.
6. Hinck, J.E., et al., *Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from rivers in the Southeastern United States*. Sci Total Environ, 2008. **390**(2-3): p. 538-57.
7. Mahidol, C., *Environmental biotechnology for developing countries: needs and priorities*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2005. **32**(11-12): p. 492-5.
8. Poolpak, T., et al., *Residue analysis of organochlorine pesticides in the Mae Klong River of Central Thailand*. J Hazard Mater, 2008. **156**(1-3): p. 230-9.
9. Ueda, T., et al., *Recent irrigation practices in the upper east bank of the Chao Phraya Delta*. Paddy Water Environ, 2005. **3**: p. 63-71.
10. Pentamwa, P. and N.T. Oanh, *Levels of pesticides and polychlorinated biphenyls in selected homes in the Bangkok metropolitan region, Thailand*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1140**: p. 91-112.
11. Siritwong, W., et al., *Organochlorine pesticide residues in plankton, Rangsit agricultural area, central Thailand*. Bull Environ Contam Toxicol, 2008. **81**(6): p. 608-12.
12. Wardle, D.A., *The influence of biotic interactions on soil biodiversity*. Ecol Lett, 2006. **9**(7): p. 870-86.

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อเชื่อมโยงกับเป้าหมายของแผนยุทธศาสตร์งานวิจัยของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้กลยุทธ์ “อาหารและน้ำ” ในการแก้ปัญหาที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ปัญหาการส่งออก รวมทั้งการเกษตรแบบครบวงจรและแบบยั่งยืน โดยอาศัยการวิจัยพื้นฐาน การวิจัยเชิงลึก และการพัฒนาองค์ความรู้เพื่อเป็นพื้นฐานที่มั่นคงต่อการแก้ปัญหาแบบยั่งยืนนั้น โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย ดังนี้

2.1 เพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ด้านกลไกการย่อยสลายสารพิษและจุลมลสารในสิ่งแวดล้อมด้วยกระบวนการทางกายภาพ-เคมี-ชีวภาพ เพื่อเป็นพื้นฐานการพัฒนาและฟื้นฟูสภาพแวดล้อมของประเทศแบบยั่งยืน

2.2 เพื่อการตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ เนื่องจากโครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงลึกเพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่ โดยศึกษาเชิงลึกถึงกลไกทางชีวภาพและเคมีที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารพิษตกค้าง องค์ความรู้เหล่านี้สามารถเผยแพร่โดยการตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้ นอกจากนี้ องค์ความรู้ใหม่เหล่านี้จะเป็นพื้นฐานสำคัญในการพัฒนากระบวนการ/เทคโนโลยีการบำบัดที่ใช้ในการแก้ปัญหให้กับเกษตรกรรวมทั้งภาคอุตสาหกรรมและภาคการผลิตอื่นๆ ในประเทศได้

3. สรุปผลการดำเนินงาน

ปัญหาการตกค้างของสารปราบศัตรูพืชและจุลมลสารที่มีความเป็นพิษและมีความคงทนในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย ก่อให้เกิดภาวะมลพิษ และมีการสะสมสารพิษเหล่านั้นในสิ่งมีชีวิตอย่างต่อเนื่องกันในช่วงโซ่อาหาร จึงเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้แล้วการปนเปื้อนตกค้างของสารพิษเหล่านี้ในอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรต่างๆ ยังส่งผลกระทบต่อการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และจัดเป็นอุปสรรคต่อการค้าระหว่างประเทศอีกด้วย ดังนั้น การบำบัดสารตกค้างที่ก่อให้เกิดภาวะเป็นพิษเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะพื้นที่ทางการเกษตรจึงจัดว่ามีความสำคัญต่อสุขอนามัยและความปลอดภัยของประชาชน มีผลต่อเศรษฐกิจการส่งออกผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของประเทศ โครงการวิจัยการบำบัดสารพิษตกค้างด้วยกระบวนการกายภาพ-เคมี-ชีวภาพนี้ จึงจัดเป็นโครงการวิจัยที่มีการศึกษาวิจัยที่มีความสมบูรณ์ในแง่ของการศึกษาศึกษาของกระบวนการทั้งสามประเภท (กายภาพ-เคมี-ชีวภาพ) และศึกษาแบบครบวงจรตั้งแต่การศึกษาความเป็นไป การเคลื่อนที่ การตกค้าง และการบำบัด เพื่อสร้างองค์ความรู้พื้นฐาน-เชิงลึก และองค์ความรู้เชิงประยุกต์เพื่อการพัฒนาการเกษตรแบบยั่งยืนต่อไป

ผลการดำเนินงานวิจัย สามารถแบ่งได้ตามหัวข้อโครงการวิจัยย่อยได้ 3 ส่วน ได้แก่

3.1 โครงการวิจัยเรื่อง **Broad range biodegradation ability and degradation pathways of *Acinetobacter baylyi* GFJ2 towards chloroanilines** โดยมีผลสรุปการวิจัย ดังนี้ และแสดงรายละเอียดดังภาคผนวก 1

The *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2 was isolated from soil that was potentially contaminated with herbicides. It exhibited complete biodegradations of 4-chloroaniline (4CA) and 3,4-dichloroaniline (34DCA), a wide

range of monohalogenated anilines (chloro-, bromo-, and fluoro-anilines) and other dichloroanilines. An in-depth investigation of the biodegradation pathway revealed that a dechlorination reaction may be involved in 34DCA biodegradation, which forms 4CA as the first intermediate. By detecting the transient intermediates and characterizing the relevant enzymes, this investigation is also the first to report that *A. baylyi* strain GFJ2 has two distinct 4CA degradation pathways that yield 4-chlorocatechol (4CC) and aniline as the first intermediate in each route, which are further metabolized through an ortho-cleavage pathway. Analysis of biodegradation kinetics analysis illustrated that *A. baylyi* GFJ2 utilized aniline and 4CC at significantly slower rates than it used 4CA, suggesting that the transformations of aniline and 4CC were probably the limiting steps during 4CA biodegradation. Our results suggest the potential application of *A. baylyi* strain GFJ2 in bioremediation and waste treatment, and the kinetic data provide the insights into the degradation mechanism, dynamics and possible limitations of the biodegradation which include substrate and product inhibitions.

ผลงานวิจัยนี้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้ (ภาคผนวก 1)

Panuch Hongsawat and Alisa S. Vangnai. 2010. Biodegradation pathways of chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2. *Journal of Hazardous Materials* 186: 1300-1307. Impact factor 4.144.

3.2 โครงการวิจัยเรื่อง Removal of chlorpyrifos by water lettuce (*Pistia Stratiotes L.*) And duckweed (*Lemna Minor L.*) โดยมีผลสรุปการวิจัย ดังนี้ และแสดงรายละเอียดดังภาคผนวก 2

The potential of water lettuce (*Pistia stratiotes L.*) and duckweed (*Lemna minor L.*) to remove chlorpyrifos in water was investigated under laboratory greenhouse conditions. At initial chlorpyrifos concentrations of 0.0, 0.1 and 0.5 mg/L, the relative growth rates (RGR) of *L. minor* and *P. stratiotes* were not significantly different. In contrast, in the presence of 1 mg/L chlorpyrifos the RGR was significantly inhibited, giving an observed fresh weight based RGRFW for *P. stratiotes* and *L. minor* from day 0 to 7 of -0.036 and -0.023 mg/g/day, respectively. The maximum removal of chlorpyrifos by *P. stratiotes* and *L. minor*, when chlorpyrifos was at an initial culture concentration of 0.5 mg/L, was 82% and 87%, respectively, with disappearance rate constants under these conditions of 2.94, 10.21 and 12.14 $\mu\text{g h}^{-1}$ for the control (no plants), and with *P. stratiotes* and *L. minor*, respectively, giving actual corrected plant removal rate constants of 7.27 and 9.20 $\mu\text{g h}^{-1}$ for *P. stratiotes* and *L. minor*, respectively. The bioconcentration factor (BCF) of *L. minor* was significantly greater than that for *P. stratiotes* and therefore, at least under these greenhousebased conditions, *L. minor* was more efficient than *P. stratiotes* for the accelerated removal of chlorpyrifos from water.

ผลงานวิจัยนี้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้ (ภาคผนวก 2)

Prasertsup, P., Ariyakanon, N. 2011. *International Journal of Phytoremediation*, 13 (4): 383-395. Impact factor 1.321

3.3 โครงการวิจัยเรื่อง Fate of estrogens and estrogenic potentials in sewerage systems

โครงการวิจัยศึกษาการเคลื่อนที่ของจุลมลสารจำพวก estrogens and estrogenic potentials ในระบบบำบัดน้ำเสีย ผลงานวิจัยนี้อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ (In press) ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้

Tawan Limpiyakorn, Supreeda Homklin, and Say Kee Ong. 2010. Fate of estrogens and estrogenic potentials in sewerage systems. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. In press. Impact factor = 7.091

4. ผลงานตีพิมพ์ในฐาน ISI ที่มีค่า impact factor ที่เกิดขึ้น

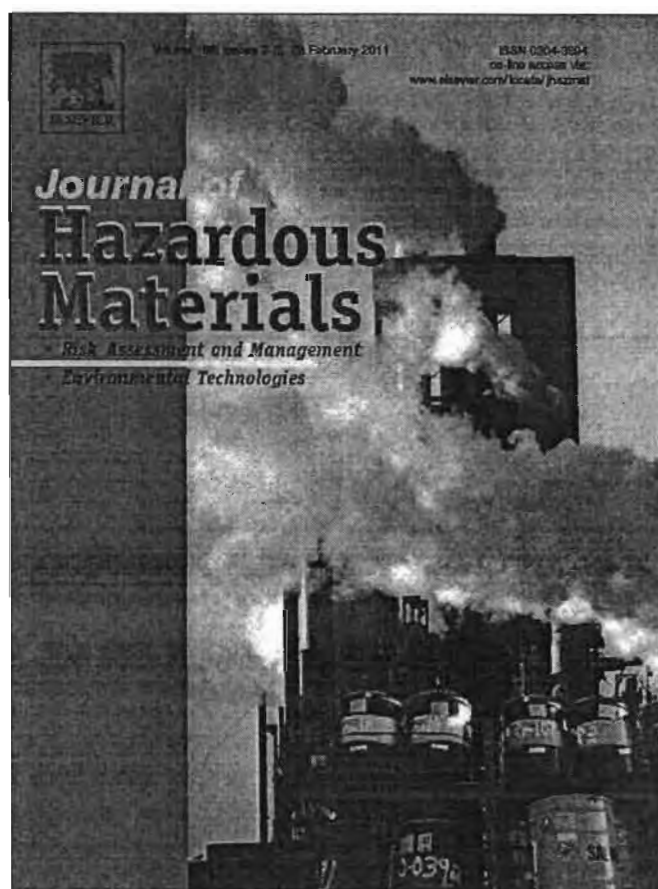
1. Panuch Hongsawat and Alisa S. Vangnai. 2010. Biodegradation pathways of chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2. Journal of Hazardous Materials 186: 1300-1307. Impact factor 4.144.
2. Prasertsup, P., Ariyakanon, N. 2011. International Journal of Phytoremediation, 13 (4): 383-395. Impact factor 1.321
3. Tawan Limpiyakorn, Supreeda Homklin, and Say Kee Ong. 2010. Fate of estrogens and estrogenic potentials in sewerage systems. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. In press. Impact factor = 7.091

5. ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

Panuch Hongsawat and Alisa S. Vangnai. 2010. Biodegradation pathways of chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2. *Journal of Hazardous Materials* 186: 1300-1307. Impact factor 4.144.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Biodegradation pathways of chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2

Parnuch Hongsawat^a, Alisa S. Vangnai^{b,c,*}

^a International Postgraduate Program in Environmental Management, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^b National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management (NCE-EHWM), Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^c Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2010

Received in revised form

26 November 2010

Accepted 1 December 2010

Available online 8 December 2010

Keywords:

4-Chloroaniline

3,4-Dichloroaniline

Monohalogenated aniline

Biodegradation pathway

Acinetobacter baylyi

Bioremediation

ABSTRACT

The *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2 was isolated from soil that was potentially contaminated with herbicides. It exhibited complete biodegradations of 4-chloroaniline (4CA) and 3,4-dichloroaniline (34DCA), a wide range of monohalogenated anilines (chloro-, bromo-, and fluoro-anilines) and other dichloroanilines. An in-depth investigation of the biodegradation pathway revealed that a dechlorination reaction may be involved in 34DCA biodegradation, which forms 4CA as the first intermediate. By detecting the transient intermediates and characterizing the relevant enzymes, this investigation is also the first to report that *A. baylyi* strain GFJ2 has two distinct 4CA degradation pathways that yield 4-chlorocatechol (4CC) and aniline as the first intermediate in each route, which are further metabolized through an *ortho*-cleavage pathway. Analysis of biodegradation kinetics analysis illustrated that *A. baylyi* GFJ2 utilized aniline and 4CC at significantly slower rates than it used 4CA, suggesting that the transformations of aniline and 4CC were probably the limiting steps during 4CA biodegradation. Our results suggest the potential application of *A. baylyi* strain GFJ2 in bioremediation and waste treatment, and the kinetic data provide the insights into the degradation mechanism, dynamics and possible limitations of the biodegradation which include substrate and product inhibitions.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chloroanilines (CAs) are a group of chlorinated aromatic amines which are originated from the biotransformation of herbicides, for example phenylcarbamate, phenylurea, or acylanilides [1]. In addition, they are widely used as intermediate compounds in the production of dyes, polyurethanes, pesticides, and pharmaceutical products. As a consequence of intensive applications in agriculture and industries, chloroanilines, especially 4-chloroaniline (4CA) and 3,4-dichloroaniline (34DCA), have been ubiquitous and accumulated in the environment including agricultural soil/water, industrial wastewater and sludge. Due to their toxicity and recalcitrant properties, they have been considered as the important environmental pollutants and are subject to legislative control by the environmental protection agency of United States and Europe [2]. To dissimilate the environmental contaminated aniline and chloroanilines, bioremediation has been noted as a primary treatment technique in which a detoxification process is depending on the microbial biodegradability. Since the resistance of micro-

bial biodegradation and toxicity of chloroanilines mainly depend on the number and position of chlorine atoms on the aromatic ring, there are many more reports of aniline-degrading bacteria than those of monochloroaniline (MCA)- or dichloroaniline (DCA)-metabolizing bacteria, some of which strictly required aniline as an inducer for cometabolic biodegradation [3]. In addition, while there are a number of publications describing microbial degradation of MCAs and DCAs under aerobic conditions, there are only a few reports on bacteria able to effectively degrade both chemical types. *Pseudomonas diminuta* was first bacterium described for its capability of degrading 3CA, 4CA and 34DCA (up to 0.3 mM), but not aniline [4], while *Alcaligenes faecalis* was reported for its ability to convert 34DCA to 4,5-dichloropyrocatechol before further metabolized [5]. Since the presence of MCAs and DCAs contaminated in the environment generally appears as co-contaminants, therefore to improve the biological remediation, microorganism with biodegradability of both MCAs and DCAs is importantly required. Moreover, in-depth information of its biodegradation pathway as well as biodegradation kinetics is necessary in order to have thorough understanding of biotransformation process which will further lead to effective control of bioremediation system.

In the present study, we successfully isolated and characterized 4CA-degrading bacterium, *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2, which has a broad range biodegradability towards various halogenated anilines. Investigation of biodegradation kinetics and

* Corresponding author at: Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Street, Pratumwan District, Bangkok 10330, Thailand. Tel.: +66 2 218 5430; fax: +66 2 218 5418.

E-mail addresses: alisa.v@chula.ac.th, avangnai@yahoo.com (A.S. Vangnai).

biodegradation inhibition profiles were also carried out for single substrates and mixed substrates. Interestingly, transient intermediate detected during biodegradation of 34DCA suggested a novel reaction involving dechlorination of 34DCA, while those detected during 4CA degradation led us to propose that two different biodegradation pathways of 4CA are existed in *A. baylyi* strain GFJ2. These results not only illustrated in-depth information of biodegradation mechanism of 34DCA and 4CA in *A. baylyi* strain GFJ2, but its effective biodegradability also demonstrates its potential application for bioaugmentation in the bioremediation treatment of contaminated site.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and cultivation medium

4-Chloroaniline (4CA), 2,3-dichloroaniline (23DCA), 2,4-dichloroaniline (24DCA), 3,4-dichloroaniline (34DCA), and 3,5-dichloroaniline (35DCA) (99% purity) (Chem Service, USA) were dissolved in high quality methanol (Fisher Scientific, USA) prior to use. Aniline (Merck, Germany), 2-chloroaniline (2CA) and 3-chloroaniline (3CA) (99% purity) (Chem Service, USA) were used as liquid. The chemicals for cultivation medium were analytical grade from Scharlau Microbiology, Spain. The minimal medium (MM) (pH 7.0) was prepared according to Vangnai and Petchkroh [6]. When supplemented with yeast extract (0.1%, w/v), the medium was designated as MMY. The media were solidified with 15 g L⁻¹ of agar for cell cultivation on a medium agar plate.

2.2. Isolation and identification of chloroaniline-degrading bacterium

Samples for bacterial isolation were collected from several sources including pristine soil, soil and surface water from agricultural areas with history use of herbicide and agricultural products exposed to herbicides and contaminated soil. The bacterial isolation was performed by plating soil suspension or liquid samples or placing a part of agricultural products directly on to an agar plate containing either MM or MMY containing 4CA or 34DCA or a combination of 4CA and 34DCA (0.2 mM each) and incubated in an incubator at 30 °C. Bacterial colonies formed on the plate were collected, repeatedly purified and then selected for further investigation. The CA-degrading bacteria was then identified by morphology, biochemical test and 16S rRNA sequence analysis according to Vangnai and Petchkroh [6]. Partial 16S rRNA gene sequence was aligned and compared with the sequences placed in Genbank using BLASTN.

2.3. Parameters affecting cell growth and 4CA biodegradation

The effects of nutrient component on bacterial growth and biodegradation of 4CA were examined. The isolate was grown in Luria–Bertani (LB) medium or MMY supplemented with one of the following carbon sources (1 g L⁻¹): glucose, glycerol; nitrogen source (1 mM): ammonium sulfate, sodium nitrate, urea; energy source (4 mM): succinate, citrate, pyruvate, each of which contained 4CA at 0.2 mM. Then, cells were incubated at 30 °C with shaking condition at 200 rpm. At the indicated time, cell turbidity was determined at 560 nm (DU800, Beckman Coulter, Inc., USA) and 4CA remained in the supernatant was determined using HPLC.

2.4. Biodegradation of aniline and halogenated anilines

All biodegradation experiments were carried out aerobically in 250-ml flasks at 30 °C with a constant shaking at 200 rpm. Each

substrate, i.e. MCA, DCA, BA, and FA, was provided at the initial concentration of 0.2 mM (unless otherwise stated) to a 100-ml medium containing 1% (v/v) cell inoculum. Cell samples were interval collected at the time indicated. Bacterial growth was determined by measuring cell optical density at 560 nm. Disappearance of the test substrate was taken as an indicator of substrate utilization. Abiotic control was also carried out to account for the substrate dissimilation caused by other physical factor, e.g. photo-degradation, if any.

2.5. Preparation of cell-free extract and enzyme assays

Cells (100 ml) were harvested by centrifugation for 20 min at 11,000 × g at 4 °C, washed twice and suspended with 5 ml of 50 mM Tris–HCl buffer pH 7.8. Cells were disrupted using a French pressure cell (Thermo Electron Corporation, USA) twice at 12,000 psi. Cell debris was removed by centrifugation at 11,000 × g for 20 min at 4 °C. The cell-free supernatant was used immediately after the preparation for the activity assays of catechol 1,2-dioxygenase (C120), chlorocatechol 1,2-dioxygenase (CC120), catechol 2,3-dioxygenase (C230) and chlorocatechol 2,3-dioxygenase (CC230) according to Vangnai and Petchkroh [6].

2.6. Analytical methods

The biodegradation of aniline, chloroaniline and the accumulation of intermediate(s) were analyzed by a reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a UV detector (240 nm). The separation was performed at 40 °C on C18 HPLC column (5 μm, 250 mm × 4.6 mm; Hyperclone, Phenomenex, USA) using acetonitrile: water mixture (70:30%, v) as the mobile phase at a flow rate of 1 ml min⁻¹. Qualitative and quantitative data were obtained by comparing the peak area of unknown peaks with those of the standard compounds with known concentration.

The GC/MS analysis of biodegradation intermediates were performed using a GC (Agilent 6890N, CA, USA) equipped with an inert mass selective detector (Agilent 5973, CA, USA). The analysis was carried out on a DB-5ms capillary column (0.25 mm × 30 m × 0.25 μm) with a splitless mode using nitrogen as carrier gas at a flow rate of 1.5 ml min⁻¹. The intermediates were identified on the basis of mass spectra and retention time using the mass spectral library PEST.L [7].

Chloride determination was carried out using an ion chromatography (LC25 chromatography, DIONEX, IL, USA) equipped with an electrochemical detector (ED50, DIONEX, IL, USA) and an Ion Pac AS19 column (4 mm × 250 mm) using KOH solution (28 mM) as an eluent with a flow rate of 1.2 ml min⁻¹ at 30 °C. The measurement was carried out with a 20-μl sample size and amount of chloride was quantitatively determined using a calibration curve of a chloride standard (NaCl in water, Merck, Darmstadt, Germany).

2.7. Biodegradation kinetic analysis

Kinetics studies were carried out using resting cell culture. Overnight grown cells in the minimal medium supplemented with succinate (4 mM), ammonium sulfate (1 mM) and yeast extract (0.1%, w/v) (MMSAY) (100 ml) were harvested, concentrated to the final optical density of approximately 2.0 before each test substrate was added to the indicated concentration to start the biodegradation experiment. The substrate degradation rates were then calculated from a plot of the substrate concentration versus time. A single substrate kinetic test was carried out with at least four different substrate concentrations. Then, the kinetic parameters, k_{max} and K_s^{app} values, of each substrate were derived by a linear regression fitting of data points according a non-growth Michaelis–Menten model developed by Schmidt et al. [8], i.e. $-dS/dt = k_0S/(K_s^{app} + S)$

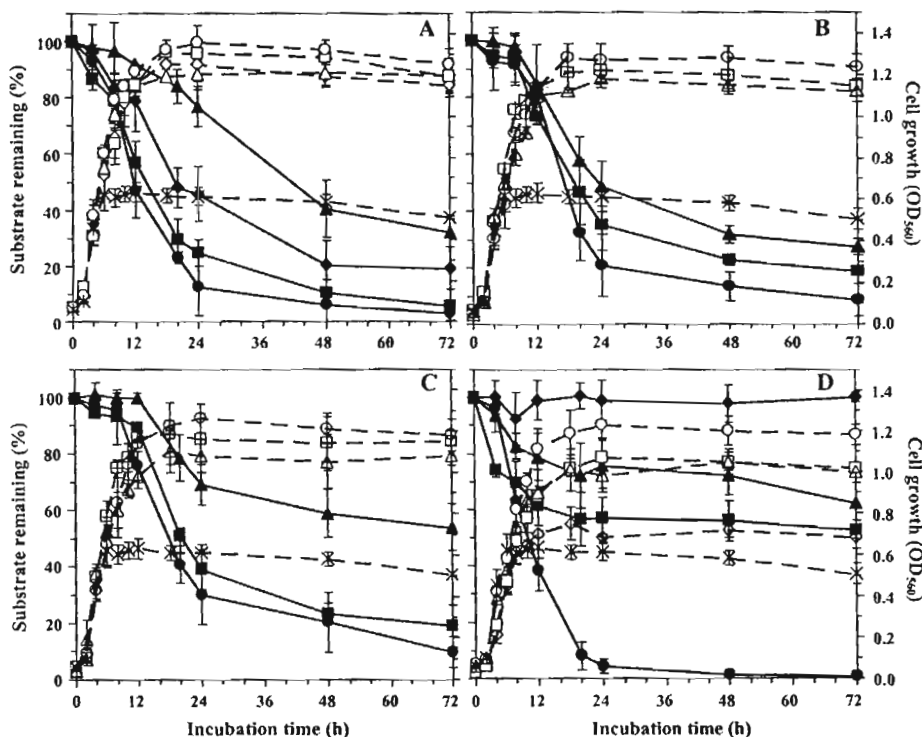


Fig. 1. Growth (opened symbol, dashed line) and biodegradation of aniline and halogenated aniline shown as the remaining substrate percentage (closed symbol, solid line) of *Acinetobacter baylyi* GFJ2. Cells were grown on the MMSAY medium supplemented with 0.2 mM of each substrate (symbol shown in order: growth, biodegradation). (A) Aniline and monochloroanilines: 2CA (Δ, Δ), 3CA (\square, \blacksquare), 4CA (\circ, \bullet), and aniline (\diamond, \blacklozenge). (B) Bromoanilines: 2BA (Δ, Δ), 3BA (\square, \blacksquare), 4BA (\circ, \bullet). (C) Fluoroanilines: 2FA (Δ, Δ), 3FA (\square, \blacksquare), 4FA (\circ, \bullet). (D) Dichloroanilines: 23DCA (\diamond, \blacklozenge), 24DCA (\square, \blacksquare), 34DCA (\circ, \bullet), and 35DCA (Δ, Δ). Cell growth on the MMSAY medium alone was shown as a control (*). Data are means of the results from at least four individual experiments. Error bars indicate standard errors.

under a condition in which $B_0 = B_{max}$, where B_0 is starting cell population density, B_{max} is maximum cell population density, and $k_0 = k_{max}B_0$. The inhibition kinetics study was carried out between a pair of substrate as indicated. The inhibition type and inhibition coefficients were derived according to a modified Cornish–Bowden relation [9]. Regression analysis was performed with the data analysis tool pack of Microsoft Excel[®] and the model equations were solved using GraphPad Prism 5 software (CA, USA).

3. Results and discussion

3.1. Isolation and characterization of strain GFJ2

Isolate GFJ2 was a gram negative, coccus-shaped bacterium. It was isolated from soil swapped from fruit peels and selectively isolated on a minimal medium agar containing 0.2 mM 4CA. Therefore, it was initially identified as a 4CA-degrading bacterium. Bacterial identification using a 16S rRNA sequence analysis revealed high similarities to the following strains: 97% similarity to rice-associated bacterium *A. baylyi* strain 3R22 (EF178435.1), 97% similarity to *A. baylyi* strain H8 (FJ009373), and 97% similarity to *A. soli* strain B1 (EU290155.1) (formerly *A. baylyi* strain B1) isolated from forest soil. Therefore, the bacterial isolate GFJ2 was designated as *A. baylyi* strain GFJ2. The partial 16S rDNA gene sequence analyzed using BLASTN program was submitted to the GenBank nucleotide sequence database (NCBI) with the accession number HQ611277.

Prior to further investigation, the influence of nutrients on growth and 4CA biodegradation was investigated. Because the yeast extract (0.1%, w/v) supplemented in the culture medium was strictly required to maintain growth and resulted in the 4CA

biodegradation rate of $0.075 \pm 0.002 \mu\text{mole h}^{-1} \text{mg cell protein}^{-1}$, the effects of other nutrient components were evaluated in a minimal medium supplemented with yeast extract (MMY). *A. baylyi* GFJ2 grew well in each nutrient tested, but the 4CA utilization rates were different to some extents. Supplementation with glucose and glycerol prolonged biodegradation lag period for 4 h and reduced the 4CA biodegradation rate by 22% and 35%, respectively. This result agreed with the previous report that showed that glucose causes an approximately 10-h growth-lag period and represses the aniline utilization of *P. multivoran* An1 by 77–99% [10]. Supplementation with ammonium sulfate as a nitrogen source increased the 4CA biodegradation of *A. baylyi* GFJ2 by 16% while the addition of sodium nitrate and urea decreased the degradation rate by 10% and 40%, respectively. The addition of succinate, citrate and pyruvate as an energy source increased the biodegradation of 4CA by 15%, 6%, and 5%, respectively. These results are in contrast with the report showing that, in *P. multivoran* An1, pyruvate and succinate strongly repress cell activity to utilize aniline [10]. Moreover, supplementation of the MMY medium with both ammonium sulfate and succinate significantly enhanced the 4CA biodegradation rate of *A. baylyi* GFJ2 by $25 \pm 2\%$.

Therefore, further investigations of the biodegradation of aniline and halogenated anilines were conducted using MMY supplemented with ammonium sulfate and succinate (MMSAY).

3.2. Biodegradation of aniline and halogenated anilines by *A. baylyi* GFJ2

The growth of *A. baylyi* GFJ2 was well supported by the MMSAY medium, and significantly enhanced when aniline or MCA was added (Fig. 1A). However, in the presence of the supplemented

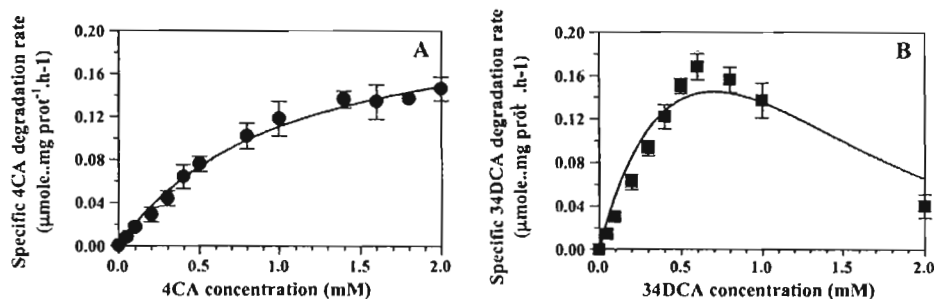


Fig. 2. Relationship between the specific biodegradation rate and the concentrations of 4-chloroaniline (●) and 3,4-dichloroaniline (■) (similar to *v* versus *S* curve) by *Acinetobacter baylyi* GFJ2. The data points were derived from substrate-depletion curve and fitted with Michaelis–Menten equation (A) and the modified Michaelis–Menten equation (i.e. Edwards model) (B) by the non-linear least-squares method.

nutrients, we could not conclude that *A. baylyi* GFJ2 utilized aniline or MCA as the sole sources of carbon and nitrogen for cell biomass production. Nevertheless, it was clearly shown that *A. baylyi* GFJ2 was capable of degrading them by the disappearance of the substrate and the liberation of chloride. *A. baylyi* GFJ2 degraded aniline and MCA at the following biodegradation rate ($\mu\text{mole h}^{-1} \text{mg cell protein}^{-1}$) and total biodegradations (expressed as % degradation): 4CA (0.087 ± 0.016 ; $97 \pm 3\%$) > 3CA (0.082 ± 0.014 ; $94 \pm 1\%$) > aniline (0.062 ± 0.002 ; $81 \pm 7\%$) > 2CA (0.022 ± 0.003 ; $68 \pm 5\%$) (Fig. 1A). After 24-h of the incubation, the stoichiometric liberation of chloride (i.e. $0.16 \pm 0.03 \text{ mM}$) confirmed the relatively complete biodegradation of 4CA. Interestingly, while most of the previously reported MCA-degrading bacteria particularly required aniline as either a co-metabolic substrate or as an inducer [6,11], neither aniline nor any other inducer was required for *A. baylyi* GFJ2.

To assess the biodegradability range of *A. baylyi* GFJ2 on other monohalogenated anilines, a series of bromoanilines (BA) (Fig. 1B) and fluoroanilines (FA) was evaluated (Fig. 1C). Upon cell exposure to each of the BA and FA isomers, a biodegradation lag phase of approximately 12 h and a subsequent reasonable biodegradation rate were observed for each compound. This result indicated that an acclimatization process, such as an induction or a de-repression of enzymes or an adaptation to the toxic chemical, occurred and allowed the bacteria to cope with the toxicity of BA and FA before further degradation [12]. *A. baylyi* GFJ2 degraded 3BA, 3FA, 4BA, and 4FA at rates and total biodegradations similar to those of 3CA and 4CA, while it was able to degrade 2BA and 2FA with 2.6 and 2.2 times higher rates than that of 2CA, respectively. However, the higher biodegradation rate of 2FA did not reflect the total biodegradation as it only reached $46 \pm 8\%$ biodegradation after 5 days of incubation (Fig. 1C).

Previous studies have stated that the microbial transformation of substituted aromatic compounds depends on the number and position of the substituted atom in the molecule. For instance, the chloroaniline utilization rate in *P. multivorans* An1 was decreased in the order of $3\text{CA} > 2\text{CA} > 4\text{CA}$ and was insignificant for 34DCA [13]. In contrast, 3CA and 4CA were the preferred substrates of *A. baylyi* GFJ2 and had a rate 4 times faster than that of 2CA. Aside from the substituent position, it has been suggested that the steric properties of substituted group likely control the biodegradation rate [14]. It has been demonstrated that a small substituent with a low value of van der Waals radius (such as hydrogen or fluorine) allows a faster aniline turnover, whereas a bulky substituent (such as chlorine, bromine, or iodine) precludes a rapid metabolism. However, such an effect was not apparent in *A. baylyi* GFJ2. These results show that *A. baylyi* GFJ2 has broad substrate specificity towards halogenated anilines, especially 4CA and 3CA.

Several microorganisms have been reported to have limited capabilities to degrade either MCA [6,15] or DCA [3,16]. However, to be useful for further applications in bioremediation, broad range biodegradability is a preferred cell characteristic. Interestingly, *A. baylyi* GFJ2 was able to completely degrade 34DCA at a relatively high rate ($0.116 \pm 0.010 \mu\text{mole h}^{-1} \text{mg cell protein}^{-1}$) and with a stoichiometric release of chloride ($0.19 \pm 0.03 \text{ mM}$). It moderately degraded 24DCA and 35DCA at rates that were 2.6 and 3.5 times slower and reached totals of $47 \pm 3\%$ and $38 \pm 9\%$, respectively, while it could not degrade 23DCA (Fig. 1D). The ability of *A. baylyi* GFJ2 to degrade 34DCA was observed even in the absence of any stimulating chemicals or co-substrate which is contrary to the reports stating that a specific inducer, such as propionanilide [17], aniline [16], or 4CA [18] is strictly required.

3.3. 4CA- and 34DCA biodegradation kinetics and intermediates

Whole-cell biodegradation kinetic was investigated to elucidate the biodegradation characteristics of *A. baylyi* GFJ2. It should be noted that these experiments were performed with whole cells, therefore it cannot be ruled out that the substrate transport limitations and other cell dynamic processes may influence the kinetic characteristics observed [19]. Two best-known kinetic models are Monod equation and Michaelis–Menten equation. Although their equations are somewhat similar, their intrinsic significances are different. The kinetics of substrate mineralization are theoretically expressed as the relationship between growth rate and substrate concentration, as described by Monod [20,21]. The biodegradation characteristic of the substrate is likely to follow a saturating kinetics described by a modified Michaelis–Menten relationship, where the initial substrate concentration (S_0) to biomass (X_0) ratio is of important concern [8]. Generally, the kinetics assay is initially conducted at high value of S_0/X_0 which allows several cell divisions as well as significant physiological and biochemical changes in the cells. However, in this study, the kinetics assays were performed using high density cells (resting cells) and no significant increase in cell numbers was observed during the test ($B_0 \cong B_{\text{max}}$, where B is cell population density) [8]. Under the conditions recommended for the batch biodegradation test, changes in both the biochemical reactions and the physiological states of cells were minimal [22]. Consequently, the kinetics observed under such conditions represent an immediate response that described the cell's biodegradation capability for the target substrate [22,23]. The biodegradation kinetic profile of 4CA by *A. baylyi* GFJ2 followed the saturating kinetics of a Michaelis–Menten-like relationship (Fig. 2A). In contrast, the 34DCA biodegradation rate was decreased at high substrate concentrations and the kinetic profile fitted with the Edwards model well (Fig. 2B), suggesting that a substrate inhibition was occurred [24]. The kinetic parameters derived by

Table 1
Apparent kinetic parameters of the biodegradation of chloroanilines and the related compounds by *Acinetobacter baylyi* GFJ2.

Substrate	Inhibitor	K_s^{APP} (mM)	k_{max} ($\mu\text{mole h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)	k_{max}/K_s^{APP} ($\times 10^{-3}$)	K_i^{APP} (mM)	K_i^{APP} (mM)	Inhibition type
34DCA	–	0.70 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.51 ± 0.02	0.73 ± 0.03^a	–	–
4CA	–	0.79 ± 0.12	0.17 ± 0.01	0.22 ± 0.02	–	–	–
Aniline	–	2.57 ± 0.10	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.01	–	–	–
4CC	–	0.33 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0.03	–	–	–
34DCA	4CA	–	–	–	0.105 ± 0.020	0.120 ± 0.015	Mixed
4CA	Aniline	–	–	–	0.64 ± 0.060	–	Competitive
4CA	4CC	–	–	–	–	0.115 ± 0.030	Uncompetitive

K_s^{APP} , the apparent half-saturation coefficient; k_{max} , the specific biodegradation rate; K_i^{APP} , the apparent inhibition coefficient, i.e. an equilibrium constant where an inhibitor (I) binds to a free enzyme (E) to form an enzyme–inhibitor complex (E–I) (competitive); K_i^{APP} , the apparent inhibition coefficient, i.e. an equilibrium constant where an inhibitor (I) binds to an enzyme–substrate complex (ES) to form an enzyme–substrate–inhibitor complex (ESI) (uncompetitive).

^a Substrate inhibitory effect.

a nonlinear least-squares method and linear regressions using a double-reciprocal plot were similar (Table 1 and Fig. 5A and B). *A. baylyi* GFJ2 exhibited K_s^{APP} for both 4CA and 34DCA within the similar range, but the k_{max} values were markedly different. Accordingly, the values of k_{max}/K_s^{APP} that represent substrate uptake competition in a single bacterial strain indicated that *A. baylyi* GFJ2 prefers to utilize 34DCA twice as much as 4CA (Table 1).

3.4. Detection of biodegradation intermediates and the proposed 4CA and 34DCA biodegradation pathways in *A. baylyi* GFJ2

During 34DCA biodegradation at a high concentration, HPLC analysis revealed a transient accumulation of the compound with a peak retention time similar to that of 4CA (3.51 min). A spiking method with a 4CA reference standard and GC–MS analysis with a comparison of the fragment ions with authentic chemical in the positive ion mode indicated that the 4CA at m/z 127 [MH^+] was indeed the intermediate of 34DCA biodegradation (Fig. 3A). 4CA formation was detected only under aerobic condition (data not shown) and strictly in the presence of cells. 4CA formation was not detected in the abiotic control, implying that 34DCA degradation in *A. baylyi* GFJ2 initially proceeds through an enzyme-catalyzed dehalogenation [25]. Microbial dehalogenation can occur through several reaction types, such as hydrolytic dehalogenation, dehydrohalogenation, and monooxygenation [25]. However, in this case, the transformation of 34DCA into 4CA suggested that a reductive dehalogenation under aerobic condition might be involved. Although aerobic bacteria do not typically conduct reductive dehalogenation reaction, such reactions are not unprecedented. For example, the reductive dehalogenation of tetrachlorohydroquinone occurs under aerobic condition

catalyzed by glutathione transferase in *Sphingobium chlorophenolicum* [26]. The mechanism and the enzyme involved in aerobic dehalogenation in *A. baylyi* GFJ2 have yet to be investigated. Nevertheless, the finding that 4CA is the intermediate in the 34DCA biodegradation pathway is novel and is in contrast with previous reports. The widely known 34DCA biodegradation pathway generally follows that of *P. putida* where 34DCA is transformed by a dioxygenase, forms 4,5-dichlorocatechol, and is subsequently mineralized [17]. Another pathway was reported in *P. fluorescens* 26-K, where 3,4-dichloroacetanilide (formed by acylation) and 3,3',4,4'-tetrachloroazoxybenzene (formed by polymerization) were detected as the intermediates [16].

Further investigation of 4CA biodegradation at a high concentration also revealed the transient accumulation of the corresponding intermediates. A spiking method with the reference standard compound and GC–MS analysis found that 4CA was converted into two intermediates, aniline (HPLC 3.16 min and m/z 93 [MH^+]) and 4CC (HPLC 2.96 min and m/z 172 [MH^+]) (Fig. 3B). The result suggests that two degradation pathways exist in *A. baylyi* GFJ2. The consistent detection of 4CC agrees with the previous reports stating that 4CA biodegradation is initially catalyzed through a dioxygenase that forms 4CC as the intermediate [1,15]. The intermediate then proceeds into a ring cleavage reaction through either *ortho*-cleavage or *meta*-cleavage. However, the discovery that aniline is one of the transient metabolites was intriguing because it implied that aniline is formed from the cleavage of the 4CA chlorine atom probably by an enzyme-catalyzed dechlorination. These data represent the first evidence that 4CA can potentially be metabolized through two distinct biodegradation pathways: the initial action of dioxygenation (presumably chloroaniline dioxygenase) that form 4CC and the dechlorination that form aniline. It should be noted that the detection of the intermediates was successful only when

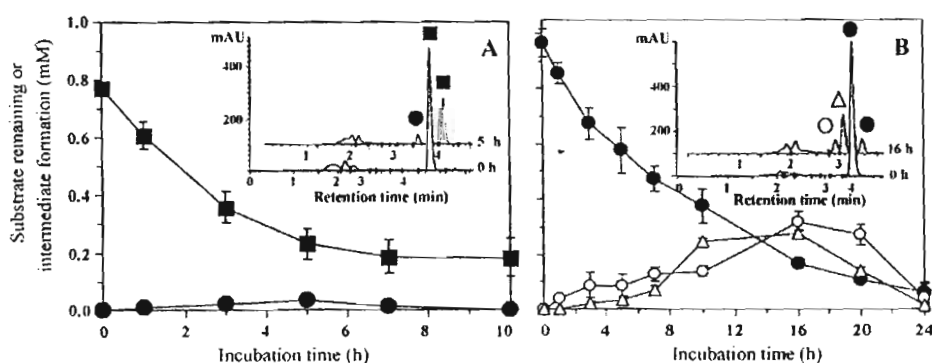


Fig. 3. The formation of the intermediates during the biodegradation of 34DCA (A) and 4CA (B) in *Acinetobacter baylyi* GFJ2. In (A), during 34DCA biodegradation (■), 4CA (●) of which the peak was at 3.51 min was formed. In (B), during 4CA biodegradation (●), the formation of 4CC (○) (2.96 min), and aniline (△) (3.16 min) were observed. The insets show the overlay of the corresponding HPLC peaks at the indicating incubation time. The inlet y-axis represents the HPLC signal intensity expressed by a milli-HPLC arbitrary unit (mAU). Data are means of the results from three individual experiments. Error bars indicate standard errors.

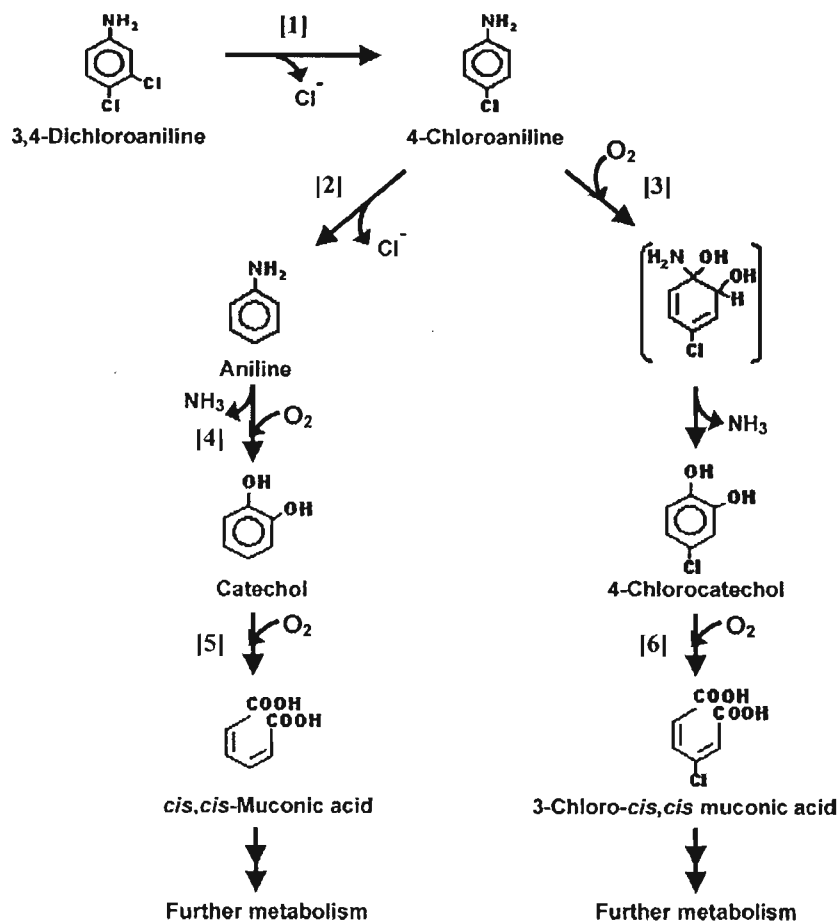


Fig. 4. The proposed biodegradation pathway for 3,4-dichloroaniline and 4-chloroaniline in *Acinetobacter baylyi* GFJ2. The reaction or enzyme activity are denoted as follows: [1], dechlorination; [2], dechlorination; [3], dioxxygenation tentatively by chloroaniline dioxygenase; [4], dioxxygenation tentatively by aniline dioxygenase; [5], catechol 1,2-dioxygenase; [6], chlorocatechol 1,2-dioxygenase.

the experiment was conducted with the resting cell suspension, and not cells under the growth conditions that rapidly metabolized the metabolic intermediates.

3.5. Characterization of the enzyme activities involved in 4CA- and 34DCA biodegradations

To confirm the existence of two distinct 4CA biodegradation pathways, the activities of aniline dioxygenase (Fig. 4, reaction [4]) and chloroaniline dioxygenase (Fig. 4, reaction [3]) were initially examined in a cell-free extract of *A. baylyi* GFJ2 pre-grown with 4CA. However, the determination of both enzyme activities was unsuccessful, probably due to the low stabilities of the enzymes in the cell-free extract. Therefore, the activities of the enzymes that potentially exist in the downstream degradation pathways, i.e. C12DO or C23DO (Fig. 4, reaction [5]), CC12DO or CC23DO (Fig. 4, reaction [6]), were examined in the cell-free extract. The determination of these enzyme activities was conducted not only to confirm the presence of two distinct pathways for 4CA biodegradation, but also to elucidate whether the degradation proceeded via *ortho*- or *meta*-cleavage pathway. The results (Table 2) clearly show that *A. baylyi* GFJ2 does not use a *meta*-cleavage pathway to degrade 4CA and 34DCA because C23DO and CC23DO activities were not detected. Low levels of C12DO and CC12DO activities were detected from non-induced cells, suggesting that both enzymes were partly constitutive. Nevertheless, the enzyme activities were substantially

induced when each specific substrate was provided. The activity of C12DO was noticeably enhanced when the cells were grown with either aniline or catechol indicating that aniline and catechol were utilized through an *ortho*-cleavage pathway. However, the activity of CC12DO was induced in the presence of a chlorinated aromatic compound (i.e. 4CC), indicating that a modified *ortho*-cleavage pathway was responsible for 4CC degradation. When the cells were grown with the chlorinated anilines (i.e. 34DCA or 4CA), significant activities of both C12DO and CC12DO were detected, which indicated that the *ortho*-cleavage and the modified *ortho*-cleavage pathways were induced in response to cell exposure to 34DCA and 4CA. These results consistently supported that 4CA was degraded through two distinct biodegradation pathways. Previous reports have shown that the degradation of chloroanilines typically occurs via a dioxxygenation and chloroaniline deamination, resulting in the most likely intermediate product, chlorocatechol [1,13,15]. However, this work is the first to report the possible existence of a second 4CA degradation pathway through aniline. The proposed biodegradation of 4CA in *A. baylyi* GFJ2 is depicted in Fig. 4.

3.6. The biodegradation kinetic and inhibition studies of 34DCA, 4CA and the corresponding intermediates

Because the detection of the transient accumulation of aniline and 4CC established them as intermediates in the 4CA biodegrada-

Table 2
Activities of enzymes involving 4CA and 34DCA biodegradation in cell-free extract of *Acinetobacter baylyi* GFJ2 grown under the condition indicated.

Culture medium and growth substrate ^a	Specific activity (nmole min ⁻¹ mg protein ⁻¹) ^b			
	C12DO ^c	CC12DO ^c	C23DO ^c	CC23DO ^c
MMSAY	84 ± 22	9 ± 3	0	0
MMSAY–aniline	437 ± 57	99 ± 24	0	0
MMSAY–catechol	295 ± 50	34 ± 5	0	0
MMSAY–4CC	72 ± 8	406 ± 58	0	0
MMSAY–4CA	306 ± 8	390 ± 21	0	0
MMSAY–34DCA	301 ± 8	272 ± 10	0	0
LB	5 ± 2	0	0	0
LB–aniline	3 ± 1	0	0	0
LB–catechol	5 ± 2	0	0	0
LB–4CC	7 ± 2	5 ± 1	0	0
LB–4CA	6 ± 3	3 ± 1	0	0
LB–34DCA	5 ± 2	3 ± 1	0	0

^a The culture medium was MMSAY with the supplementation of the indicated substrate at 0.2 mM.

^b Data were means of the results from four individual experiments and shown with SEs.

^c C12DO, catechol 1,2-dioxygenase; CC12DO, chlorocatechol 1,2-dioxygenase; C23DO, catechol 2,3-dioxygenase; CC23DO, chlorocatechol 2,3-dioxygenase.

tion pathway, their degradation kinetic parameters (K_s^{app} and k_{max}) were determined. The values of both parameters obtained from non-linear least-squares fitting of the Michaelis–Menten equation and the linear regression of the Lineweaver–Burk plot (data not shown) were in agreement, as shown in Table 1. *A. baylyi* GFJ2 utilized aniline and 4CC at significantly slower rates than 4CA (Table 1). This result explains their accumulation when the 4CA-depletion test was performed at relatively high concentrations (Fig. 3) and suggests that the transformations of aniline and 4CC are probably the limiting steps of 4CA biodegradation.

The biodegradation kinetic study is necessary to provide insights into the mechanism and dynamics of pollutant removal. It also to determine the biodegradation efficiency by providing predictive values for the *in situ* biotransformation mechanism and provide possible limitations for the biodegradation reactions (including substrate and product inhibitions) [27], especially when the intermediates, most of which are structurally related to the toxic

chemical of interest, are accumulated. In this case, the influence of 4CA in 34DCA biodegradation and the influences of aniline and 4CC on 4CA biodegradation were evaluated. Generally, the type of inhibition and an inhibition constant are determined using a Dixon plot, in which the reciprocal of the velocity, $1/v$, is plotted against the inhibitor concentration, $[I]$, at two or more substrate concentrations, $[S]$ [9]. However, this plot does not unambiguously distinguished between the competitive and mixed inhibitions [9,28]. Therefore, in this case, the plot of the substrate concentration over the specific reaction velocity, $[S]/v$, was plotted against the inhibitor concentration, $[I]$, to determine the inhibition type (Fig. 5A–C). This plot was subsequently used to determine the apparent dissociation constant of the enzyme–inhibitor (EI) complex (K_i^{app}) and the apparent dissociation constant of the enzyme–substrate–inhibitor (ESI) complex (K_i^{app}) in the mixed inhibition [9] (Fig. 5A and B), while the K_i^{app} of the competitive inhibition was deduced from the Dixon plot (Fig. 5D). This result

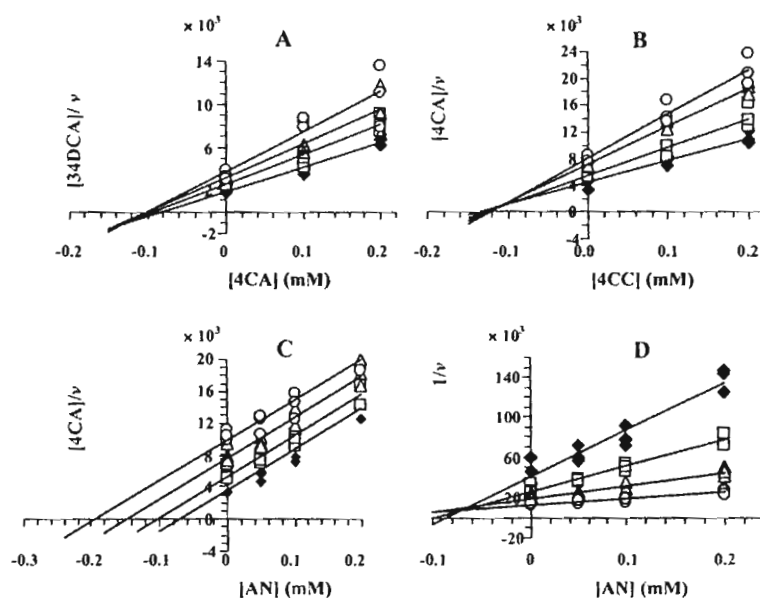


Fig. 5. Characteristic plots for 34DCA and 4CA inhibitions. The plot of the substrate concentration over the specific reaction velocity, $[S]/v$, versus the inhibitor concentration, $[I]$ was used to determine the inhibition type (A–C). The mixed inhibition pattern shown by the influence of 4CA on the degradation of various 34DCA concentrations (mM) (A): 0.05 (●), 0.1 (□), 0.3 (△), 0.5 (○). The uncompetitive inhibition pattern shown by influence of 4CC on the degradation of various 4CA concentrations (mM) (B): 0.1 (●), 0.2 (□), 0.3 (△), 0.5 (○). The competitive inhibition pattern shown by effect of aniline on the degradation of various 4CA concentrations (mM) (C): 0.1 (●), 0.2 (□), 0.4 (△), 0.8 (○). The Dixon plot (D) was used to determine the inhibition coefficient of the competitive inhibition between aniline and 4CA. Data are from at least four individual experiments.

showed that 4CA could act as a strong mixed-competitive inhibitor for 34DCA biodegradation and has the capacity to bind E and ES to form EI and ESI, respectively. This information is not only useful in terms of the understanding of chloroaniline biodegradation mechanism in *A. baylyi* GFJ2, but is also important in designing chloroaniline treatment system, where 4CA and 34DCA generally appear as co-contaminants. As for 4CA degradation in *A. baylyi* GFJ2, 4CC was shown to be an uncompetitive inhibitor (Fig. 5B) that can bind to ES to form an ESI complex. In contrast, aniline acted as a competitive inhibitor (Fig. 5C and D), indicating that it can competitively bind to the same active site of the enzyme responsible for 4CA degradation. Nevertheless, it is premature to conclude that 4CA and aniline are transformed by the same enzyme system. Although there have been several reports on genes involved in aniline biodegradation [29–31], no specific genes for chloroaniline biodegradation have yet been described. Our attempt to obtain genes involved in chloroaniline biodegradation in *A. baylyi* GFJ2 were carried out using probes of the consensus regions described in previous reports, but was unsuccessful. These genes, therefore, remain to be investigated.

4. Conclusions

The *A. baylyi* strain GFJ2 was isolated as a bacterium capable of the efficient biodegradation of 4CA and 34DCA, and broad-range biodegradation of other monohalogenated anilines, including chloro-, bromo-, and fluoro-anilines and DCAs. This work also presents novel, diverse biodegradation pathways for 4CA and 34DCA. While previous reports have demonstrated that 4CA and 34DCA are degraded using separated and unrelated routes, the biodegradation pathways in *A. baylyi* strain GFJ2 are more or less consecutively related. To our knowledge, this is the first report that dechlorination may be involved in 34DCA biodegradation, where 4CA is formed as the first intermediate. However, the mechanism and the enzyme involved in this reaction require further investigation. Furthermore, by detecting the intermediates and characterizing the enzymes involved, this is also the first report that the *A. baylyi* strain GFJ2 has two distinct pathways for 4CA metabolism that yield 4CC or aniline as the first intermediates in each route. The biodegradation results obtained from this study suggest the potential application of *A. baylyi* strain GFJ2 in bioremediation and waste treatment, and the kinetics data also provide insights into the mechanism and dynamics of pollutant removal and the possible limitations of the biodegradation reactions (including substrate and product inhibitions).

Acknowledgements

This work was financially supported by The National Research University Project of CHE and Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (FW 008 B) and the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK2555) under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture (PERFECTA).

References

- [1] H. Radianingtyas, G.K. Robinson, A.T. Bull, Characterization of a soil-derived bacterial consortium degrading 4-chloroaniline, *Microbiology* 149 (2003) 3279–3287.
- [2] European Chemicals Bureau, 3,4-Dichloroanilines, Summary Risk Assessment Report. Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, Italy, 2006.
- [3] V.M. Travkin, L.A. Golovleva, The degradation of 3,4-dichloroaniline by *Pseudomonas fluorescens* strain 26-K, *Microbiologiya* 72 (2003) 240–243.
- [4] E.G. Surovtseva, V.S. Ivoilov, Y.N. Karasevich, G.K. Vacileva, Chlorinated anilines, a source of carbon, nitrogen and energy for *Pseudomonas diminuta*, *Microbiologiya* 54 (1985) 948–952.
- [5] E.G. Surovtseva, G.K. Vacileva, B.P. Baskunov, A.L. Volnova, Decomposition of 3,4-dichloroaniline by an *Alcaligenes faecalis* culture, *Microbiologiya* 50 (1981) 740–743.
- [6] A.S. Vangnai, W. Petchkroh, Biodegradation of 4-chloroaniline by bacteria enriched from soil, *FEMS Microbiol. Lett.* 268 (2007) 209–216.
- [7] H.J. Stan, Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 347–377.
- [8] S.K. Schmidt, S. Simkins, M. Alexander, Models for the kinetics of biodegradation of organic compounds not supporting growth, *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (1985) 323–331.
- [9] A. Cortes, M. Cascante, M.L. Cardenas, A. Cornish-Bowden, Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data, *Biochem. J.* 357 (2001) 263–268.
- [10] V. Helm, H. Reber, Investigation of the regulation of aniline utilization in *Pseudomonas multivorans* strain An1, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 7 (1979) 191–199.
- [11] L.L. Zhang, D. He, J.M. Chen, Y. Liu, Biodegradation of 2-chloroaniline, 3-chloroaniline, and 4-chloroaniline by a novel strain *Delftia tsuruhatensis* HT, *J. Hazard. Mater.* 179 (2010) 875–882.
- [12] B.A. Wiggins, S.H. Jones, M. Alexander, Explanations for the acclimatization period preceding the mineralisation of organic chemicals in aquatic environment, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 791–796.
- [13] H. Reber, V. Helm, N.G.K. Karanth, Comparative studies on the metabolism of aniline and chloroanilines by *Pseudomonas multivorans* strain An1, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 7 (1979) 181–189.
- [14] A. Farrell, B. Quilty, Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of mono-chlorophenols and phenol, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28 (2002) 316–324.
- [15] J. Zeyer, A. Wasserfallen, K.N. Timmis, Microbial mineralization of ring-substituted anilines through an ortho-cleavage pathway, *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (1985) 447–453.
- [16] V.M. Travkin, I.P. Solyanikova, I.M. Rietjens, J. Vervoort, W.J. van Berkel, L.A. Golovleva, Degradation of 3,4-dichloro- and 3,4-difluoroaniline by *Pseudomonas fluorescens* 26-K, *J. Environ. Sci. Health B* 38 (2003) 121–132.
- [17] I.S. You, R. Bartha, Metabolism of 3,4-dichloroaniline by *Pseudomonas putida*, *J. Agric. Food Chem.* 30 (1982) 274–277.
- [18] J. Zeyer, P.C. Kearney, Microbial metabolism of propanil and 3,4-dichloroaniline, *Pestic. Biochem. Physiol.* 17 (1982) 224–231.
- [19] D.K. Button, Biochemical basis for whole-cell uptake kinetics: specific affinity, oligotrophic capacity, and the meaning of the Michaelis constant, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 2033–2038.
- [20] Y. Liu, Overview of some theoretical approaches for derivation of the Monod equation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73 (2007) 1241–1250.
- [21] Y. Liu, Y.M. Lin, S.F. Yang, A thermodynamic interpretation of the Monod equation, *Curr. Microbiol.* 46 (2003) 233–234.
- [22] P. Chudoba, B. Capdeville, J. Chudoba, Explanation of biological meaning of the S_0/X_0 ratio in batch cultivation, *Water Sci. Technol.* 26 (1992) 743–751.
- [23] W. Sokol, Oxidation of an inhibitory substrate by washed cells (oxidation of phenol by *Pseudomonas putida*), *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1987) 921–927.
- [24] S.C. Chen, K.H. Li, H.Y. Fang, Growth kinetics of EDTA biodegradation by *Burkholderia cepacia*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21 (2005) 11–16.
- [25] K.H. van Pee, S. Unversucht, Biological dehalogenation and halogenation reactions, *Chemosphere* 52 (2003) 299–312.
- [26] P.M. Kiefer Jr., D.L. McCarthy, S.D. Copley, The reaction catalyzed by tetrachlorohydroquinone dehalogenase does not involve nucleophilic aromatic substitution, *Biochemistry* 41 (2002) 1308–1314.
- [27] A. Monero, L. Lanza, M. Zilli, L. Sene, A. Converti, Batch kinetics of *Pseudomonas* sp. growth on benzene. Modeling of product and substrate inhibitions, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 676–679.
- [28] M. Schlamowitz, A. Shaw, W.T. Jackson, Limitations of the Dixon plot for ascertaining nature of enzyme inhibition, *Tex. Rep. Biol. Med.* 27 (1969) 483–488.
- [29] E.L. Ang, J.P. Obbard, H. Zhao, Directed evolution of aniline dioxygenase for enhanced bioremediation of aromatic amines, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81 (2009) 1063–1070.
- [30] L. Geng, M. Chen, Q. Liang, W. Liu, W. Zhang, S. Ping, W. Lu, Y. Yan, W. Wang, M. Takeo, M. Lin, Functional analysis of a putative regulatory gene, *tadR*, involved in aniline degradation in *Delftia tsuruhatensis* AD9, *Arch. Microbiol.* 191 (2009) 603–614.
- [31] Q. Liang, M. Takeo, M. Chen, W. Zhang, Y. Xu, M. Lin, Chromosome-encoded gene cluster for the metabolic pathway that converts aniline to TCA-cycle intermediates in *Delftia tsuruhatensis* AD9, *Microbiology* 151 (2005) 3435–3446.

ภาคผนวก 2

Prasertsup, P., Ariyakanon, N. 2011. International Journal of Phytoremediation, 13 (4): 383-395. Impact factor 1.321

This article was downloaded by: [2007 - 2008-2009 Chulalongkorn University]

On: 3 May 2011

Access details: Access Details: [subscription number 780894003]

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



International Journal of Phytoremediation

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713610150>

Removal of Chlorpyrifos by Water Lettuce (*Pistia stratiotes* L.) and Duckweed (*Lemna minor* L.)

Pichamon Prasertsup^a; Naiyanan Ariyakanon^b

^a Interdepartment of Environmental Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand ^b

Department of General Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Accepted uncorrected manuscript posted online: 17 November 2010

First published on: 19 February 2011

To cite this Article Prasertsup, Pichamon and Ariyakanon, Naiyanan(2011) 'Removal of Chlorpyrifos by Water Lettuce (*Pistia stratiotes* L.) and Duckweed (*Lemna minor* L.)', International Journal of Phytoremediation, 13: 4, 383 – 395, First published on: 19 February 2011 (iFirst)

To link to this Article: DOI: 10.1080/15226514.2010.495145

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2010.495145>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

REMOVAL OF CHLORPYRIFOS BY WATER LETTUCE (*PISTIA STRATIOTES* L.) AND DUCKWEED (*LEMNA MINOR* L.)

Pichamon Prasertsup¹ and Naiyanan Ariyakanon²

¹Interdepartment of Environmental Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Department of General Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

The potential of water lettuce (Pistia stratiotes L.) and duckweed (Lemna minor L.) to remove chlorpyrifos in water was investigated under laboratory greenhouse conditions. At initial chlorpyrifos concentrations of 0.0, 0.1 and 0.5 mg/L, the relative growth rates (RGR) of L. minor and P. stratiotes were not significantly different. In contrast, in the presence of 1 mg/L chlorpyrifos the RGR was significantly inhibited, giving an observed fresh weight based RGR_{FW} for P. stratiotes and L. minor from day 0 to 7 of -0.036 and -0.023 mg/g/day, respectively. The maximum removal of chlorpyrifos by P. stratiotes and L. minor, when chlorpyrifos was at an initial culture concentration of 0.5 mg/L, was 82% and 87%, respectively, with disappearance rate constants under these conditions of 2.94, 10.21 and 12.14 $\mu\text{g h}^{-1}$ for the control (no plants), and with P. stratiotes and L. minor, respectively, giving actual corrected plant removal rate constants of 7.27 and 9.20 $\mu\text{g h}^{-1}$ for P. stratiotes and L. minor, respectively. The bioconcentration factor (BCF) of L. minor was significantly greater than that for P. stratiotes and therefore, at least under these greenhouse-based conditions, L. minor was more efficient than P. stratiotes for the accelerated removal of chlorpyrifos from water.

KEY WORDS: chlorpyrifos, water lettuce, duckweed, phytoremediation

INTRODUCTION

Pesticides have been widely and increasingly used to control insect pests, plant pathogens, and weeds over the past 50 years. Some of these pesticides will eventually reach the soil following field application, even when sprayed on the foliage of crop plants and weeds. Most of them have an adverse effect on the environment and ecology, such as the soil and water, which poses a serious threat to the sustainability of the environment (Kennedy and Gewin, 1997; Johnsen *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002). In 2007, it was reported that chlorpyrifos was the most imported insecticide in Thailand, with an estimated application of 1,535,694 kg/year at a cost of \$7,092,820 (Agricultural Toxic Substances Research Group, 2007). The concentration of chlorpyrifos in water and soil in the central agricultural areas of Thailand was in the range of 0.01–1.31 mg/kg and 0.01–0.81 mg/kg,

Address correspondence to Naiyanan Ariyakanon, Department of General Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. E-mail: anaiyanan@yahoo.com

respectively (Arunwarakorn *et al.*, 2007), which is clearly above the standard limit of no detectable (using Gas Chromatography) chlorpyrifos in the discharge water from industrial plants (Pollution Control Department, 1996).

Chlorpyrifos (*O, O*-diethyl *O*-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothionate) is a broad-spectrum organophosphate insecticide, nematocide and acaricide, and is widely used to control insect pests on grain, cotton, fruit, nuts and vegetable crops, as well as lawns and ornamental plants. It has been suggested that the ability of chlorpyrifos to accumulate in living tissues may create a potential risk to humans and other organisms (Serrano *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2005). There are several reports indicating that chlorpyrifos bioaccumulates in blue-green algae (Lal *et al.*, 1987), aquatic plants and goldfish (Spacie and Hamelink, 1985). Laboratory studies on the fate of chlorpyrifos in pure water indicate that hydrolysis and photolysis occur at moderate rates under neutral conditions with half-lives of about a month at a neutral pH and 25°C. Under more alkaline conditions, hydrolysis proceeds more rapidly, with half-lives of around two weeks at pH 9 (DowAgroSciences, 2008). The major degradation pathway of chlorpyrifos begins with cleavage of the phosphorus ester bond to yield 3,5,6-trichloro-2-pyridinal (TCP). In soil and water, TCP is degraded by microbial activity and photolysis to carbon dioxide and organic matter. In plants, TCP conjugates are sequestered (Racke, 1993).

Phytoremediation is proposed to be a cost-effective alternative for the treatment of contaminated soil and water. It is a green technology, environmentally friendly and aesthetically pleasing to the public (Ensley, 2000). Phytodegradation, a kind of phytoremediation, is the breakdown of contaminants taken up by plants through metabolic processes within the plant, or the breakdown of contaminants external to the plant through the effect of compounds produced by the plants. Such organic chemicals, including chlorinated solvents and pesticides, are taken up and accumulated by plants (EPA, 1998).

There have been several studies focused on the phytoremediation of pesticides. Burken and Schnoor (1997) reported that hybrid poplar trees (*Populus* sp.) can take up, hydrolyze, and dealkylate atrazine to less toxic metabolites. The removal of azinphos methyl by alfalfa (*Medicago sativa* L., var. *Romagnola*) in hydroponic cultures was such that after 20 days of culture, the initial amount of azinphos methyl was reduced to non-detectable levels in the presence of plants (Flocco *et al.*, 2004).

Some aquatic plants have a high capability to accumulate pesticides by different mechanisms, such as direct root uptake, detoxification by phytotransformation and conjugation with glutathione or sugars and subsequent storage of nonphytotoxic metabolites in plant tissues (Schwitzguébel *et al.*, 2006). The water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) (Xia and Ma, 2006), *Juncus effusus*, *Ludwigia peploides* (Bouldin *et al.*, 2006), *L. minor*, *Spirodela polyrhiza*, *Elodea canadensis* and *Cabomba aquatica* all have been reported to have a sufficiently efficient uptake capacity as to be able to remove pesticides (Olette *et al.*, 2008, 2009). However, only limited information is available on the removal of chlorpyrifos by aquatic plants.

P. stratiotes are perennial aquatic weeds that are considered noxious and extremely invasive for freshwater environments. It is well known to accumulate a wide range of heavy metals and to potentially tolerate high metal concentrations and so it has been used for the treatment of urban sewage (Zimmels *et al.*, 2006). Duckweeds (*Lemna* sp.) are ubiquitous floating freshwater monocotyledons. Their rapid vegetative reproductive cycle, with a doubling time of 1–4 days or less, and their ease to culture under laboratory conditions are important features that make duckweed species relevant models for comparative

ecotoxicological studies (Kanon-Boule *et al.*, 2009). However, the ability of *P. stratiotes* and *L. minor* to absorb chlorpyrifos from water has yet to be reported.

In this research, *P. stratiotes* and *L. minor* were evaluated and compared for their ability to remove chlorpyrifos from water, as was the removal efficiency of chlorpyrifos into the tissues of these two plant species. The agronomical behavior was evaluated by means of fresh weight, dry weight and growth rate determinations to evaluate the potential reliability of the species for the phytoremediation of chlorpyrifos contaminated water.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Plants

Two aquatic plants, water lettuce (*P. stratiotes* L.) and duckweed (*L. minor* L.), were selected to assess their removal capacities of chlorpyrifos from water. The experimental plants were collected from the ponds at Kasetsart University, Bangkok, Thailand, and taken in 46 × 70 cm polyethylene bags to the laboratory. The plants were disinfected by immersion in 0.01% (v/v) Clorox for two minutes and then rinsed with distilled water for five minutes before being thoroughly cleaned under gentle running water. The plants of the two species were then carefully selected, isolated and reproduced under the assay conditions to ensure their adaptation. For this purpose, cultures of *P. stratiotes* and *L. minor* were maintained in 60 × 75 × 25 cm PVC aquaria containing Hoagland's No. 2 nutrient solution (see below) for two weeks. After this adaptation period, the plants were again selected for the assay, according to the criteria of the number and size of the leaves, and taken to the experimental vessels. All vessels were put on shelves equipped with supplementary lighting (4600 lx; 12 h photoperiod; 27 ± 1°C).

Experimental Design

The experimental design used an incomplete randomized block design with five treatments and three replications: three control groups and two experimental groups. The treatments are described as follows:

- T1 *P. stratiotes*
- T2 *L. minor*
- T3 No plants + chlorpyrifos (0.1, 0.5 and 1.0 mg/L)
- T4 *P. stratiotes* + chlorpyrifos (0.1, 0.5 and 1.0 mg/L)
- T5 *L. minor* + chlorpyrifos (0.1, 0.5 and 1.0 mg/L)

The experimental units were identical glass vessels of 2.5 L capacity, a surface area of 314.3 cm² and a depth of 14 cm.

Preparation of Nutrient Solution and Chlorpyrifos

The vessels were placed in a greenhouse. To each vessel was added Hoagland's No. 2 nutrient solution (Sigma, USA) (Hoagland and Arnon, 1938). The total volume of the solution (1.5 L) in each container was kept constant by adding Hoagland's No. 2 nutrient solution to compensate for water lost through plant transpiration and evaporation during

the whole experiment. The rate of water loss was less than 2–3 mL per day and so the maximum increase in salts and osmotic potential this induced was <1.2% (it does not dilute the chlorpyrifos concentration).

The chlorpyrifos (DowElanco, USA) levels in the water of experimental groups, as well as in the control group of water with chlorpyrifos without plants, were set at 0.1, 0.5, and 1 mg/L, and the initial seeding plant biomass for both species was approximately 5 g of fresh weight.

Water Sampling and Extraction of Chlorpyrifos in Water

Certain physicochemical parameters of the nutrient solution, that is the pH, temperature, conductivity, dissolved oxygen (DO), total suspended solids (TSS) and total dissolved solids (TDS), were measured every day during the whole experiment. Samples (1 L) were taken from the vessels on days 0–7 for the analysis of chlorpyrifos levels.

The water samples were extracted at a neutral pH with methylene chloride using a continuous liquid-liquid extractor (EPA Method 3520). Chlorpyrifos in the concentrated extract of water sample was detected directly, as detailed below.

Plant Sampling and Extraction of Chlorpyrifos in Plants

The plant samples were collected as whole plants from each vessel on days 0–7 after incubation. For each tank, all the plants were collected on the one date, with different tanks being harvested for different dates. Plants were carefully washed using tap water and then distilled water to remove any residual chemicals on the surface of the plant, briefly drained on a sieve, dabbed dry and then the whole plant was weighed (wet weight). The plant samples were then dried to a constant mass in an oven at 65°C for 48 hours, weighed (dry weight) and then crushed and extracted for evaluation of the chlorpyrifos levels.

The plant material was extracted following the soxhlet extraction (EPA method 3540). The eluents were transferred into autosampler vials and the chlorpyrifos concentrations were determined.

Chlorpyrifos Determination

The determination of chlorpyrifos was carried out using a gas chromatograph with an Electron Capture Detector (Model GC-2010, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), using an authentic external standard. The GC was operated with a 1:1 split injection and a purge time of 0.7 minutes. The column was a 30 m × 0.25 mm i.d. fused-silica capillary coated with a DB-5 stationary phase (film thickness of 0.25 μm). Injector and detector temperatures were 250°C and 310°C, respectively. Carrier and makeup gases were nitrogen (1.5 and 60 mL/min, respectively). The average recoveries of chlorpyrifos (n = 5) at 1 mg/L in nutrient solution and plant extract were 97 ± 3% and 98 ± 2%, respectively. The detection limit of chlorpyrifos was approximately 0.01 mg/L in culture solution and 0.05 mg/kg in plants. For standards, chlorpyrifos at a concentration of 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, and 1.0 mg/L were prepared and analyzed using GC-ECD. The calibration curve plotted from this data showed a linear curve with a high correlation coefficient ($R^2 = 0.9809$). Under these conditions, chlorpyrifos was found to elute at 7 minutes.

Data and Statistical Analysis

The relative growth rates (RGR) were calculated according to McGregor *et al.* (2008) from the wet and dry biomass measurements of the control plants as follows:

$$\text{RGR} = [\ln(W_2) - \ln(W_1)]/t_2 - t_1, \quad (1)$$

where W_1 and W_2 are plant weights at time t_1 and t_2 .

The disappearance curves of chlorpyrifos in aqueous solution for each treatment, were found to follow first-order rate kinetics, as evaluated by:

$$C_t = C_0 e^{-kt}, \quad (2)$$

where C_t and C_0 denote the chlorpyrifos concentration (mg/L) at any time t (h) and initial time, and k is the disappearance rate constant (h^{-1}) of chlorpyrifos in the culture solution.

The chlorpyrifos disappearance curves were plotted, and the disappearance rate constants were derived from these, by Microsoft Excel.

The chlorpyrifos removal efficiency was measured as the ratio of the total amount of chlorpyrifos remaining at the assay point to the initial starting amount, and is reported as a%. The bioconcentration factor (BCF), defined as the ratio of the concentration of the chemical in the whole organism to that in the water, was evaluated as reported (Serrano *et al.*, 1997).

All statistical analysis was performed using the SPSS Statistics version 17.0 for windows (SPSS Inc., USA). Significant differences between controls and contaminated samples, including the relative growth rates, disappearance rate constant, percentage removal and the BCF, were determined by the Turkey test and P values <0.05 were accepted as significant.

RESULTS

Water Chemistry

The average physiochemical composition of the culture solutions used for the experiments including temperature, pH, dissolved oxygen and total suspended solid, showed no significant differences within each treatment over all seven days of the experiment (Table 1). The temperature of the culture solutions for all the treatments was within the range 27.1–27.5°C, and did not significantly differ during the seven day exposure period. The pH of water was not significantly different from day zero to day seven within and between all treatments, remaining within the range of 6.17–6.35. Likewise, the dissolved oxygen (range 5.39–5.65 mg/L) and the total suspended solid (TSS; range 19.3–19.7) were not significantly different between days within and between all treatments. Since these factors can change dry and wet weight growth of plants as well as the ability to uptake and metabolize many chemicals, their relative stability between treatments observed here makes for a more confident interpretation of the variances being more likely to be due to direct changes in the chlorpyrifos concentration and or bioremedial plant species used. However, the conductivity of the water (range 1613–1960 $\mu\text{S}/\text{cm}$) and total dissolved solid (TDS; range 803–984 mg/L) were significantly different between days within and between all treatments, but with no clear trend with respect to the initial chlorpyrifos concentration.

Table 1 Average physiochemical composition of each culture solution used for the experiment

Treatment	Temperature (°C) ns	pH ns	Conductivity (μs/cm)	DO (mg/L) ns	TSS (mg/L) ns	TDS (mg/L)
<i>P. stratiotes</i>	27.4 ± 0.7	6.22 ± 0.21	1807 ± 67 ^a	5.51 ± 0.57	19.7 ± 0.56	904 ± 35 ^m
<i>L. minor</i>	27.2 ± 0.6	6.17 ± 0.18	1613 ± 91 ^b	5.64 ± 1.34	19.5 ± 0.85	803 ± 58 ⁿ
Chlorpyrifos 0.1 mg/L	27.2 ± 0.7	6.32 ± 0.17	1911 ± 97 ^c	5.42 ± 0.49	19.4 ± 1.02	958 ± 77 ^o
Chlorpyrifos 0.5 mg/L	27.2 ± 0.8	6.31 ± 0.15	1960 ± 86 ^d	5.40 ± 0.27	19.6 ± 0.81	984 ± 63 ^p
Chlorpyrifos 1 mg/L	27.1 ± 0.8	6.29 ± 0.09	1881 ± 96 ^e	5.48 ± 0.27	19.7 ± 0.69	942 ± 86 ^f
<i>P. stratiotes</i> + chlorpyrifos 0.1 mg/L	27.5 ± 0.8	6.16 ± 0.13	1764 ± 89 ^f	5.47 ± 0.53	19.4 ± 0.72	881 ± 72 ^s
<i>P. stratiotes</i> + chlorpyrifos 0.5 mg/L	27.4 ± 0.8	6.35 ± 0.21	1772 ± 72 ^s	5.39 ± 1.00	19.3 ± 0.67	885 ± 58 ^t
<i>P. stratiotes</i> + chlorpyrifos 1 mg/L	27.5 ± 0.9	6.25 ± 0.19	1821 ± 44 ^h	5.50 ± 0.78	19.5 ± 1.10	911 ± 23 ^u
<i>L. minor</i> + chlorpyrifos 0.1 mg/L	27.3 ± 0.7	6.21 ± 0.13	1630 ± 60 ⁱ	5.62 ± 1.42	19.7 ± 0.78	812 ± 53 ^w
<i>L. minor</i> + chlorpyrifos 0.5 mg/L	27.2 ± 0.6	6.24 ± 0.19	1728 ± 43 ^j	5.65 ± 1.02	19.5 ± 1.20	864 ± 48 ^x
<i>L. minor</i> + chlorpyrifos 1 mg/L	27.4 ± 0.8	6.22 ± 0.15	1674 ± 54 ^k	5.64 ± 1.31	19.6 ± 0.93	835 ± 80 ^y

Data are shown as the mean ± 1 S.D. and are derived from three repeats. Means within a column with different lower case superscript letters are significantly different ($P < 0.05$), whereas ns represents that all means within that column are not significantly different.

Effect of Chlorpyrifos on the Biomass and Relative Growth Rates of *P. stratiotes* and *L. minor*

The RGR of *P. stratiotes* and *L. minor*, both with and without chlorpyrifos, were compared from days 0 to 7. In the culture solution without chlorpyrifos, the biomass of *P. stratiotes* and *L. minor* increased from day zero to day seven (Figure 1) with an average relative growth rate (RGR_{FW}) over this time period of 0.101 and 0.118 mg/g/day, respectively (Table 2), although growth was not linear (Table 2). The biomass of *P. stratiotes* and *L. minor* grown in the presence of an initial chlorpyrifos level of 0.1 and 0.5 mg/L also increased over the seven day period and numerically was less marked than that seen without chlorpyrifos, revealing an apparent chlorpyrifos dose-dependent reduction in the increase in biomass and RGR. However, these numerical differences in the RGR for both wet weight (RGR_{FW}) and dry weight (RGR_{DW}) were not statistically significant. This indicates that both species are tolerant, to at least some extent, to chlorpyrifos at these low concentrations. However, in contrast, in the presence of chlorpyrifos at 1.0 mg/L, the biomass of *P. stratiotes* and *L. minor* decreased from days 0–7 (Figure 1), and yielded a net negative and significantly reduced RGR_{FW} for *P. stratiotes* and *L. minor* of -0.036 and -0.023 mg/g/day, respectively, over the seven-day period (Table 2). Thus, chlorpyrifos at 1 mg/L was toxic for both plant species. Indeed, at 1.5 mg/L both plants showed extreme adverse effects within 96 hours (data not shown).

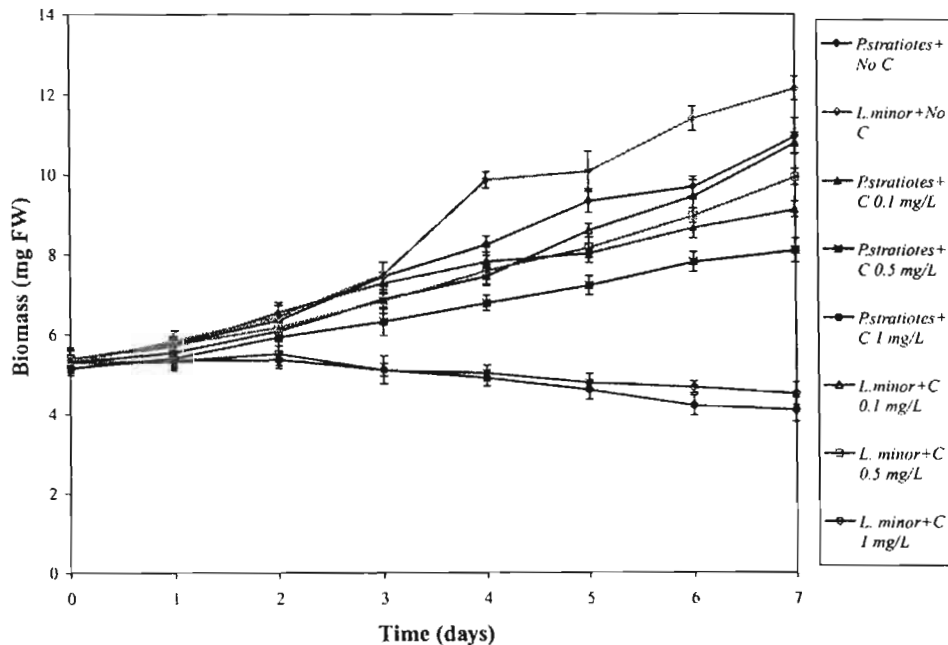


Figure 1 The biomass (fresh weight) of *P. stratiotes* and *L. minor* grown in Hoagland's No. 2 solution with and without chlorpyrifos (0.1, 0.5, and 1 mg/L). Data are shown as the mean \pm S.D. and are derived from three repeats.

Table 2 Relative growth rates (RGR) of *P. stratiotes* and *L. minor* grown in Hoagland's No. 2 solution with the indicated amounts of chlorpyrifos

Plant	Chlorpyrifos (mg/L)	RGR _{FW} (mg/g/day)	RGR _{DW} (mg/g/day)
<i>P. stratiotes</i>	0.0	0.101 ± 0.081 ^a	0.085 ± 0.012 ^a
<i>P. stratiotes</i>	0.1	0.075 ± 0.048 ^a	0.070 ± 0.024 ^a
<i>P. stratiotes</i>	0.5	0.064 ± 0.032 ^a	0.063 ± 0.039 ^a
<i>P. stratiotes</i>	1	-0.036 ± 0.015 ^b	-0.046 ± 0.022 ^b
<i>L. minor</i>	0.0	0.118 ± 0.057 ^a	0.105 ± 0.018 ^a
<i>L. minor</i>	0.1	0.101 ± 0.073 ^a	0.086 ± 0.019 ^a
<i>L. minor</i>	0.5	0.088 ± 0.029 ^a	0.090 ± 0.043 ^a
<i>L. minor</i>	1	-0.023 ± 0.007 ^b	-0.029 ± 0.011 ^b

FW and DW represent fresh and dry weight, respectively. Data are shown as the mean ± 1 S.D. and are derived from three repeats. Means within a column with different lower case superscript letters (^a, ^b) are significantly different ($P < 0.05$).

Effect of *P. stratiotes* and *L. minor* on the Removal of Chlorpyrifos from Culture Solution

The disappearance curves of chlorpyrifos in aqueous solution for each treatment (Figure 2), were found to follow first-order rate kinetics (analysis not shown).

From this data and using the first-rate order equation (2), the disappearance rate constants of chlorpyrifos in culture solutions under various treatments were calculated, and are listed in Table 3. The disappearance rate constant of chlorpyrifos in solution alone at 0.1,

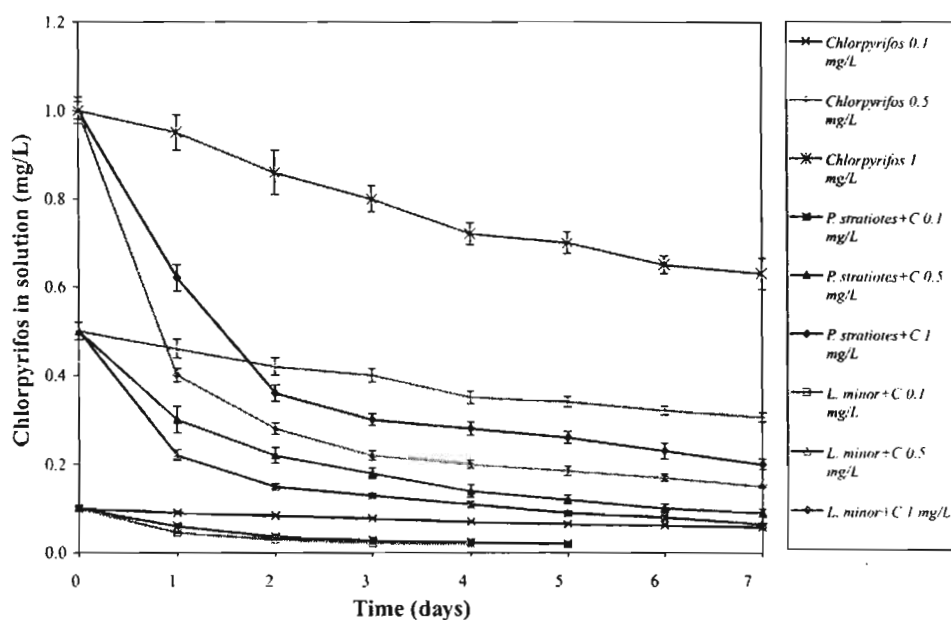


Figure 2 Disappearance of chlorpyrifos in Hoagland's No. 2 solution with and without the indicated bioremedial plants. Data are shown as the mean ± S.D. and are derived from three repeats. Chlorpyrifos, at the initial concentration of 0.1 mg/L, was not detectable from day 4 and 5 onwards after culture with *L. minor* and *P. stratiotes*, respectively.

Table 3 Disappearance rate constants and total removal level (% of initial amount) of chlorpyrifos in Hoagland's No. 2 solution with or without the bioremedial plants, *P. stratiotes* and *L. minor*

Plant	Chlorpyrifos (mg/L)	Disappearance rate constant ($\mu\text{g h}^{-1}$)	Removal (% of original amount)
Unplanted	0.1	3.24 ± 0.09^a	42 ± 0.7^i
Unplanted	0.5	2.94 ± 0.11^b	39 ± 0.5^j
Unplanted	1	2.75 ± 0.15^b	37 ± 1.1^j
<i>P. stratiotes</i>	0.1	*ND(13.41 ± 0.75^c)	*ND(80 ± 1.3^k)
<i>P. stratiotes</i>	0.5	10.21 ± 0.56^d	82 ± 1.7^k
<i>P. stratiotes</i>	1	9.58 ± 0.82^e	80 ± 1.8^k
<i>L. minor</i>	0.1	**ND(19.76 ± 1.2^f)	**ND(85 ± 2.3^m)
<i>L. minor</i>	0.5	12.14 ± 0.91^g	87 ± 2.1^m
<i>L. minor</i>	1	11.29 ± 0.83^h	85 ± 1.6^m

Data are shown as the mean \pm 1 S.D. and are derived from three repeats. Means with different lower case superscript letters (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, m) are significantly different ($P < 0.05$). *ND. Chlorpyrifos was not detectable from days 5–7 so the disappearance rate constant was calculated from days 0–4. **ND. Chlorpyrifos was not detectable from days 4–7 so the disappearance rate constant was calculated from days 0–3.

0.5 and 1.0 mg/L decreased numerically with increasing chlorpyrifos concentrations in the plant-free solution, but this was not statistically significant at chlorpyrifos levels of 0.5 and 1 mg/L. A comparison of these rate constants for *L. minor* and *P. stratiotes*, at a chlorpyrifos level of 0.5 mg/L, showed that the disappearance rate constant of chlorpyrifos was increased about 4.1- and 3.5-fold, respectively, compared to the control. The disappearance rate constant of chlorpyrifos of *L. minor* was statistically significantly greater than that for *P. stratiotes* ($P < 0.05$) at initial chlorpyrifos levels of 0.5 and 1 mg/L.

Interestingly, the chlorpyrifos removal efficiency in the control (unplanted) solutions at a concentration of 0.1 mg/L was significantly greater than at the concentration of 0.5 and 1.0 mg/L (Table 3). It is unclear if this represents a real process, such as the adherence of chlorpyrifos to the culture flasks (which would deplete a higher percentage of low concentration than high concentration solutions), or a concentration dependent degradation process, or that it simply reflects a stochastic artifact of sampling and measurement errors. Nevertheless, if we assume this reflects intrasample experimental variances, it is of note that these are minor compared to the considerably larger differences between with and without plant cultivation, and thus plant mediated effects upon chlorpyrifos reduction is likely to still be valid for both species tested. The percentage removal of chlorpyrifos in the culture solution for *L. minor* was greater than *P. stratiotes* in solutions seeded at an initial chlorpyrifos concentration of 0.5 or 1.0 mg/L, with a maximum removal of chlorpyrifos for *L. minor* and *P. stratiotes* of 87% and 82% after seven days of incubation, respectively, being observed in solutions seeded at an initial chlorpyrifos concentration of 0.5 mg/L (Table 3). The results indicated that whilst both plants were effective at removing chlorpyrifos, *L. minor* was slightly more efficient than *P. stratiotes*.

Bioconcentration Factor (BCF) of *P. stratiotes* and *L. minor*

The BCF can be used to characterize the accumulation of pollutants through chemical partitioning from the aqueous phase into an organic phase (Serrano *et al.*, 1997). The BCF of *L. minor* was clearly greater than that for *P. stratiotes* at all time-points evaluated (Figure 3). The BCF of both plant species rapidly increased from day 0 to 3, although the rate

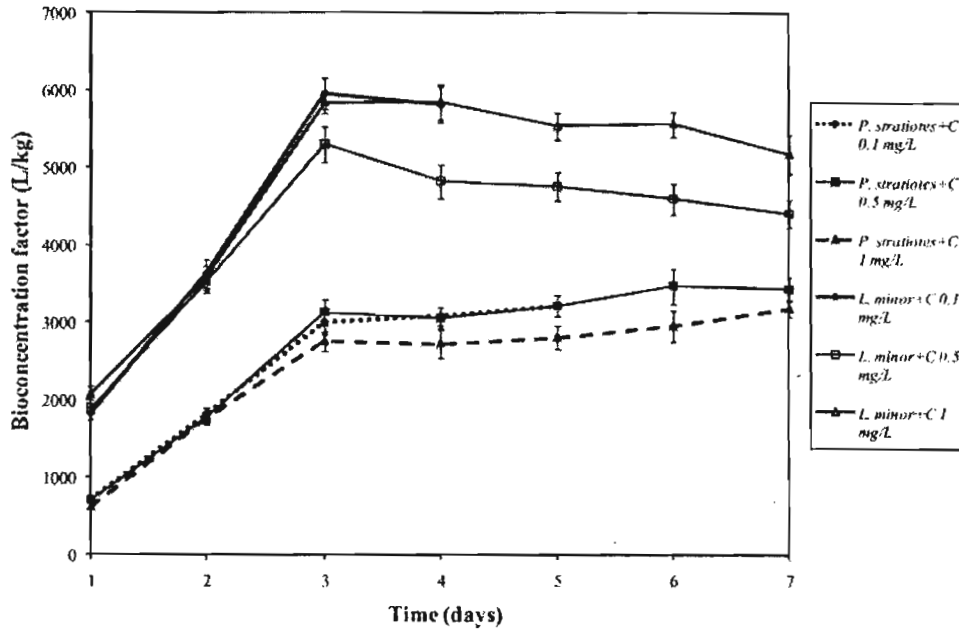


Figure 3 The bioconcentration factor (BCF) of chlorpyrifos in *P. stratiotes* and *L. minor* (based on dry weight) when grown in Hoagland's No. 2 solution with chlorpyrifos (0.1, 0.5, and 1 mg/L). Data are shown as the mean \pm 1 S.D. and are derived from three repeats. *The BCF was not calculated for *P. stratiotes* and *L. minor* cultures at an initial chlorpyrifos concentration of 0.1 mg/L for days 5–7 and 4–7, respectively, because chlorpyrifos was not detectable.

of increase was slightly faster for the three treatments involving *L. minor* (~1400–1500 L/kg/day) than that of *P. stratiotes* (~900–1000 L/kg/day). Thereafter, for *P. stratiotes*, the BCF only gradually increased or remained near static from day 4 to day 7, while for *L. minor*, the BCF slightly decreased over this time period, but it still remained at a higher total level than that for *P. stratiotes*. The results are consistent with the notion that some of the accumulated chlorpyrifos in the tissues of *L. minor* could be assimilated by the plants.

DISCUSSION

The biomass of *L. minor* and *P. stratiotes* grown in nutrient media in the presence of chlorpyrifos at 0.1 and 0.5 mg/L increased and there was no visible morphological change in plants during the seven day experimental period. Thus, especially if these results hold for longer periods (to be substantiated), both plant species can tolerate, and would likely grow relatively well in wastewater containing, low concentrations of chlorpyrifos. However, chlorpyrifos at 1.0 mg/L likely had some toxicity to both *P. stratiotes* and *L. minor*, detected by chlorosis and biomass reduction from day three onwards, which matches the reduced RGR. Indeed, acute toxicity to chlorpyrifos at 1.5 mg/L was noted within 96 hours (data not shown). The toxicity of chlorpyrifos to aquatic plants has been reported before, with a reported EC₅₀ for chlorpyrifos on the growth inhibition of *Scenedesmus* sp. and *Seletonema costatum* of 0.48 and 0.255 mg/L at 96 hours, respectively (DowAgro-Sciences, 2008). Although the limited concentrations assayed here do not allow an accurate

evaluation of the EC_{50} for *L. minor* and *P. stratiotes*, it is likely to be somewhat higher than 0.5 mg/L and thus *L. minor* and *P. stratiotes* are potentially less susceptible to chlorpyrifos toxicity, although this requires confirmation. The removal efficiency of atrazine by poplar trees (*Populus maximowiczii*) was found to occur rapidly at 0.5 mg/L, but the removal efficiency decreased as the initial atrazine concentration increased over 3 mg/L (Chang *et al.*, 2005).

The maximum removal level of chlorpyrifos attained in this study by *L. minor* and *P. stratiotes* was ~100% within 4–5 days at an initial concentration of 0.1 mg/L, and 87% and 82%, respectively, after seven days at an initial chlorpyrifos concentration of 0.5 mg/L, which potentially indicates that plant uptake might be the main process during the removal of chlorpyrifos by both plant species. Note that microbial degradation of chlorpyrifos was considered to be minimal because the plants were disinfected by immersion in 0.01% (v/v) Clorox before the experiment. When compared to the other reported data on pesticide remediation, the efficiency of *L. minor* and *P. stratiotes* to remove chlorpyrifos is greater than that reported for the water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to remove ethion (69%) (Xia and Ma, 2006), and for the poplar tree (*P. maximowiczii*) to remove atrazine (75%) over five days at an initial atrazine concentration of 0.5 mg/L (Chang *et al.*, 2005). Regardless, the percentage removal of chlorpyrifos by *L. minor* was greater than that by *P. stratiotes*. This result is similar to a study on the removal efficiency of dimethomorph and pyrimethanil from water by five macrophyte species (*L. minor*, *S. polyrhiza*, *C. aquatica*, *C. palustris*, and *E. canadensis*). *L. minor* and *S. polyrhiza* showed the highest removal efficiency for the two fungicides during the four days test periods (Olette *et al.*, 2009).

The BCF of *L. minor* was greater than that of *P. stratiotes*, which might be due to the different morphology and mechanism of uptake between the two species. *L. minor* is a small aquatic plant with very fine and numerous roots that spread throughout the surface of the experimental vessel. *P. stratiotes* is larger than that for *L. minor* and has a longer root, but the root surface area of *P. stratiotes* is smaller than *L. minor*, and thus *L. minor* has a greater contact area for absorption of chlorpyrifos from the culture solution than *P. stratiotes*. Moreover, from days 4–7 of the experiment, the BCF of *L. minor* gradually decreased, which might be the result of phytodegradation occurring in the tissues of *L. minor*, although this requires confirmation. Compared to the uptake of the organophosphate insecticide pyridaphenthion in the green algae *Chlorella saccharophila*, the BCF of *L. minor* and *P. stratiotes* were both greater than that reported for *C. saccharophila* (28 L/kg), which was calculated using a model (Jonsson *et al.*, 2001). However, in a study with *C. vulgaris* at a cell density of 11.6×10^9 cells/L, the mean BCF of anthracene in *C. vulgaris* was found to be relatively high (6,000 L/kg) (Sijm *et al.*, 1995). In contrast, the mean BCFs for the uptake of penta-chlorobenzene and hexa-chlorobenzene from water in soya bean (*Glycine max*) roots were 139 and 308 L/kg, respectively (Kraaij and Connell, 1997).

This study demonstrates the interesting potential use of *L. minor* and *P. stratiotes* in the phytoremediation of chlorpyrifos from aquatic sources. Both plants might be utilized as an efficient, economical and ecological alternative to accelerate the removal of wastewater contaminated with a relatively low concentration of chlorpyrifos (0.5 mg/L), as they efficiently reduced an initial level of 0.1 mg/L to below the threshold of detection. Thus, two or three sequential growth and harvest periods over 2–3 weeks maybe sufficient for bioremediation of chlorpyrifos contaminated water at levels of up to 1 mg/L. However, further studies are needed to better understand the mechanisms involved at the plant level and to optimize the plants' capacity for chlorpyrifos phytoremediation, before confirming this innovative technology for efficient use in cleansing pesticide-contaminated water.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Dr. Robert Butcher, PCU, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for his invaluable comments and review, and to two anonymous reviewers whose comments on an earlier version improved this manuscript. This research was in part supported by the Inter-Department of Environmental Science, Chulalongkorn University.

REFERENCES

- Agricultural Toxic Substances Research Group. 2007. Report of importing toxic substance for agriculture. Bangkok, Thailand. <http://www.doa.go.th/home/tabid/36/ItemId/492/Default.aspx>. Accessed 8 May 2009.
- Arunwarakorn M, Sooksai T, Tempiyapol K, Maungklai C. 2007. Pesticide Residues in water, soil and pomelo in central agricultural area followed GAP. Office of Agricultural Research and Development Region 5. 1–17. http://it.doa.go.th/refs/files/294_2550.pdf. Accessed on 12 August 2009.
- Bouldin JL, Farris JL, Moore MT, Smith SJ, Cooper CM. 2006. Hydroponic uptake of atrazine and lambda-cyhalothrin in *Juncus effusus* and *Ludwigia peploides*. *Chemosphere*. 65: 1049–1057.
- Burken JG, Schnoor JL. 1997. Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. *Environmental Science and Technology*. 31: 1399–1402.
- Chang SW, Lee SJ, Je CH. 2005. Phytoremediation of atrazine by poplar trees: toxicity, uptake, and transformation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 40: 801–811.
- DowAgroSciences. 2008. Lorsban™ 15G Granular Insecticide. Material safety data sheet. 1–7. http://www.dowagro.com/PublishedLiterature/dh_01d9/0901b803801d926e.pdf?filepath=ca/pdfs/noreg/010-20909.pdf&fromPage=GetDoc. Accessed 1 May 2009.
- Ensley BD. 2000. Rationale for use of phytoremediation. In: Raskin I, Ensley B, eds. *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment*. New York (NY): John Wiley & Sons, Inc. p. 3–11.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1998. A citizen's guide to phytoremediation. 1–6. <http://www.epa.gov/tio/download/remed/phyto2.pdf>. Accessed on 14 April 2009.
- Flocco CG, Carranza MP, Carvajal LG, Loewy RM, Angelo AM, Giuliotti AM. 2004. Removal of azinphos methyl by alfalfa plants (*Medicago sativa* L.) in a soil-free system. *Science of the Total Environment*. 327: 31–39.
- Hoagland DR, Arnon DI. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. *Univ. Calif. Coll. Agric. Exp. Sta. Circ.* Berkeley, CA. p. 347–353. <http://www.biocompare.com/ProductDetails/349567/Hoagland's-No-2-Basal-Salt-Mixture.html>. Accessed 5 January 2010.
- Johansen K, Jacobsen CS, Torsvik V, Sorensen J. 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils—A review. *Biology and Fertility of Soils*. 33: 443–453.
- Jonsson CM, Paraiba LC, Mendoza MT, Sabater C, Carrasco JM. 2001. Bioconcentration of the insecticide pyridaphenthion by the green algae *Chlorella saccharophila*. *Chemosphere*. 43: 321–325.
- Kanon-Boule M, Vicente JAF, Nabais C, Prasad MNV, Freitas H. 2009. Ecophysiological tolerance of duckweed exposed to copper. *Aquatic Toxicology*. 91: 1–9.
- Kennedy AC, Gewin VL. 1997. Soil microbial diversity: Present and future considerations. *Soil Science*. 162: 607–617.
- Kraaij H, Connell DW. 1997. Bioconcentration and uptake kinetics of chlorobenzenes in soy-bean roots. *Chemosphere*. 34: 2607–2620.

- Lal S, Saxena DM, Lal R. 1987. Bioconcentration and metabolism of DDT, fenitrothion and chlorpyrifos by the blue-green algae *Anabaena sp.* and *Aulosira fertilissima*. *Environmental Pollution*. 46: 187–196.
- McGregor EB, Solomon KR, Hanson ML. 2008. Effects of planting system design on the toxicological sensitivity of *Myriophyllum spicatum* and *Elodea canadensis* to atrazine. *Chemosphere* 73: 249–260.
- Olette R, Couderchet M, Biagianti S, Eullaffroy, P. 2008. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. *Chemosphere*. 70: 1414–1421.
- Olette R, Couderchet M, Eullaffroy P. 2009. Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: Toxicity and removal rate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72: 2096–2101.
- Pollution Control Department. 1996. Water Quality Standards. Ministry of Science, Technology and Environment. http://www.pcd.go.th/Info_serv/reg_std_water04.html. Accessed 6 August 2009.
- Racke KD. 1993. The environmental fate of chlorpyrifos. *Rev Environ Contam Toxicol*. 131: 1–151.
- Schwitzguébel JP, Meyer J, Kidd P. 2006. Pesticides removal using plants: Phytodegradation versus phytostimulation. In: Mackova M, Dowling DN, Macek T, eds. *Phytoremediation and Rhizoremediation*. Springer. p. 179–198.
- Serrano R, Lopez FJ, Hernandez F, Pena JB. 1997. Bioconcentration of chlorpyrifos, chlorfenvinphos and methidathion in *Mytilus galloprovincialis*. *Environ Contam Toxicol*. 59: 968–975.
- Sijm DT, Middelkoop J, Vrisekoop K. 1995. Algal density dependent bioconcentration factors of hydrophobic chemicals. *Chemosphere*. 31: 4001–4012.
- Singh BK, Walker A, Wright DJ. 2002. Persistence of chlorpyrifos, fenamiphos, chlorothalonil, and pendimethalin in soil and their effects on soil microbial characteristics. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 69: 181–188.
- Spacie A, Hamelink JL. 1985. Bioaccumulation. In: Rand PM, Petrocelli SR, eds. *Fundamentals of aquatic Toxicology: Methods and Applications*. New York: Hemisphere Publishers. p. 497–534.
- Wang LG, Jiang X, Mao YM, Zhao ZH, Bian YR. 2005. Organophosphorus pesticide extraction and cleanup from soils and measurement using GC-NPD. *Pedosphere*. 15: 386–394.
- Xia H, Ma X. 2006. Phytoremediation of ethion by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) from water. *Bioresource Technology*. 97: 1050–1054.
- Zimmels Y, Kirzhner F, Malkovskaja A. 2006. Application of *Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes* for treatment of urban sewage in Israel. *J Environ Manag*. 81: 420–428.

