



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลของซิลเวอร์ไอออนขนาดนาโนต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน
และการเพิ่มศักยภาพด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุธงษา สิริพัฒนานกุล และคณะ

มิถุนายน 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลของซิลเวอร์นาโนภาคขนาดนาโนต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน
และการเพิ่มศักยภาพด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์

ผู้วิจัย

สังกัด

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุธนา สิริพัฒนากุล
2. Prof. Dr. Eakalak Khan
3. รองศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วังใน

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
North Dakota State University
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380280

ชื่อโครงการ: โครงการผลของซิลเวอร์อนุภาคนาโนต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน และการเพิ่มศักยภาพด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ผศ.ดร. สุมณา สิริพัฒนานกุล มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
 Prof. Dr. Eakalak Khan North Dakota State University
 รศ.ดร. อลิสา วังใน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมล: ensumasi@ubu.ac.th; jeans_sumana@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ: ซิลเวอร์อนุภาคนาโน (AgNP) ถูกผลิตและใช้เพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนส่งผลให้มีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการปนเปื้อนของ AgNP ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งหมายรวมถึงระบบบำบัดน้ำเสียด้วย การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาผลของ AgNP ต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันและปรับปรุงระบบด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์ โดยการศึกษาครอบคลุมปัจจัยความเข้มข้นของแอมโมเนียและ AgNP เริ่มต้น และวัสดุดักติด (ชนิดและขนาด) การทดลองศึกษากิจกรรมไนตริฟิเคชันใช้หลักเรสไพโรเมตริก นอกจากนี้การทดลองยังได้สังเกตลักษณะเซลล์จุลินทรีย์และวัสดุดักติดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและส่องกราดและส่องผ่าน ผลการศึกษาพบว่ากระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันเป็นไปตามโมเดลของ Michaelis-Menten โดยมีค่าอัตราการใช้ออกซิเจนสูงสุด (OUR_{max}) เท่ากับ 0.2132 และ 0.2273 mg-O₂/L/min และค่าคงที่ K_s เท่ากับ 5.42 และ 15.87 mg-N/L ตามลำดับ AgNP ส่งผลให้ OUR_{max} และ K_s ลดลง โดยในกรณีดังกล่าวกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันเป็นไปตามจลนพลศาสตร์เชิงยับยั้งแบบไม่มีการแข่งขัน (ค่าคงที่การยับยั้ง (K_i) เท่ากับ 9.3 และ 5.5 mg/L ตามลำดับ) ความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นไม่มีผลต่อกิจกรรมไนตริฟิเคชันในขณะที่ความเข้มข้นของ AgNP (0.25-10.00 mg/L) ยับยั้งกิจกรรมไนตริฟิเคชันร้อยละ 8-38 และกิจกรรมแอมโมเนียออกซิเดชันร้อยละ 14-28 นอกจากนี้ยังพบว่ากรณีที่มี AgNP กิจกรรมไนตริฟิเคชันของเซลล์ดักติดด้วยแคลเซียมแอลจีเนต (CA) และพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) สูงกว่าเซลล์อิสระ เซลล์ดักติดด้วย CA (ร้อยละ 64-100) คงกิจกรรมไนตริฟิเคชันดีกว่าเซลล์ดักติดด้วย PVA (ร้อยละ 4-87) สำหรับการศึกษาขนาดของเซลล์ดักติดพบว่าเซลล์ไวนิลแอลกอฮอล์ขนาดใหญ่มีประสิทธิภาพสูงกว่า จากผลการสังเกตโครงสร้างระดับจุลภาคพบว่า AgNP ส่งผลทำให้ผิวของเซลล์และไฮโดรพลาสซึมถูกทำลายเป็นเหตุให้กิจกรรมไนตริฟิเคชันลดลงเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าวัสดุดักติดสามารถลดผลลบของ AgNP ต่อกิจกรรมไนตริฟิเคชันได้

คำหลัก : การดักติดเซลล์ ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ ในทรีฟโคชัน เรสไฟโรเมตรี ซิลเวอร์
อนุภาคนาโน

Abstract

Project Code: MRG5380280

Project Title: Effect of silver nanoparticle on nitrification process and performance enhancement using cell entrapment technique

Investigator: Assist.Prof. Sumana Siripattanakul, Ph.D., Ubon Ratchathani University
 Prof. Eakalak Khan, Ph.D., North Dakota State University
 Assoc.Prof. Alisa Vangnai, Ph.D., Chulalongkorn University

E-mail Address: ensumasi@ubu.ac.th; jeans_sumana@yahoo.com

Project Period: 2 years

Abstract: Silver nanoparticles (AgNPs) have substantially increased in production and utilization resulting in potential of AgNPs contamination in environment including wastewater treatment plants. This study aimed to investigate effects of AgNPs on nitrification process and enhance the system by cell entrapment technique. Initial ammonia and AgNP concentrations, and entrapment materials and matrix sizes were the variables. Nitrification activity was investigated using a respirometric assay. Scanning and transmission electron microscopic observations of the microbial cells and entrapment matrices were also performed. Results showed that nitrification and ammonia oxidation followed Michaelis-Menten model with maximum oxygen uptake rates (OUR_{max}) 0.2132 and 0.2273 mg-O₂/L/min and half saturation coefficients (K_s) of 5.42 and 15.87 mg-N/L, respectively. Presence of AgNPs resulted in lower OUR_{max} and K_s . The nitrification and ammonia oxidation processes in the case followed uncompetitive inhibition kinetics with inhibition constants (K_i) of 9.3 and 5.5 mg/L, respectively. The initial ammonia concentration did not influence the nitrification activity while the AgNP concentrations (0.25-10.00 mg/L) inhibited the nitrification activity (8-38% compared to the control) and ammonia oxidation activity (14-28% compared to control). In the presence of AgNPs, both calcium alginate (CA) and polyvinyl alcohol (PVA)-entrapped cells had higher nitrification activity compared to free cells. Nitrification activity in the presence of AgNPs by the CA-entrapped cells was better than that of the PVA-entrapped cells (64-100% versus 4-87% compared to without AgNPs). Cells entrapped in a larger matrix size performed better. Based on micro-structural observation, AgNPs caused damages to cell surface and cytoplasm which very likely led

to decreased nitrification activity. The entrapment matrices successfully reduced the adverse effects of AgNPs on nitrification activity.

Keywords : cell entrapment, cell physiology, nitrification, respirometry, silver nanoparticle

บทสรุปผู้บริหาร

รหัสโครงการ: MRG5380280

ชื่อโครงการ: โครงการผลของซิลเวอร์นาโนภาคขนาดนาโนต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน
และการเพิ่มศักยภาพด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์
Effect of silver nanoparticle on nitrification process and performance
enhancement using cell entrapment technique

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ผศ.ดร. สุมณา สิริพัฒน์กุล มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
Prof. Dr. Eakalak Khan North Dakota State University
รศ.ดร. อลิสา วังใน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันซิลเวอร์นาโนภาคขนาดนาโน (silver nanoparticle; AgNP) เป็นส่วนประกอบของวัสดุที่ใช้ทั่วไปในบ้านเรือนและชีวิตประจำวันหลายชนิด แม้ปัจจุบันยังไม่มีผลการศึกษาการตกค้างของ AgNP ในสิ่งแวดล้อมอย่างชัดเจน แต่มีรายงานการใช้ AgNP ปริมาณมากขึ้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา เช่น ในทวีปยุโรปมีรายงานการใช้ AgNP 30 ตันต่อปีในปี ค.ศ. 2004 ซึ่งเพิ่มขึ้นเป็น 500 เท่าจากปี ค.ศ. 2000 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าในอนาคตอันใกล้ AgNP จะตกค้างในสิ่งแวดล้อมปริมาณสูงเช่นกัน ซิลเวอร์เป็นโลหะหนักชนิดหนึ่งที่มีความเป็นพิษทั้งต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อซิลเวอร์มีอนุภาคขนาดนาโนจะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตสูงกว่าอนุภาคขนาดไมโครถึง 100 เท่า ดังนั้นหากมี AgNP ตกค้างในสิ่งแวดล้อมแม้เพียงปริมาณน้อยก็สามารถส่งผลกระทบต่อระบบสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศวิทยาได้

ระบบบำบัดน้ำเสียเป็นหน่วยสิ่งแวดล้อมหนึ่งที่ AgNP อาจตกค้างได้ จากการศึกษาของ Blaser et al. (2008) พบว่า AgNP ส่วนใหญ่จะเข้าสู่หน่วยสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ผ่านระบบบำบัดน้ำเสีย โดยมีการคาดการณ์ว่าอาจมี AgNP ตกค้างได้สูงถึง 39 mg Ag/kg dry sewage sludge จากสถานการณ์นี้จะเห็นว่า AgNP มีแนวโน้มที่จะส่งผลกระทบต่อตะกอนจุลินทรีย์และระบบบำบัดน้ำเสียอย่างรุนแรงได้ในอนาคต เป็นที่รู้กันทั่วไปว่ากระบวนการไนตริฟิเคชันเป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่มีความอ่อนไหวต่อสิ่งแวดล้อมและสภาวะในการเดินระบบ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาระบบบำบัดน้ำเสียในส่วนของการไนตริฟิเคชัน

การศึกษานี้จึงเกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชันและ AgNP มุ่งเน้นในการศึกษา ลักษณะของ AgNP และผลของสารประกอบเกลือและลิแกนด์ต่อความเป็นพิษของ AgNP ในกระบวนการไนตริฟิเคชันเท่านั้น แต่องค์ความรู้ดังกล่าวยังไม่เพียงพอต่อการระบุความเป็นไป (fate) ของ AgNP ทั้งต่อระบบบำบัดน้ำเสียและสิ่งแวดล้อม และนอกจากนี้ใน

ปัจจุบันยังไม่มียานวิจัยที่ศึกษาผลของ AgNP ต่อกลุ่มจุลินทรีย์ รวมทั้งแนวทางป้องกันปัญหาการปนเปื้อนของ AgNP ต่อระบบบำบัดน้ำเสีย

สำหรับแนวทางแก้ปัญหาล้มเหลวของระบบบำบัดน้ำเสียวิธีหนึ่ง คือ เทคนิคการดักติดเซลล์ (cell entrapment) เทคนิคนี้เป็นการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ไว้ในสารพอลิเมอร์ ระบบดังกล่าวมีข้อดีหลายประการ คือ สามารถควบคุมปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ได้ และสารพอลิเมอร์สามารถป้องกันจุลินทรีย์จากสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้จากลักษณะโครงสร้างของเซลล์ดักติดซึ่งเป็นโครงตาข่ายมีแนวโน้มที่จะป้องกัน AgNP ไม่ให้เกาะติดเซลล์จุลินทรีย์ได้ จากสมบัติของเซลล์ดักติดดังกล่าวระบบเซลล์ดักติดเป็นระบบที่มีศักยภาพในการประยุกต์เพื่อป้องกันปัญหาที่กล่าวถึงข้างต้น โดยระบบเซลล์ดักติดนอกจากจะมีความเหมาะสมในด้านสมบัติแล้ว วิธีการผลิตเซลล์ดักติดเป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายน้อย ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์หรือเทคโนโลยีขั้นสูง รวมทั้งเซลล์ดักติดสามารถนำไปใช้กับระบบบำบัดน้ำเสียที่มีอยู่เดิมได้ อย่างไรก็ตามในการประยุกต์ใช้เทคนิคการดักติดเซลล์ให้ประสบความสำเร็จ จำเป็นจะต้องศึกษาหาสภาวะ ชนิด และขนาดของเซลล์ดักติดที่เหมาะสม มิฉะนั้นเทคนิคดังกล่าวนอกจากจะไม่ได้ช่วยแก้ปัญหา แต่ยังอาจส่งผลให้เกิดปัญหาของการซึมผ่านของอาหารและออกซิเจน (substrate and oxygen diffusion)

จากเหตุผลข้างต้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาผลกระทบของ AgNP ต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันและการปรับปรุงศักยภาพของกระบวนการด้วยเทคนิคเซลล์ดักติด โดยปัจจัยที่ศึกษา คือ ความเข้มข้นของ AgNP ชนิดและขนาดของเซลล์ดักติดต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน

วัตถุประสงค์

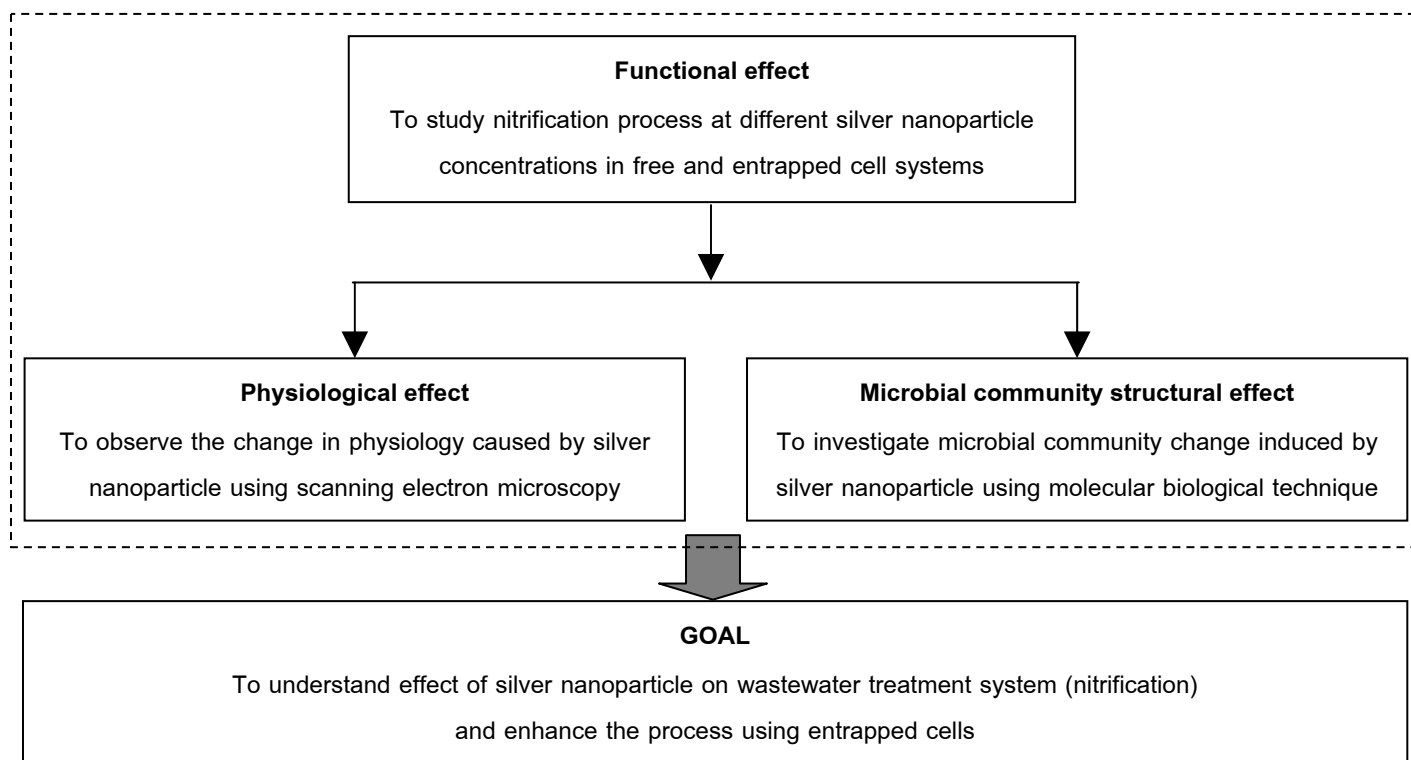
โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายหลักของโครงการ คือ เพื่อให้ทราบถึงความเป็นไปของ AgNP ต่อระบบบำบัดน้ำเสีย ทั้งในแง่ศักยภาพในการทำงานและผลต่อจุลินทรีย์ รวมทั้งหาแนวทางในการป้องกันปัญหาดังกล่าว เพื่อให้งานวิจัยบรรลุเป้าหมายนี้งานวิจัยมีรายละเอียดของวัตถุประสงค์การวิจัย ดังนี้

- 1) เพื่อศึกษาผลของ AgNP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน
- 2) เพื่อศึกษาผลของ AgNP ต่อลักษณะทางกายภาพของกลุ่มจุลินทรีย์
- 3) เพื่อศึกษาผลของ AgNP ต่อโครงสร้างทางชีวภาพของกลุ่มจุลินทรีย์
- 4) เพื่อศึกษาการปรับปรุงศักยภาพของกระบวนการด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์ด้วยสารดักติดต่างชนิดและต่างขนาด

วิธีดำเนินการวิจัย

แนวคิดของงานวิจัยนี้สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 1 งานวิจัยนี้ซึ่งเป็นงานทดลองในระดับห้องปฏิบัติการสามารถแบ่งภาระงานออกได้เป็น 2 ส่วนหลัก 1) การศึกษาผลของ AgNP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน โดยศึกษาลักษณะการยับยั้งของ AgNP ในกระบวนการดังกล่าว ผลของ AgNP ต่อลักษณะทางกายภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ และผลของ

AgNP ต่อโครงสร้างทางชีวภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ 2) การศึกษาการปรับปรุงศักยภาพของกระบวนการด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์ด้วยสารดักติดต่างชนิดและต่างขนาด



รูปที่ 1 แนวคิดงานวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยสามารถจำแนกออกได้เป็น 7 ขั้นตอน ดังนี้

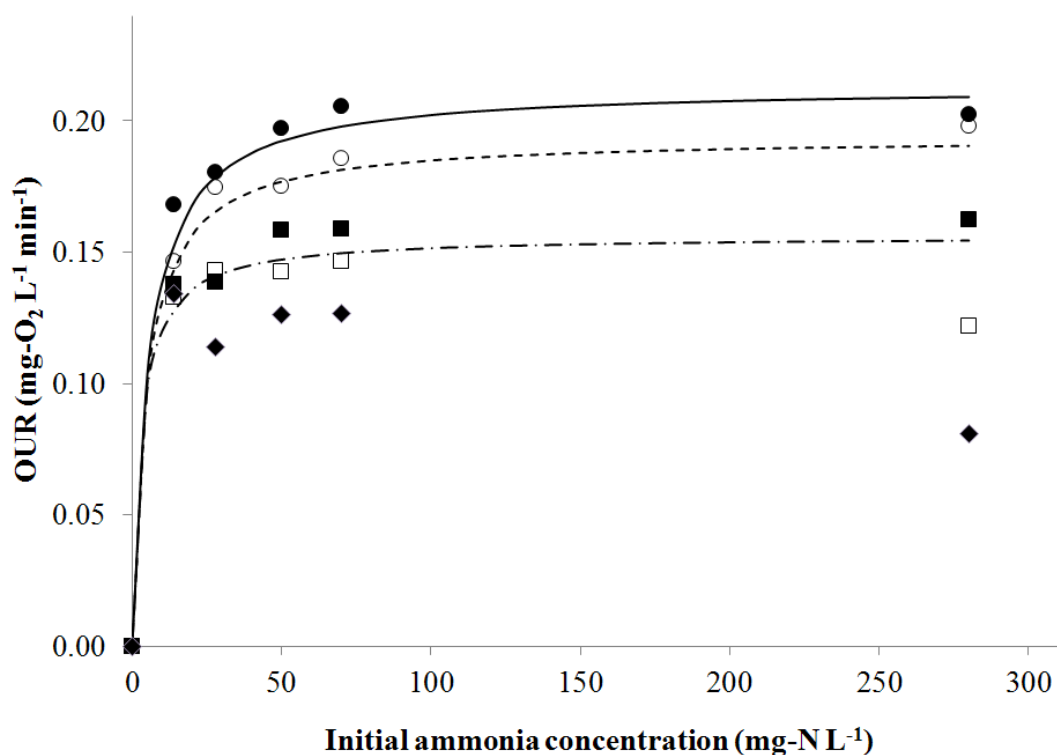
- 1) การรวบรวมและศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ขั้นตอนนี้เป็นการรวบรวมและศึกษาข้อมูลที่ใช้ในการวิจัย โดยสามารถแบ่งออกได้เป็นข้อมูลของ AgNP ข้อมูลการเดินระบบบำบัดน้ำเสียโดยเน้นที่กระบวนการไนตริฟิเคชัน และข้อมูลเซลล์ดักติดและการใช้งาน
- 2) การเตรียมจุลินทรีย์ในไตรฟายอิง ขั้นตอนนี้เป็นการเตรียมจุลินทรีย์ โดยเป็นการเลี้ยงเชื้อจากตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (activated sludge) การเพาะเลี้ยงและปรับสภาพจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีแอมโมเนียเป็นองค์ประกอบ ขั้นตอนนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 6 เดือน เพื่อให้กลุ่มจุลินทรีย์มีความเสถียร (stable mixed culture) และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนียคงที่
- 3) การดักติดเซลล์จุลินทรีย์ ขั้นตอนนี้เป็นการดักติดเซลล์จุลินทรีย์ด้วยสารดักติด 2 ชนิด คือ แคลเซียมแอลจีเนต (calcium alginate; CA) และ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) โดยขั้นตอนนี้จะเตรียมเซลล์ดักติดด้วย CA ตาม Smidsrod and Skjak-Braek (1990) ส่วนการเตรียมเซลล์ดักติดด้วย PVA จะได้เตรียมตามวิธีการแบบปรับปรุง (modified method) ตาม Siripattanakul et al. (2008)

- 4) การศึกษาผลของ AgNP ต่อการทำงานของจุลินทรีย์ ขั้นตอนเป็นการศึกษากระบวนการไนตริฟิเคชันโดยการวัดการใช้ออกซิเจน (oxygen uptake rate; *OUR*) การทดลองใช้ชุดถังปฏิกรณ์เรสไพโรมิเตอร์ (respirometer) การทดลองเริ่มต้นจากการนำเซลล์จุลินทรีย์อิสระลงในเรสไพโรมิเตอร์ที่มีน้ำเสียอยู่แล้วเพื่อศึกษาผลต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน จากนั้นวัดค่า *OUR* เป็นเวลา 240 min หรือจนกระทั่งค่าออกซิเจนละลายที่วัดได้คงที่ การวิจัยศึกษาที่ความเข้มข้นของ AgNP และแอมโมเนียต่าง ๆ กัน การทดลองจะทำในลักษณะเดียวกันอย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยและค่าความเชื่อมั่นทางหลักทางสถิติ จากนั้นนำผลที่ได้หาค่าจลนพลศาสตร์ไนตริฟิเคชันเชิงยับยั้งเปรียบเทียบระหว่างมีและไม่มี การปนเปื้อน AgNP
- 5) การศึกษาผลของ AgNP ต่อกายภาพและโครงสร้างทางชีวภาพเบื้องต้นของจุลินทรีย์ ขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านก่อนและหลังได้รับ AgNP
- 6) การศึกษาการปรับปรุงกระบวนการไนตริฟิเคชันด้วยเซลล์ดักติด ขั้นตอนเป็นการศึกษากระบวนการไนตริฟิเคชันโดยการวัด *OUR* การทดลองใช้ชุดถังปฏิกรณ์เรสไพโรมิเตอร์ (respirometer) การทดลองเริ่มต้นจากการนำเซลล์จุลินทรีย์ทั้งที่เป็นเซลล์อิสระและเซลล์ดักติดตามที่เตรียมไว้ข้างต้นใส่ลงในเรสไพโรมิเตอร์ที่มีน้ำเสียอยู่แล้ว จากนั้นทดลองลักษณะเดียวกับข้อที่ผ่านมา
- 7) การศึกษาผลของ AgNP ต่อกายภาพของจุลินทรีย์และวัสดุดักติด ขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาลักษณะเซลล์อิสระและเซลล์ดักติดก่อนและหลังได้รับ AgNP ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และศึกษาลักษณะวัสดุดักติดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
- 8) การสรุปผลงานวิจัยและการเผยแพร่ผลงาน ขั้นตอนนี้เป็นสรุปผลงานวิจัยทั้งหมดและจัดทำรูปเล่มเอกสารการวิจัย เพื่อเผยแพร่ต่อไป โดยเอกสารการวิจัยจะทำเมื่อสิ้นสุดโครงการ แต่นอกจากนี้การเผยแพร่ผลงานวิจัยจะเผยแพร่ในรูปแบบบทความวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติภายหลัง

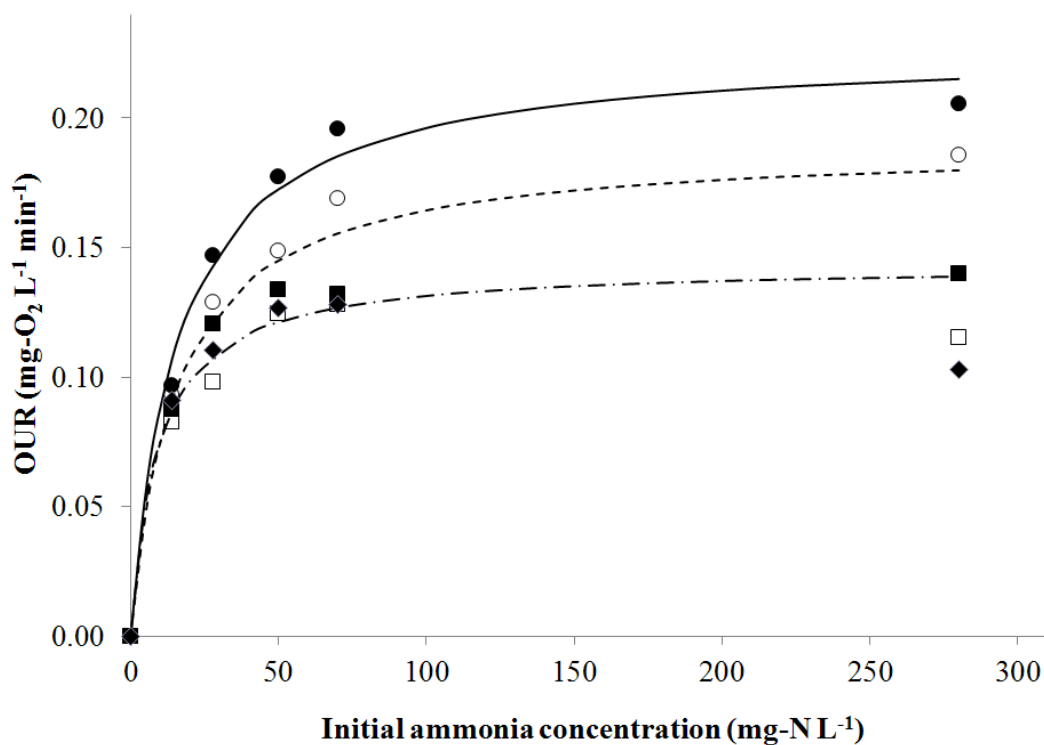
ผลการวิจัย

ผลของ AgNP ต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน

การทดลองกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันศึกษาที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้น 14 ถึง 280 mg-N/L ผลการศึกษาแสดงในรูป OUR ต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นดังรูปที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ผลจากชุดทดลองที่ไม่ได้เติม AgNP เป็นไปตามโมเดลของ Michaelis-Menten โดยเมื่อคำนวณหาค่า OUR_{max} และ K_s พบว่ากระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันมีค่า OUR_{max} เท่ากับ 0.2132 และ 0.2273 mg-O₂/L/min และ K_s เท่ากับ 5.42 และ 15.87 mg-N/L ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ผลดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่า OUR_{max} ของกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันมีค่าใกล้เคียงกันแต่ K_s แตกต่างกันโดยสิ้นเชิง



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง OUR ต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นในการทดลองกระบวนการไนตริฟิเคชัน เมื่อมี AgNP ความเข้มข้น 0.00 (○) 0.25 (●) 0.50 (■) 5.00 (□) และ 10 (◆) mg/L



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่าง OUR ต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นในการทดลอง กระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน เมื่อมี AgNP ความเข้มข้น 0.00 (○) 0.25 (●) 0.50 (■) 5.00 (□) และ 10 (◆) mg/L

ตารางที่ 1 ค่า OUR_{max} และ K_s ของกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน ภายใต้สภาวะที่มี AgNP

AgNPs (mg/L)	Nitrification			Ammonia oxidation		
	OUR_{max} (mg-O ₂ /L/min)	K_s (mg-N/L)	R^2	OUR_{max} (mg-O ₂ /L/min)	K_s (mg-N/L)	R^2
0.00	0.2132	5.42	0.997	0.2273	15.87	0.989
0.25	0.1990	4.92	0.997	0.1984	16.15	0.988
0.50	0.1645	3.19	0.994	0.1564	9.99	0.994
5.00	0.1336	0.50	0.998	0.1497	8.82	0.998
10.00	0.1320	N/A ⁽¹⁾	N/A ⁽¹⁾	0.1448	8.33	0.999

⁽¹⁾ data not available

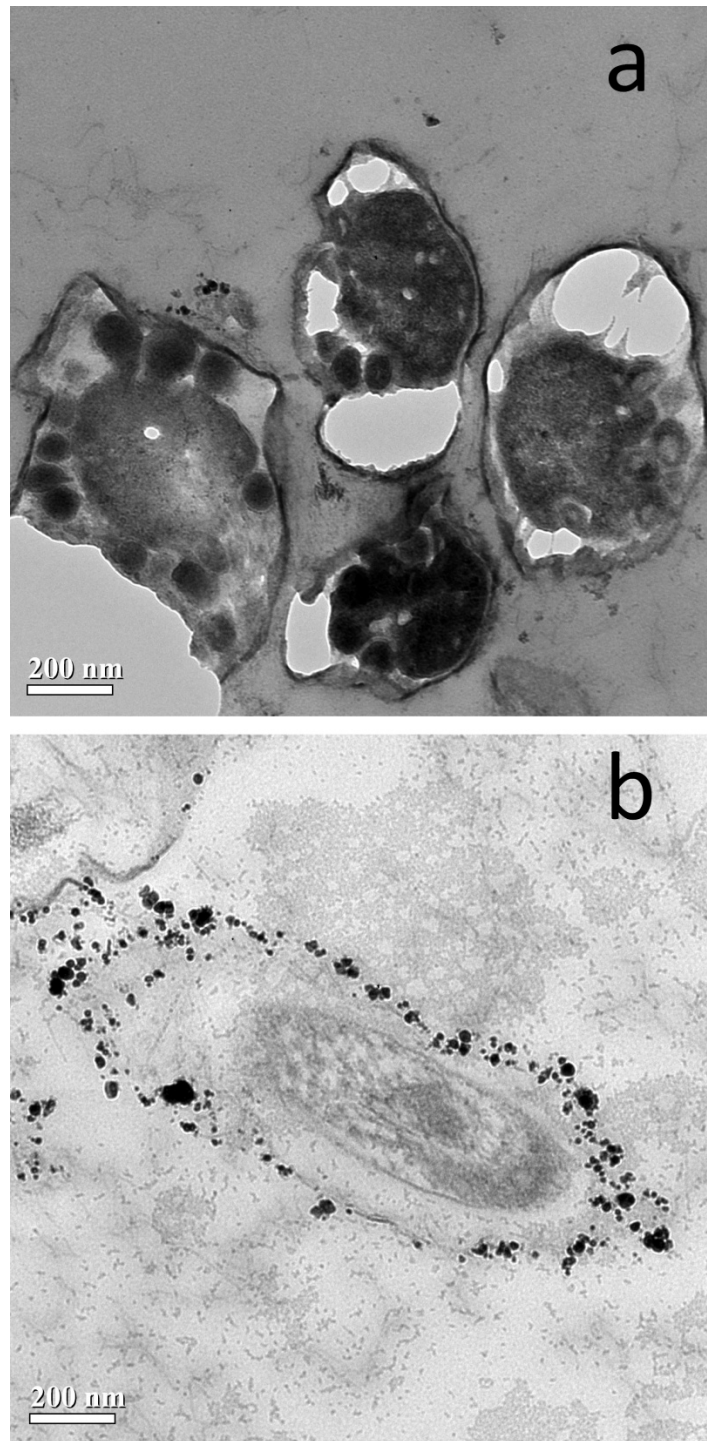
จากตารางที่ 1 พบว่า ภายใต้สภาวะที่มี AgNP เมื่อความเข้มข้นของ AgNP เริ่มต้นสูงส่งผลให้ OUR_{max} และ K_s ลดลง ผลการทดลองดังรูปที่ 2 และ 3 บ่งชี้ว่าจลนพลศาสตร์การยับยั้งด้วย AgNP ในการศึกษาเป็นแบบไม่มีการแข่งขันทั้งในกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน โดยทั่วไปว่าโลหะต่าง ๆ มีอิทธิพลต่อเซลล์จุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าผลการทดลองนี้พบว่า AgNP อาจส่งผลต่อกระบวนการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน โดยลักษณะของการยับยั้งเป็นแบบไม่มีการแข่งขัน เมื่อคำนวณหาค่าคงที่การยับยั้ง K_i ของกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน เท่ากับ 9.3 และ 5.5 mg/L ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อ AgNP มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นระดับของการยับยั้งของสูงขึ้นเช่นกัน AgNP ที่ความเข้มข้น 0.25 ถึง 10.00 mg/L ส่งผลให้เกิดการยับยั้งร้อยละ 8 ถึง 38 ในกระบวนการไนตริฟิเคชันและร้อยละ 14 ถึง 28 ในกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน ส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นมิได้มีผลต่อร้อยละการยับยั้งอย่างชัดเจน

สำหรับการศึกษาผลต่อกายภาพและโครงสร้างทางชีวภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ พบว่าลักษณะจุลินทรีย์ทั้งจากกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันเป็นไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ พบเซลล์จุลินทรีย์ถูกทำลายปะปนในเซลล์ตัวอย่างทุกชุดการทดลอง (รูปที่ 4) รูปที่ 4a แสดงให้เห็นเซลล์ถูกทำลายอย่างชัดเจน ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าสารพิษรวมทั้ง AgNP ส่งผลให้ผนังและเซลล์หุ้มเซลล์ฉีกขาด เป็นเหตุให้สารภายในเซลล์รั่วไหลและทำให้เซลล์ตายหรือยับยั้งการทำงานของเซลล์ในที่สุด

นอกจากนี้จากการศึกษาด้วย TEM ยังพบการเกาะกลุ่มของ AgNP รอบเซลล์ดังรูปที่ 4b โดยทั่วไปเมื่อลักษณะนี้ คือ สารอีพีเอส (extracellular polymeric substance; EPS) ซึ่งถูกผลิตขึ้นมาในสภาวะที่เซลล์มีความเครียดจากสิ่งแวดล้อม (environmental stress) ซึ่งหากพิจารณาผล TEM นี้ประกอบกับร้อยละและจลนพลศาสตร์การยับยั้งปานกลางในหัวข้อก่อนหน้านี้พบว่า แม้ในการทดลองที่มี AgNP ถึง 10 mg/L การยับยั้งทั้งในกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันน้อยกว่าร้อยละ 50 ซึ่งอาจเกิดจากการปกป้องเซลล์ด้วยสารอีพีเอสนี้เอง กล่าวคือ เซลล์บางชนิดในกลุ่มจุลินทรีย์ผลิตเมือกอีพีเอสรอบตัวทำให้มีโอกาสสัมผัส AgNP น้อยลงส่งผลให้พบการยับยั้งกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันไม่สูงนัก

สำหรับผลต่อโครงสร้างทางชีวภาพพบว่าจากผลการทดลองจลนพลศาสตร์การยับยั้งสามารถระบุได้ว่า AgNP ส่งผลต่อจุลินทรีย์ในตรียาอิงทั้งหมดและแอมโมเนียออกซิไดซิงต่างกันส่งผลให้จลนพลศาสตร์การยับยั้งแตกต่างกัน นอกจากนี้จากรูป TEM ยังสนับสนุนว่าโครงสร้างทางชีวภาพของกลุ่มจุลินทรีย์อาจเปลี่ยนแปลงจากผลของ AgNP เนื่องจากมีจุลินทรีย์บางชนิดถูกทำลาย



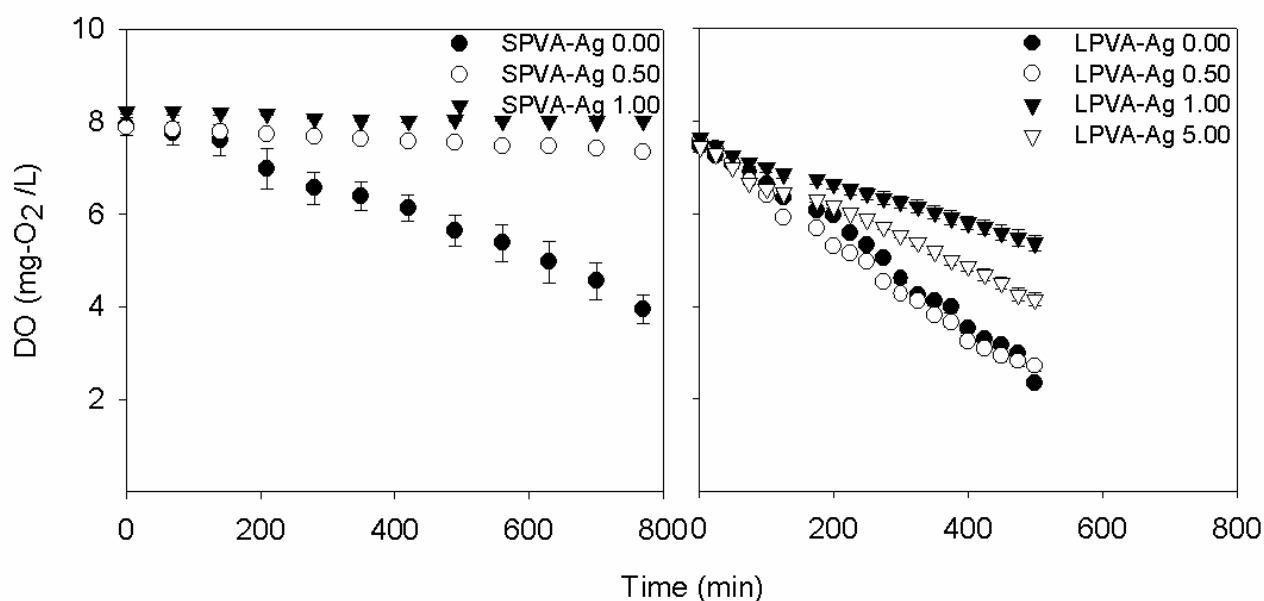
รูปที่ 4 เซลล์จุลินทรีย์ภายหลังการทดลองที่มี AgNP 10 mg/L

ผลการปรับปรุงศักยภาพของกระบวนการด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์

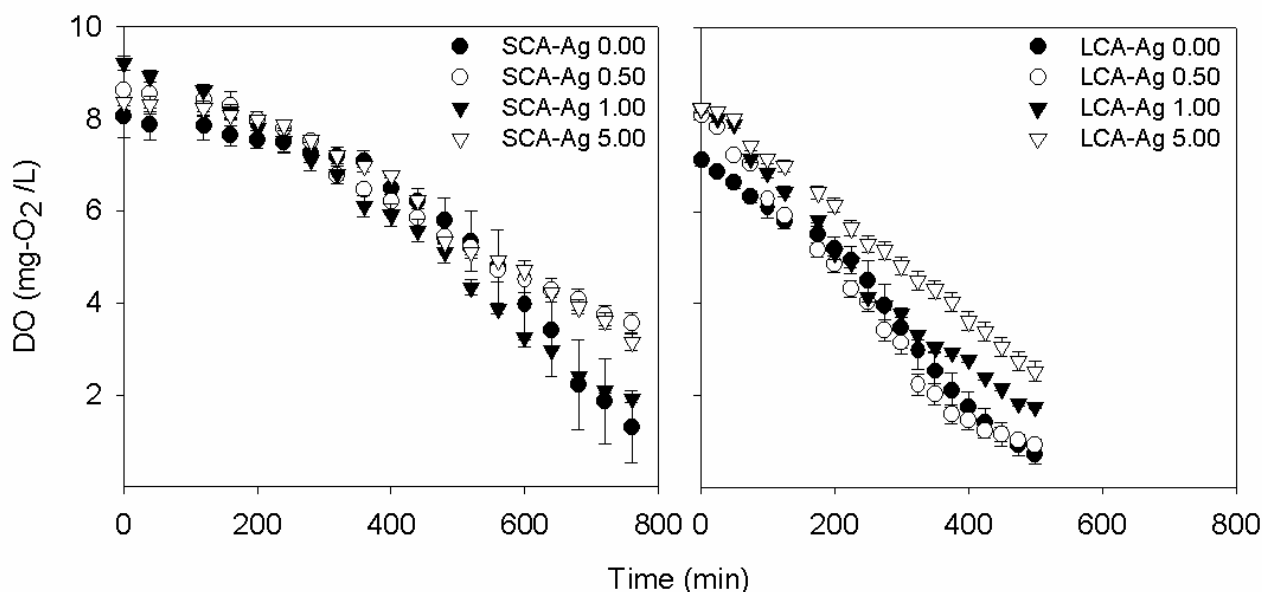
การทดลองขั้นตอนนี้มุ่งเน้นการศึกษากระบวนการไนตริฟิเคชันด้วยเซลล์ดักติดด้วย PVA และ CA ดังแสดงผลในรูปที่ 5 และ 6 แนวโน้มของค่า DO ในการทดลองทุกชุดเป็นไปในลักษณะเดียวกัน คือ DO มีค่าลดลงเรื่อย ๆ เมื่อเวลาผ่านไป โดยในการทดลองที่มี AgNP เริ่มต้นความเข้มข้นสูง DO ลดลงช้ากว่าการทดลองที่มี AgNP น้อย

เมื่อคำนวณหา OUR ของการทดลองด้วยเซลล์ดักติด ชุดทดลองเซลล์ดักติดด้วย PVA ขนาดเล็กและใหญ่มี OUR เท่ากับ 0.000-0.006 และ 0.006-0.014 $\text{mg-O}_2/\text{L}/\text{min}$, ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ชุดทดลองที่ไม่มี AgNP) พบว่ากิจกรรมไนตริฟิเคชันคิดเป็นร้อยละ 5-11 และ 44-88 ของชุดควบคุม ส่วนในชุดทดลองเซลล์ดักติดด้วย CA ขนาดเล็กและใหญ่พบว่ามีค่า OUR ระหว่าง 0.009-0.014 และ 0.019-0.024 $\text{mg-O}_2/\text{L}/\text{min}$ ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ชุดทดลองที่ไม่มี AgNP) พบว่ากิจกรรมไนตริฟิเคชันคิดเป็นร้อยละ 65-110 และ 81-94 ของชุดควบคุม เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองเซลล์ดักติดด้วย PVA พบว่าการยับยั้งในชุดทดลองเซลล์ดักติดด้วย CA มีน้อยกว่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งในชุดทดลองเซลล์ดักติดขนาดใหญ่

เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ดักติดขนาดเล็กและใหญ่พบว่าเซลล์ในวัสดุดักติดขนาดใหญ่ได้รับผลจาก AgNP น้อยกว่าส่งผลให้คงกิจกรรมไนตริฟิเคชันได้ดีกว่า ปรากฏการณ์นี้คาดว่าเกิดจากวัสดุดักติดขนาดใหญ่มีความหนามากกว่าทำให้มีการเคลื่อนภายในวัสดุพอร์ระยะทางยาวและยากลำบากกว่าส่งผลให้มีโอกาสที่ AgNP (และ Ag^+ ที่ปลดปล่อยออกจาก AgNP) สัมผัสเซลล์น้อยกว่า



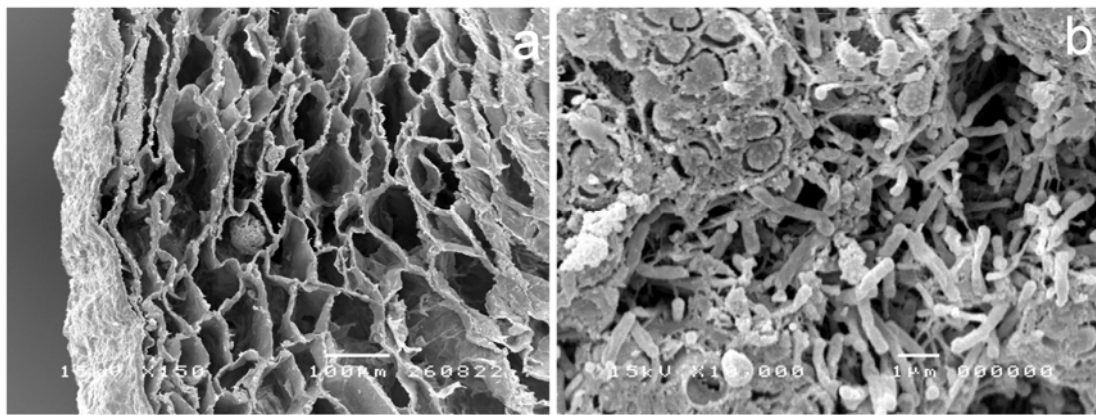
รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนต่อเวลาในกระบวนการไนตริฟิเคชันด้วยเซลล์ดักติดด้วย PVA (SPVA คือ เซลล์ดักติดด้วย PVA ขนาดเล็ก และ LPVA คือ เซลล์ดักติดด้วย PVA ขนาดใหญ่)



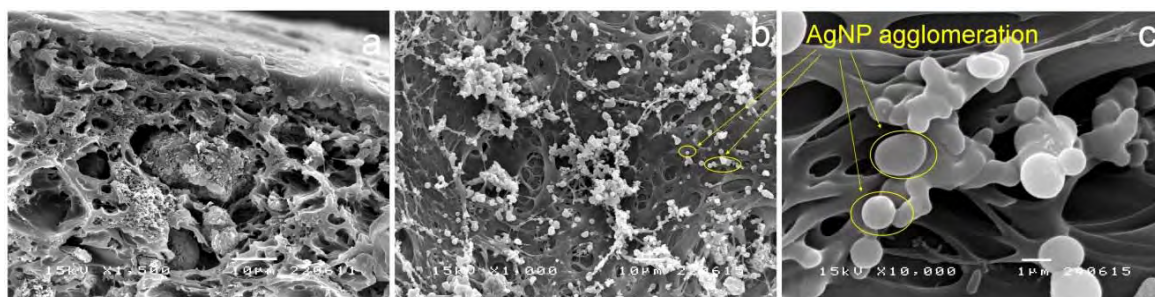
รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนต่อเวลาในกระบวนการไนตริฟิเคชัน ด้วยเซลล์ดักติดด้วย CA (SCA คือ เซลล์ดักติดด้วย CA ขนาดเล็ก และ LCA คือ เซลล์ดักติดด้วย CA ขนาดใหญ่)

ผลการศึกษาโครงสร้างเซลล์ดักติดในระดับจุลภาคด้วย SEM แสดงดังรูปที่ 7 และ 8 ในรูปที่ 7a พบว่าวัสดุดักติดด้วย CA มีโครงสร้างตาข่ายละเอียดมากคล้ายกับแผ่นกระดาษ โดยในรูพรุนขนาดเล็กมีเซลล์จุลินทรีย์ดักติดอยู่ภายใน (รูปที่ 7b) รูปดังกล่าวนี้สนับสนุนการอธิบายผลก่อนหน้านี้นี้เกี่ยวกับรูพรุนจำนวนมากในเซลล์ดักติดซึ่งส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ยากลำบากภายในเซลล์ดักติด สำหรับรูปที่ 8a ซึ่งแสดงเซลล์ดักติดด้วย PVA พบว่ามีรูพรุนจำนวนมากและผิวหยาบ โดยรูพรุนมีขนาดประมาณ 10 - 20 μm นอกจากนี้ในรูปที่ 8b และ c ซึ่งเป็นวัสดุดักติด PVA (ไม่มีเซลล์จุลินทรีย์) พบกลุ่มก้อนของ AgNP ลักษณะคล้ายลูกบอล ผลในรูปดังกล่าวสามารถกล่าวได้ว่าวัสดุดักติด PVA นอกจากจะลดโอกาสสัมผัสของเซลล์และ AgNP แล้วยังปกป้องจุลินทรีย์จาก AgNP ทางกายภาพโดยรวมกลุ่มและยึด AgNP ด้วยวัสดุดักติด (รูปที่ 8c)

เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ดักติดด้วย PVA และ CA พบว่าแม้วัสดุดักติดด้วย CA ไม่สามารถยึด AgNP ได้ดัง PVA แต่เซลล์ดักติดด้วย CA ยังมีประสิทธิภาพดีกว่าซึ่งคาดว่าเกิดจากโครงสร้างของ CA มีความละเอียดมากกว่า PVA จากผลนี้ยังสามารถชี้ได้อีกว่ากลไกการปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ในกรณีนี้คาดว่าป็นกลไกทางกายภาพเป็นสำคัญ



รูปที่ 7 เซลล์ดักติดด้วย CA a) ที่กำลังขยาย 150× และ b) ที่กำลังขยาย 10,000×



รูปที่ 8 เซลล์ดักติดด้วย PVA a) ที่กำลังขยาย 1,500× b) การรวมกลุ่มของ AgNP ในวัสดุดักติด PVA (ไม่มี NAS) ที่กำลังขยาย 1,000× และ c) การรวมกลุ่มของ AgNP ในวัสดุดักติด PVA (ไม่มี NAS) ที่กำลังขยาย 10,000×

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

- 1) กระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันเป็นไปตามโมเดลของ Michaelis-Menten โดยมีค่า OUR_{max} และ K_s ของกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน OUR_{max} เท่ากับ 0.2132 และ 0.2273 mg-O₂/L/min และ K_s เท่ากับ 5.42 และ 15.87 mg-N/L ตามลำดับ
- 2) ภายใต้สภาวะที่มี AgNP เมื่อความเข้มข้นของ AgNP เริ่มต้นสูงส่งผลให้ OUR_{max} และ K_s ลดลง โดยจลนพลศาสตร์การยับยั้งด้วย AgNP ในการศึกษาเป็นแบบไม่มีการแข่งขันทั้งในกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน ซึ่งมีค่าคงที่การยับยั้ง K_i ของกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน เท่ากับ 9.3 และ 5.5 mg/L ตามลำดับ

- 3) เมื่อ AgNP มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นระดับของการยับยั้งของสูงขึ้น AgNP ที่ความเข้มข้น 0.25 ถึง 10.00 mg/L ส่งผลให้เกิดการยับยั้งร้อยละ 8 ถึง 38 ในกระบวนการไนตริฟิเคชันและร้อยละ 14 ถึง 28 ในกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน ส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นมิได้มีผลต่อร้อยละการยับยั้งอย่างชัดเจน
- 4) เซลล์จุลินทรีย์ถูกทำลายด้วย AgNP ในลักษณะที่ผนังและเยื่อหุ้มเซลล์ยุบและฉีกขาด นอกจากนี้ยังพบว่าการรั่วไหลของสารภายในเซลล์
- 5) *OUR* ของการทดลองด้วยเซลล์ดักติดด้วย PVA ขนาดเล็กและใหญ่มี *OUR* เท่ากับ 0.000-0.006 และ 0.006-0.014 mg-O₂/L/min ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ชุดทดลองที่ไม่มี AgNP) พบว่ากิจกรรมไนตริฟิเคชันคิดเป็นร้อยละ 5-11 และ 44-88 ของชุดควบคุม ส่วนในชุดทดลองเซลล์ดักติดด้วย CA ขนาดเล็กและใหญ่พบว่ามีค่า *OUR* ระหว่าง 0.009-0.014 และ 0.019-0.024 mg-O₂/L/min ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่ากิจกรรมไนตริฟิเคชันคิดเป็นร้อยละ 65-110 และ 81-94 ของชุดควบคุม
- 6) เซลล์ในวัสดุดักติดขนาดใหญ่ได้รับผลจาก AgNP น้อยกว่า (การเปลี่ยนถ่ายมวลสารพิษน้อยกว่า) ส่งผลให้คงกิจกรรมไนตริฟิเคชันได้ดีกว่า
- 7) เซลล์ดักติดด้วย CA ลดการยับยั้งดีกว่า PVA เนื่องจากมีโครงสร้างที่ละเอียดกว่า
- 8) จากการศึกษาลักษณะเซลล์ดักติดในระดับจุลภาคพบว่ากลไกการปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ในกรณีนี้คาดว่าเป็นกลไกทางกายภาพเป็นสำคัญ

ข้อเสนอแนะ

- 1) ควรมีการทดลองสภาวะดำเนินระบบบำบัดด้วยเซลล์ดักติดที่เหมาะสม เช่น ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม ระยะเวลาพักน้ำ (hydraulic retention time) ระยะเวลาพักเซลล์ (solid retention time) เป็นต้น เพื่อศึกษาความเหมาะสมก่อนการประยุกต์ใช้จริงต่อไป
- 2) ควรมีการศึกษาความคงทนของเซลล์ดักติด เพื่อให้ทราบความเหมาะสมในการใช้งานจริงต่อไป รวมทั้งควรมีงานศึกษาครอบคลุมการพัฒนาวัสดุดักติดที่มีความคงทนสูงมากขึ้น
- 3) ควรมีงานศึกษาต่อเนื่องในประเด็นกลไกการเสริมของ AgNP ให้เกิดการยับยั้งด้วยตัวเอง
- 4) ควรมีการศึกษากลไกการยับยั้งของ AgNP ในระดับชีวโมเลกุล

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ดำเนินการภายใต้ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี 2553 ซึ่งสนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ผู้วิจัยขอขอบคุณ Prof. Dr. Eakalak Khan และ รศ.ดร. อลิสา วังโน ที่ปรึกษางานวิจัยนี้ที่ให้คำแนะนำแนวทางการดำเนินงานวิจัยและการจัดเตรียมบทความเพื่อการตีพิมพ์เผยแพร่ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.ดร.ตะวัน ลิ้มปิยากร ชุติมา พลอยจันทร์กุล และ Nguyen Thanh Giao ผู้ร่วมดำเนินงานวิจัยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผศ.ดร. สุมณา สิริพัฒนานกุล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	iii
บทสรุปผู้บริหาร	v
กิตติกรรมประกาศ	xvii
สารบัญ	xviii
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ซิลเวอร์อนุภาคขนาดนาโน	4
2.2 กระบวนการไนตริฟิเคชัน	14
2.3 เซลล์ดักติด	15
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	21
3.1 กรอบการวิจัย	21
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	21
3.2.1 สมบัติของซิลเวอร์อนุภาคขนาดนาโน	23
3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและปรับสภาพเชื้อไนตริฟายอิง	23
3.2.3 การทดลองการศึกษาผลของ AgNP ในการยับยั้งกระบวนการไนตริฟิเคชัน	24
3.2.4 การทดลองการปรับปรุงศักยภาพของกระบวนการด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์	27

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	29
4.1 ผลของ AgNP ต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน	29
4.1.1 ลักษณะการยับยั้งของ AgNP ต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน	29
4.1.2 ผลของ AgNP ต่อลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างทางชีวภาพของกลุ่มจุลินทรีย์	34
4.2 ผลการปรับปรุงศักยภาพของกระบวนการด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์	36
4.2.1 กระบวนการไนตริฟิเคชันด้วยเซลล์ดักติด	36
4.2.2 ผลของ AgNP ต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์ดักติด	39
 บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	 42
5.1 สรุปผลการวิจัย	42
5.2 ข้อเสนอแนะ	43
 บรรณานุกรม	 44
 ภาคผนวก	 53
ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมตัวอย่างและเซลล์ดักติด	53
ภาคผนวก ข บทความวิชาการ	57

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันซิลเวอร์อนุภาคนาโน (silver nanoparticle; AgNP) เป็นส่วนประกอบของวัสดุที่ใช้ทั่วไปในบ้านเรือนและชีวิตประจำวันหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด เครื่องสำอาง ยา และสิ่งทอ ตลอดจนในระบบประปา โดย AgNP มีประโยชน์เพื่อเป็นสารฆ่าเชื้อหรือป้องกันการเกิดจุลินทรีย์ (Li et al., 2008; Blaser et al., 2008) แม้ปัจจุบันยังไม่มีผลการศึกษาการตกค้างของ AgNP ในสิ่งแวดล้อมอย่างชัดเจน แต่มีรายงานการใช้ AgNP ปริมาณมากขึ้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา เช่น ในทวีปยุโรปมีรายงานการใช้ AgNP 30 ตันต่อปีในปี ค.ศ. 2004 ซึ่งเพิ่มขึ้นเป็น 500 เท่าจากปี ค.ศ. 2000 (Li et al., 2008) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าในอนาคตอันใกล้ AgNP จะตกค้างในสิ่งแวดล้อมปริมาณสูงเช่นกัน ซิลเวอร์เป็นโลหะหนักชนิดหนึ่งที่มีความเป็นพิษทั้งต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม โดยมีรายงานความเป็นพิษทั้งต่อเซลล์สัตว์ แบคทีเรีย และไวรัส (Xu et al., 2004; Elichiguerra et al., 2005; Limbach et al., 2007) การศึกษาในอดีตพบว่าซิลเวอร์สามารถทำลายผนัง/เยื่อหุ้ม/ซึมผ่านเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งระยะยาวอาจส่งผลต่อการมีชีวิต (Feng et al., 2000; Lok et al., 2006; Choi et al., 2008) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อซิลเวอร์มีอนุภาคนาโนจะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตสูงกว่าอนุภาคขนาดไมโครถึง 100 เท่า (Lok et al., 2006) ดังนั้นหากมี AgNP ตกค้างในสิ่งแวดล้อมแม้เพียงปริมาณน้อยก็สามารถส่งผลกระทบต่อระบบสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศวิทยาได้

ระบบบำบัดน้ำเสียเป็นหน่วยสิ่งแวดล้อมหนึ่งที่ AgNP อาจตกค้างได้ จากการศึกษาของ Blaser et al. (2008) พบว่า AgNP ส่วนใหญ่จะเข้าสู่หน่วยสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ผ่านระบบบำบัดน้ำเสีย ไม่ว่าจะเป็นระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมการผลิตที่ใช้ AgNP เป็นวัตถุดิบหรือจากน้ำเสียชุมชนที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบเป็น AgNP เมื่อ AgNP เข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียแล้วอนุภาคบางส่วนจะละลายอยู่ในน้ำเสีย แต่อนุภาคส่วนใหญ่จะถูกดูดซับอยู่กับตะกอน (sludge) ในระบบบำบัดน้ำเสีย โดยมีการคาดการณ์ว่าอาจมี AgNP ตกค้างได้สูงถึง 39 mg-Ag/kg dry sewage sludge จากสถานการณ์นี้จะเห็นว่า AgNP มีแนวโน้มที่จะส่งผลกระทบต่อตะกอนจุลินทรีย์และระบบบำบัดน้ำเสียอย่างรุนแรงได้ในอนาคต

สำหรับหน่วยบำบัดน้ำเสียทั่วไปมีกระบวนการบำบัดหลัก 2 กระบวนการ คือ การกำจัดคาร์บอน (carbonaceous removal) และการกำจัดไนโตรเจน (nitrogenous removal) ด้วยกระบวนการไนตริฟิเคชัน-ดีไนตริฟิเคชัน (nitrification-denitrification processes) เป็นที่รู้จักกันทั่วไปว่ากระบวนการไนตริฟิเคชันเป็นกระบวนการที่มีความอ่อนไหวต่อสิ่งแวดล้อมและสภาวะในการเดินระบบ เช่น ในสภาวะที่มีอุณหภูมิหรือความเข้มข้นของออกซิเจนละลายสูงหรือต่ำเกินไป เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษาจึงมุ่งเน้นการศึกษาระบบบำบัดน้ำเสียในส่วนของกระบวนการไนตริฟิเคชัน จากการศึกษาในอดีตพบว่ากระบวนการไนตริฟิเคชันเมื่อมี

ปนเปื้อนของสารพิษประสิทธิภาพการทำงานจะลดลงมาก เช่น ในการศึกษาของ Park and Ely (2008) พบว่าเมื่อ *Nitrosomonas europaea* ได้รับสารประกอบคลอไรด์ของแคดเมียม โปรท และทองแดง ที่ความเข้มข้นระหว่าง 1-8 mg/L ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานลดลงถึงร้อยละ 90 สำหรับการศึกษากการปนเปื้อนของ AgNP พบว่าที่ความเข้มข้นตกค้างเพียง 1 mg/L กระบวนการไนตริฟิเคชันถูกยับยั้งสูงถึงร้อยละ 86 (Choi et al., 2008) การศึกษาของ Choi et al. (2008) เป็น 1 ใน 4 การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับผลของ AgNP ต่อระบบบำบัดน้ำเสียที่มีอยู่ในปัจจุบัน (Choi et al., 2008; Choi and Hu., 2008; Choi et al., 2009; Choi and Hu, 2009) ซึ่งงานวิจัยเหล่านี้มุ่งเน้นในการศึกษาลักษณะของ AgNP และผลของสารประกอบเกลือและลิแกนด์ต่อความเป็นพิษของ AgNP ในกระบวนการไนตริฟิเคชันเท่านั้น แต่ต้องรู้ความรู้อย่างยิ่งว่ายังไม่เพียงพอต่อการระบุความเป็นไป (Fate) ของ AgNP ทั้งต่อระบบบำบัดน้ำเสียและสิ่งแวดล้อม และนอกจากนี้ในปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาผลของ AgNP ต่อกลุ่มจุลินทรีย์ รวมทั้งแนวทางป้องกันปัญหาการปนเปื้อนของ AgNP ต่อระบบบำบัดน้ำเสีย

สำหรับแนวทางแก้ปัญหาความล้มเหลวของระบบบำบัดน้ำเสียวิธีหนึ่ง คือ เทคนิคการดักติดเซลล์ (cell entrapment) เทคนิคนี้เป็นการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ไว้ภายในสารพอลิเมอร์ เช่น สารแคลเซียมแอลจีเนต (calcium alginate; CA) สารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol; PVA) เป็นต้น (Siripattanakul et al., 2008a; Siripattanakul et al., 2008b) ภาพที่ 1 เป็นภาพตัวอย่างของเซลล์ดักติดด้วย CA ระบบดังกล่าวมีข้อดีหลายประการ คือ สามารถควบคุมปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ได้ และสารพอลิเมอร์สามารถป้องกันจุลินทรีย์จากสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ เช่น สภาพที่มีความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำเกินไป สภาพที่มีอุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป สภาพที่มีสารพิษ เป็นต้น (van Veen et al., 1997; Siripattanakul et al., 2008b; Siripattanakul and Khan, 2010) นอกจากนี้จากลักษณะโครงสร้างของเซลล์ดักติดซึ่งเป็นโครงตาข่าย (Siripattanakul et al., 2008b) มีแนวโน้มที่จะป้องกัน AgNP ไม่ให้เกาะติดเซลล์จุลินทรีย์ได้ จากสมบัติของเซลล์ดักติดดังกล่าวระบบเซลล์ดักติดเป็นระบบที่มีศักยภาพในการประยุกต์เพื่อป้องกันปัญหาที่กล่าวถึงข้างต้น โดยระบบเซลล์ดักติดนอกจากจะมีความเหมาะสมในด้านสมบัติแล้ว วิธีการผลิตเซลล์ดักติดเป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายน้อย ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์หรือเทคโนโลยีขั้นสูง รวมทั้งเซลล์ดักติดสามารถนำไปใช้กับระบบบำบัดน้ำเสียที่มีอยู่เดิมได้ อย่างไรก็ตามในการประยุกต์ใช้เทคนิคการดักติดเซลล์ให้ประสบความสำเร็จ จำเป็นจะต้องศึกษาหาสภาวะ ชนิด และขนาดของเซลล์ดักติดที่เหมาะสม มิฉะนั้นเทคนิคดังกล่าวนอกจากจะไม่ได้ช่วยแก้ปัญหา แต่ยังอาจส่งผลให้เกิดปัญหาของการซึมผ่านของอาหารและออกซิเจน (substrate and oxygen diffusion)

จากเหตุผลข้างต้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาผลของ AgNP ต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันและการปรับปรุงศักยภาพของกระบวนการด้วยเทคนิคเซลล์ดักติด โดยปัจจัยที่ศึกษา คือ ความเข้มข้นของ AgNP ชนิดของเซลล์ดักติด (CA และ PVA) และขนาดของเซลล์ดักติดต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน รวมทั้งศึกษาลักษณะทางกายภาพ (physiology) และโครงสร้าง

ของกลุ่มจุลินทรีย์ (microbial community structure) ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ดักติดเมื่อมีการปนเปื้อนของ AgNP

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายหลักของโครงการ คือ เพื่อให้ทราบถึงความเป็นไปของ AgNP ต่อระบบบำบัดน้ำเสีย ทั้งในแง่ศักยภาพในการทำงานและผลต่อจุลินทรีย์ รวมทั้งหาแนวทางในการป้องกันปัญหาดังกล่าว เพื่อให้งานวิจัยบรรลุเป้าหมายนี้งานวิจัยมีรายละเอียดของวัตถุประสงค์การวิจัย ดังนี้

- 1) เพื่อศึกษาผลของ AgNP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน
- 2) เพื่อศึกษาผลของ AgNP ต่อลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์
- 3) เพื่อศึกษาผลของ AgNP ต่อโครงสร้างทางชีวภาพของจุลินทรีย์
- 4) เพื่อศึกษาการปรับปรุงศักยภาพของกระบวนการด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์ด้วยสารดักติดต่างชนิดและต่างขนาด

1.3 ขอบเขตการวิจัย

- 1) AgNP สังเคราะห์ด้วยกระบวนการโบโรไฮไดรด์รีดักชัน (borohydride reduction process)
- 2) จุลินทรีย์ไนตริฟายอิงเพาะเลี้ยงมาจากตะกอนจุลินทรีย์จากระบบตะกอนเร่ง โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 6 เดือน ก่อนใช้งาน
- 3) การทดลองเป็นแบบกะ (batch) ในระดับห้องปฏิบัติการ
- 4) การทดลองกระบวนการไนตริฟิเคชันเป็นไปตามวิธีทางเรสไพโรเมตริก (respirometric method)
- 5) วิธีการดักติดเซลล์ในงานวิจัยนี้ คือ การดักติดด้วย CA และ PVA
- 6) การทดลองนี้ศึกษาขนาดของเซลล์ดักติดต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน โดยขนาดที่ศึกษา คือ 3 และ 7 mm เป็นตัวแทนเม็ดเซลล์ตรึงขนาดเล็กและใหญ่ตามลำดับ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ซิลเวอร์นาโนภาคขนาดนาโน

2.1.1 การสังเคราะห์และการใช้ประโยชน์ซิลเวอร์นาโนภาคขนาดนาโน

วิธีการสังเคราะห์ AgNP มีหลายวิธีการเพื่อให้ได้สารที่มีสมบัติ (ขนาด รูปร่าง และ พื้นผิว) ตามที่ต้องการ (Xu et al., 2006; Choi and Hu, 2008; Durán et al., 2010; Marambio-Jones and Hoek, 2010) โดยทั่วไปวิธีการสังเคราะห์สารดังกล่าวสามารถจำแนกออกได้เป็น 3 ประเภท ซึ่งประกอบด้วย วิธีการทางกายภาพ วิธีการทางเคมี และวิธีการทางชีววิทยา รายละเอียดของวิธีการแสดงดังตารางที่ 2.1

วิธีการทางกายภาพเป็นวิธีการที่ไม่ใช้สารเคมีหรือใช้เพียงเล็กน้อยแต่โดยทั่วไปใช้พลังงานและเวลานาน (Abou El-Nour et al., 2010) ส่วนวิธีการทางเคมีเป็นวิธีการที่เป็นที่นิยมมากที่สุด (Marambio-Jones and Hoek, 2010) เนื่องจากวิธีการดังกล่าวดำเนินการง่ายและใช้เพียงเครื่องมือพื้นฐานทั่วไป นอกจากนี้วิธีการนี้ยังสามารถปรับปรุงเพื่อให้ได้วัสดุที่มีคุณสมบัติตรงตามที่ต้องการได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ส่วนมากใช้สารเคมีอันตรายในการสังเคราะห์หลายชนิด (Marambio-Jones and Hoek, 2010) ดังนั้นวิธีการทางชีววิทยาจึงได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยวิธีการนี้ใช้สารจากธรรมชาติในการสังเคราะห์ เช่น สารสกัดจากพืช สารสกัดจากจุลินทรีย์ เป็นต้น (Darroudi et al., 2010)

AgNP ได้ถูกพัฒนาเพื่อใช้ในงานหลากหลายประเภท เช่น การใช้งานทางการแพทย์ การใช้งานในบ้านเรือน และ การใช้งานในอุตสาหกรรม เป็นต้น (Abou El-Nour et al., 2010; Arvizo et al., 2012) สำหรับการใช้งานทางการแพทย์ AgNP ใช้สำหรับการฆ่าเชื้อ และการรักษาโรค เช่น การลดการติดเชื้อและอักเสบในบาดแผล การฆ่าเชื้อโรคในเครื่องมือทางการแพทย์ การบำบัดเนื้องอก และการปลูกถ่ายหลอดเลือด (Atiyeh et al., 2007; Tian et al., 2007; Chen and Schluesener, 2008; Rai et al., 2009; Chaloupka et al., 2010; Arvizo et al., 2012) ส่วนการใช้งานในบ้านเรือน AgNP เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์หลายชนิดเพื่อใช้ป้องกันเชื้อโรค เช่น เสื้อผ้า เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์พลาสติก เป็นต้น (Benn and Westerhoff, 2008; Blaser et al., 2008; Chaudhry et al., 2008; Kokura et al., 2010) ในงานทางอุตสาหกรรม AgNP ถูกใช้ในการผลิตเซ็นเซอร์ (McFarland and Van Duyne, 2003; Ren et al., 2005; Zheng et al., 2008) นอกจากนี้ในปัจจุบันยังพบอีกว่า AgNP ได้ถูกนำมาใช้ในกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำและน้ำเสีย เช่น การกำจัดแบคทีเรียในน้ำดื่ม เป็นต้น (Lv et al., 2009; Wu et al., 2010; Dankovich and Gray, 2011; Manimegalai et al., 2011)

ตารางที่ 2.1 วิธีการสังเคราะห์ซิลเวอร์อนุภาคนาโน

Method	Method description	Examples
<u>Physical approach</u>		
Evaporation/condensation	Silver ion solution is vaporized into a carrier gas and then cooled for nucleation and nanoparticle formation.	Lehtinen et al. (2004) Baker et al. (2005) Raffi et al. (2007)
Irradiation	Silver nanoparticles are produced by irradiating (laser, microwave, or ionization) silver solution. The particle size could be controlled by variation of irradiation time and laser power.	Becker et al. (1998) Mafuné et al. (2000) Pyatenko et al. (2004) Amendola et al. (2007)
<u>Chemical approach</u>		
Chemical reduction	Silver ion in a solution is reduced by a reducing agent (such as borohydride, citrate, poly (vinylpyrrolidone), and poly (ethylene glycol)) and formed silver atom (Ag^0). The silver atoms agglomerate and become particles. Also, a capping agent (such as surfactant) might be used to stabilize AgNPs.	Bokshits et al. (2004) He et al. (2004) Wang et al. (2005) Hsu and Wu (2007)
Electrochemical reduction	A silver anode is electrochemically dissolved in a solvent. The silver nanoparticles are then separated from the solvent.	Rodríguez-Sánchez et al. (2000) Yin et al. (2003) Murray et al. (2005)

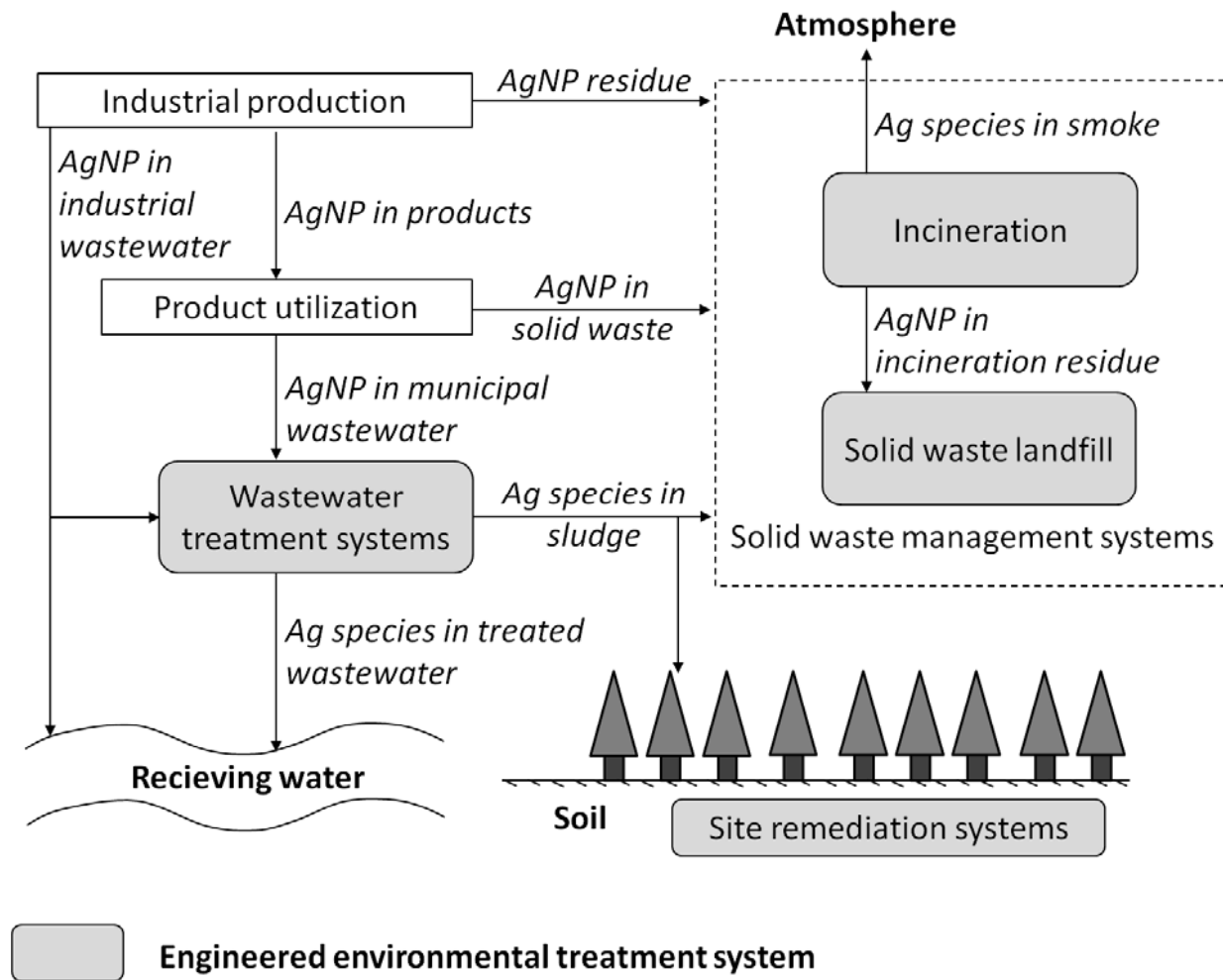
Method	Method description	Examples
Photochemical reduction	Silver ion in a solution is reduced by a reducing agent and then irradiated to form silver nanoparticles.	Pietrobon and Kitaev (2008) Maretti et al. (2009)
<u>Biological approach</u>	The method is biochemical reduction. It is similar to chemical reduction method but use extracts from organisms (microorganisms and plants) as reducing agents and/or capping agents. The well-known biological extracts used for AgNP synthesis are proteins, amino acids, and polysaccharides.	Sharma et al. (2009) Darroudi et al.(2010) Marambio-Jones and Hoek (2010)

2.1.2 ความเป็นไปและการปนเปื้อนของซิลเวอร์อนุภาคขนาดนาโน

ในการประยุกต์ใช้จริง AgNP จัดเป็นวัสดุชนิดใหม่ ดังนั้นความเป็นไปและการปนเปื้อนของซิลเวอร์อนุภาคขนาดนาโนจึงยังไม่ชัดเจนนัก ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลสมมูลมวลของ AgNP ในสิ่งแวดล้อม มีเพียงข้อมูลจากการคาดการณ์จากแบบจำลองคณิตศาสตร์หรือการตรวจติดตามในระดับห้องปฏิบัติการหรือระดับนําร่องเป็นส่วนใหญ่ (Blaser et al., 2008; Benn and Westerhoff, 2008; Kaegi et al., 2010; Kim et al., 2010)

Blaser et al. (2008) ได้รวบรวมข้อมูลและรายงานถึงความเป็นไปของ AgNP ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและพลาสติก การศึกษาดังกล่าวยืนยันว่าในหลายประเทศ เช่น ประเทศในทวีปเอเชีย อเมริกาเหนือ และยุโรป พบว่า AgNP เหลือทิ้งส่วนมากปนเปื้อนเข้าสู่ระบบการจัดการมูลฝอยซึ่งสุดท้ายสะสมในหลุมฝังกลบมูลฝอย ส่วน AgNP บางส่วน (ประมาณ 190-410 ton/yr) ผ่านเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสีย และที่สุดจึงกระจายลงแหล่งน้ำธรรมชาติและดิน นอกจากนี้ยังพบว่า AgNP ปริมาณน้อยกระจายสู่บรรยากาศจากควันของกระบวนการเผาไหม้มูลฝอย ข้อมูลดังกล่าวนี้สามารถแจกแจงความเป็นไปของ AgNP ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและพลาสติกได้ดังรูปที่ 2.1

จากรูปที่ 2.1 ยังสามารถสังเกตเพิ่มเติมได้อีกว่าภายหลัง AgNP เคลื่อนที่ผ่านกระบวนการต่าง ๆ AgNP อาจเปลี่ยนฟอร์มได้ (Nowack, 2010) ในปี ค.ศ. 2010 Kim et al. พบซิลเวอร์ซัลไฟด์อนุภาคขนาดนาโน (Ag_2S) ในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียแห่งหนึ่งในประเทศสหรัฐอเมริกา ปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้คาดว่าจะเกิดจาก AgNP เปลี่ยนฟอร์มเป็น Ag^+ และ Ag_2S ในที่สุด ในเวลาต่อมา Kaegi et al. (2011) รายงานยืนยันว่า AgNP เปลี่ยนฟอร์มเป็น Ag_2S ในระบบบำบัดน้ำเสียที่ไม่มีการเติมอากาศ ส่งผลให้มี Ag_2S เป็นตะกอนของแข็งแขวนลอยในน้ำผ่านการบำบัดหรือดูดซับที่ผิวของตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย ตารางที่ 2.2 ได้สรุปรวบรวมการปนเปื้อนของ AgNP จากงานในอดีต โดยพบว่ามีรายงานการปนเปื้อนหลากหลายทั้งมากและน้อยแตกต่างกันไปตามเทคโนโลยีการผลิต ระบบรวบรวมและบำบัดน้ำเสีย และลักษณะน้ำเสียจากกิจกรรมต่าง ๆ (Benn and Westerhoff, 2008; Kim et al., 2010; Nowack, 2010; Hoque et al., 2012)



รูปที่ 2.1 ความเป็นไปของ AgNP ในสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 2.2 การปนเปื้อนของ AgNP ในสิ่งแวดล้อมจากงานในอดีต

Study description	Silver detected form	Contaminated concentration	Location	Reference
Silver released from nanoparticles incorporated into textiles and plastics and risk freshwater ecosystems were determined.	Total Ag (model)	Predicted silver concentrations in WWTS and sludge were 2-18 $\mu\text{g/L}$ and 7-39 mg/kg, respectively. The silver concentrations in Rhine river were estimated at up to 148 ng/L.	Switzerland	Blaser et al. (2008)
Quantities of AgNPs released into environment and their risk were modelled.	AgNP (model)	Predicted AgNP concentrations in air, water, and soil ranged 0.002-0.004 $\mu\text{g/m}^3$, 0.03-0.08 $\mu\text{g/L}$, 0.02-0.1 $\mu\text{g/kg}$, respectively.	Switzerland	Muller and Nowack (2008)

Probabilistic material flow analysis was used to model AgNP concentrations in environment.	AgNP (model)	Predicted AgNP concentrations in soil, sludge treated soil, surface water, WWTS effluent, WWTS sludge, sediment, and air in Europe were 22.7 ng/kg/yr, 1,581 ng/kg/yr, 0.8 ng/L, 42.5 ng/L, 1.7 mg/kg, 952 ng/kg/yr, and 0.008 ng/m³, respectively. Predicted AgNP concentrations in soil, sludge treated soil, surface water, WWTS effluent, WWTS sludge, sediment, and air in USA were 8.3 ng/kg/yr, 662 ng/kg/yr, 0.1 ng/L, 21 ng/L, 1.6 mg/kg, 195 ng/kg/yr, and 0.002 ng/m³, respectively. Predicted AgNP concentrations in soil, surface water, WWTS effluent, WWTS sludge, sediment, and air in Switzerland were 11.2 ng/kg/yr, 0.7 ng/L, 38.7 ng/L, 1.9 mg/kg, 1,203 ng/kg/yr, and 0.021 ng/m³, respectively.	Europe, USA, and Switzerland	Gottschalk et al. (2009)
Release of AgNPs from paints used for outdoor applications <i>via</i> rain was investigated.	Total Ag	Silver nanoparticles could leach at the concentration of up to 145 µg-Ag/L during the initial runoff event.	Switzerland	Kaegi et al. (2010)

Predicted AgNP concentrations releasing from cosmetic-based nano-products to environment were predicted and used for risk assessment.	AgNP (model)	Silver nanoparticles released into wastewater were 7.8-306.6 kg/annum while AgNPs in WWTSSs were 6.2-184.2 kg/annum. Silver nanoparticles of 2.8-183.2 kg/annum were released into aquatic systems. The predicted AgNP concentration in aquatic ecosystem were 0.003 to 0.619 µg/L.	Johannesburg, South Africa	Musee et al. (2010)
Silver nanoparticle analysis by an inductively coupled plasma–mass spectrometry, operated in a single-particle counting mode technique was developed. Influent and effluent samples from a wastewater treatment in Boulder, CO, USA were detected for AgNP concentrations.	Dissolved silver (dAg) and AgNP	In influent, dAg of 520 ng/L and AgNPs of 200 ng/L were detected while dAg of 60 ng/L and AgNPs of 100 ng/L were measured in the final effluent.	Boulder, CO, USA	Mitrano et al. (2011)

Novel detection method for AgNPs was developed. The AgNP concentrations in surface water and influent of a wastewater treatment plant were detected.	AgNP	The concentration and size of AgNPs in the influent from a wastewater treatment in Peterborough, Ontario, Canada were 1.90 ng/mL and 9.3 nm, respectively. Surface water samples collected from Plastic Lake, Chemong Lake, and Otonabee River in central Ontario, Canada did not detect AgNPs at detection limit of 0.8 ng/mL.	Ontario, Canada	Hoque et al. (2012)
--	------	---	-----------------	---------------------

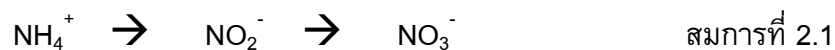
2.1.3 ความเป็นพิษของซิลเวอร์นาโน

งานวิจัยในอดีตได้ระบุถึงความเป็นพิษของ AgNP ทั้งต่อ จุลินทรีย์ พืช สัตว์ และ มนุษย์ (Lok et al., 2006; Choi et al., 2008; Damm et al., 2008; Marambio-Jones and Hoek, 2010; Guzman, 2012; Lapresta-Fernández et al., 2012) AgNP สามารถทำลาย เซลล์ได้ทั้งจาก 1) AgNP เอง 2) Ag^+ และ 3) รีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (reactive oxygen species; ROS) ซึ่งเกิดจาก AgNP (Choi et al., 2008; Asharani et al., 2009; Marambio-Jones and Hoek, 2010) กลไกความเป็นพิษอาจเกิดได้จาก AgNP ทำลายผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และส่วนประกอบอื่น ๆ ของเซลล์ AgNP ยับยั้งกระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์ และ AgNP ทำลาย DNA ของเซลล์ ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

- 1) AgNP ทำลายผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และส่วนประกอบอื่น ๆ ของเซลล์ กลไกนี้เกิดจาก AgNP ยึดเกาะที่ผนังเซลล์ จากนั้นซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แล้วเข้าทำลายส่วนประกอบของเซลล์ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าระดับของความเป็นพิษของ AgNP แตกต่างไปตามลักษณะเซลล์ ตัวอย่างเช่นสำหรับแบคทีเรียโดยทั่วไปพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกคงทนต่อ AgNP สูงกว่าแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นเพปติโดไกลแคน (peptidoglycan layer) ที่หนาซึ่งสามารถปกป้อง AgNP ได้ดีกว่า (Jung et al., 2008; Guzman, 2012) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยรายงานว่าซิลเวอร์ (AgNP และ Ag^+) ส่วนใหญ่เกาะติดที่ผิวของเซลล์ที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (Morones et al. 2005; Hwang et al., 2008)
- 2) AgNP ยับยั้งกระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์และทำลาย DNA กลไกการยับยั้งนี้เกิดจาก Ag^+ ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเรสไพเรชันของเซลล์ (Marambio-Jones and Hoek, 2010; Lapresta-Fernández et al., 2012) โดยพบว่าซิลเวอร์ทำปฏิกิริยากับกลุ่มไทออล (thiol group; -SH) ที่อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Durán et al., 2010; Marambio-Jones and Hoek, 2010) นอกจากนี้ Ag^+ ยังยับยั้งการสังเคราะห์ ATP และการรับฟอสเฟต รวมทั้งยังเพิ่มการกลายของ DNA (DNA mutation) ส่วน ROS สามารถผลิตสารอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งส่งผลทำลายไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นเหตุให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย โปรตีนทำงานผิดปกติ และทำลาย DNA ในที่สุด (Mendis et al., 2005; Nel et al., 2006; Choi et al., 2008; Marambio-Jones and Hoek, 2010)

2.2 กระบวนการไนตริฟิเคชัน

ในระบบบำบัดน้ำเสียทั่วไป สารประกอบไนโตรเจนส่วนมากอยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ ไนโตรเจนหรือยูเรีย สารดังกล่าวจะถูกย่อยสลาย (Degradation) หรือไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ขั้นตอนนี้สารประกอบจะเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียม (NH_4^+) แล้วจากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการไนตริฟิเคชัน โดยกระบวนการนี้เป็นกระบวนการเปลี่ยนแอมโมเนียมให้เป็นไนเตรท ภายใต้สภาวะใช้ออกซิเจนดังแสดงในสมการที่ 2.1 กระบวนการนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอน กล่าวคือ แอมโมเนียมจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ (NO_2^-) และไนไตรท์จะถูกเปลี่ยนเป็นไนเตรท (NO_3^-) ในที่สุด ปัจจัยควบคุมในกระบวนการไนตริฟิเคชัน คือ อุณหภูมิ สารอาหาร ความเข้มข้นของแอมโมเนียมเริ่มต้น สารพิษ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณออกซิเจน (Gerardi, 2002)



จุลินทรีย์ภายในกระบวนการไนตริฟิเคชันแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามขั้นตอนของกระบวนการ โดยกลุ่มจุลินทรีย์ในขั้นตอนแรก คือ จุลินทรีย์ที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนีย (Ammonia-oxidizing microorganism) จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีทั้งที่เป็นแบคทีเรียและอาเคีย (Achea) (Leininger et al., 2006) ในอดีตจุลินทรีย์หลักในกลุ่มนี้ คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ในสกุล *Nitrosococcus* *Nitrosocystis* *Nitrosolobus* *Nitrosomonas* และ *Nitrosospira* (Gerardi, 2002) โดยแบคทีเรียชนิดหลัก คือ *Nitrosomonas* จนกระทั่งในช่วง 5 ปีหลังนี้จึงได้มีการค้นพบอาเคียที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียได้ (Konneke et al., 2005) ส่วนจุลินทรีย์กลุ่มที่สอง คือ จุลินทรีย์ที่สามารถออกซิไดซ์ไนไตรท์ (Nitrite-oxidizing microorganism) จุลินทรีย์หลักในกลุ่มนี้ คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ในสกุล *Nitrobacter* *Nitrococcus* และ *Nitrospira* โดยแบคทีเรียชนิดหลัก คือ *Nitrobacter*

กระบวนการไนตริฟิเคชันเป็นกระบวนการที่มีข้อจำกัดของอัตราการเกิดปฏิกิริยา (Rate-limiting process) โดยขั้นตอนที่เป็นปัจจัยหลัก คือ ขั้นตอนแรก เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความอ่อนไหวต่อสภาวะภายนอกมาก เช่น แม้แบคทีเรียไนตริฟายอิงเป็นแบคทีเรียแบบใช้อากาศ แต่ที่สภาวะที่มีออกซิเจนละลายสูงกว่า 1 mg/L O_2 จะส่งผลถึงจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียและประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว (Park and Noguera, 2004) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นรายงานผลกระทบเนื่องจากการปนเปื้อนของสารพิษ Park and Ely (2008) พบว่าเมื่อ *Nitrosomonas europaea* ได้รับสารประกอบคลอไรด์ของโลหะหนักที่ความเข้มข้นระหว่าง $1\text{-}8 \text{ mg/L}$ ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานลดลงถึงร้อยละ 90

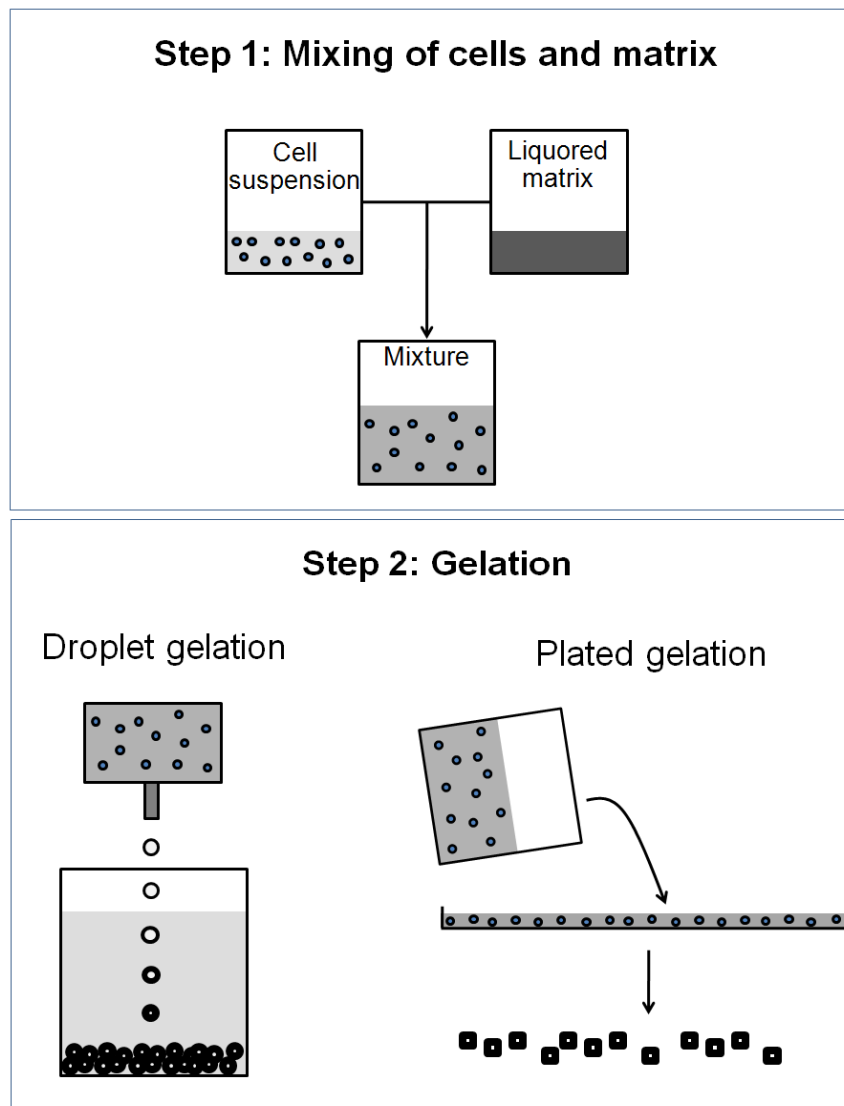
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการในตรีฟิเคชันมีมายาวนานกว่า 20 ปี ดังนั้นงานวิจัยทางด้านปัจจัยการเดินระบบ หรือสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียทั่วไปได้มีงานศึกษามากมาย ปัจจุบันทิศทางการวิจัยมีความเฉพาะมากขึ้น โดยอาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ซึ่งได้แก่ 1) งานวิจัยการพัฒนาระบบบำบัดน้ำเสียใหม่ เช่น กระบวนการ SHARON (Hellings et al., 1998) การปรับปรุงประสิทธิภาพการทำงานด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์ (Hill and Khan, 2008) เป็นต้น 2) การศึกษากลไกในเชิงลึก เช่น จีน (gene) หรือเอนไซม์ที่ควบคุมกระบวนการในตรีฟิเคชัน ตลอดจนงานวิจัยค้นหาจุลินทรีย์ชนิดใหม่หรือพืชนชนิดจุลินทรีย์ในตรีฟายอิง (Gerardi, 2002; Park and Noguera, 2004; Park and Ely, 2008)

2.3 เซลล์ดักติด

2.3.1 ความหมายและหลักการของเซลล์ดักติด

การดักติดเซลล์ (cell entrapment) คือ การดักติดจุลินทรีย์ด้วยวัสดุตั้งรูปประเภทสารพอลิเมอร์หรือแผ่นเมมเบรน เป็นการตรึงเซลล์ที่เกิดจากการที่จุลินทรีย์ถูกดักติดอยู่ภายในโดยที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับวัสดุตั้งผิว วิธีการนี้จึงสามารถประยุกต์ใช้ได้ในงานหลายประเภท วัสดุที่นิยมใช้งาน ได้แก่ สารประกอบแอลจีเนต (alginate) คาราจีแนน (carageenan) พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) เป็นต้น (Jen et al., 1996; Kok and Hasirci, 2000; Park, 2000)

การดักติดเซลล์โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การผสมเซลล์จุลินทรีย์และวัสดุดักติด และ 2) การก่อให้เกิดเจล (gelation) (Dulieu et al., 1999) ซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 2.2 การผสมเซลล์จุลินทรีย์มีวัตถุประสงค์เพื่อกระจายเซลล์ให้ทั่ววัสดุดักติด ซึ่งวิธีการผสมเซลล์สามารถทำได้โดยการกวนด้วยใบพัดหรือเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ส่วนวิธีการก่อให้เกิดเจลสามารถจำแนกได้เป็น 2 วิธี คือ การหยดเป็นเจล (droplet gelation) และการเทเป็นเจล (plated gelation) การหยดเป็นเจลเป็นการหยดส่วนผสมระหว่างวัสดุดักติดและเซลล์ลงในสารละลายทำแข็งเจล (gel formation solution) โดยใช้เข็มฉีดยาหรือปั๊ม เซลล์ดักติดด้วยวิธีการนี้มีลักษณะเป็นทรงกลม ส่วนการเทเป็นเจลเป็นการเทส่วนผสมลงในสารละลายทำแข็งเจล จากนั้นตัดจึงตัดเจลเป็นชิ้น เซลล์ดักติดด้วยวิธีการนี้มีลักษณะเป็นทรงสี่เหลี่ยม



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการดักติดเซลล์ (Siripattanakul and Khan, 2010)

การก่อให้เกิดเจลอาจเกิดได้จากหลายกระบวนการ (Bickerstaff G.F., 1997) ซึ่งได้แก่

- 1) การเกิดเจลด้วยประจุ (ionotropic gelation) เป็นการเกิดปฏิกิริยาเชื่อมโยง (cross-linking) ระหว่างวัสดุติดติดและสารละลายประจุบวก (cation) ตัวอย่างการดักติดประเภทนี้ คือ การดักติดด้วยแคลเซียมแอลจีเนต
- 2) การเกิดเจลด้วยการเหนี่ยวนำทางอุณหภูมิ (temperature-induced gelation) เป็นการแยกเฟสด้วยอุณหภูมิ กล่าวคือ เมื่ออุณหภูมิลดลงสารละลายวัสดุติดเปลี่ยนเป็นเจล ตัวอย่างการดักติดประเภทนี้ คือ การดักติดด้วยอากาโรส (agarose) และเจลาติน (gelatin)

- 3) กระบวนการพอลิเมอไรเซชันอินทรีย์ (organic polymerization) เป็นปฏิกิริยาระหว่างมอนอเมอร์อินทรีย์ ตัวอย่างการดักติดประเภทนี้ คือ การดักติดด้วยพอลีอะครีลาไมด์ (polyacrylamide) และพอลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) เป็นต้น กระบวนการเกิดเจลของวัสดุดักติดประเภทนี้อาจมีการเติมสารเชื่อมไขว้ (cross-linking agent) เพื่อส่งเสริมให้เกิดเจลดีขึ้น
- 4) การแยกเฟส (phase separation) เป็นการสกัดเซลล์จุลินทรีย์ด้วยตัวทำละลายที่สามารถก่อเจลได้ วิธีการนี้ไม่ค่อยนิยมใช้เนื่องจากตัวทำละลายอาจมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ได้

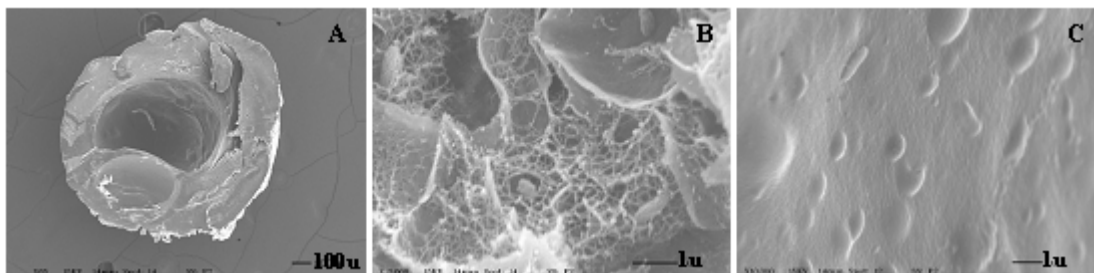
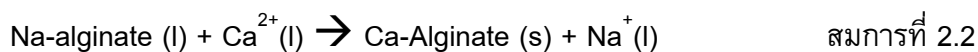
2.3.2 วัสดุดักติดที่นิยมใช้

วัสดุดักติดที่นิยมใช้ในงานทางด้านสิ่งแวดล้อมสามารถจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ วัสดุธรรมชาติและวัสดุสังเคราะห์ วัสดุดักติดธรรมชาติเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่ได้จากสาหร่าย (algae) หรือสาหร่ายทะเล (seaweed) ตัวอย่างเช่น แคลเซียมแอลจีเนต คาราจีแนน อากาโรส และ เจลเลติน เป็นต้น ส่วนวัสดุดักติดสังเคราะห์เป็นสารพอลิเมอร์ เช่น พอลีอะครีลาไมด์ และพอลีไวนิลแอลกอฮอล์ เป็นต้น แนวทางในการเลือกวัสดุดักติดแสดงไว้ในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แนวทางในการเลือกวัสดุตกแต่ง

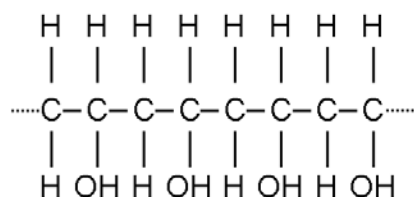
สมบัติ	แนวทาง	อ้างอิง
พื้นที่ผิว (surface area)	วัสดุตกแต่งที่มีพื้นที่ผิวมาก	Kourkotos et al. (2004)
วิธีดำเนินการ (handling) และ การฟื้นฟูสภาพ (regeneration)	วิธีการตกแต่งและการฟื้นฟูสภาพ วัสดุตกแต่งกระทำได้ง่าย	Kourkotos et al. (2004)
การกักเซลล์ (cell retention)	วัสดุตกแต่งกักเซลล์ได้มาก	Kourkotos et al. (2004)
การมีชีวิตของจุลินทรีย์ (cell viability)	วัสดุตกแต่งกักเซลล์แล้วส่งผลต่อ การมีชีวิตของจุลินทรีย์น้อย	Kourkotos et al. (2004)
กิจกรรมทางชีวภาพ (biological activity)	วัสดุตกแต่งกักเซลล์แล้วส่งเสริม กิจกรรมทางชีวภาพ	Jen et al. (1996) Kourkotos et al. (2004)
ความพรุน (porosity) และ ความสามารถในการแพร่ (diffusivity)	วัสดุตกแต่งมีความพรุนและ ความสามารถในการแพร่สูง (จุลินทรีย์สามารถตกแต่งได้ดีและ สารอาหารแพร่เข้าสู่ภายในได้ดี)	Jen et al. (1996) Leenen et al. (1996) Kourkotos et al. (2004)
เสถียรภาพทางกลและทาง เคมี (mechanical and chemical stability)	วัสดุตกแต่งมีเสถียรภาพทางกล และทางเคมีสูง	Leenen et al. (1996) Kourkotos et al. (2004)
ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตกแต่ง (preparation procedure)	ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตกแต่ง กระทำได้ง่าย	Leenen et al. (1996) Kourkotos et al. (2004)
ความสามารถในการละลาย (solubility)	วัสดุตกแต่งมีความสามารถในการ ละลายต่ำ (วัสดุมีเสถียรภาพสูง)	Leenen et al. (1996)
ความสามารถในการย่อย สลายทางชีวภาพ (biodegradability)	วัสดุตกแต่งความสามารถในการ ย่อยสลายทางชีวภาพต่ำ (วัสดุมี เสถียรภาพสูง)	Leenen et al. (1996)
การเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth)	เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดี	Leenen et al. (1996)
ค่าใช้จ่าย (cost)	ค่าใช้จ่ายต่ำ	Leenen et al. (1996)

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการดักติดเซลล์จุลินทรีย์ด้วยสารแคลเซียมแอลจีเนต (Calcium Alginate; CA) และการดักติดด้วยเทคนิคฟอสฟอรีเลเต็ดพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Phosphorylated polyvinyl alcohol; PPVA) สำหรับกระบวนการตรึงรูปด้วย CA สารละลายโซเดียมแอลจีเนต (ที่ผสมกับเซลล์จุลินทรีย์) จะทำปฏิกิริยาเชื่อมแบบไขว้ (Cross-linking) กับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ดังสมการที่ 2.2 (Smidsrod and Skjak-Braek, 1990) ภายหลังจากกระบวนการตรึงเซลล์เสร็จสิ้น CA ซึ่งมีสถานะเป็นเจลจะมีลักษณะดังภาพที่ 1 โดยโครงสร้างระดับจุลภาคของเม็ดเซลล์ดักติดเป็นตาข่าย (รูปที่ 2.3) และมีเซลล์จุลินทรีย์ถูกดักติดในเม็ด CA ดังรูปที่ 2.3b

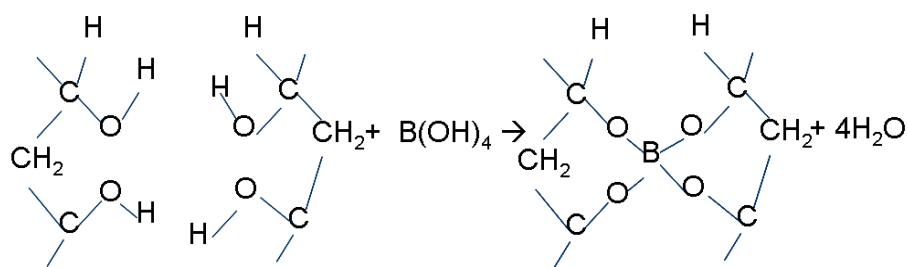


รูปที่ 2.3 เซลล์จุลินทรีย์ภายในเม็ดแคลเซียมแอลจีเนต (Siripattanakul et al., 2008a)

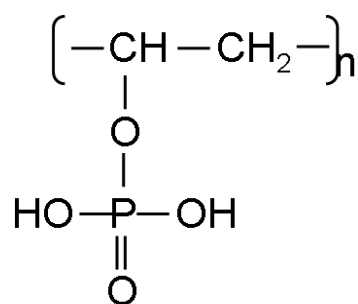
สำหรับกระบวนการดักติดด้วย PPVA สาร PVA เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม สาร PVA มีโครงสร้างเคมีดังรูปที่ 2.4 สำหรับเทคนิคการดักติดแบบ PPVA เป็นการดักติด 2 ขั้นตอน วิธีการนี้พัฒนาโดย Chen and Lin (1994) ในขั้นตอนที่ 1 สาร PVA ทำปฏิกิริยากับกรดบอริกดังสมการที่ 2.3 จากนั้นจึงเกิดกระบวนการฟอสฟอรีเลชัน (Phosphorylation) ระหว่างสาร PVA กับฟอสฟอรัสเกิดเป็นโดยผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยามีโครงสร้างดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.4 สาร PVA



สมการที่ 2.3



รูปที่ 2.5 PPVA

การประยุกต์ใช้เทคนิคการดักติดเซลล์มีมานานกว่า 20 ปี โดยในอดีตเทคนิคนี้ถูกใช้มากในงานวิจัยและอุตสาหกรรมอาหาร สำหรับการประยุกต์ใช้ในงานสิ่งแวดล้อมเริ่มเป็นที่นิยมมากขึ้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา โดยการประยุกต์ใช้มีทั้งในระบบบำบัดน้ำเสียและการฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อน (Siripattanakul and Khan, 2010) ซึ่งมีทั้งการใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของระบบหรือเพื่อกำจัดสารพิษ เช่น 2,4-dichlorophenoxyacetic acid 3-chlorobenzoate 3-chloroaniline diesel และ atrazine เป็นต้น (Pramanik and Khan, 2008; Siripattanakul et al., 2008b; Siripattanakul and Khan, 2010) สำหรับการประยุกต์ใช้เทคนิคการดักติดเซลล์เพื่อกำจัดไนโตรเจนมีการศึกษาทั้งที่ใช้ CA และ PPVA (Chen and Lin, 1994; Yang et al., 1997; Chen et al., 1998; Hill and Khan, 2008) แต่ในงานที่ผ่านมามุ่งเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบการกำจัดไนโตรเจน

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

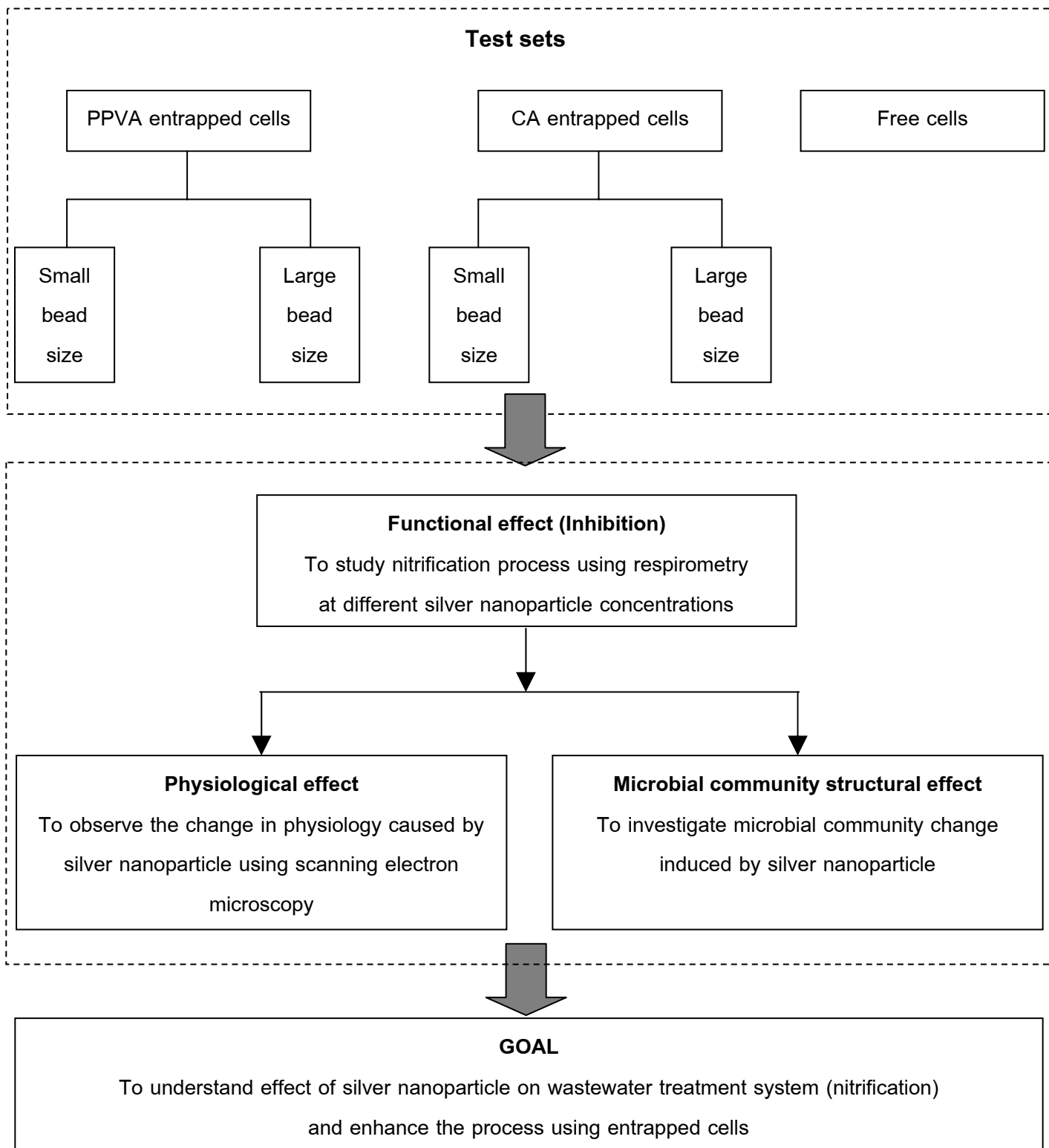
3.1 กรอบการวิจัย

กรอบแนวคิดของงานวิจัยนี้สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 3.1 โดยหลังจากศึกษาทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องแล้ว งานวิจัยนี้ซึ่งเป็นงานทดลองในระดับห้องปฏิบัติการสามารถแบ่งภาระงานออกได้เป็น 2 ส่วนหลัก 1) การศึกษาผลของ AgNP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน โดยศึกษาลักษณะการยับยั้งของ AgNP ในกระบวนการดังกล่าว ผลของ AgNP ต่อลักษณะทางกายภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ และผลของ AgNP ต่อโครงสร้างทางชีวภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ 2) การศึกษาการปรับปรุงศักยภาพของกระบวนการด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์ด้วยสารดักติดต่างชนิดและต่างขนาด

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการโดยศึกษาทดลองที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 5 ช่วง คือ

- 1) การศึกษาและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง โดยขั้นตอนนี้เป็นการรวบรวมข้อมูลสมบัติของ AgNP หลักการและวิธีการดักติดเซลล์ สมบัติของสารดักติด หลักการและวิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสีย การงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในอดีต
- 2) การออกแบบการทดลอง ขั้นตอนนี้เป็นการวางแผนและออกแบบการทดลอง โดยมุ่งเน้นให้ออกแบบให้ครอบคลุมวัตถุประสงค์ของการศึกษาทั้งหมด และมีชุดเปรียบเทียบเพื่อสามารถบ่งชี้ความเชื่อมั่นของผลการศึกษาได้
- 3) การทดลองและการอภิปรายผล ขั้นตอนนี้เป็นการทดลองตามแผนการที่วางไว้ตามกรอบการวิจัยในรูปที่ 3.1 และวิเคราะห์ผลการศึกษา คำนวณหาค่าจลนพลศาสตร์การบำบัดน้ำเสียที่เปลี่ยนไป
- 4) สรุปผลการศึกษา ขั้นตอนนี้เป็นการสรุปผลการศึกษาทั้งหมด และเสนอแนะแนวทางในการศึกษาต่อในอนาคต
- 5) การเผยแพร่ผลงานและการประยุกต์ใช้ในอนาคต ผลการศึกษานี้ได้นำเสนอให้โรงพยาบาลตัวอย่างเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ นอกจากนี้ผลการศึกษายังจะได้รับการเผยแพร่ในวงการวิชาการผ่านทางประชุมวิชาการ หรือบทความวิจัยในวารสารวิชาการได้ต่อไป

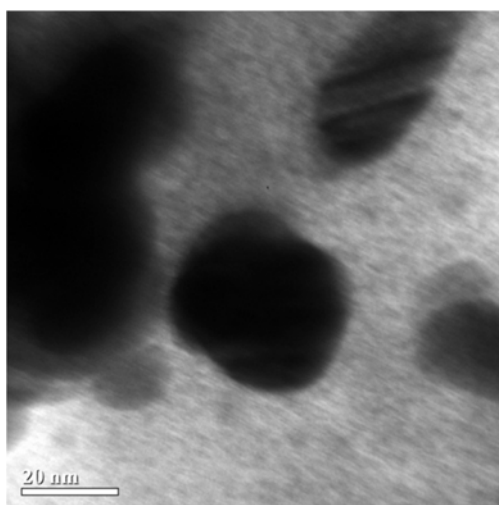


รูปที่ 3.1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

สำหรับรายละเอียดของการทดลองมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.2.1 สมบัติของซิลเวอร์อนุภาคนาโน

ซิลเวอร์อนุภาคนาโนที่ใช้ในการศึกษานี้สังเคราะห์ด้วยกระบวนการโบโรไฮไดรต์รีดักชันตามงานวิจัยในอดีต (Hynung and Zukoski, 1998; Ngeontae et al., 2009). อนุภาคเป็นทรงกลมมีขนาดเฉลี่ย 14 nm (รูปที่ 3.2) มีค่า plasmon extinction เท่ากับ 403 nm อนุภาคลักษณะนี้เป็นที่นิยมใช้ในงานอุตสาหกรรมทั่วไป



รูปที่ 3.2 ซิลเวอร์อนุภาคนาโน

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและการปรับสภาพเชื้อไนโตรฟายอิง

ตะกอนแอกติเวเต็ดสลัดจ์ที่ใช้ในการศึกษานี้มาจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนแห่งหนึ่งในกรุงเทพฯ ระบบดังกล่าวเป็นระบบแอกติเวเต็ดสลัดจ์ที่มีอัตราการไหล 30,000 m³/d และมีค่าการกักตะกอน (solids retention time) เท่ากับ 28 วัน

ตะกอนแอกติเวเต็ดสลัดจ์ปรับสภาพให้เป็นตะกอนแอกติเวเต็ดสลัดจ์ไนโตรฟายอิง (nitrifying activated sludge; NAS) ด้วยถังปฏิกรณ์เดินระบบแบบเอสบีอาร์ ขนาด 12 L ภายใต้สภาวะที่มีการเติมอากาศเป็นเวลา 2 เดือน ก่อนเริ่มการทดลอง ถังปฏิกรณ์แบบเอสบีอาร์เดินระบบโดยควบคุมเวลากักน้ำ (hydraulic retention time) 2 วัน และเวลากักตะกอน (solids retention time) 24 วัน น้ำเสียที่ใช้ในการปรับสภาพเป็นน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบน้ำเสียสังเคราะห์

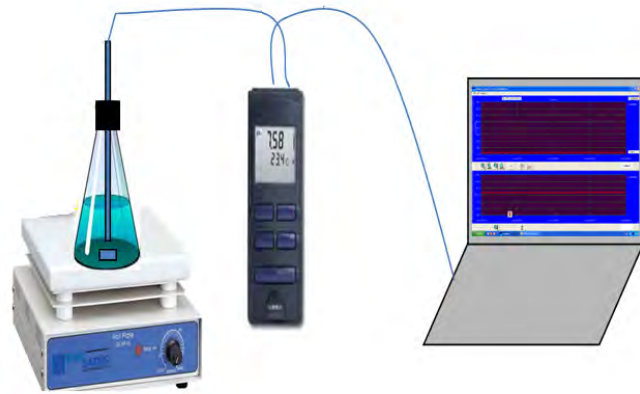
ส่วนประกอบ	ปริมาณ (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.33
NaHCO_3	0.75
K_2HPO_4	2.1 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.07
inorganic salt solution	1mL ซึ่งประกอบด้วย
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40 g
KH_2PO_4	20 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
Na_2MoO_4	0.1 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.02 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.002 g

3.2.3 การทดลองการศึกษาผลของ AgNP ในการยับยั้งกระบวนการไนตริฟิเคชัน

1) ถังปฏิกรณ์เรสไพราทอรีและการเดินระบบเรสไพราทอรี

NAS ที่ปรับสภาพแล้วถูกปั่นเหวี่ยงและล้าง 5 ครั้งด้วยเกลืออนินทรีย์ (ตารางที่ 3.1) ก่อนบรรจุลงในถังปฏิกรณ์เรสไพราทอรี ถังปฏิกรณ์เรสไพราทอรีเป็นขวดแก้ว (250 mL) ปิดได้แน่นสนิทโดยมีการติดตั้งโพรบดีโอ (DO probe, WTW GmbH, Weiheim, Germany) กับขวดดังกล่าวและมีการกวนภายในขวดด้วยเครื่องกวนด้วยแม่เหล็ก นอกจากนี้โพรบดีโอต่อเข้ากับมิเตอร์ดีโอที่บันทึกข้อมูลโดยตรงในคอมพิวเตอร์ (รูปที่ 3.3)

การเตรียมถังปฏิกรณ์ NAS ที่ล้างแล้วถูกบรรจุลงในถังปฏิกรณ์เรสไพราทอรี โดยมีความเข้มข้นของตะกอนในถัง เท่ากับ 113 ± 14 mg-MLVSS/L จากนั้นจึงเติมน้ำเสียสังเคราะห์ (ส่วนประกอบหลักในน้ำเสียสังเคราะห์เป็นดังตารางที่ 3.1) จนเต็มแล้วติดตั้งอุปกรณ์ (โพรบดีโอและมิเตอร์) ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ถังปฏิกรณ์เรสไพราทอรี

การทดลองนี้จำแนกออกได้เป็นการศึกษาผลของ AgNP ต่อจุลินทรีย์ 2 กลุ่ม ซึ่งได้แก่ จุลินทรีย์ไนตริฟายอิง (nitrifying microorganism) และจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซิง (ammonia-oxidizing microorganism; AOM) การทดลองทั้ง 2 ชุด ดำเนินการในลักษณะเดียวกัน ยกเว้นการทดลองชุดศึกษาจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซิงมีการเติมโซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3) ในน้ำเสีย (ความเข้มข้นในถังปฏิกรณ์ เท่ากับ $24 \mu\text{M}$) เพื่อยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ไนไตรท์ออกซิไดซิง (nitrite-oxidizing microorganism; NOM)

การทดลองขั้นตอนนี้มุ่งเน้นการศึกษาผลของ AgNP ต่อจุลินทรีย์ไนตริฟายอิง และลักษณะการยับยั้ง การทดลองดำเนินการภายในถังปฏิกรณ์ที่กล่าวไว้ในข้างต้นโดยมีการติดตามค่าดีไอซึ่งใช้เวลาทั้งสิ้น 90 นาทีต่อชุดทดลอง การทดลองดำเนินการในลักษณะนี้โดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียและ AgNP เริ่มต้นอยู่ระหว่าง 14-280 และ 0.00-10.00 mg/L ตามลำดับ การทดลองแต่ละค่าความเข้มข้นทำซ้ำทั้งหมด 4 รอบ

จากนั้นจึงนำผลการติดตามค่าดีไอไปคำนวณหาร้อยละการยับยั้งและลักษณะการยับยั้ง (ซึ่งรายละเอียดจะกล่าวถึงในหัวข้อต่อไป) ข้อสังเกตเพิ่มเติมการติดตามค่าดีไอเป็นการบ่งชี้การไนตริฟิเคชัน กล่าวคือ หากระบบมีออกซิเจนลดลงมากบ่งชี้เกิดไนตริฟิเคชันมากขึ้น

2) การคาดการณ์ลักษณะการยับยั้งและการคำนวณหาค่าคงที่การยับยั้ง

การคาดการณ์ลักษณะการยับยั้งพิจารณาจากอัตราการใช้ออกซิเจน (oxygen uptake rate; OUR) โดย OUR คำนวณจากการเปลี่ยนแปลงของ DO ต่อเวลา จากนั้นสามารถคำนวณหาอัตราการใช้ออกซิเจนสูงสุด OUR_{max} และค่า K_s ตามสมการของ Michaelis-Menten ดังสมการที่ 3.1

$$OUR = OUR_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

สมการที่ 3.1

โดย	OUR	=	oxygen uptake rate (mg-O ₂ /L/min)
	OUR_{max}	=	maximum oxygen uptake rate (mg-O ₂ /L/min)
	S	=	ammonia concentration (mg-N/L)
	K_s	=	half saturation coefficient for ammonia (mg-N/L)

จากนั้นในสภาวะที่มีตัวยับยั้ง (AgNP) คำนวณหาลักษณะการยับยั้ง 3 แบบ คือ การยับยั้งแบบมีการแข่งขัน (competitive inhibition) การยับยั้งแบบไม่มีการแข่งขัน (uncompetitive inhibition) แบบการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition)

ข้อสังเกตสำหรับการศึกษาลักษณะการยับยั้งเป็นแบบไม่แข่งขัน (รายละเอียดของผลแสดงในบทถัดไป) ซึ่งสมการที่ 3.1 ปรับปรุงเป็นสมการที่ 3.2

$$OUR = OUR_{max} \frac{S}{K_s + S(1 + \frac{I}{K_i})}$$

สมการที่ 3.2

โดย	OUR	=	oxygen uptake rate (mg-O ₂ /L/min)
	OUR_{max}	=	maximum oxygen uptake rate (mg-O ₂ /L/min)
	S	=	ammonia concentration (mg-N/L)
	K_s	=	half saturation coefficient for ammonia (mg-N/L)
	I	=	concentration of AgNPs (mg/L)
	K_i	=	inhibition constant (mg/L)

สมการดังกล่าวสามารถจัดรูปสมการได้ใหม่ตาม Lineweaver-Burk model ดังสมการที่ 3.3 K_i สามารถคำนวณจากกราฟระหว่าง K_s/OUR_{max} และ I โดยจุดตัดแกน x ได้แก่ $-K_i$

$$\frac{1}{OUR} = \frac{K_s}{OUR_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{OUR_{max}} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)$$

สมการที่ 3.3

สำหรับการคำนวณร้อยละการยับยั้งจาก AgNP คำนวณจาก OUR เปรียบเทียบกันระหว่างชุดทดลองที่มี AgNP ต่าง ๆ และชุดควบคุม (ไม่มี AgNP) การคำนวณเป็นดังสมการที่ 3.4

$$Inhibition(\%) = \frac{(OUR_{control} - OUR_{AgNPs}) \times 100}{OUR_{control}} \quad \text{สมการที่ 3.4}$$

3) การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพด้วยเครื่อง TEM

ตัวอย่าง NAS จากการทดลองในถังปฏิกรณ์เรสไพราทอรี (ก่อนและหลังการทดลอง) ได้ศึกษาลักษณะทางกายภาพด้วยเครื่อง TEM สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก1

3.2.4 การทดลองการปรับปรุงศักยภาพของกระบวนการด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์

1) การเตรียมเซลล์ดักติด

NAS ถูกปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกน้ำใสออกแล้วเจือจางกลับในสารละลายเกลือนินทรีย์ (ตามสูตรในตารางที่ 3.1) ปริมาณ 10 mL จะได้เซลล์ NAS เข้มข้น แล้วจากนั้นเขย่าเซลล์ด้วยเครื่องเขย่าแนวตั้ง (vertical shaker) เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างเซลล์ จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกน้ำล้างออก การล้างเซลล์กระทำลักษณะเดียวกันทั้งสิ้น 4 รอบ ซึ่งสุดท้ายภายหลังเจือจางเซลล์ในสารละลายเกลือนินทรีย์ NAS มีความเข้มข้นประมาณ 5,000 mg-SS/L สำหรับวิธีการเตรียมเซลล์ดักติดด้วย CA และ PVA มีวิธีการเตรียมแสดงไว้ในภาคผนวก ก2

2) การเดินระบบ

การทดลองนี้จำแนกออกได้เป็นการศึกษาผลของ AgNP ต่อจุลินทรีย์ 3 กลุ่ม คือ จุลินทรีย์อิสระ จุลินทรีย์ดักติดด้วย CA (ขนาดเล็กและใหญ่ ซึ่งเตรียมที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 และ 6 mm) และ จุลินทรีย์ดักติดด้วย PVA (ขนาดเล็กและใหญ่ ซึ่งเตรียมที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 และ 6 mm) การทดลองดำเนินการภายในถังปฏิกรณ์ที่กล่าวไว้ในข้างต้น โดยมีการติดตามค่าดีไอจนกระทั่ง DO เป็นศูนย์หรือคงที่ การทดลองทุกชุดกระทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย

จากนั้นจึงนำผลการติดตามค่าดีไอไปคำนวณหา OUR และ ร้อยละการยับยั้ง นอกจากนี้ตัวอย่างเซลล์จากการทดลองบางชุดได้ศึกษาลักษณะทางกายภาพด้วยเครื่อง TEM และ SEM

3) การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพด้วยเครื่อง TEM และ SEM

ตัวอย่าง NAS อีสระและดักติดจากการทดลองในถังปฏิกรณ์เรสไพราทอรี (ก่อนและหลังการทดลอง) ได้ศึกษาลักษณะทางกายภาพด้วยเครื่อง TEM และ SEM สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก1

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลของ AgNP ต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน

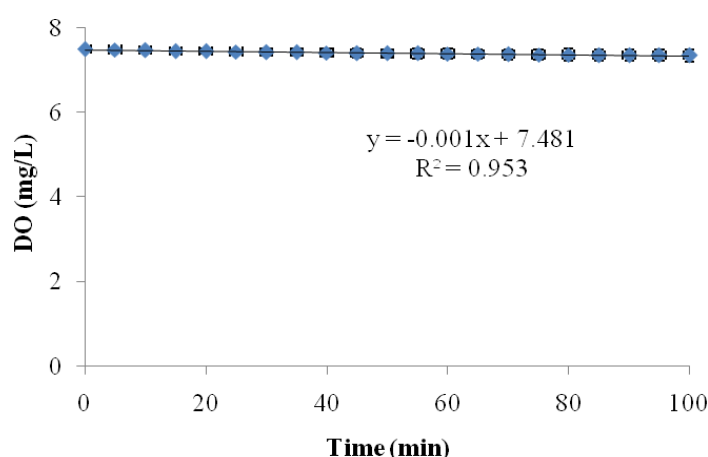
4.1.1 ลักษณะการยับยั้งของ AgNP ต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน

1) การใช้ออกซิเจนโดยเฮเทอโรโทรปและปัจจัยภายนอก

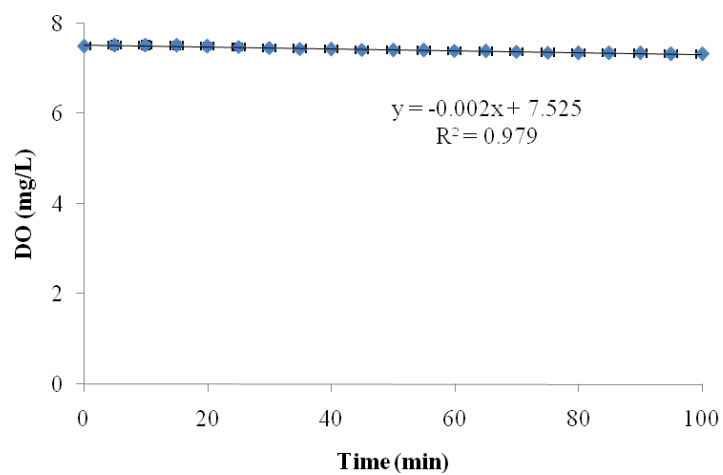
นอกจาก NAS แล้วโดยทั่วไปในธรรมชาติอาจมีการใช้ออกซิเจนโดยจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรปหรือจากปัจจัยภายนอก ซึ่งอาจส่งผลต่อการศึกษากระบวนการไนตริฟิเคชันโดยวิธีเรสไพราทอรี (เนื่องจากการพิจารณาจากการใช้ออกซิเจนเช่นกัน) ดังนั้นก่อนการทดลองจึงได้มีการศึกษาผลของปัจจัยดังกล่าวเพื่อยืนยันความถูกต้องของการทดลอง

การทดลองชุดควบคุม 2 ชุด ซึ่ง ได้แก่ (1) ชุดศึกษาผลของจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรป ซึ่งศึกษาในถังปฏิกรณ์เรสไพราทอรีที่เติม NAS และ AgNP แต่ไม่ได้เติมแอมโมเนีย และ (2) ชุดศึกษาผลของปัจจัยภายนอก ซึ่งศึกษาในถังปฏิกรณ์เรสไพราทอรีที่เติมแอมโมเนีย และ AgNP แต่ไม่ได้เติม NAS

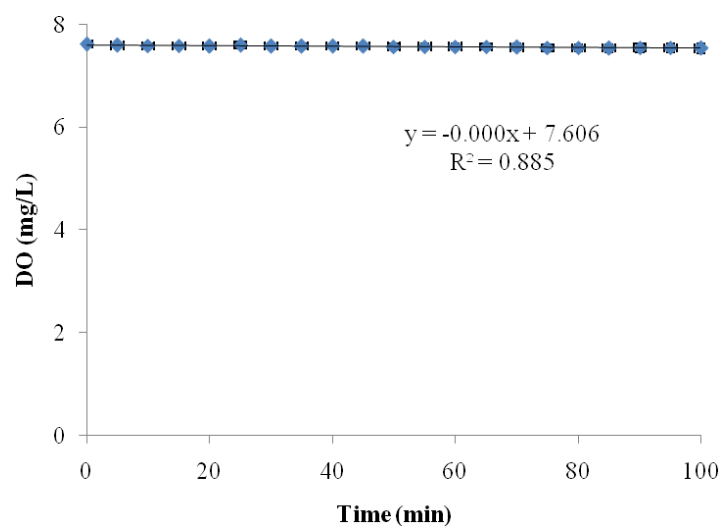
จากผลการทดลองพบว่าในการทดลองทั้งสองชุดมีค่า DO คงที่ (รูปที่ 4.1 ถึง 4.3) เมื่อคำนวณหา OUR พบว่าผลของปัจจัยภายนอกมีค่า OUR เท่ากับ $0.002 \text{ mg-O}_2/\text{L/min}$ ส่วนชุดศึกษาผลของจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรป ในกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันมีค่าเท่ากับ 0.000 และ $0.002 \text{ mg-O}_2/\text{L/min}$ ตามลำดับ จากผลดังกล่าวสามารถชี้ชัดได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรปและปัจจัยภายนอกไม่รบกวนกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน



รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนต่อเวลาในการทดลอง
ศึกษาผลของปัจจัยภายนอก



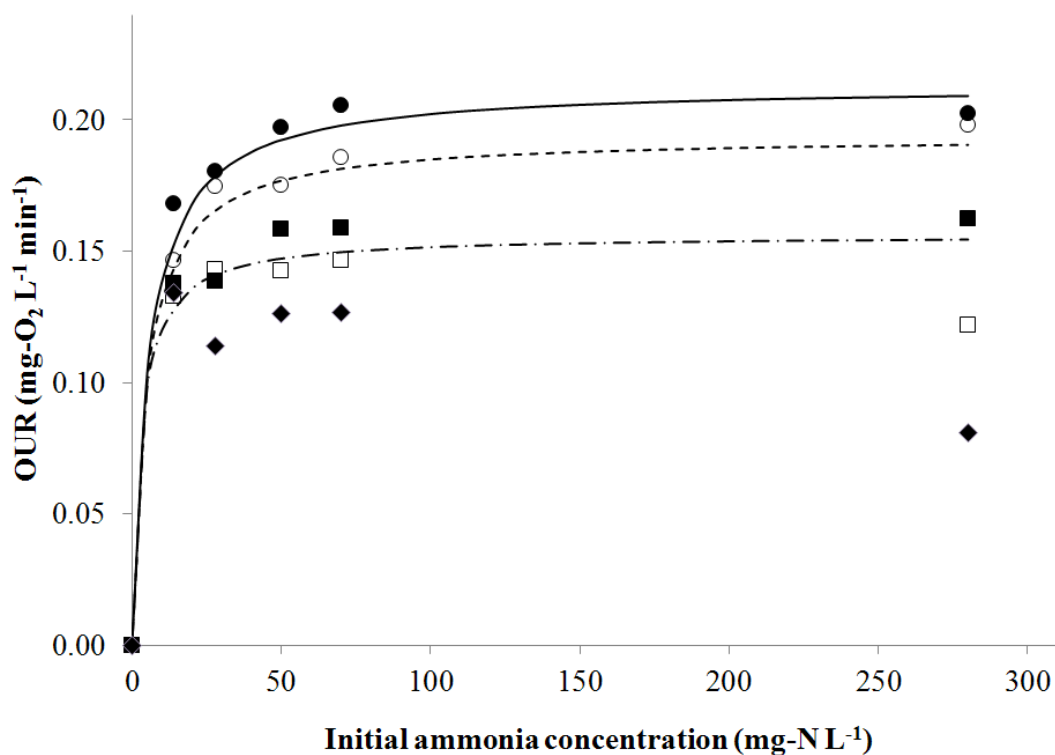
รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนต่อเวลาในการทดลองศึกษาผลของจุลินทรีย์
กลุ่มเฮเทอโรโทรปต่อกระบวนการไนตริฟิเคชัน



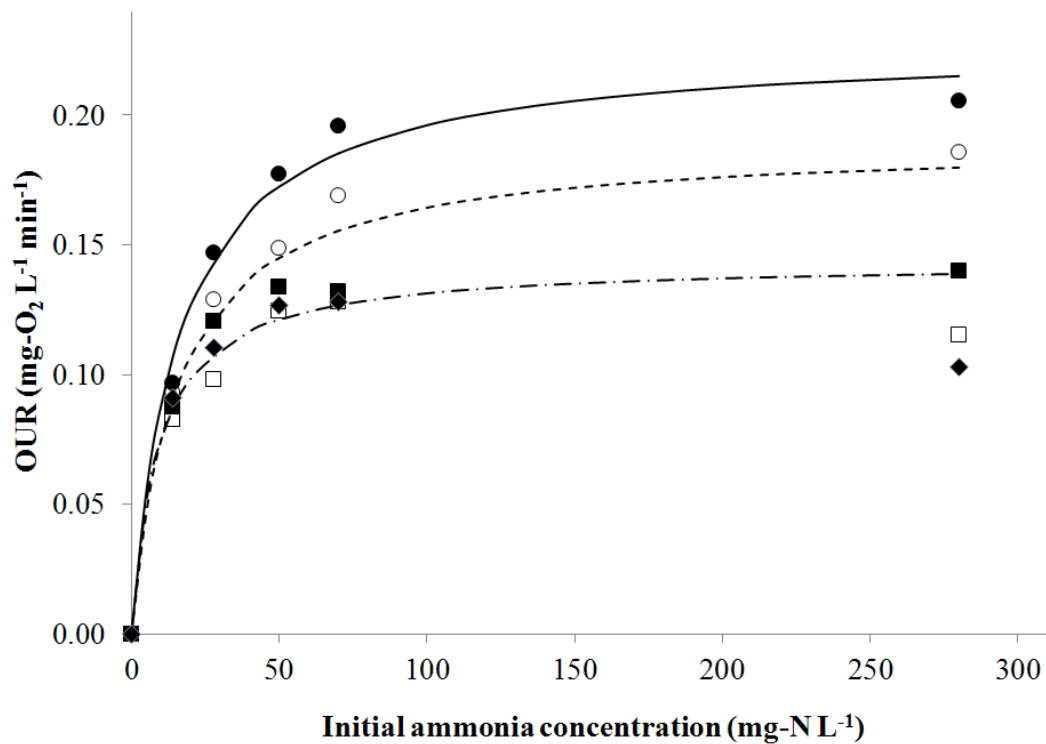
รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนต่อเวลาในการทดลองศึกษาผลของจุลินทรีย์
กลุ่มเฮเทอโรโทรปต่อกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน

2) จลนพลศาสตร์เชิงยับยั้งของกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันด้วย AgNP

การทดลองกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันศึกษาที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้น 14 ถึง 280 mg-N/L ผลการศึกษาแสดงในรูป OUR ต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นดังรูปที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ ผลจากชุดทดลองที่ไม่ได้เติม AgNP เป็นไปตามโมเดลของ Michaelis-Menten โดยเมื่อคำนวณหาค่า OUR_{max} และ K_s พบว่ากระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันมีค่า OUR_{max} เท่ากับ 0.2132 และ 0.2273 mg-O₂/L/min และ K_s เท่ากับ 5.42 และ 15.87 mg-N/L ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ผลดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่า OUR_{max} ของกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันมีค่าใกล้เคียงกันแต่ K_s แตกต่างกันโดยสิ้นเชิง ผลลักษณะนี้เกิดขึ้นในงานวิจัยที่ผ่านมาเช่นกัน (Carrera et al., 2004) โดยงานวิจัยดังกล่าวระบุว่าในการศึกษาเปรียบเทียบการทำงานของเซลล์ในรูปแบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูป กระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันมีค่า K_s เท่ากับ 1.6 และ 11 mg-N/L ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่าง OUR ต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นในการทดลองกระบวนการไนตริฟิเคชัน เมื่อมี AgNP ความเข้มข้น 0.00 (○) 0.25 (●) 0.50 (■) 5.00 (□) และ 10 (◆) mg/L



รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่าง OUR ต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นในการทดลอง กระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน เมื่อมี AgNP ความเข้มข้น 0.00 (○) 0.25 (●) 0.50 (■) 5.00 (□) และ 10 (◆) mg/L

ตารางที่ 4.1 ค่า OUR_{max} และ K_s ของกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน ภายใต้สภาวะที่มี AgNP

AgNPs (mg/L)	Nitrification			Ammonia oxidation		
	OUR_{max} (mg-O ₂ /L/min)	K_s (mg-N/L)	R^2	OUR_{max} (mg-O ₂ /L/min)	K_s (mg-N/L)	R^2
0.00	0.2132	5.42	0.997	0.2273	15.87	0.989
0.25	0.1990	4.92	0.997	0.1984	16.15	0.988
0.50	0.1645	3.19	0.994	0.1564	9.99	0.994
5.00	0.1336	0.50	0.998	0.1497	8.82	0.998
10.00	0.1320	N/A ⁽¹⁾	N/A ⁽¹⁾	0.1448	8.33	0.999

⁽¹⁾ data not available

จากตารางที่ 4.1 พบว่า ภายใต้สภาวะที่มี AgNP เมื่อความเข้มข้นของ AgNP เริ่มต้นสูงส่งผลให้ OUR_{max} และ K_s ลดลง จลนพลศาสตร์การยับยั้งขึ้นอยู่กับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งสามารถจำแนกออกได้เป็น 3 ลักษณะ คือ (1) แบบมีการแข่งขัน (competitive) (2) แบบไม่มีการแข่งขัน (uncompetitive) และ (3) แบบไม่แข่งขัน (non-competitive) ซึ่งผลการทดลองดังรูปที่ 4.3 และ 4.4 บ่งชี้ว่าจลนพลศาสตร์การยับยั้งด้วย AgNP ในการศึกษานี้เป็นแบบไม่มีการแข่งขันทั้งในกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน

โดยทั่วไปว่าโลหะต่าง ๆ มีอิทธิพลต่อเซลล์จุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน (Ren and Frymier, 2003) โปรตีนหมายรวมถึงอวัยวะของจุลินทรีย์ เอนไซม์ และสารอื่น ๆ ในเซลล์ เช่น DNA ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าผลการทดลองนี้พบว่า AgNP อาจส่งผลต่อกระบวนการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน โดยลักษณะของการยับยั้งเป็นแบบไม่มีการแข่งขัน เมื่อคำนวณหาค่าคงที่การยับยั้ง K_i ของกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน เท่ากับ 9.3 และ 5.5 mg/L ตามลำดับ

นอกจากนี้เมื่อพิจารณารูปที่ 4.3 และ 4.4 ระหว่างข้อมูลจากการทดลอง (เป็นจุด) และการคาดการณ์จากโมเดล (เป็นเส้น) พบว่าการทดลอง ณ ความเข้มข้นของ AgNP 0.00 และ 0.50 mg/L มีค่าใกล้เคียงกันมาก แต่ในการทดลอง ณ ความเข้มข้นของ AgNP สูง (5.00 และ 10.00 mg/L) พบว่าแนวโน้มของ OUR ลดลงเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียเพิ่มขึ้น ซึ่งลักษณะแนวโน้มแบบนี้เป็นลักษณะการยับยั้งด้วยตัวเอง (self inhibition) ซึ่งพบในกรณีที่สารอาหาร (substrate) ที่มีความเป็นพิษหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กรณีที่มีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น (Park and Bae, 2009) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าปรากฏการณ์นี้เป็นการเสริม (synergistic effect) ของ AgNP ให้แอมโมเนียมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วย

3) ร้อยละการยับยั้งของกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันด้วย AgNP

ร้อยละการยับยั้งของกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันด้วย AgNP แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 จากตารางดังกล่าวแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเมื่อ AgNP มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นระดับของการยับยั้งของสูงขึ้นเช่นกัน AgNP ที่ความเข้มข้น 0.25 ถึง 10.00 mg/L ส่งผลให้เกิดการยับยั้งร้อยละ 8 ถึง 38 ในกระบวนการไนตริฟิเคชันและร้อยละ 14 ถึง 28 ในกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน ส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นมิได้มีผลต่อร้อยละการยับยั้งอย่างชัดเจน (สามารถสังเกตผลได้อย่างชัดเจนในชุดทดลองที่ไม่มี AgNP ในรูปที่ 4.3 และ 4.4)

นอกจากนี้แม้ว่าผลการทดลองอาจบ่งชี้ได้ว่าความเข้มข้นของ AgNP สูงอาจส่งผลเสริมให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นมีผลทั้งต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันซึ่งลักษณะคล้ายกันนี้ก็ได้รับในการศึกษาในอดีตเช่นกัน (Wang et al.,

2004) แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ยังไม่สามารถชี้ได้อย่างชัดเจนถึงกลไกของการเสริม ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาต่อเนื่องในประเด็นดังกล่าวในอนาคต

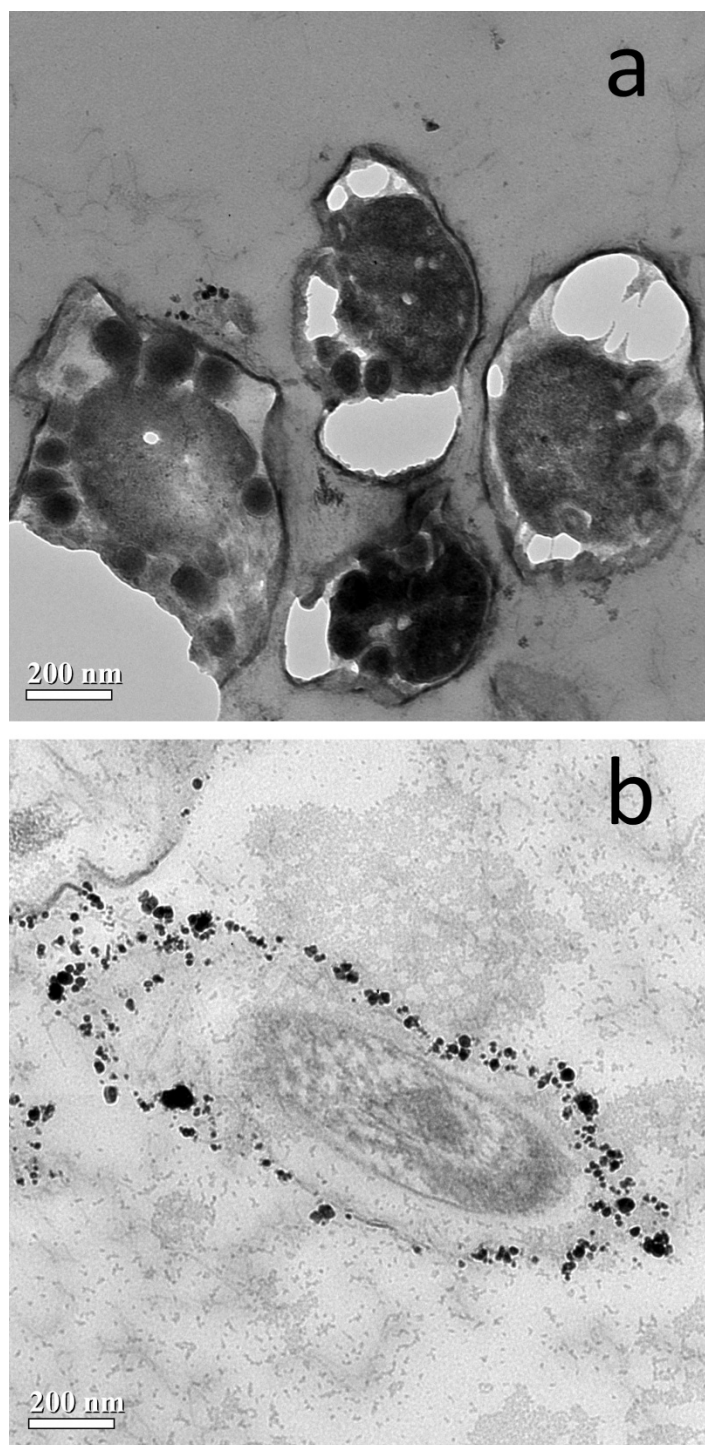
ตารางที่ 4.2 ร้อยละการยับยั้งกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันด้วย AgNP

Factor	Concentration (mg/L)	Inhibition (%± standard deviation)	
		Nitrification	Ammonia Oxidation
AgNP	0.25	8 ± 4.8	14 ± 4.4
	0.5	21 ± 2.2	26 ± 7.2
	5	36 ± 14.4	28 ± 9.4
	10	38 ± 14.2	28 ± 6.2
Ammonia	14	18 ± 4.1	8 ± 4.8
	28	30 ± 6.8	22 ± 9.1
	50	25 ± 11.5	25 ± 2.5
	70	26 ± 13	29 ± 10
	280	47 ± 23.3	34 ± 17.8

งานวิจัยในอดีตระบุร้อยละการยับยั้งในการทำงานของจุลินทรีย์ไนตริฟายอิงแตกต่างกัน เช่น Hu et al. (2010) ระบุผลกระทบเพียงร้อยละ 41 ในขณะที่ Choi et al. (2008) รายงานผลกระทบถึงร้อยละ 86 ในการทดลองที่ความเข้มข้น AgNP เริ่มต้นเท่ากัน (1 mg/L) สำหรับการศึกษานี้ร้อยละการยับยั้งกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันเฉลี่ยเท่ากับ 21 และ 26 ตามลำดับ ในการทดลองที่ความเข้มข้นของ AgNP เท่ากับ 0.50 mg/L ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Hu et al. (2010) ความแตกต่างของผลกระทบในงานวิจัยต่าง ๆ นี้เกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ที่ศึกษา ลักษณะและปริมาณของ AgNP การรวมกลุ่มของ AgNP ตลอดจนระยะเวลาสัมผัส AgNP

4.1.2 ผลของ AgNP ต่อลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างทางชีวภาพของกลุ่มจุลินทรีย์

การทดลองในขั้นตอนนี้ได้คัดเลือกเซลล์จุลินทรีย์ตัวอย่างจากการทดลองบางชุดเพื่อพิจารณาผลต่อกายภาพและโครงสร้างทางชีวภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ พบการศึกษาพบว่าลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์ทุกชุดการทดลอง (ทั้งจากกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน) เป็นไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ พบเซลล์จุลินทรีย์ถูกทำลายปะปนในเซลล์ตัวอย่างทุกชุดการทดลอง ดังตัวอย่างในรูปที่ 4.5 ซึ่งแสดงเซลล์จุลินทรีย์ NAS ภายหลังการทดลองที่มี AgNP 10.00 mg/L



รูปที่ 4.5 เซลล์จุลินทรีย์ภายหลังการทดลองที่มี AgNP 10 mg/L

รูปที่ 4.5a แสดงให้เห็นเซลล์ถูกทำลายอย่างชัดเจน ผลลักษณะคล้ายกันนี้ได้แสดงไว้ในการศึกษาที่มีสารพิษชนิดอื่นเช่นกัน เช่น titanium dioxide เป็นต้น (Wu et al., 2010) ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าสารพิษรวมทั้ง AgNP ส่งผลให้ผนังและเซลล์หุ้มเซลล์เสียหายเป็นเหตุให้สารภายในเซลล์รั่วไหลและทำให้เซลล์ตายหรือยับยั้งการทำงานของเซลล์ในที่สุด

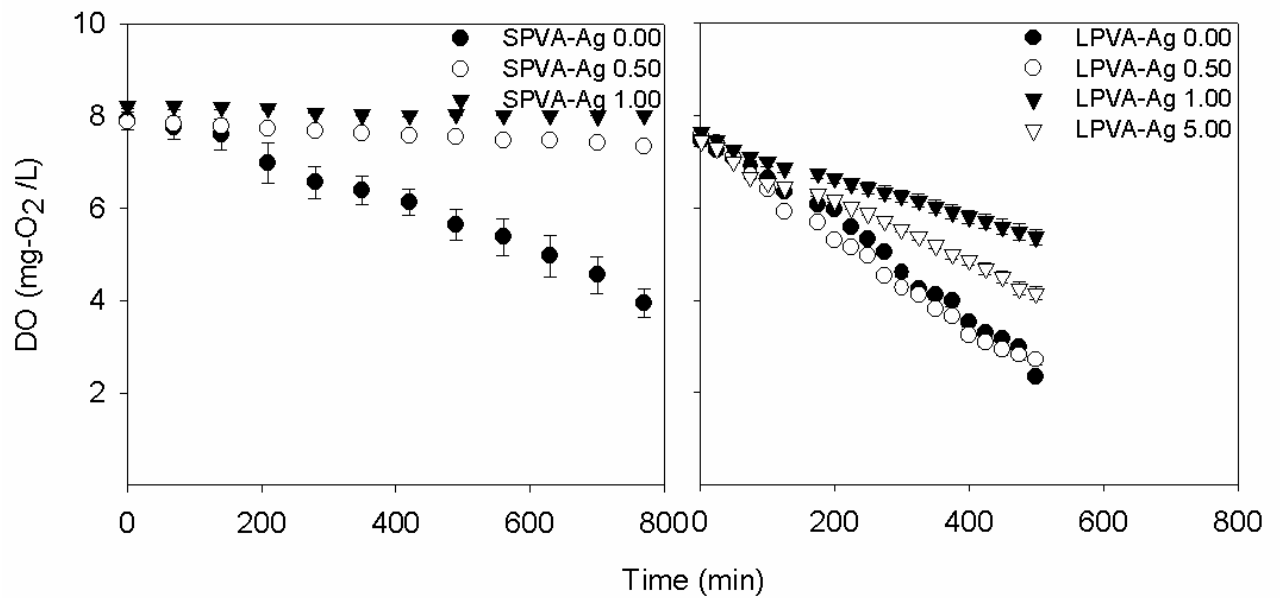
นอกจากนี้จากการศึกษาด้วย TEM ยังพบการเกาะกลุ่มของ AgNP รอบเซลล์ดังรูปที่ 4.5b โดยทั่วไปเมื่อกลักษณะนี้ คือ สารอีพีเอส (extracellular polymeric substance; EPS) ซึ่งถูกผลิตขึ้นมาในสภาวะที่เซลล์มีความเครียดจากสิ่งแวดล้อม (environmental stress) ซึ่งหากพิจารณาผล TEM นี้ประกอบกับร้อยละและจลนพลศาสตร์การยับยั้งปานกลางในหัวข้อก่อนหน้านี้พบว่า แม้ในการทดลองที่มี AgNP ถึง 10 mg/L การยับยั้งทั้งในกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันน้อยกว่าร้อยละ 50 ซึ่งอาจเกิดจากการปกป้องเซลล์ด้วยสารอีพีเอสนี้เอง กล่าวคือ เซลล์บางชนิดในกลุ่มจุลินทรีย์ผลิตเมือกอีพีเอสรอบตัวทำให้มีโอกาสสัมผัส AgNP น้อยลงส่งผลให้พบการยับยั้งกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันไม่สูงนัก

สำหรับผลต่อโครงสร้างทางชีวภาพพบว่าจากผลการทดลองจลนพลศาสตร์การยับยั้งสามารถระบุได้ว่า AgNP ส่งผลต่อจุลินทรีย์ไนตริฟายอิงทั้งหมดและแอมโมเนียออกซิไดซิงต่างกันส่งผลให้จลนพลศาสตร์การยับยั้งแตกต่างกัน นอกจากนี้จากรูป TEM ยังสนับสนุนว่าโครงสร้างทางชีวภาพของกลุ่มจุลินทรีย์อาจเปลี่ยนแปลงจากผลของ AgNP เนื่องจากมีจุลินทรีย์บางชนิดถูกทำลาย แต่อย่างไรก็ตามจากผลทั้งหมดเป็นเห็นการบ่งชี้ในเบื้องต้นเท่านั้นควรมีงานวิจัยต่อเนื่องในประเด็นดังกล่าว

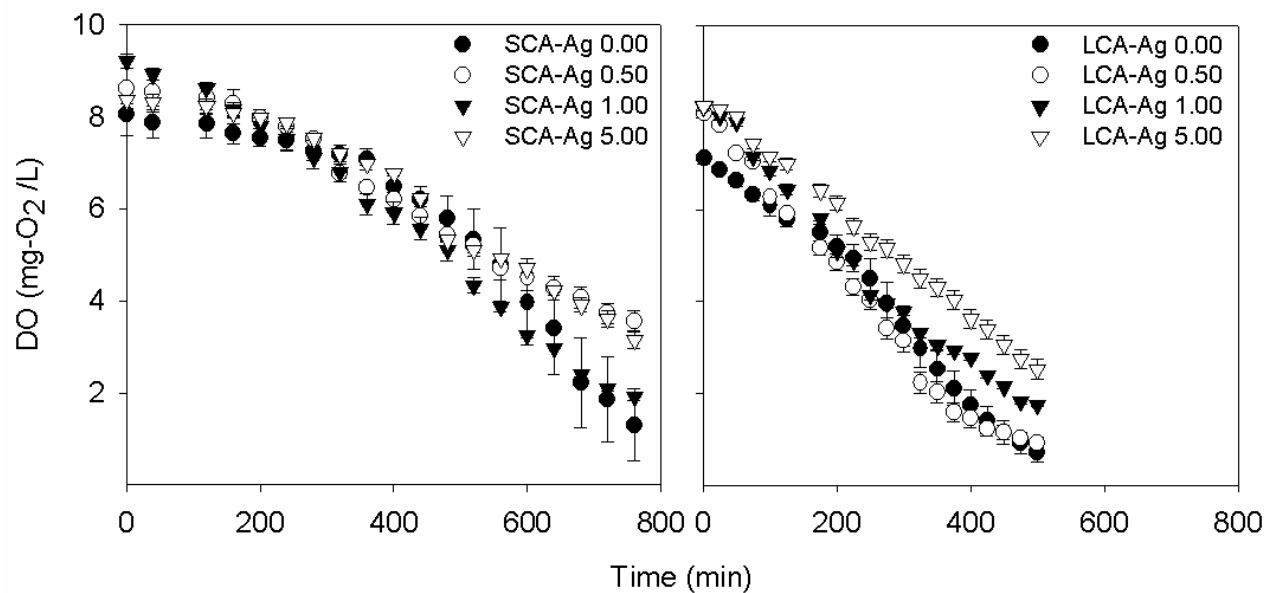
4.2 ผลการปรับปรุงศักยภาพของกระบวนการด้วยเทคนิคการดักติดเซลล์

4.2.1 กระบวนการไนตริฟิเคชันด้วยเซลล์ดักติด

การทดลองขั้นตอนนี้มุ่งเน้นการศึกษากระบวนการไนตริฟิเคชันด้วยเซลล์ดักติดด้วย PVA และ CA ดังแสดงผลในรูปที่ 4.6 และ 4.7 แนวโน้มของค่า DO ในการทดลองทุกชุดเป็นไปในลักษณะเดียวกัน คือ DO มีค่าลดลงเรื่อย ๆ เมื่อเวลาผ่านไป โดยในการทดลองที่มี AgNP เริ่มต้นความเข้มข้นสูง DO ลดลงช้ากว่าการทดลองที่มี AgNP น้อย



รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนต่อเวลาในกระบวนการไนตริฟิเคชัน
ด้วยเซลล์ดักติดด้วย PVA (SPVA คือ เซลล์ดักติดด้วย PVA ขนาดเล็ก
และ LPVA คือ เซลล์ดักติดด้วย PVA ขนาดใหญ่)



รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนต่อเวลาในกระบวนการไนตริฟิเคชัน
ด้วยเซลล์ดักติดด้วย CA (SCA คือ เซลล์ดักติดด้วย CA ขนาดเล็ก
และ LCA คือ เซลล์ดักติดด้วย CA ขนาดใหญ่)

เมื่อคำนวณหา *OUR* ของการทดลองด้วยเซลล์ดักติดเป็นดังตารางที่ 4.3 ชุดทดลองเซลล์ดักติดด้วย PVA ขนาดเล็กและใหญ่มี *OUR* เท่ากับ 0.000-0.006 และ 0.006-0.014 mg-O₂/L/min, ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ชุดทดลองที่ไม่มี AgNP) พบว่ากิจกรรมไนตริฟิเคชันคิดเป็นร้อยละ 5-11 และ 44-88 ของชุดควบคุม (ตารางที่ 4.3) ส่วนในชุดทดลองเซลล์ดักติดด้วย CA ขนาดเล็กและใหญ่พบว่ามีค่า *OUR* ระหว่าง 0.009-0.014 และ 0.019-0.024 mg-O₂/L/min ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ชุดทดลองที่ไม่มี AgNP) พบว่ากิจกรรมไนตริฟิเคชันคิดเป็นร้อยละ 65-110 และ 81-94 ของชุดควบคุม เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองเซลล์ดักติดด้วย PVA พบว่าการยับยั้งในชุดทดลองเซลล์ดักติดด้วย CA มีน้อยกว่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งในชุดทดลองเซลล์ดักติดขนาดใหญ่

ตารางที่ 4.3 *OUR* ของกระบวนการไนตริฟิเคชันด้วยเซลล์ดักติด

Type of entrapment material	Bead size	Initial AgNP concentration (mg/L)	<i>OUR</i> (mg-O ₂ /L/min)	% Activity (% compared to control)
CA	Small (3 mm in diameter)	0.00	0.014	100
		0.50	0.013	90
		1.00	0.015	110
		5.00	0.009	65
	Large (6 mm in diameter)	0.00	0.024	100
		0.50	0.023	94
		1.00	0.020	84
		5.00	0.019	81
PVA	Small (3 mm in diameter)	0.00	0.006	100
		0.50	0.001	11
		1.00	0.000	5
	Large (6 mm in diameter)	0.00	0.014	100
		0.50	0.013	88
		1.00	0.012	82
		5.00	0.006	44

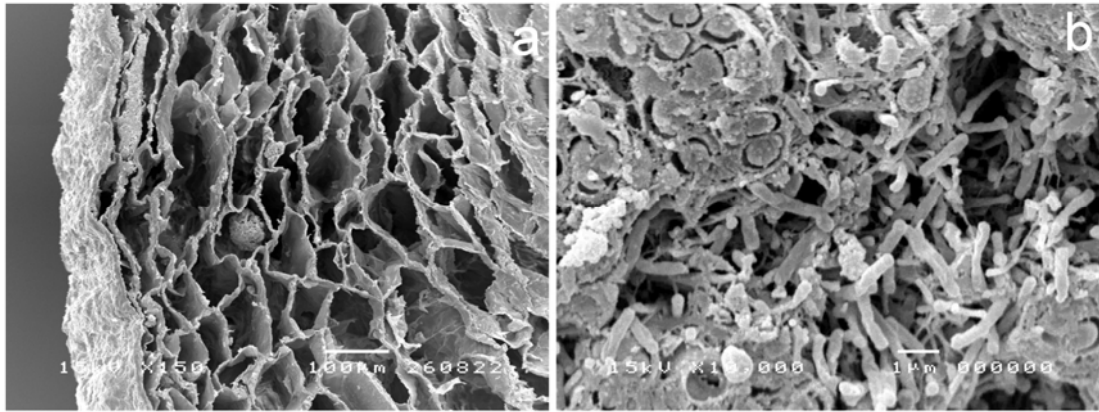
เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ดักติดขนาดเล็กและใหญ่พบว่าจากงานวิจัยในอดีตระบุว่า เซลล์ขนาดเล็กมีการเปลี่ยนถ่ายมวล (รวมทั้งสารพิษ) และแก๊สดีกว่าเซลล์ดักติดขนาดใหญ่ (Aksu and Bulbul, 1999; Dursun and Tepe, 2005) จากผลการทดลองนี้เป็นไปตามงานวิจัยในอดีต กล่าวคือ เซลล์ในวัสดุดักติดขนาดใหญ่ได้รับผลจาก AgNP น้อยกว่า (การเปลี่ยนถ่ายมวลสารพิษน้อยกว่า) ส่งผลให้คงกิจกรรมไนตริฟิเคชันได้ดีกว่า ปรากฏการณ์นี้คาดว่าเกิดจากวัสดุดักติดขนาดใหญ่มีความหนาแน่นมากกว่าทำให้มีการเคลื่อนภายในวัสดุพอร์ระยะทางยาวและยากลำบากกว่าส่งผลให้มีโอกาสที่ AgNP (และ Ag^+ ที่ปลดปล่อยออกจาก AgNP) สัมผัสเซลล์น้อยกว่า นอกจากนี้งานวิจัยในอดีตยังได้ระบุถึงโอกาสสารพิษอาจถูกดูดซับด้วยวัสดุดักติด (Cassidy et al., 1996; Siripattanakul et al., 2008b) ดังนั้น AgNP อาจถูกดูดซับที่วัสดุดักติดระหว่างการเคลื่อนผ่านรูพรุนเข้าสู่เซลล์ทำให้มีปริมาณ AgNP เข้าสู่เซลล์น้อยลงเช่นกัน

สำหรับเมื่อเปรียบเทียบเซลล์ดักติดด้วย CA และ PVA พบว่าเซลล์ดักติดด้วย CA ทำงานดีกว่าเซลล์ดักติดด้วย PVA มาก ดังตัวอย่างเช่น ในชุดทดลองที่มี AgNP 5.00 mg/L เซลล์ดักติดด้วย CA ขนาดใหญ่มีประสิทธิภาพดีกว่า PVA ถึง 2 เท่า จากผลดังกล่าวนี้สามารถสรุปได้ว่าในการศึกษานี้วัสดุดักติดปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ได้ดีกว่าส่งผลให้ศักยภาพกระบวนการไนตริฟิเคชันสูงกว่า

4.2.2 ผลของ AgNP ต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์ดักติด

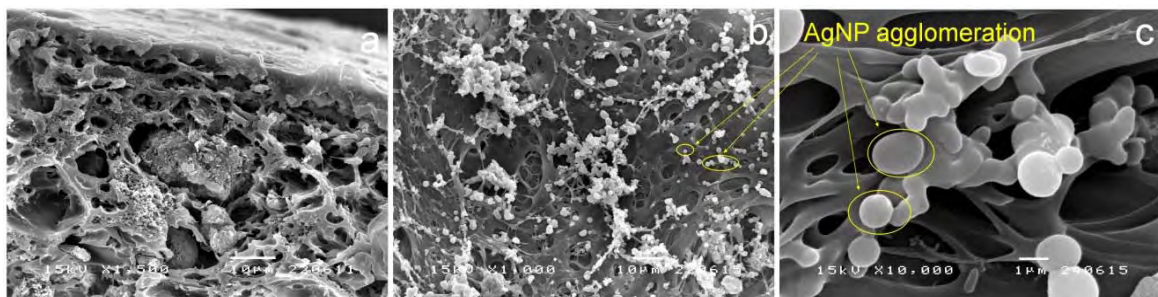
ผลการศึกษาโครงสร้างเซลล์ดักติดในระดับจุลภาคด้วย SEM แสดงดังรูปที่ 4.8 และ 4.9 ในรูปที่ 4.8a พบว่าวัสดุดักติดด้วย CA มีโครงสร้างตาข่ายละเอียดมากคล้ายกับแผ่นกระดาษ โดยในรูพรุนขนาดเล็กมีเซลล์จุลินทรีย์ดักติดอยู่ภายใน (รูปที่ 4.8b) โครงสร้างตาข่ายละเอียดนี้เกิดจากกระบวนการเชื่อมแบบไขว้ของแคลเซียมและแอลจีเนต (Smidsrod and Skjak-Braek, 1990) นอกจากนี้ยังพบว่ามีไมโครโคโลนี (micro-colony) ของจุลินทรีย์เจริญอยู่ภายในช่องว่างขนาดใหญ่อีกด้วย (รูปที่ 4.8a) จากรูปที่ 4.8 นี้สนับสนุนการอภิปรายผลก่อนหน้านี้เกี่ยวกับรูพรุนจำนวนมากในเซลล์ดักติดซึ่งส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ยากลำบากภายในเซลล์ดักติด

สำหรับรูปที่ 4.9a ซึ่งแสดงเซลล์ดักติดด้วย PVA พบว่ามีรูพรุนจำนวนมากและผิวหยาบ โดยรูพรุนมีขนาดประมาณ 10 - 20 μm นอกจากนี้ยังพบเซลล์ที่เจริญในลักษณะไมโครโคโลนีเช่นเดียวกับเซลล์ดักติดด้วย CA



รูปที่ 4.8 เซลล์ดักติดด้วย CA a) ที่กำลังขยาย 150× และ b) ที่กำลังขยาย 10,000×

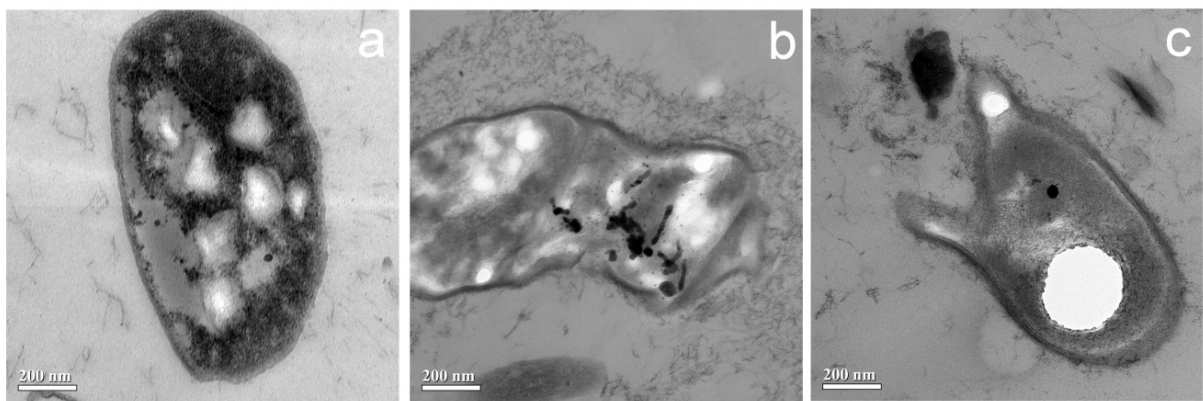
นอกจากนี้ในรูปที่ 4.9b และ c ซึ่งเป็นวัสดุดักติด PVA (ไม่มีเซลล์จุลินทรีย์) พบกลุ่มก้อนของ AgNP ลักษณะคล้ายลูกบอล ซึ่งลักษณะเช่นนี้ในอดีต Kim et al. (2006) ซึ่งสังเคราะห์ AgNP โดยมี PVA เป็นส่วนประกอบก็พบการรวมกลุ่มของ PVA ในลักษณะเดียวกัน ผลในรูปดังกล่าวสามารถกล่าวได้ว่าวัสดุดักติด PVA นอกจากจะลดโอกาสสัมผัสของเซลล์และ AgNP แล้วยังปกป้องจุลินทรีย์จาก AgNP ทางกายภาพโดยรวมกลุ่มและยึด AgNP ด้วยวัสดุดักติด (รูปที่ 4.9c)



รูปที่ 4.9 เซลล์ดักติดด้วย PVA a) ที่กำลังขยาย 1,500× b) การรวมกลุ่มของ AgNP ในวัสดุดักติด PVA (ไม่มี NAS) ที่กำลังขยาย 1,000× และ c) การรวมกลุ่มของ AgNP ในวัสดุดักติด PVA (ไม่มี NAS) ที่กำลังขยาย 10,000×

เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ดักติดด้วย PVA และ CA พบว่าแม้วัสดุดักติดด้วย CA ไม่สามารถยึด AgNP ได้ดัง PVA แต่เซลล์ดักติดด้วย CA ยังมีประสิทธิภาพดีกว่าซึ่งคาดว่าเกิดจากโครงสร้างของ CA มีความละเอียดมากกว่า PVA จากผลนี้ยังสามารถชี้ได้อีกว่ากลไกการปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ในกรณีนี้คาดว่าเป็นกลไกทางกายภาพเป็นสำคัญ

สำหรับผลการศึกษาด้วย TEM พบว่าเซลล์อิสระและเซลล์ดักติดทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายกันดังรูปที่ 4.10 โดยพบเซลล์ถูกทำลายลักษณะคล้ายกันแต่พบว่าเซลล์อิสระมีจำนวนเซลล์ถูกทำลายมากกว่า รูปที่ 4.10a เป็นรูปเซลล์อิสระที่ไม่ถูกทำลาย (จากชุดทดลองควบคุม) เมื่อเปรียบเทียบกับรูปที่ 4.10b ซึ่งเป็นเซลล์ที่มาจากการทดลองชุดที่มี AgNP พบว่ามีจุดดำภายในเซลล์จำนวนมาก จุดดังกล่าวคาดว่าเป็น AgNP ที่เคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์หรือรอยฉีกขาดของเซลล์ (ซึ่งมีลักษณะขบยุ่ย) นอกจากนี้ยังพบว่าการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ดังรูปที่ 4.10c ซึ่งผลลักษณะนี้เป็นไปตามงานวิจัยที่ผ่านมา (Choi and Hu, 2008; Marambio-Jones and Hoek, 2010)



รูปที่ 4.10 รูปเซลล์ a) จากชุดควบคุม b) จากชุดที่มี AgNP และ c) เซลล์ที่ถูกทำลาย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

- 1) กระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชันเป็นไปตามโมเดลของ Michaelis-Menten โดยมีค่า OUR_{max} และ K_s ของกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน OUR_{max} เท่ากับ 0.2132 และ 0.2273 mg-O₂/L/min และ K_s เท่ากับ 5.42 และ 15.87 mg-N/L ตามลำดับ
- 2) ภายใต้สภาวะที่มี AgNP เมื่อความเข้มข้นของ AgNP เริ่มต้นสูงส่งผลให้ OUR_{max} และ K_s ลดลง โดยจลนพลศาสตร์การยับยั้งด้วย AgNP ในการศึกษาเป็นแบบไม่มีการแข่งขันทั้งในกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน ซึ่งมีค่าคงที่การยับยั้ง K_i ของกระบวนการไนตริฟิเคชันและแอมโมเนียออกซิเดชัน เท่ากับ 9.3 และ 5.5 mg/L ตามลำดับ
- 3) เมื่อ AgNP มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นระดับของการยับยั้งของสูงขึ้น AgNP ที่ความเข้มข้น 0.25 ถึง 10.00 mg/L ส่งผลให้เกิดการยับยั้งร้อยละ 8 ถึง 38 ในกระบวนการไนตริฟิเคชันและร้อยละ 14 ถึง 28 ในกระบวนการแอมโมเนียออกซิเดชัน ส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นมิได้มีผลต่อร้อยละการยับยั้งอย่างชัดเจน
- 4) เซลล์จุลินทรีย์ถูกทำลายด้วย AgNP ในลักษณะที่ผนังและเยื่อหุ้มเซลล์ยุบและฉีกขาด นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารรั่วไหลของสารภายในเซลล์
- 5) OUR ของการทดลองด้วยเซลล์ดักติดด้วย PVA ขนาดเล็กและใหญ่มี OUR เท่ากับ 0.000-0.006 และ 0.006-0.014 mg-O₂/L/min ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ชุดทดลองที่ไม่มี AgNP) พบว่ากิจกรรมไนตริฟิเคชันคิดเป็นร้อยละ 5-11 และ 44-88 ของชุดควบคุม ส่วนในชุดทดลองเซลล์ดักติดด้วย CA ขนาดเล็กและใหญ่พบว่ามีค่า OUR ระหว่าง 0.009-0.014 และ 0.019-0.024 mg-O₂/L/min ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่ากิจกรรมไนตริฟิเคชันคิดเป็นร้อยละ 65-110 และ 81-94 ของชุดควบคุม
- 6) เซลล์ในวัสดุดักติดขนาดใหญ่ได้รับผลจาก AgNP น้อยกว่า (การเปลี่ยนถ่ายมวลสารพิษน้อยกว่า) ส่งผลให้กิจกรรมไนตริฟิเคชันได้ดีกว่า
- 7) เซลล์ดักติดด้วย CA ลดการยับยั้งดีกว่า PVA เนื่องจากมีโครงสร้างที่ละเอียดกว่า
- 8) จากการศึกษาลักษณะเซลล์ดักติดในระดับจุลภาคพบว่ากลไกการปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ในกรณีนี้คาดว่าเป็นกลไกทางกายภาพเป็นสำคัญ

5.2 ข้อเสนอแนะ

- 1) ควรมีการทดลองสภาวะดำเนินระบบบำบัดด้วยเซลล์ดักติดที่เหมาะสม เช่น ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม ระยะเวลาพักน้ำ (hydraulic retention time) ระยะเวลาพักเซลล์ (solid retention time) เป็นต้น เพื่อศึกษาความเหมาะสมก่อนการประยุกต์ใช้จริงต่อไป
- 2) ควรมีการศึกษาความคงทนของเซลล์ดักติด เพื่อให้ทราบความเหมาะสมในการใช้งานจริงต่อไป รวมทั้งควรมีงานศึกษาครอบคลุมการพัฒนาวัสดุดักติดที่มีความคงทนสูงมากขึ้น
- 3) ควรมีงานศึกษาต่อเนื่องในประเด็นกลไกการเสริมของ AgNP ให้เกิดการยับยั้งด้วยตัวเอง
- 4) ควรมีการศึกษากลไกการยับยั้งของ AgNP ในระดับชีวโมเลกุล

บรรณานุกรม

- Abou El-Nour, K.M.M., Eftaiha, A., Al-Warthan, A., Ammar, R. 2010. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*. 3, 135-140.
- Aksu, Z., Bulbul, G., 1999. Determination of the effective diffusion coefficient of phenol in Ca-alginate-immobilized *P. putida* beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 344-348.
- Amendola, V., Polizzi, S., Meneghetti, M. 2007. Free silver nanoparticles synthesized by laser ablation in organic solvents and their easy functionalization. *Langmuir*, 23 (12), 6766–6770.
- Arvizo, R.R., Bhattacharyya, S., Kudgus, R.A., Giri, K., Bhattacharyya, R., Mukherjee, P. 2012. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chemical Society Reviews*. 41, 2943-2970.
- Asharani, P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P., Valiyaveetil, S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 3, 279-290.
- Atiyeh, B.S., Costagliola, M., Hayek, S.N., Dibo, S.A. 2007. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns*, 33, 139-148.
- Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan Darrin, J., Ismat Shah S. 2005. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5 (2), 244-249.
- Becker, M.F., Brock, J.R., Cai, H., Henneke, D.E., Keto, J.W., Lee, J., Nichols, W.T., Glicksman, H.D. 1998. Metal nanoparticles generated by laser ablation. *Nanostructured Materials*. 10 (5), 853-863.
- Benn, T.M., Westerhoff, P. 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabric. *Environmental Science and Technology*. 42, 4133-4139.
- Blaser, S.A., Scheringer, M., MacLeod, M., and Hungerbühler, K. 2008. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the Total Environment*, 390, 396-409.
- Bokshits, Yu., V., Shevchenko, A.N., Ponyavina, A.N., Rakhmanov, S.K. 2004. Formation of silver and copper nanoparticles upon the reduction of their poorly soluble precursors in aqueous solution. *Colloidal Journal*. 66 (5), 517-522.

- Carrera, J., Jubany, I., Carvallo, L., Chamy, R., and Lafuente, J. 2004. Kinetic models for Nitrification inhibition by ammonium and nitrite in a suspended and an immobilized biomass systems. *Process biochemistry*. 39, 1159-1165.
- Cassidy, M.B., Lee, H., Trevors, J. T., 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 16, 79-101.
- Chaudhry, Q., Scotter, M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A., Castle, L., Aitken, R., Watkins, R. 2008. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 25 (3), 241-258.
- Chaloupka, K., Malam, Y., Seifalian, A.M. 2010. Nanosilver as a new generation of nanoprodukt in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*. 28 (11), 580-588.
- Chen, K.C., Lin, Y.F. 1994. Immobilization of microorganisms with phosphorylated polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 79-83.
- Chen, K.C., Lee, S.C., Chin, S.C., Houn, J.Y. 1998. Simultaneous carbon-nitrogen removal in wastewater using phosphorylated PVA-immobilized microorganisms. *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 311-320.
- Chen, X. Schluesener, H.J. 2008. Nanosilver: a nanoprodukt in medical application. *Toxicology Letters*. 176, 1-12.
- Choi, O., Clevenger, T.E., Deng, B., Surampalli, R.Y., Ross, L., Hu, Z. 2009. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Research*, 43, 1879-1886.
- Choi, O., Deng, K.K., Kim, N.J., Ross, L., Surampalli, R.Y., Hu, Z. 2008. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, 42, 3066-3074.
- Choi, O.K., Hu, Z.Q. 2008. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria, *Environmental Science and Technology*, 42, 4583-4588.
- Choi, O.K., Hu, Z.Q. 2009. Nitrification inhibition by silver nanoparticles. *Water Science and Technology*, 59, 1699-1702.
- Damm, C., Munstedt, H., Rosch, A. 2008. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites. *Materials Chemistry and Physics*. 108, 61-66.

- Darroudi, M., Ahmad M.B., Abdullah A.H., Ibrahim N.A., Shameli K. 2010. Effect of accelerator in green synthesis of silver nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 11, 3898-3905.
- Dankovich, T.A., Gray, D.G. 2011. Bactericidal paper impregnated with silver nanoparticles for point-of-use water treatment. *Environmental Science and Technology*. 45 (5), 1992-1998.
- Durán, N., Marcato, P.D., De Conti, R., Alves, O.L., Costa, F.T.M., Brocchi, M. 2010. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 21 (6), 949-959.
- Dursun, A.Y., Tepe, O., 2005. Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized *Ralstonia eutropha*. *Journal of Hazardous Materials*, 126, 105-111.
- Elichiguerra, J.L., Burt, J.L., Morones, J.R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H.H., and Yacaman, M.J., 2006. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 3, 6.
- Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Zhao, K., Cui, F.Z., Kim, T.N. 2000. A mechanism study of antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 52, 662-668.
- Gerardi, M.H. 2002. Nitrification and Denitrification in Activated Sludge Process. John Wiley & Sons, Inc., NY.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental Science and Technology*. 43 (24), 9216-9222.
- Guzman, M., Dille, J., Godet, S. 2012. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 8, 37-45.
- He, B., Tan, J.J., Liew, K.Y., Liu, H., 2004. Synthesis of size controlled Ag nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 221, 121-126.
- Hellinga, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1998. The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Science and Technology*, 37, 135-142.
- Hoque, M.E., Khosravi, K., Newman, K., Metcalfe, C.D. 2012. Detection and characterization of silver nanoparticles in aqueous matrices using asymmetric-flow

- field flow fractionation with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1233, 109-115.
- Hill, C.B., Khan, E. 2008. A Comparative Study of Immobilized Nitrifying and Co-Immobilized Nitrifying and Denitrifying Bacteria for Ammonia Removal of Sludge Digester Supernatant. *Water, Air, and Soil Pollution*, 195, 23-33.
- Hsu, S.L., Wu, R. 2007. Synthesis of contamination-free silver nanoparticle suspensions for micro-interconnects. *Materials Letters*. 61(17), 3719-3722.
- Hu, Z., Liang, Z., Das, A. 2010. Bacterial response to a shock load of nanosilver in an activated sludge treatment system. *Water Research*, 44, 5432-5438.
- Hwang, E., Lee, J., Chae, Y., Kim, Y., Kim, B., Sang, B., Gu, M. 2008. Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. *Small*. 4, 746-750.
- Hynning, D.L.V., Zukoski, C.F., 1998. Formation mechanisms and aggregation behavior of borohydride reduced silver particles. *Langmuir*, 14, 7034-7046.
- Jung, W.K., Koo, H.C., Kim, K.W., Shin, S., Kim, S.H., Park, Y.H. 2008. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, 74(7), 2171-2178.
- Kaegi, R., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Mueller, E., Vonbank, R., Boller, M., Burkhardt, M. 2010. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environmental Pollution*. 158 (9), 2900-2905.
- Kaegi, R., Voegelin, A., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Burkhardt, M., Siegrist, H. 2011. Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environmental Science and Technology*. 45 (9), 3902-3908.
- Kim, B., Park, C.-S., Murayama, M., Hochella, M.F. 2010. Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products. *Environmental Science and Technology*. 44 (19), 7509-7514.
- Kok, F.N., Hasirci V. 2000 in: Wise, D.L., Trantolo, D.J., Cichon, E.J., Inyang, H.I., Stottmeier U. (Eds.), *Bioremediation of Contaminated Soils*, Marcel Dekker, New York, 465-535.
- Kokura, S., Handa, O., Takagi, T., Ishikawa, T., Naito, Y., Yoshikawa, T. 2010. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 6 (4), 570-574.

- Konneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B. Waterbury, J.B., Stahl, D.A. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437, 543-546.
- Lapresta-Fernández, A., Fernández, A., Blasco, J. 2012. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends in Analytical Chemistry*. 32, 40-59.
- Lehtinen, K.E.J., Backman, U., Jokiniemi, J.K., Kulmala, M. 2004. Three-body collisions as a particle formation mechanism in silver nanoparticle synthesis. *Journal of Colloid and Interface Science*. 274(2), 526-530.
- Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442, 806-809.
- Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D.Y., Brunet, L. Liga, M.V., Li, D., and Alvarez, P.J.J. 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Research*, 42, 4591-4602.
- Limbach, L. K., Wick, P., Manser, P., Grass, R. N., Bruinink, A., Stark, W. J. 2007. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environmental Science and Technology*, 41, 4158-4163.
- Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Tam, P.K.-H., Chiu, J.-F., Che, C.-M. 2006. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research*. 5 (4), 916-924.
- Lv, Y., Liu, H., Wang, Z., Liu, S., Hao, L., Sang, Y., Liu, D., Wang, J., Boughton, R.I. 2009. Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment. *Journal of Membrane Science*. 331 (1-2), 50-56.
- Mafuné, F., Kohno, J., Takeda, Y., Kondow, T., Sawabe, H. 2000. Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry B*. 104, 9111-9117.
- Manimegalai, G., Shantha Kumar, S., Sharma, C. 2011. Pesticide mineralization in water using silver nanoparticles. *International Journal of Chemical Sciences*. 9 (3), 1463-1471.
- Marambio-Jones, C., Hoek, E.M.V. 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterial and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1531-1551.

- Maretti, L., Billone, P.S., Liu, Y., Scaiano, J.C. 2009. Facile photochemical synthesis and characterization of highly fluorescent silver nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 131 (39), 13972-13980.
- McFarland, A.D., Van Duyne, R.P. 2003. Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity. *Nano Letters*, 3 (8), 1057-1062.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H., Kim, S. 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Science*. 77, 2166-2178.
- Mitrano, D.M., Leshner, E.K., Bednar, A., Monserud, J., Higgins, C.P., Ranville, J.F. 2011. Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31(1), 115-121.
- Morones, J., Elechiguerra, J., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J., Ramirez, J., Yacaman, M. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 16, 2346-2353.
- Mueller, N.C., Nowack, B. 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science and Technology*. 42 (12), 4447-4453.
- Murray, B.J., Li, Q., Newberg, J.T., Menke, E.J., Hemminger, J.C., Penner, R.M. 2005. Shape- and size-selective electrochemical synthesis of dispersed silver(I) oxide colloids. *Nano Letters*. 5 (11), 2319-2324.
- Musee, N. 2010. Simulated environmental risk estimation of engineered nanomaterials: A case of cosmetics in Johannesburg City. *Human and Experimental Toxicology*. DOI: 10.1177/0960327110391387.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 311, 622-627.
- Ngeontae, W., Janrungroatsakul, W., Maneewattanapinyo, P., Ekgasit, S., Aeungmaitrepirom, W., Tuntulani, T., 2009. Novel potentiometric approach in glucose biosensor using silver nanoparticles as redox marker. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 137, 320-326.
- Nowack, B. 2010. Nanosilver revisited downstream. *Science*. 330 (6007), 1054-1055.
- Park, S., Bae, W. 2009. Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. *Process Biochemistry*, 44, 631-640.

- Park, J.K., Chang, H.N. 2000. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*, 18, 303-319.
- Park, S., Ely, R.L. 2008. Candidate stress genes of *Nitrosomonas europaea* for monitoring inhibition of nitrification by heavy metals. *Apply and Environmental Microbiology*, 74, 5475-5482.
- Park, H.D., Noguera, D.R. 2004. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Water Research*, 38, 3275-3286.
- Pietrobon, B., Kitaev, V. 2008. Photochemical synthesis of monodisperse size-controlled silver decahedral nanoparticles and their remarkable optical properties. *Chemistry of Materials*. 20 (16), 5186-5190.
- Pramanik, S., Khan, E. 2008. Effects of cell entrapment on growth rate and metabolic activity of mixed cultures in biological wastewater treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 43, 245-251.
- Pyatenko, A., Shimokawa, K., Yamaguchi, M., Nishimura, O., Suzuki, M. 2004. Synthesis of silver nanoparticles by laser ablation in pure water. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*. 79 (4-6), 803-806.
- Raffi, M., Rumaiz, A.K., Hasan, M.M., Ismat Shah, S. 2007. Studies of the growth parameters for silver nanoparticle synthesis by inert gas condensation. *Journal of Materials Research*, 22, 3378-3384.
- Rai, M., Yadav, A., Gade, A. 2009. Silver Nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. 27, 76-83.
- Ren, S., Frymier, P.D. 2003. Kinetics of toxicity of metals to luminescent bacteria. *Advanced Environment Research*, 7, 537-547.
- Ren, X., Meng, X., Chen, D., Tang, F., Jiao, J. 2005. Using silver nanoparticle to enhance current response of biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 21 (3), 433-437.
- Rodríguez-Sánchez, L., Blanco, M.C., López-Quintela, M.A. 2000. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 104, (41), 9683-9688.
- Sharma, V.K., Yngard, R.A., Lin, Y. 2009. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*. 145, 83-96.

- Siripattanakul, S., Pochant, C. J., and Khan, E. 2008a. Immobilized Cell Bioaugmentation for Nitrate Removal from Agricultural Infiltrate: A Sand Column Study. *IWA World Water Congress 2008*, Vienna, Austria, September 7-12, 2008.
- Siripattanakul, S., Wirojanagud, W., McEvoy, J., Khan, E. 2008b. Effect of cell-to-matrix ratio in polyvinyl alcohol immobilized pure and mixed cultures for atrazine degradation. *Water, Air, and Soil Pollution: Focus*, 8, 257-266.
- Siripattanakul, S. and Khan, E. 2010. Fundamentals and Applications of Entrapped Cell Bioaugmentation for Contaminant Removal. In: *Emerging Environmental Technologies, Volume 2*. Springer,
- Smidsrod, O., Skjak-Braek, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8, 71-78.
- Tian, J., Wong, K.K.Y., Ho, C., Lok, C., Yu, W., Che, C., Chiu, J., Tam, P.K.H. 2007. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*. 2, 129-136.
- van Veen, J.A., van Overbeek, L.S., van Elsas, J.D. 1997, Fate and activity of microorganism introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 121-135.
- Wang, H., Qiao, X., Chen, J., Ding, S. 2005. Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 256, 111-115.
- Wang, Y., Ma, L., Li, Z., Du, Z., Liu, Z., Qin, J., Wang, X., Huang, Z., Gu, L., Chen, A.S.C. 2004. Synergetic inhibition of metal ions and genistein on α -glucosidase. *FEBS Letter*, 576, 46-50.
- Wu, P., Xie, R., Imlay, K., Shang, J.K. 2010. Visible-light-induced bactericidal activity of titanium dioxide codoped with nitrogen and silver. *Environmental Science and Technology*, 44, 6992-6997.
- Wu, Z., Zhang, Y., Tao, T., Zhang, L., Fong, H. 2010. Silver nanoparticles on amidoximefibers for photo-catalytic degradation of organic dyes in waste water. *Applied Surface Science*. 257 (3), 1092-1097.
- Xu, X.H., Brownlow, W.J., Kyriacou, S.V., Wan, Q., and Viola, J.J., 2004. Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochemistry*, 43, 10400–10413.

- Xu, R., Wang, D., Zhang, J., Li, Y. 2006. Shape-dependent catalytic activity of silver nanoparticles for the oxidation of styrene. *Chemistry - An Asian Journal*. 1 (6), 888-893.
- Yang, P.Y., Zhang, Z.Q., Jeong, B.G. 1997. Simultaneous removal of carbon and nitrogen using an entrapped-mixed-microbial-cell process. *Water Research*, 31, 2617-2625.
- Yin, B., Ma, H., Wang, S., Chen, S. 2003. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles under protection of poly(*N*-vinylpyrrolidone). *The Journal of Physical Chemistry B*. 107 (34), 8898-8904.
- Zheng, X., Guo, D., Shao, Y., Jia, S., Xu, S., Zhao, B., Xu, W., Corredor, C., Lombardi, J.R. 2008. Photochemical modification of an optical fiber tip with a silver nanoparticle film: A SERS chemical sensor. *Langmuir*. 24 (8), 4394-4398.

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมตัวอย่างและเซลล์ดักติด

ภาคผนวก ก1

วิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM

- 1) The cell samples were fixed by a glutaraldehyde solution of 2.5% overnight at 4 °C.
- 2) The fixed cells were washed by a series of solutions including the phosphate buffer and deionized water.
- 3) The washed cells were mixed with an osmium tetroxide solution of 1%.
- 4) After that, the mixture was mixed with melt agar of 1.5% to form the gel.
- 5) The hardened agar was cut as a cube and was then dehydrated with 35%, 50%, 70%, 95% of ethanol, and absolute ethanol, respectively.
- 6) The dehydrated cubic cells were saturated in propylene oxide and were then soaked with spur resin and propylene oxide mixture.
- 7) The cubes were baked at 70 °C for 8 to 10 hr.
- 8) The baked cubes were cut by an ultramicrotome.
- 9) The cut cubes with sizes between 60 and 90 nm were pasted into copper grid and stained with uranyl acetate and lead citrate for increasing the contrast.
- 10) The stained cubes with cells were observed using TEM (JEOL, JEM-2100, Tokyo, Japan) at Chulalongkorn Univeristy, Thailand.

วิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ SEM

- 1) The CA-entrapped cell beads were rinsed in a CaCl_2 solution and fixed in a glutaraldehyde solution. The beads were cut into two parts (half) by ultramicrotome (Leica, CM 3000, Nussloch, Germany). After that, they were dehydrated with a series of ethanol and CaCl_2 solutions. Then, the absolute ethanol was applied as the last step of dehydration. The dehydrated bead pieces were dried using a critical point dryer (Balzers, CPD 020, Liechtenstein). Then, the pieces were attached to a stub by glue and coated with gold using an ion sputter (Balzers, SCD 040, Liechtenstein).
- 2) The PVA-entrapped cells were prepared in a similar manner as the CA-entrapped cells. The PVA-entrapped cells were fixed in a glutaraldehyde solution. The beads were dehydrated with a series of ethanol solutions. Then, the beads were divided into two parts using a razor blade in liquid nitrogen, attached to a stub, and coated with gold.
- 3) For free cells, 2 mL of the NAS samples were fixed with a glutaraldehyde solution. The fixed cells were washed in phosphate buffer and a 1% osmium tetroxide solution. The cells were mixed with melt agar of 1.5% to form gel at 45-50°C. The hardened agar was cut into 0.5-mm cubes. The cubes with cells were dehydrated with a series of ethanol solutions.
- 4) The dried CA and PVA beads and the free cells were observed using SEM with an energy dispersive spectroscopy attachment (SEM-EDS) (JEOL, JSM-5410LV, Tokyo, Japan).

ภาคผนวก ก2

วิธีการเตรียมตัวอย่างและเซลล์ดักติด

The entire CA cell entrapment preparation procedure was described elsewhere (Smidsrod and Skjak-Braek, 1990; Siripattanakul and Khan, 2010). A sodium alginate solution of 2% (w/v) was mixed with the concentrated NAS. The mixture was dropped into a calcium chloride solution of 3.5% (w/v) to form CA spherical beads with a diameter of 3 or 6 mm. The CA beads were kept at 4°C until use.

The PVA cell entrapment preparation procedure was according to Siripattanakul et al. (2008b). A polyvinyl alcohol solution of 10% (w/v) was mixed with the concentrated NAS homogenously. The mixture was dropped into a saturated boric acid solution to form 3 or 6 mm spherical beads. The formed spherical beads were transferred to 500 mL of 1 M sodium orthophosphate buffer (pH 7.0) and left for 1-2 hr to obtain harden PVA beads. The PVA beads were kept at 4 °C until use. Both CA and PVA-entrapped cells were freshly prepared for each experiment.

ภาคผนวก ข

บทความวิชาการ

บทความวิชาการในงานประชุมวิชาการ

1. Ploychankul, C., Rongsayamanont, C., Limpayakorn, T., and **Siripattanakul, S.**
Influence of Silver Nanoparticle on Nitrification Performance in Wastewater Treatment System. *2010 Asian-Pacific Regional Conference on Practical Environmental Technologies*, Ubonratchathani, Thailand, March 24-27, 2010.
2. Giao N., **Siripattanakul S.**, and Limpiyakorn T. Influence of Nanoparticles on Ammonium Oxidation of Enriched Nitrifying Activated Sludge. The Third Conference on Environmental science, Engineering and Management, Bangkok, Thailand, March 14-15, 2011.

บทความวิชาการในวารสารวิชาการ

1. **Siripattanakul-Ratpukdi, S.**, Ploychankul, C., Limpiyakorn, T., Rongsayamanont, C., Vangnai, A.S., Khan, E., Mitigation of Nitrification Inhibition by Silver Nanoparticles Using Cell Entrapment Technique. **Submitted to *Water Research***
2. **Siripattanakul-Ratpukdi, S.**, Fürhacker, M., Vangnai, A.S., Khan, E., Silver Nanoparticles Contaminated in Engineered Environmental Treatment Systems, **Prepared for submitting to *Journal of Hazardous material***

Ploychankul, C., Rongsayamanont, C., Limpayakorn, T., and **Siripattanakul, S.**
Influence of Silver Nanoparticle on Nitrification Performance in Wastewater Treatment
System. *2010 Asian-Pacific Regional Conference on Practical Environmental
Technologies*, Ubonratchathani, Thailand, March 24-27, 2010.

INFLUENCE OF SILVER NANOPARTICLE ON NITRIFICATION PERFORMANCE IN WASTEWATER TREATMENT SYSTEM

Chutima Plovchankul^{1,2}, Chaiwat Rongsayamanont^{1,2}, Tawan Limpayakorn³, Sumana Siripattanakul^{4*}

¹ *International Postgraduate Programs in Environmental Management, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand*

² *National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management (NCE-EHWM), Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand*

³ *Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand*

⁴ *Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering and NCE-EHWM, Ubon Ratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand*

* E-mail: sumana.s@ubu.ac.th Tel: +66-45-353-300 ext. 3359

INTRODUCTION

Nanotechnology relates to a wide range of technologies that incorporate materials feature with a range of dimensions between approximately 1 and 100 nm. Nanoparticles, particles in nano scale, are a part of nanotechnologies claimed to substances, such as silver, iron, gold, and the particles that have no direct analog, nanotubes (nano-scale carbon), as well as, dendrimers (nano-scale organic compounds) [1,2]. The nanoparticles have been incorporated in numerous consumer products. Silver nanoparticle (nAg) is one of the most well-liked nanoparticles utilized in the world. It is known as an antimicrobial agent. In industrial sector, nAg was broadly utilized in products, such as bicycles frames, plastic containers, drug, and textiles [3-6]. Thus far, trend of nAg utilization has obviously increased. Although there was no published document of nAg contamination in the environment, the nAg contamination would be a problematic issue in environment either surface water, soil, groundwater, or wastewater treatment systems in the near future.

Silver particle including nAg is used as an antimicrobial agent. The silver particle inhibits growth of microbial cells, synthesis of protein, deoxyribonucleic acid, and ribonucleic acid, and activity of dehydrogenases enzymes in tricarboxylic acid cycle [7]. Previous studies reported that antimicrobial capability of the silver particle was because of its toxicity [8-9]. Otherwise, it was investigated that the silver particle can destroy or attach to cell membrane resulting in the effect on growth or viability [10]. Nonetheless, most of previous studies were focused on effect of silver particles in micro-scale [8-10].

Among wastewater treatment processes, nitrification is known as a sensitive process to environmental conditions, such as temperature, pH, or toxic substance [11-14]. There were a few studies on fate and toxicity mechanism of nAg in wastewater treatment systems. The previous studies focused on effect of the nAg in the difference of sizes [10]. The result indicated that nAg gave worse effect than general silver particle (micro-scale) since nAg could penetrate through cell membrane and attribute to 100-time higher effect to the cells

compared to the micro-scale silver particle. The work is needed to continue in different variations for better understanding in the effect of nAg on the nitrification process.

The aim of this study is to investigate the influence of nAg on the activity of NAS in synthetic wastewater treatment system based on respirometric experiment. The nitrification with different nAg and ammonia concentrations was conducted. Oxygen uptake rate (OUR) and specific oxygen uptake rate (SOUR) were then calculated.

MATERIALS AND METHODS

Nitrifying Activated Sludge and Cultural Conditions

Returned activated sludge from Siphaya municipal wastewater treatment plant, Bangkok, Thailand was taken and cultivated in two 12-L sequencing batch bioreactors (SBR) under aerobic condition for 1.5 months. The nitrifying bacteria in these bioreactors were enriched at a hydraulic retention time (HRT) of 2 d and a solid retention time (SRT) of approximately 24 d. The compositions of growth medium and inorganic salt were shown in Table 1.

Table1 The composition of growth medium

Chemical	Concentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.33 g/L
NaHCO_3	0.75 g/L
K_2HPO_4	2.1 g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.07 g/L
Inorganic salt	1 ml/L

Table2 The composition of inorganic salt

Chemical	Concentration
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40 g/L
KH_2PO_4	200 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 g/L
Na_2MoO_4	0.1 g/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.2 g/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.02 g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.002 g/L

Silver Nanoparticle Characteristics

Silver nanoparticles were obtained from Sensor Research Unit at Department of Chemistry, Chulalongkorn University, Thailand. The nAg was characterized before used. The spherical nAg with an average size of 14 nm was applied in the study since it is a typical properties of nAg widely utilized in industrial section.

Respirometer Setup and Operation

The duplicate experiments were conducted. A respirometer was built from a 250-mL flask with a screw cap coupled with the oxygen probe (WTW inoLab Oxi 730, WTW GmbH, Germany). The apparatus was set as shown in Figure 1. The NAS was taken and centrifuged at 4,000 rpm for 5 min. Supernatant was discarded. The centrifuged NAS was resuspended in a washing solution (an inorganic salt solution) and vigorously mixed using a vertical shaker. The resuspended NAS was centrifuged. The washing solution was then discarded. The washed NAS was then rewashed with this manner for 4 times.

The cleaned NAS was transferred into the respirometer. The synthetic wastewater containing with different ammonia and nAg concentrations as shown in Table 3 was added into the respirometer. Note that the final mixture in the respirometer contained the cleaned NAS at volatile suspended solid (VSS) of 500 mg/L. The respirometer was operated and monitored every minute until dissolved oxygen (DO) concentrations reached stable.

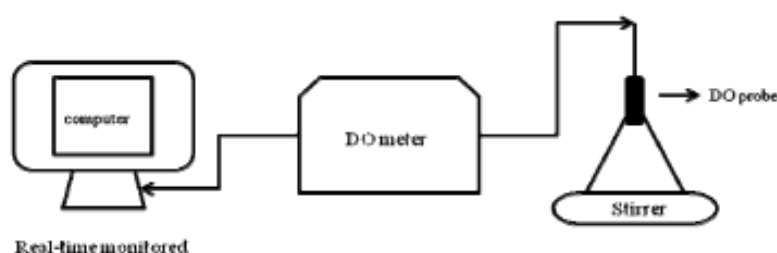


Figure 1 Respirometer setup

Table3 Synthetic wastewater compositions

No.	Test Name	nAg concentration (mg/L)	NH ₃ concentration (mg/L)
1	00528NP	0.05	28
2	0528NP	0.50	28
3	528NP	5.00	28
4	00570NP	0.05	70
5	0570NP	0.50	70
6	570NP	5.00	70

Oxygen Uptake Rate and Specific Oxygen Uptake Rate Calculation

Oxygen Uptake Rate was figured by DO value while SOUR was calculated by OUR and cell mass value in the respirometer. The rates were calculated as shown in equation 1 and 2. Note that the rates were calculated only during the log (rapid declining) period.

$$OUR = \frac{d[DO]}{dt} = \text{Slope of DO value versus time graph} \quad (1)$$

$$SOUR = \frac{OUR}{VSS} \quad (2)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Initial Ammonia Concentration

Nitrification of the nAg-contaminated wastewater at the ammonia concentrations of 28 and 70 mg-N/L was performed. The concentrations (28 and 70 mg-N/L) were selected to represent ammonia concentrations in municipal wastewater treatment and sludge digestion systems, respectively. The observed DO values from the tests with each nAg concentration and ammonia concentrations of 28 and 70 mg-N/L were similar as shown in Figure 2. From the tests with nAg concentrations of 0.05 and 0.5 mg/L and ammonia concentrations of 28 and 70 mg-N/L (Test No. 1 to 4), DO quickly decreased during the first 40-60 min and reached steady state at approximately DO of 0 mg O₂/L thereafter (Figure 2a and 2b). On the contrary, DO of the tests with nAg concentration of 5 mg/L and ammonia concentrations of 28 and 70 mg-N/L (Test No. 5 and 6) gradually decreased (Figure 2c). After testing for 200 min, DO of 3 and 7 mg O₂/L still observed in the systems with the ammonia concentrations of 28 and 70 mg-N/L, respectively.

Based on the results in Figure 2, OURs and SOURs were calculated as shown in Table 4. The OUR and SOUR values indicated that the different ammonia concentrations (28 and 70 mg-N/L) did not play any role in nitrification process. Normally, the initial ammonia concentration influences nitrification (OUR and SOUR) rate. Higher ammonia concentration gives higher nitrification rate while too high ammonia concentration inhibits the rate. Phenomenon observed in this study could be because the tested ammonia concentrations did not much different resulting in similar nitrification rates. The result indicated that the ammonia concentration of lower than 70 mg-N/L did not inhibit nitrification in the nAg-contaminated wastewater. Similarly, Kim et al. reported ammonia concentration of lower than 350 mg-N/L did not affect nitrification process [15].

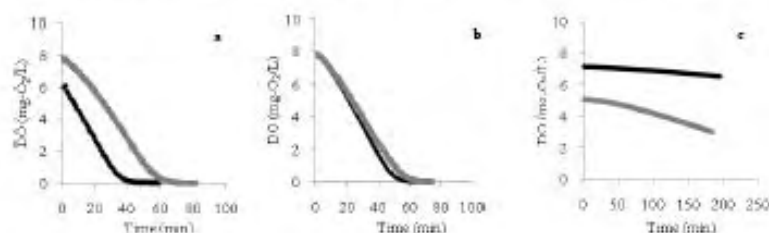


Figure 2 Dissolved oxygen concentration from the tests at 28 mg-N/L (black color) and 70 mg-N/L (grey color) with nAg concentrations of (a) 0.05 mg/L, (b) 0.5 mg/L, and (c) 5mg/L, respectively

Table 4 Oxygen Uptake Rates and Specific Oxygen Uptake Rates

No.	Test name	NH ₃ concentration (mg-N/L)	nAg concentration (mg/L)	OUR (mg O ₂ /L/min)	SOUR (mg O ₂ /g VSS/min)
1	00528NP	28	0.05	0.1675	0.4437
2	0528NP	28	0.50	0.1649	0.4368
3	528NP	28	5.00	0.0038	0.0101
4	00570NP	70	0.05	0.1359	0.3600
5	0570NP	70	0.50	0.1455	0.3854
6	570NP	70	5.00	0.0058	0.0154

The average VSS was 0.3775±0.1 mg-VSS/L

Effect of Initial Silver Nano-particle Concentration

Nitrification of the nAg-contaminated wastewater at different nAg concentrations was performed (Figure 3). Figures 3a and 3b present similar results. The DO concentrations of the tests at the nAg concentrations of 0.05 and 0.5 mg/L were similar. The DO values dramatically decreased during the first hour to accomplished DO of 0 mg O₂/L. On the other hand, DO at the nAg concentration of 5 mg/L was gradually reduced and did not reach steady state. It is also noticed that the tests at the nAg concentration of 5 mg/L were much more time-consuming.

Based on the OUR and SOUR results in Table 4, it is obvious that different nAg concentrations played an important role in nitrification process. The rates of the tests at nAg concentrations of 0.05 and 0.5 mg/L were nearly the same (OUR of 0.014 to 0.016 mg-O₂/L/min and SOUR of 0.36 to 0.44 mg-O₂/g VSS/min) while the rates of the tests at nAg concentrations of 5 mg/L were 50-times less than those from other tests. This indicated that nAg apparently inhibited nitrification process. However, the concentrations of nAg also influenced nitrification differently. It could imply that threshold concentration of nAg to nitrifying bacteria and nitrification process may be between 0.5 and 5 mg/L. Similarly, Çeçen et al. concluded that the increasing of heavy metal concentration inhibited the OUR activity in nitrifying bacteria [16-17].

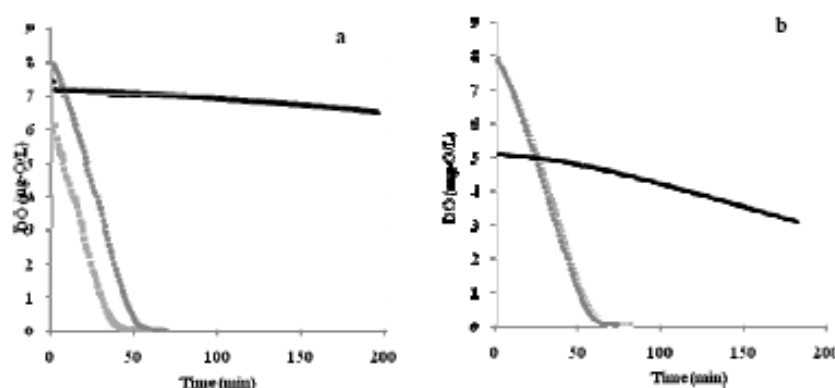


Figure 3 Dissolved oxygen from the tests at nAg concentrations of 0.05 mg/L (light grey), 0.5 mg/L (grey), and 5 mg/L (black) with ammonia concentrations of a) 28 mg-N/L and b) 70 mg-N/L, respectively.

CONCLUSIONS

Nitrification of the nAg-contaminated wastewater at different nAg concentrations was investigated. The results showed that the initial ammonia concentration did not influence nitrification while the nAg concentration played an important role in nitrification process. The tests at the nAg concentrations of 0.05 and 0.5 mg/L completed nitrification within an hour while nitrification from the tests with high nAg concentration (5 mg/L) was obviously inhibited. The OUR and SOUR values ranged from 0.004 to 0.016 mg-O₂/L/min and 0.01 to 0.44 mg-O₂/gVSS/min, respectively. The rates from tests at nAg concentrations of 5 mg/L were 50-times less than those from other tests. For future study, the other environmental factors on nitrification of the nAg-contaminated wastewater, such as temperature and pH should be conducted for a better understanding. Also, insight information of the inhibition mechanism and abatement technology should be concerned.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors thanks Associate Professor Sanong Ekgasit and Pattawat Maneewattanapinyo, the Department of chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for providing a nAg solution and its information.

REFERENCES

- [1] Kaiser J.-P., Wick P., Manser P., Spohn P., Bruinink A.: *J. Mater. Sci. Mater. M.* 19, 4 (2008) 1523-1527.
- [2] Savage N., Diallo M.S.: *J. Nano. Res.* 7, 4-5 (2005) 331-342.
- [3] Kanellos, M. Carbon nanotubes enter Tour de France, CNET News.com, 07/07/2006.
- [4] Yang P.H., Sun X.S., Chiu J.F., Sun H.Z., He Q.Y.: *Bioconjugate Chem.* 16 (2005) 494-496.
- [5] Hong R., Han G., Fernandez J.M., Kim B.J., Forbes N.S., Rotello V.M.: *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 1078-1079.

- [6] Benn T.M., Westerhoff P.: *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 4133-4139.
- [7] Surve N.N., Bagde U.S.: *Int. J. Biomed. Sci.* 7, 3 (2009) 139-144.
- [8] McGeer J.C., Playle R.C., Wood C.M., Galvez F.: *Environ. Sci. Technol.* 34, 19 (2000) 4199-4207.
- [9] Fan F.F., A.J.: *J. Phys. Chem. B* 106, 2 (2002) 279-287.
- [10] Choi O.K., Hu Z.: *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 4583-4588.
- [11] Bernet N., Dangcong P., Delgenès J.-P., Moletta R.: *J. Environ. Eng.* 127, 3 (2001) 266-271.
- [12] Ford D.L., Churchwell R.L., Kachtick J.W.: *J. Water Pollut. Control Fed.* 52, (1980) 2726-2746.
- [13] Shammas N.K.: *J. Water Pollut. Control Fed.* 58, 52 (1986) 52-58.
- [14] Painter H.A.: *Water Res.* 4 (1970) 393-450.
- [15] Kim Y.M., Park D., Lee D.S., Park J.M.: *J. Hazard. Mater.* 152, 3 (2008) 915-921.
- [16] Çeçen F., Neslihan S., Geyik A.G.: *J. Hazard. Mater.* (2010).
- [17] Hu Z., Chandran K., Grasso D., Smets B.F.: *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3074-3078.

Giao N., **Siripattanakul S.**, and Limpiyakorn T. Influence of Nanoparticles on Ammonium Oxidation of Enriched Nitrifying Activated Sludge. The Third Conference on Environmental science, Engineering and Management, Bangkok, Thailand, March 14-15, 2011.

Influence of Silver Nanoparticles on Ammonium Oxidation of Enriched Nitrifying Activated Sludge

Nguyen Thanh Giao^{1,2}, Sumana Siripattanakul³, Tawan Limpiyakorn⁴

¹National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²International Postgraduate Programs in Environmental Management, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand;

³Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering and National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management, Ubon Ratchathani University, Ubonratchathani, Thailand

⁴Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Abstract

Ammonium oxidation plays an important role in nitrogen removal in any wastewater treatment facilities. This process is known as a very low microbial reproduction rate since the microorganisms are very sensitive to non-growth substrates including toxic substances. Silver nanoparticles (AgNPs) are one of the toxic substances significantly increased in production and use. In this study, the inhibitory effect of AgNPs on ammonium oxidation was investigated. The initial concentrations of AgNPs and ammonium nitrogen ranged from 0.25 to 10 mg/L and 14 to 280 mg/L, respectively. The result showed that the effect of AgNPs on ammonium oxidation process followed uncompetitive inhibition model. The calculated inhibition coefficient (K_i) was 21.7 mg/L while half saturation coefficient (K_s) was 15.9 mgN-NH₄⁺/L. The results also indicated that AgNPs inhibited ammonium oxidation of 25 to 30% for the low and moderate and approximately 41% for the high ammonium containing wastewater treatment plants. The initial concentration of AgNPs caused side-effects for ammonium oxidation was recorded at 0.25 mg/L. Silver nanoparticles at low concentrations of 0.25, 0.5 and 1 mg/L inhibited up to 16%, 26% and 38% ammonium oxidation activities in wastewater treatment plants, respectively. The findings imply that AgNPs have negative impacts on nitrogen removal in biological reactors.

Key words: ammonia oxidizing microorganism, silver nanoparticle, inhibition coefficient, nitrifying activated sludge

Introduction

Silver nanoparticles (AgNPs) have been widely used and gained public attention due to its biocidal characteristics. It was proved having negative impact on human cells as well as environment (Kim et al., 2008; Kim et al., 2009), especially nitrification process in activated sludge systems (Blaser, 2008). Nitrification is widely used process for biological removal of nitrogen from wastewater. Among wastewater treatment processes, it is believed that one of the most sensitive processes in wastewater treatment systems. The process comprises of two-steps. Ammonia (NH₃) is oxidized to nitrite (NO₂⁻) by ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) and then nitrite is subsequently oxidized to nitrate (NO₃⁻) by nitrite-oxidizing microorganisms (NOM). Of which, ammonium oxidation is known as a rate-limiting and more sensitive step because of the microorganism behaviors. Thus, the presence of AgNPs in wastewater treatment facilities may cause unexpected effects on ammonium oxidative performances of the systems.

Effects of toxic substances in wastewater treatment plants have been intensively investigated. Several heavy metals, such as Cr^{3+} , Cr^{6+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , and Cd^{2+} have been studied and postulated to cause significant effects as a non-competitive inhibitor on nitrification process in activated sludge systems (Lewandowski et al., 1985; Cokgor et al., 2007). However, inhibitory kinetic information of AgNPs in ammonium oxidation process is still lacking.

Purpose

The purpose of the present study was to investigate the ammonium oxidation inhibitory kinetics by AgNPs. The findings of this study will contribute understanding the effects of AgNPs on wastewater treatment operation. This can be useful in many practical applications that can result in improved biological reactor design and regulations of production and use of AgNPs products.

Materials and methods

Silver nanoparticle synthesis

Silver nanoparticles were obtained from Sensor Research Unit at Department of Chemistry, Chulalongkorn University, Thailand. The particles were synthesized by borohydride reduction process followed method described elsewhere (Hynning and Zukoski, 1998; Ngeontae et al., 2009). The silver nanoparticles were synthesized from silver nitrate with sodium borohydride in the methyl cellulose solution. The spherical AgNPs with an average size of 14 nm were characterized using transmission electron microscopy. Note that size and shape were chosen because they are typical characteristics applied in commercial products.

Enrichment of nitrifying activated sludge (NAS)

The activated sludge was collected from Siphaya Municipal Wastewater Treatment Plant (Bangkok, Thailand) and enriched in 12-L reactors in sequencing batch reactor mode for 6 months before use. The hydraulic retention time and solid retention time of the reactors were maintained at 2 days and 24 days, respectively. Temperature, pH, and dissolved oxygen concentration (DO) were maintained at 25-30°C, 7-8, and above 2 mg/L, respectively. The activity of NAS was monitored by measuring the decrease of ammonium (NH_4^+) and increase of nitrate (NO_3^-) in the reactors. The stock sludge was used for the respirometric experiments when the ammonia utilization rate reached steady state. Enrichment medium was described elsewhere (Limpiyakorn et al., 2007). A synthetic stock feed medium contained 0.33 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4.04 g/L Na_2HPO_4 , 2.1 g/L K_2HPO_4 , 0.75 g/L NaHCO_3 , and trace inorganic salt solution 1mL. The solution comprised 40 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 200 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L Na_2MoO_4 , 0.2 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 0.002 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. All chemicals were purchased from Merck Company (Darmstadt, Germany) via local distributor.

Respirometric essay setup and operation

In respirometric experiments, mix liquor volatile suspended solids (MLVSS) of 110 ± 14 mg/L was centrifuged, washed, and added to the vessel, which was later filled up with synthetic wastewater. The synthetic wastewater formulation was the same with the stock feed prepared by phosphate buffer with pH range from 7.8 to 8.2. Sodium azide (NaN_3) was added to the final concentration of $24 \mu\text{M}$ to inhibit nitrite oxidizers (Ginestet et al., 1998). The vessel was magnetically stirred and operated at room temperature ($23\text{-}25^\circ\text{C}$). The DO depletion in the vessel due to ammonium utilization was monitored and recorded every minute by using DO probe (DO meter, WTW GmbH, Weiheim, Germany). For the tests with AgNPs, six duplicate experiments were performed. Each of experiment was carried out with the initial concentrations of N-NH_4^+ ranged from 14-280 mg/L at fixed AgNPs. The initial AgNP concentrations were 0.25, 0.5, 1, 3, 5, and 10 mg/L. The vessel was aerated until it reached saturation at dissolved oxygen concentration of 7-8 mg/L. The blank experiments were performed as the same manner but no AgNPs were supplied. The oxygen consumption by heterotrophs also was tested by using the treatment without ammonium.

Analytical methods

Nitrogen species such as N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- , and MLVSS were determined followed protocols in Standard Method for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition (APHA, 1998). Regarding to these protocols, ammonium was measured by using phenate method, nitrite was followed colorimetric method, and nitrate was followed ultraviolet spectrophotometric screening method. Analysis of MLVSS was performed by using 2540E method. The DO concentrations and pH were measured by WTW OxiLevel-2 DO meter (WTW GmbH, Weiheim, Germany) and WTW Inolab-1 pH meter (WTW GmbH, Weiheim, Germany), respectively.

Kinetic analysis

Oxygen Uptake Rate (OUR) was determined based on the change of dissolved oxygen over the time. The OUR was then used for determination of $\text{OUR}_{\max}$ and K_s values by fitting the OUR and initial ammonium concentrations into Monod equation with Michaelis-Menten type (equation 1) by using SigmaPlot version 11.0 (Sigmaplot, Dick Mitchell, SYSTAT, Inc.):

$$\text{OUR} = \text{OUR}_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

where OUR is the oxygen uptake rate ($\text{mg O}_2/\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$); $\text{OUR}_{\max}$ is the maximum oxygen uptake rate ($\text{mg O}_2/\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), S is the growth-substrate concentration ($\text{mg N-NH}_4^+/\text{L}$), K_s is the half saturation coefficient for growth-substrate ($\text{mg N-NH}_4^+/\text{L}$). Under the presence of AgNPs the equation (1) is rewritten as follow (equation 2):

$$\text{OUR} = \text{OUR}_{\max} \frac{S}{K_s + S(1 + \frac{I}{K_i})} \quad (2)$$

where I is the concentration of AgNPs (mg/L), K_i is inhibition constant (mg/L). The equation (2) can be taken the reciprocal of both sides to give the Lineweaver-Burk model as shown below (equation 3):

$$\frac{1}{OUR} = \frac{K_s}{OUR_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{OUR_{max}} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \quad (3)$$

The K_i value in equation 2 can be estimated by plotting K_s values against the inhibitor $[I]$ concentration. A better approach to estimate K_i is to plot the K_s / OUR_{max} versus inhibitor concentration $[I]$. The intercept on the x-axis will give the $-K_i$ value. Enzyme Kinetic Modules incorporated in the SigmaPlot software (Sigmaplot, Dick Mitchell, SYSTAT, Inc.) could easily solve for K_i based on equation (3).

Results and discussion

Ammonia oxidizing activity without AgNPs

The experiment comprises of phosphate and bicarbonate buffer but no ammonia and no AgNPs were used to test heterotrophic activity. The result (Figure 1) showed that dissolved oxygen was constant at 7.5 mg/L meaning that the slope representing for the oxygen consumption rate was zero (Figure 1a). This implied that heterotrophs insignificantly competed oxygen with ammonium oxidizing microbes. In addition, the experiment included ammonium concentration of 70 mg/L mixed together with relevant amounts of phosphate and bicarbonate buffer, with AgNPs at the concentration of 10 mg/L and without any nitrifying cells was also performed. The result obtained was the same with heterotrophic test that there was found not any dissolved oxygen consumed (Figure 1b) implying that there was only nitrifying microorganisms consumed dissolved oxygen.

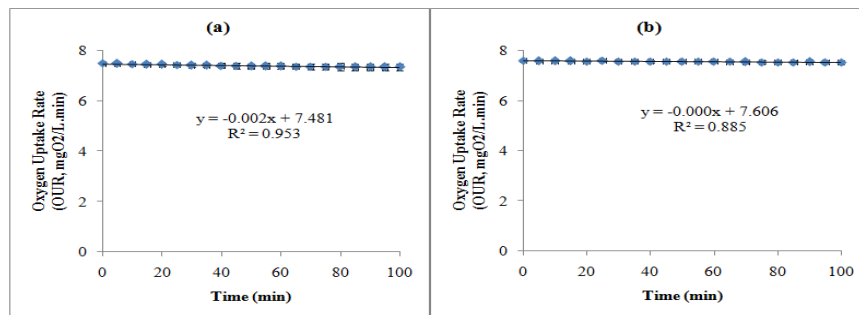


Figure 1. The control experiments (a) heterotrophs test (b) dissolved oxygen sink test

Influence of initial $N-NH_4^+$ concentrations on ammonium oxidation performance was showed in the Figure 2. The rate of oxygen consumption was expressed by slope of the linear line that represents for depletion of dissolved oxygen with respect to time. The results indicated that the initial $N-NH_4^+$ concentrations influenced ammonium oxidation activity in the manner that higher $N-NH_4^+$ concentration result in higher ammonium oxidation rate. Dissolved oxygen decreased rapidly or the slope increased when $N-NH_4^+$ concentration increased. For instances, the slopes were 0.002, 0.064, 0.123, 0.125, 0.193 and 0.198 $mgO_2/L.min$ corresponded to $N-NH_4^+$

concentrations of 0, 5, 10, 50, 70, and 280 mg/L. It was observed that the slope increase slowly when N-NH_4^+ concentration increased from 70 mg/L to 280 mg/L. The result of this study was in the line with that reported by Kim et al. that the N-NH_4^+ concentration of lower than 350 mg/L did not affect the nitrification process thus did not influence ammonium oxidation process.

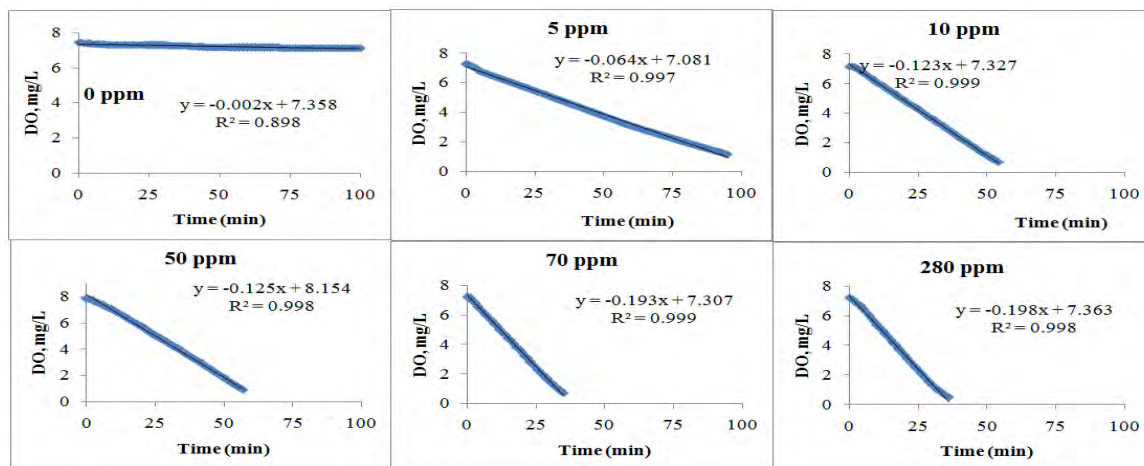


Figure 2. Influence of N-NH_4^+ concentration on Oxygen Uptake Rate

Ammonia oxidizing activity with AgNPs

Influence of AgNPs and N-NH_4^+ on oxygen uptake rate on the ammonium oxidation (Figure 3) was investigated. As can be seen, AgNPs reduced dissolved oxygen consumption ability of nitrifying microbes. For example, at the fixed concentration of N-NH_4^+ of 14 mg/L, the oxygen uptake rates for ammonium oxidation were 0.097, 0.093, 0.088, 0.085, and 0.085 $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$ corresponding to the AgNPs concentrations of 0, 0.25, 0.5, 1 and 5 mg/L. At higher N-NH_4^+ concentrations of 28 mg/L and 70 mg/L which were selected to represent for the N-NH_4^+ concentration in most of the municipal and industrial wastewater treatment plants, the results of oxygen uptake rates also indicated when increasing AgNPs concentrations resulted in decreasing in oxygen uptake rates but the slopes almost leveled off when AgNPs in the range of 1-10 mg/L regardless of the N-NH_4^+ concentration.

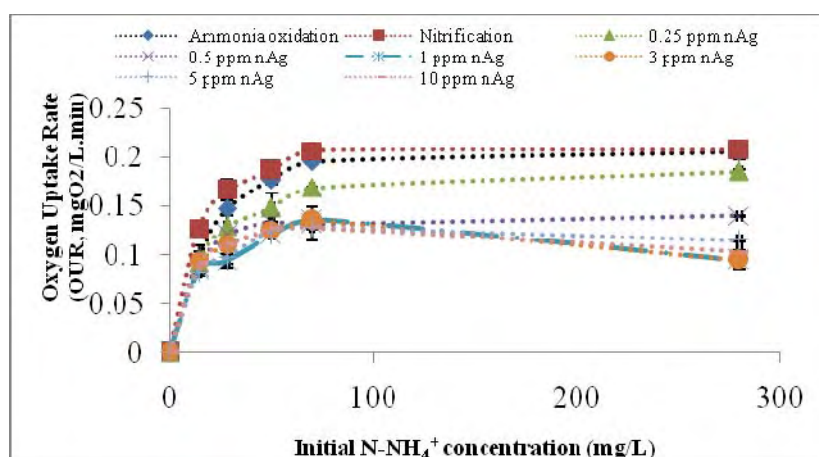


Figure 3. Oxygen Uptake Rate in the presence of AgNPs

Inhibitory ammonium oxidation kinetics

The ammonium oxidation kinetics was calculated followed Monod or Michaelis-Menten equation as shown in Figure 4. The calculated OUR_{max} and K_s were 0.227 mg O₂/L.min and 15.88 mg N-NH₄/L respectively. The calculated K_s value was lower to that of Bilge and Cecen (2007) (K_s = 60-70 mgN/L) but higher than in Carrera's study (K_s = 11mgN/L). This could be because in the prior study, the activated sludge was fed with high initial N-NH₄⁺ concentration of 200 mg/L whereas this study only used around 70 mg/L of N-NH₄⁺ resulting in lower values. In another study, Racz et al. (2010) found K_s values of 17.8 mg-N/L, and 26.5 mg-N/L for peptone-fed reactor and glucose-fed reactor, respectively. It was believed that the concentration of organic carbon was different in activated sludge resulted in different microbial community leading to different in ammonium oxidation. This explanation was in accordance with the result interpretation from Bilge and Cecen (2007). However, the result in Figure 4 shows that NAS in this study mostly consume oxygen for ammonium oxidation process since OUR_{max} and K_s values of ammonium oxidation and full nitrification were similar.

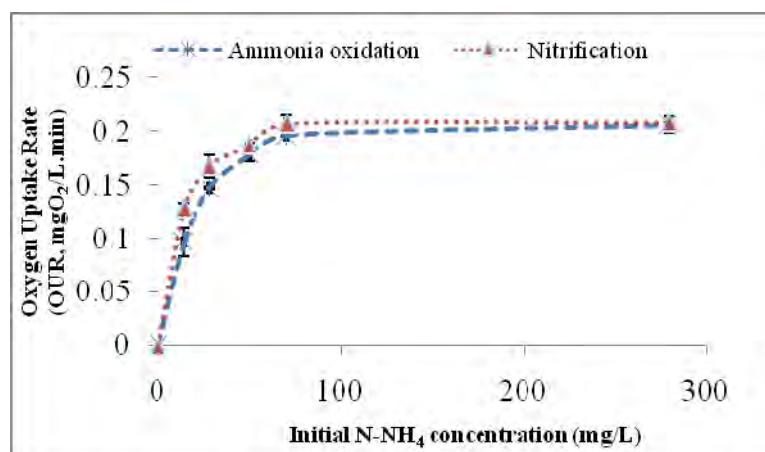


Figure 4. Oxygen uptake rate of the enriched NAS

At different concentrations of AgNPs, apparent OUR patterns followed the Michaelis-Menten type (Figure 3). The Michaelis-Menten equation is the fundamental equation of Enzymes Kinetics and describes a rectangular hyperbolic dependence of velocity on substrate. It has the dual nature because it is a combination of zero-order and first-order kinetics. When substrate is low, the equation for rate is first-order in substrate and when substrate is high, the equation for rate is zero-order. In this study, an increasing AgNPs led to a decreasing of oxygen uptake rates indicating that the inhibitory effect of AgNPs on ammonium oxidation. It seemed that AgNPs have the characteristics of an uncompetitive inhibition because the apparent OUR_{max} and K_s are both slightly decreased. In fact, for true uncompetitive inhibition, the OUR_{max} and the K_s are decreased by the same factor ($1 + I/K_i$), so the ratio of K_s/OUR_{max} does not change. This resulted in a Lineweaver-Burk plot with two parallel lines corresponding to the uninhibited and inhibited experiments (Figure 5).

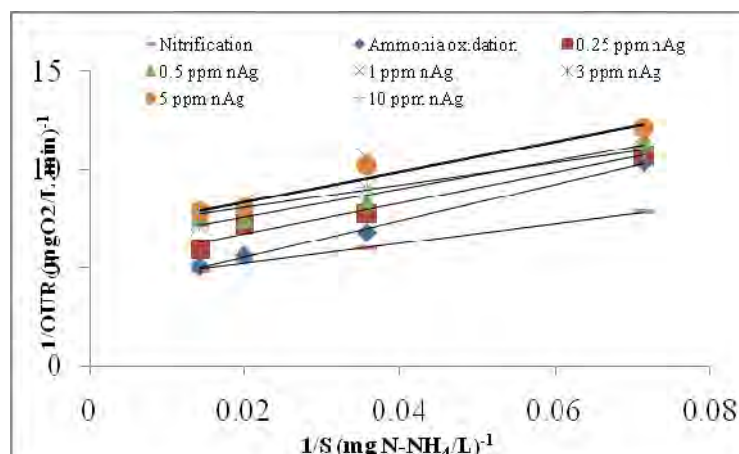


Figure 5. Lineweaver - Burk Plot

Inhibition coefficient K_i

The calculated inhibition coefficient K_i was 21.7 mg/L. So far, there is no published report of K_i value for AgNPs for ammonium oxidation in the activated sludge system. Only a few studies have been focused on calculation of K_i values for heavy metals (Lewandowski et al., 1985). Effects of metals on biodegradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) by using pure culture of *Pseudomonas aeruginosa* were studied. Accordingly, the inhibition coefficient K_i for Cr^{3+} , Zn^{2+} , and Mn^{2+} were in the range of 161-165 mg/L while the inhibition coefficient for Cu^{2+} was recorded at the concentration of 32.4 mg/L. The calculated K_i for AgNPs in this study was lower than that of literature. Some other studies found lower K_i values compared to this study. For examples, K_i value of 12 mg/L also was estimated for cadmium (Cd^{2+}) in the denitrification process in activated sludge (Gumaelius et al., 1996) and inhibition coefficient for Cr^{6+} was found to be 1.2 mg/L in the biological reactors (Lewandowski et al., 1985). Silver nanoparticles exhibited inhibitory effect differently from heavy metals. Most of heavy metals fell into noncompetitive inhibition while AgNPs was found to be uncompetitive behavior in the present study. Some heavy metals can stimulate the growth of the microbes for instances, Ni^{2+} , Co^{2+} , Cr^{6+} at the concentration of 10, 5, and 25 mg/L were significantly stimulated the maximum growth rate in the activated sludge (Gikas, 2007). This kind of stimulation effect was not observed in this study.

Quantification of the inhibition of AgNPs for ammonium oxidation indicated that AgNPs at the very low concentrations of 0.25, 0.5 and 1 mg/L inhibit $16 \pm 8.2\%$, $26 \pm 7.3\%$ and $38 \pm 11.3\%$ of ammonium oxidation activity in the experimental conditions, respectively. The inhibition effect of AgNPs was slightly changed when its concentrations increased from 1 to 10 mg/L. Furthermore, the effect of N-NH_4^+ concentration under the presence of AgNPs also was observed. The results showed that higher N-NH_4^+ concentration may result in higher inhibition rate of respiration of ammonium oxidative microorganisms. The percentage of inhibition was $8 \pm 4.85\%$, $25 \pm 8.98\%$, $26 \pm 2.76\%$, $30 \pm 7.93\%$, and $41 \pm 17.21\%$ for the concentration of 14, 28, 50, 70 and 280 mg $\text{N-NH}_4^+/\text{L}$, respectively. The integration effect of AgNPs and N-NH_4^+ was observed at high (280 mg/L) concentration of N-NH_4^+ but more evidence needed to make a stronger conclusion.

The previous studies reported that Cr^{6+} and Ni^{2+} inhibited microbial oxygen uptake rate up to 15% and 40%, respectively, within 30 min. Respiration rate of nitrifying bacteria was found to be inhibited by up to 86% at the AgNPs concentration of 1 mg/L (Choi et al., 2008). However,

the result of this present study showed that there was only 38% respiration rate inhibited at the concentration of 1 mg/L. This discrepancy may be because of the presence of both Ammonium Oxidizing Bacteria (AOB) and Ammonium Oxidizing Archaea (AOA) in the cultivated culture. In previous study, it was found that the original activated sludge used in this study comprised both AOA and AOB (Sonthiphand and Limpiyakorn, 2009). Also, it is known that AOA have been reported to be well tolerated in the extreme environments thus they may tolerate with the presence of AgNPs.

Several mechanisms have been proposed for effect of AgNPs on bacteria but not archaea. The growth inhibition of microbes may be related to the formation of free radicals from the surface of AgNPs (Panacek et al., 2009). Uncontrolled generation of free radicals can attach membrane lipids and then lead to a breakdown of membrane function. This may not be the reason for this study, because by nature, free radicals will consume oxygen in the experimental condition; however, the control experiment was conducted and proved that there was no dissolved oxygen consumption other than microbial activity. Another suggested mechanism is the formation of “pits” in the cell wall of bacteria under the presence of AgNPs (Choi et al., 2008). Furthermore, it was recommended that the nanoparticles preferably attack the respiratory chain, cell division finally leading to cell death (Sondi and Salopek-Sondi, 2004). Unfortunately, little information of AgNPs effect mechanisms has been proposed for the case of AOA.

Conclusions

Influence of AgNPs on ammonium oxidation was investigated by using respirometric method. Under the presence of AgNPs, the maximum oxygen uptake rate (OUR_{max}) and half saturation constant (Ks) were slightly declined. The effect of AgNPs on both followed uncompetitive inhibition model. This model was tested using Lineweaver-Burk plot ($1/OUR$ vs $1/S$) resulted in the parallel lines of with and without AgNPs. Half saturation constants (Ks) without AgNPs for ammonium oxidation was $15.88 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$ and the inhibition coefficients (K_i) was 21.7 mg/L . Silver nanoparticles at the very low concentrations of 0.25, 0.5 and 1 mg/L inhibited $16 \pm 8.2\%$, $26 \pm 7.3\%$ and $38 \pm 11.3\%$, respectively, of ammonium oxidation activity in the experimental conditions. The inhibitory effect of AgNPs was slightly changed when its concentrations increased from 1 to 10 mg/L. It is anticipated that the findings of this study will be useful in regulations of production and use of AgNPs products.

Acknowledgement

A financial support of this study was funded by National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management (NCE-EHWM), International Postgraduate Programs in Environmental Management, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand are gratefully acknowledged. We thank to NCE-EHWM laboratory technicians for their academic and technical help during the study period.

References

- American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edition, Washington DC, USA, 1998.
- Blaser, S. A. Estimation of Cumulative Aquatic Exposure and Risk Due to Silver: Contribution of Nano Functionalized Plastics and Textiles. Journal of the Total Environment 390 (2008): 396-409.
- Choi, O., Deng, K. K., Kim, N. J., Ross, J., Surampallie, R. Y., and Hua, Z. The Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles, Silver Ions, and Silver Chloride Colloids on Microbial Growth. Journal of Water Research 42 (2008): 3066-3074.
- Cokgor, E. U., Karahan, O., Ozdemir, S., Insel, G., and Orhon, D. Critical Appraisal of Respirometric Methods for Metal Inhibition on Activated Sludge. Journal of Hazardous Materials B139 (2007): 332-339.
- Gikas, P. Kinetic Responses of Activated Sludge to Individual and Joint Nickel (Ni(II)) and Cobalt (Co(II)): An Isobolographic Approach. Journal of Hazardous Materials 143 (2007): 246-256.
- Ginestet, P., J.M., A., Urbain, V., and Block, J. C. Estimation of Nitrifying Bacterial Activities by Measuring Oxygen Uptake in the Presence of the Metabolic Inhibitors Allylthiourea and Azide. Appl Environ Microbiol. 6 (1998): 2266–2268.
- Gumaelius, L., Smith, E. H., and Dalhammaw, G. Potential Biomarker for Denitrification of Wastewaters: Effects of Process Variables and Cadmium Toxicity. Wat. Res 30,12 (1996): 3025-3031.
- Hynning, D. L. V. and Zukoski, C. F. Formation Mechanisms and Aggregation Behavior of Borohydride Reduced Silver Particles. Langmuir 14 (1998): 7034-7046.
- Kim, S., Choi, E. J., Choi, J., Chung Park, K. H. K., Yi, J., and Ryu, D. Y. Oxidative Stress-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles in Human Hepatoma Cells. Toxicology in Vitro 23 (2009): 1076–1084.
- Kim, Y. S., Kim, J. S., Cho, H. S., Rha, D. S., Kim, J. M., Park, J. D., Choi, B. S., Lim, R., Chang, H. K., Chung, Y. H., Kwon, I. H., Jeong, J., Han, B. S., and Yu, I. J. Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats. Journal of Inhalation Toxicology 20,6 (2008): 575-583.
- Lewandowski, Z., Janta, K., and Mazierski, J. Inhibition Coefficient (K_i) Determination in Activated Sludge Wat. Res 19,5 (1985): 671-674.
- Limpiyakorn, T., Kurisu, F., Sakamoto, Y., and Yagi, O. Effects of Ammonium and Nitrite on Communities and Populations of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Laboratory-Scale Continuous-Flow Reactors. FEMS Microbiol Ecol 60 (2007): 501-512.
- Ngeontae, W., Janrungratsakul, W., Maneewattanapinyo, P., Ekgasit, S., Aeungmaitrepirom, W., and Tuntulani, T. Novel Potentiometric Approach in Glucose Biosensor Using Silver Nanoparticles as Redox Marker. Sensors and Actuators B Chemical 137 (2009): 320-326.
- Panacek, A., Kolar, M., Vecerova, R., Prucek, R., Soukupova, J., Krystof, V., Hamal, P., Zboril, R., and Kvitek, L. Antifungal Activity of Silver Nanoparticles against Candida Spp. Biomaterials 30 (2009): 6333–6340.
- Sondi, I. and Salopek-Sondi, B. Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agent: A Case Study on E.Coli as a Model for Gram-Negative Bacteria. Journal of Colloid and Interface Science 275 (2004): 177-182.

Sonthiphand, P. and Limpiyakorn, T. Communities of Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea in Full – Scale Industrial Wastewater Treatment Plants. Applied and environmental microbiology 6 (2009): 2266–2268.

Siripattanakul-Ratpukdi, S., Ploychankul, C., Limpiyakorn, T., Rongsayamanont, C., Vangnai, A.S., Khan, E., Mitigation of Nitrification Inhibition by Silver Nanoparticles Using Cell Entrapment Technique. **Submitted to *Water Research***

Mitigation of Nitrification Inhibition by Silver Nanoparticles Using Cell

Entrapment Technique

Sumana Siripattanakul-Ratpukdi^{1*}, Chutima Ploychankul^{2,3}, Tawan Limpiyakorn^{3,4},

Chaiwat Rongsayamanont^{2,3}, Alisa S. Vangnai⁵, Eakalak Khan⁶

¹Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering and Center of Excellence
for Environmental and Hazardous Waste Management,
UbonRatchathani University, UbonRatchathani 34190, Thailand

²International Postgraduate Programs in Environmental Management, Graduate School,
ChulalongkornUniversity, Bangkok 10330, Thailand

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

⁴Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering,
Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁵Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University,
Bangkok 10330, Thailand

⁶Department of Civil Engineering, North Dakota State University,
Fargo, ND 58108, USA

***Corresponding author.** Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering,
UbonRatchathani University, Satolmark Street, Warinchamrap, UbonRatchathani 34190,
Thailand. Phone: 66-45-353300 ext. 3359; Fax: 66-45-353333; E-mail:
ensumasi@ubu.ac.th, jeans_sumana@yahoo.com

Abstract

Silver nanoparticles (AgNPs) have substantially increased in production and utilization resulting in potential of AgNPs contamination in engineered and natural environment including wastewater treatment plants. Effects of AgNPs on nitrification activities of free and entrapped nitrifying activated sludge were investigated using a respirometric assay. Initial ammonia and AgNP concentrations, and entrapment materials and matrix sizes were the variables. Scanning and transmission electron microscopic observations of the microbial cells and entrapment matrices were also performed. Results showed that the initial ammonia concentration (28 and 70 mg-N/L) did not influence the nitrification activity while the AgNP concentrations (0.05-5.00 mg/L) affected the nitrification activity (2% to 98% compared to the control). In the presence of AgNPs, both calcium alginate (CA) and polyvinyl alcohol (PVA)-entrapped cells had higher nitrification activity compared to free cells. Nitrification activity in the presence of AgNPs by the CA-entrapped cells was better than that of the PVA-entrapped cells (64% to 100% versus 4% to 87% compared to without AgNPs). Cells entrapped in a larger matrix size performed better. Silver nanoparticles caused damages to cell membrane and cytoplasm which very likely led to decreased nitrification activity. The entrapment matrices successfully reduced the adverse effects of AgNPs on nitrification activity.

Keywords: cell entrapment, cell physiology, nitrification, respirometry, silver nanoparticle

1. Introduction

Silver nanoparticle (AgNP) is one of the most widely utilized nanoparticles in the world. It is known as an effective biocidal agent (Blaser et al., 2008; Marambio-Jones and Hoek, 2010). Silver nanoparticles are broadly applied in products, such as plastic containers, drug, detergent, and textiles. Previous studies have proved that AgNPs adversely influenced microbial viability (Zhang et al., 2008; Marambio-Jones and Hoek, 2010; Guzman et al., 2012). Therefore, AgNP contamination after production or utilization could potentially be a problematic environmental issue in the near future.

Blaser et al. (2008) reported that most AgNPs polluted environment via wastewater treatment systems. The particles might enter wastewater stream via industrial production processes or products during use. Silver nanoparticles tended to attach on microbial sludge at a concentration of up to 39 mg-Ag/kg dry sludge (Blaser et al., 2008). This can cause failure to biological wastewater treatment systems. Among traditional wastewater treatment processes (carbonaceous and nitrogenous removal processes), nitrification is known as a sensitive process (Choi et al., 2008). This is because nitrifying microorganisms are slow growing and sensitive to environmental stresses such as temperature, dissolved oxygen concentration, pH, and toxic substances. For example, nitrification was inhibited at 86% when wastewater was contaminated with 1 mg/L of AgNPs (Choi et al., 2008). Thus far, there have been only few studies on fate and toxicity mechanism of AgNPs in the nitrification process (Choi et al., 2008; Choi and Hu, 2008; Choi and Hu, 2009; Radniecki et al., 2011). There has been no published report on how to mitigate the negative effect of AgNPs on the process.

Cell entrapment technique, immobilization of microorganism in a porous polymeric matrix, is a potential method to alleviate the AgNP inhibition problem. The technique was successfully applied for removal of nitrogen, carbon, and hazardous substances (Chen et al., 1998; Siripattanakul et al., 2008; Siripattanakul and Khan, 2010). Several previous studies reported the success of the entrapped cell utilization for toxic protection (Cassidy et al., 1996; Dursun and Tepe, 2005; Siripattanakul and Khan, 2010). In this case, the technique should be able to lessen the AgNP toxicity leading to reliable nitrification activity in wastewater treatment plant.

This study aimed to investigate the use of cell entrapment technique for providing effective nitrification of wastewater contaminated with AgNPs. Two widely used polymeric materials including calcium alginate (CA) and polyvinyl alcohol (PVA) were chosen as entrapment matrices. Nitrification kinetics was tested using a respirometric assay. Initial ammonia and AgNP concentrations, entrapment material types (CA and PVA), and matrix sizes (small and large diameter beads) were the variables. A free cell system was examined as a comparison. Microbial cells and matrix microstructures were observed using electron microscopy to gain insight information on AgNP toxicity.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Alginic acid sodium salt was acquired from Sigma-Aldrich (Singapore) and polyvinyl alcohol (99.0-99.8% fully hydrolyzed, molecular weight 77,000-79,000) was obtained from J.T. Baker (NJ, USA). Other chemicals including chemicals for cultural medium,

cell entrapment, nitrification parameter analyses, and sample preparation for microscopic observation were laboratory grade obtaining from local distributors (Bangkok, Thailand).

2.2 Silver nanoparticle synthesis

Silver nanoparticles were synthesized by borohydride reduction process following a method described elsewhere (Hynning and Zukoski, 1998; Ngeontae et al., 2009). The plasmon extinction of the particles was at 403 nm with a narrow full width at half height of 50 nm. The particles were spherical and had an average size of 14 nm based on transmission electron microscopy (TEM) (Figure 1). The size and shape were consistent with typical characteristics of commercial AgNPs.

2.3 Nitrifying activated sludge and cultural condition

Returned activated sludge was collected from a Municipal Wastewater Treatment Plant, Bangkok, Thailand. The plant employs an activated sludge process with a flow rate of 30,000 m³/d and a solids retention time of 28 d. Nitrifying bacteria in the collected sludge was enriched in two 12-L sequencing batch reactors under aerobic conditions for 1.5 months. The hydraulic and solids retention times of the reactors were 2 and 24 d, respectively. Synthetic wastewater was used for the enrichment and comprised (in 1L): 0.33 g of (NH₄)₂SO₄, 0.75 g of NaHCO₃, K₂HPO₄ of 2.1 g, Na₂HPO₄•2H₂O of 5.07, and an inorganic salt solution of 1mL. The inorganic salt solution contained 40 g of MgSO₄•7H₂O, 40 g of CaCl₂•2H₂O, KH₂PO₄ of 20 g, FeSO₄•7H₂O of 1 g, Na₂MoO₄ of 0.1 g, MnCl₂•4H₂O of 0.2g, CuSO₄•5H₂O of 0.02 g, ZnSO₄•7H₂O of 0.1 g, and CoCl₂•6H₂O of 0.002 g.

2.4 Cell preparation

2.4.1 Free cell preparation

The enriched nitrifying activated sludge (NAS) was centrifuged at 4,000 rpm for 5 min and the supernatant was discarded. The centrifuged NAS was resuspended in a washing solution of 10 mL (an inorganic salt solution described earlier) and vigorously mixed using a vertical shaker for 5 min. The resuspended NAS was washed by vigorous shaking, centrifuging, and discarding the washing solution for 4 times. The washed NAS was then resuspended in the inorganic salt solution to obtain concentrated NAS of 5,000 mg/L.

2.4.2 Entrapped cell preparation

The entire CA cell entrapment preparation procedure was described elsewhere (Smidsrod and Skjak-Braek, 1990; Siripattanakul and Khan, 2010). A sodium alginate solution of 2% (w/v) was mixed with the concentrated NAS. The mixture was dropped into a calcium chloride solution of 3.5% (w/v) to form CA spherical beads with a diameter of 3 or 6 mm. The CA beads were kept at 4°C until use.

The PVA cell entrapment preparation procedure was according to Siripattanakul et al. (2008). A polyvinyl alcohol solution of 10% (w/v) was mixed with the concentrated NAS homogenously. The mixture was dropped into a saturated boric acid solution to form 3 or 6 mm spherical beads. The formed spherical beads were transferred to 500 mL of 1 M sodium orthophosphate buffer (pH 7.0) and left for 1-2 hr to obtain harden PVA

beads. The PVA beads were kept at 4 °C until use. Both CA and PVA-entrapped cells were freshly prepared for each experiment.

2.5 *Respirometer setup and operation*

A respirometer was built from a 250-mL flask with a screw cap coupled with a dissolved oxygen (DO) meter (WTW inoLabOxi 730, WTW GmbH, Germany). The DO concentration was continuously measured and recorded in a computer for the entirety of each experiment. The setup was tested for interferences from the environment by monitoring DO concentration continuously using sterilized synthetic wastewater with no inoculation. It was found that the DO remained stable throughout the test duration of 12 hr.

The cleaned NAS (free cells), CA-entrapped cells, or PVA-entrapped cells were transferred into the respirometer which was later completely filled with the synthetic wastewater containing different ammonia and AgNP concentrations (described later) to avoid oxygen diffusion into the system. The final mixture in the respirometer contained the cleaned NAS at a volatile suspended solids (VSS) concentration of 500 mg/L for both free and entrapped cells. The respirometer was operated and monitored every minute until DO concentration stabilized. The DO data were recorded and calculated for oxygen uptake rate (*OUR*) according to equation 1. The rates were calculated only during the log (rapid DO declining) period. Percentage of the nitrification activity was calculated using equation 2.

$$OUR = \frac{d[DO]}{dt}$$

equation 1

$$\% \text{ Activity} = \frac{OUR_{test}}{OUR_{control}} \times 100$$

equation 2

[DO] is DO concentration (mg/L) while t is time (min). OUR_{test} (mg-O₂/L/min) is a calculated OUR of the test (such as one for CA-entrapped cells, 3 mm matrix diameter, ammonia of 28 mg/L, and AgNPs of 0.50 mg/L, see the next paragraph for variables). $OUR_{control}$ is a calculated OUR of the test at the same conditions but without AgNPs.

All experiments in this study were duplicated. For the tests by free NAS, the influences of initial ammonia concentration (28 and 70 mg-N/L) and AgNP concentration (0.00, 0.05, 0.50, and 5.00 mg/L) were examined. Later, the effect of the CA and PVA-entrapped bead sizes (3 mm and 6mm in diameter representing small and large beads) was determined for selected initial ammonia and AgNP concentrations. After the respirometric assay, the entrapped NAS and the matrices (only the material used as a control to compare to the entrapped cells) of 5 beads were observed for bead physiology using scanning electron microscopy (SEM). Twenty milliliters of the free cells and 20 beads of CA and PVA-entrapped cells were also examined for structural changes using TEM and SEM, respectively.

2.6 Scanning electron microscopy

The CA and PVA-entrapped cells were prepared for SEM observations according to a procedure described elsewhere (Siripattanakul et al., 2008; Siripattanakul et al., 2010). Briefly, the CA-entrapped cell beads were rinsed in a CaCl₂ solution and fixed in a glutaraldehyde solution. The beads were cut into two parts (half) by ultramicrotome (Leica, CM 3000, Nussloch, Germany). After that, they were dehydrated with a series of ethanol and CaCl₂ solutions. Then, the absolute ethanol was applied as the last step of

dehydration. The dehydrated bead pieces were dried using a critical point dryer (Balzers, CPD 020, Liechtenstein). Then, the pieces were attached to a stub by glue and coated with gold using an ion sputter (Balzers, SCD 040, Liechtenstein).

The PVA-entrapped cells were prepared in a similar manner as the CA-entrapped cells. The PVA-entrapped cells were fixed in a glutaraldehyde solution. The beads were dehydrated with a series of ethanol solutions. Then, the beads were divided into two parts using a razor blade in liquid nitrogen, attached to a stub, and coated with gold. The dried CA and PVA beads were observed using SEM with an energy dispersive spectroscopy attachment (SEM-EDS) (JEOL, JSM-5410LV, Tokyo, Japan).

2.7 Transmission electron microscopy

For free cells, 2 mL of the NAS samples were fixed with glutaraldehyde solution. The fixed cells were washed in phosphate buffer and a 1% osmium tetroxide solution. The cells were mixed with melt agar of 1.5% to form gel at 45-50°C. The hardened agar was cut into 0.5-mm cubes. The cubes with cells were dehydrated with a series of ethanol solutions similar to the SEM sample preparation. The dehydrated cubes were saturated in a series of propylene oxide and spur resin. Next, the cubes were baked at 70°C for 8-10 hr. The baked cubes were cut by an ultramicrotome. The cut cubes with thickness of between 60 and 90 nm were pasted onto copper grid and stained with uranyl acetate and lead citrate to increase the contrast. For the entrapment beads, 5 beads were cut into small pieces and then squeezed to get the microbial cells out of the matrices. After that, the cells were prepared in the same manner as the free cells. The stained cubes with cells were observed using TEM (JEOL, JEM-2100, Tokyo, Japan).

3. Results and Discussion

3.1 Effects of initial ammonia and AgNP concentrations on nitrification activity of free cells

The DO curves from the tests at different AgNP concentrations (0.00, 0.05, 0.50, and 5.00 mg/L) and ammonia concentrations (28 and 70 mg-N/L) are shown in Figure 2. It is noted that these two ammonia concentrations were chosen because they are the typical influent concentrations of the municipal wastewater treatment systems. For most of the tests, the DO quickly decreased during the first 150 min and tended to stabilize after it was approaching depletion. Only DO of the tests at AgNP concentration of 5.00 mg/L decreased gradually and at the end of the experiments (180 to 200 min), DO of approximately 4 to 7 mg-O₂/L remained.

Based on the results in Figure 2, *OURs* were calculated and presented in Table 1. The *OUR* values for the tests at different AgNP concentrations ranged from 0.004 to 0.168 and 0.006 to 0.146 mg-O₂/L/min at the initial ammonia concentrations of 28 and 70 mg-N/L, respectively. These *OUR* results suggested that initial ammonia concentration slightly affected nitrification activity (*OUR*). Normally, initial ammonia concentration influences nitrification rate (Anthonisen et al., 1976; Yoon and Kim, 2003; Kim et al., 2006; Park et al., 2009). Higher ammonia concentration gives higher nitrification rate while too high ammonia concentration inhibits the activity. The phenomenon observed in this study could be because both tested ammonia concentrations were much lower than inhibition level and were not different enough resulting in similar *OURs*.

It is obvious that initial AgNP concentrations affected *OUR*. The *OURs* at the initial AgNP concentrations of 0.00 (control), 0.05, and 0.50 mg/L were nearly the same (*OUR* of 0.1 mg-O₂/L/min) (Table 1). The nitrification activity decreased 18-29% as the initial

AgNP concentration increased from 0.05 to 0.50 mg/L. The *OURs* of the tests at the initial AgNP concentration of 5.00 mg/L were up to 14-times less than those of the other tests and decreased 96% compared to the test without AgNP (control)(Table 1). The results suggested that AgNPs at a concentration of 5.00mg/L or higher almost completely inhibited nitrification.

It was reported that portions of AgNPs can dissolve to Ag^+ ions (ranging between 0.1 to 2.2% of the total silver content) but the degree of dissolution depends on AgNP preparation method and experimental conditions (Lok et al., 2007; Choi et al., 2008). Silver can affect cellular physiology especially interactions with proteins including cell organelles, enzymes, or nucleic acids resulting in partial or complete inhibition to microbial activity (Ren and Frymier, 2003; Choi et al., 2008; Marambio-Jones and Hoek, 2010). Antibacterial action of AgNPs can be from two mechanisms: 1) Intracellular protein damage by Ag^+ ions releasing from AgNPs or reactive oxygen species created by Ag^+ ions and AgNPs and 2) Cell surface damage by attachment of Ag^+ ions and AgNPs (Marambio-Jones and Hoek, 2010). The nitrification inhibition observed in this study could be from either cell surface or protein damage by AgNPs and Ag^+ ions. Since ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase, which are enzymes governing ammonia oxidation, are located in cell membrane (Choi et al., 2008), the attachment of AgNPs and Ag^+ ions onto the cell surface and penetration into cell membrane may result in deactivation of the enzymes.

3.2 Nitrification mitigation using the entrapped cells

Dissolved oxygen concentrations along the tests involving the small and large matrices of entrapped cells are presented in Figures 3 to 4. The trends of DO profiles for all the tests were similar when comparing to the tests by the free cells. The DO value gradually dropped. The DO of the tests at higher AgNP concentrations decreased slower than those from the tests at lower AgNPs.

For the CA-entrapped cells, the *OURs* by the small and large matrices were 0.009-0.014 and 0.019-0.024 mg-O₂/L/min, respectively (Table 2). The nitrification activities by the small and large CA matrices of entrapped cells were 65-110% and 81-94% of the control. The inhibition by AgNPs was less in the tests of the CA-entrapped cells compared to the PVA-entrapped cells, especially, for those in the large matrix.

The *OURs* by the small and large matrices of PVA-entrapped cells were 0.000-0.006 and 0.006-0.014 mg-O₂/L/min, respectively (Table 2). The nitrification activities by the small and large PVA-entrapped cells were 5-11% and 44-88% of the control. Dissolved oxygen reduction in the tests with the PVA-entrapped cells at high AgNPs (> 0.50 mg/L) was limited, especially for the small matrix. Similar to the CA-entrapped cells, the two sizes of the entrapment matrix provided different levels of mitigation on nitrification inhibition by AgNPs.

Previous studies reported that small entrapment beads have better mass (including toxic substance) and gas transfer (Aksu and Bulbul, 1999; Dursun and Tepe, 2005). As expected, the cells entrapped in the larger matrix were less adversely affected by AgNPs in term of nitrification activity. This could be because the thicker layer of matrix led to

more torturous transport of AgNPs resulting in less AgNP contact (also Ag^+ released from AgNPs) with the cells.

The entrapped cells at the optimum preparation conditions significantly alleviated the inhibition by AgNPs compared to the free cells. The entrapment matrices could reduce contact between cells and AgNP leading to lower inhibition. Also, it is known that several toxic substances could sorb on the entrapment matrices (Cassidy et al., 1996; Siripattanakul et al., 2008). Therefore, some AgNPs may sorb on the matrices resulting in lower AgNP penetration.

Between the CA and PVA-entrapped cells, the CA-entrapped cells exhibited more effective nitrification. As an example, for the large matrix, the activity of CA-entrapped cells at the AgNP concentration at 5.00 mg/L was twice of the PVA-entrapped cells (Table 2). This indicates that the CA matrix provided better environment (better cell protection) for the cells resulting in higher nitrification performances.

3.3 Microscopic observation on the free and entrapped cells

The microstructures of the CA and PVA entrapment matrices were investigated by SEM (Figures 5 and 6). In Figure 5a, a dense network (sheet like) contained numerous very fine pores fully occupied by the cells (Figure 5b). The dense cross-linking was network of calcium and alginate (Smidsrod and Skjak-Braek, 1990). Some microcolonies were also found in macropores (Figure 5a). The SEM images supported the nitrification test results. There were numerous pores leading to torturous transport and sorption of AgNPs as discussed earlier.

Figure 6a presents the PVA matrix which contained plenty of pores and rough surface. The pore sizes ranged from 10 to 20 μm . The cells occupied as microcolonies

inside the matrix as found in the CA matrix were observed. It is noted that in Figures 6b and 6c, only AgNPs with no cells were added. Interestingly, agglomeration of AgNPs within the PVA matrix was detected as white balls (Figures 6b and 6c). Similarly, Kim et al. (2006) synthesized AgNPs using a technique utilizing PVA; they also found the agglomeration between AgNPs and PVA (as white balls). This observation supported that, the PVA-entrapped cells physically protected the cells from AgNPs. The matrix could reduce opportunity for AgNP-cell contact. Also, in the PVA matrix, the agglomerated AgNPs adhered on the net structure increasing the reduction of the AgNP-cell contact (Figure 6c).

To compare the CA and PVA-entrapped cells, even though the CA matrix did not bind with AgNPs as the PVA matrix, the nitrification performance was even higher than the PVA-entrapped cells. This might be from the CA microstructure which was much smaller. The microscopic results suggested that the entrapment matrices play an important role on the cell protection from AgNPs. The main protection mechanism is likely physical.

The free cell and the cells separated from the PVA and CA matrices were observed for the influence of AgNPs using TEM (Figure 7). The damage observed in the free and entrapped cells was similar but the magnitude of the damage in the free cells was more than those observed in the entrapped cells (data not shown). Figure 7a presents a free NAS cell without damage which was taken from the control test (no AgNPs). It is evident that AgNPs penetrated into the cells (Figure 7b). The cell membrane and cell wall were noticeably damaged (soft edge) after treating with AgNPs (Figures 7b and 7c). The interior component moved out of the cells (white area in Figure 7c). The result was

similar to previous studies that reported penetration of nanoparticles through cell membrane and wall causing cell damage (Choi and Hu, 2008; Marambio-Jones and Hoek, 2010; Wu et al., 2010).

4. Conclusions

The initial AgNP concentration apparently affected the nitrification process. Higher AgNP concentrations inhibited nitrification more (up to 98% inhibition). This study successfully mitigated the AgNP inhibition problem using the entrapped cell technique. Both CA and PVA-entrapped cells could lessen the inhibition but nitrification performance by the CA-entrapped cells was better. The larger entrapment matrix performed better than the small one. The microscopic observations supported the respirometric results. Silver nanoparticles injured cell membrane and cytoplasm. A future study on microbial viability and community change induced by AgNPs is recommended. A long-term reliability of entrapped cells exposed to AgNPs should be investigated.

Acknowledgments

This material is based upon work supported by the Thailand Research Fund, Office of the Higher Education Commission, and Ubon Ratchathani University, Thailand under the New Researcher Grant (MRG5380280). This work was also conducted as a part of a research cluster “Fate and Removal of Emerging Micropollutants in Environment” financially supported by Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management and a Special Task Force for Activating Research (STAR) program of Chulalongkorn University. Any opinions, findings, and conclusions or recommendations

expressed in this material are those of the authors and do not necessarily reflect the views of the funding agencies.

References

- Aksu, Z., Bulbul, G., 1999. Determination of the effective diffusion coefficient of phenol in Ca-alginate-immobilized *P. putida* beads. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 344-348.
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Stinath, E.G., 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitric acid. *Journal of Water Pollution Control Federation* 48, 835-852.
- Blaser, S.A., Scheringer, M., MacLeod, M., Hungerbühler, K., 2008. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the Total Environment* 390, 396-409.
- Cassidy, M.B., Lee, H., Trevors, J. T., 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology* 16, 79-101.
- Chen, K.C., Lee, S.C., Chin, S.C., Hwang, J.Y., 1998. Simultaneous carbon-nitrogen removal in wastewater using phosphorylated PVA-immobilized microorganisms. *Enzyme and Microbial Technology* 23, 311-320.
- Choi, O., Deng, K.K., Kim, N.J., Ross, L., Surampalli, R.Y., Hu, Z., 2008. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* 42, 3066-3074.

- Choi, O.K., Hu, Z.Q., 2008. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental Science and Technology* 42, 4583-4588.
- Choi, O.K., Hu, Z.Q., 2009. Nitrification inhibition by silver nanoparticles. *Water Science and Technology* 59, 1699-1702.
- Dursun, A.Y., Tepe, O., 2005. Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized *Ralstonia eutropha*. *Journal of Hazardous Materials* 126, 105-111.
- Guzman, M., Dille, J., Godet, S. 2012. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8, 37-45.
- Hyning, D.L.V., Zukoski, C.F., 1998. Formation mechanisms and aggregation behavior of borohydride reduced silver particles. *Langmuir* 14, 7034-7046.
- Kim, D., Lee, D., Keller, J. 2006. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresource Technology* 97, 459-468.
- Kim, H., Lee, K., Kim, S., 2006. Growth of monodisperse silver nanoparticles in polymer matrix by spray pyrolysis. *Aerosol Science and Technology* 40, 536-544.
- Lok, C., Ho, C., Chen, R., He, Q., Yu, W., Sun, H., Tam, P.K., Chiu, J., Che, C., 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12, 527-534.

- Marambio-Jones, C., Hoek, E.M.V., 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research* 12, 1531-1551.
- Ngeontae, W., Janrungratsakul, W., Maneewattanapinyo, P., Ekgasit, S., Aeungmaitrepirom, W., Tuntulani, T., 2009. Novel potentiometric approach in glucose biosensor using silver nanoparticles as redox marker. *Sensors and Actuators B: Chemical* 137, 320-326.
- Park, S., Bae, W., 2009. Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. *Process Biochemistry* 44, 631-640.
- Radniecki, T.S., Stankus, D.P., Neigh, A., Nason, J.A., Semprini, L., 2011. Influence of liberated silver from silver nanoparticles on nitrification inhibition of *Nitrosomonas europaea*. *Chemosphere* 85, 43-49.
- Ren, S., Frymier, P.D., 2003. Kinetics of toxicity of metals to luminescent bacteria. *Advances in Environmental Research* 7, 537-547.
- Siripattanakul, S., Khan, E., 2010. Fundamentals and applications of entrapped cell bioaugmentation for contaminant removal. In: *Emerging Environmental Technologies*, Volume 2. Springer.
- Siripattanakul, S., Pochant, C.J., Khan, E., 2010. Nitrate removal from agricultural infiltrate by bioaugmented free and alginate entrapped cells. *Water Environment Research* 82, 617-621.

- Siripattanakul, S., Wirojanagud, W., McEvoy, J., Khan, E., 2008. Effect of cell-to-matrix ratio in polyvinyl alcohol immobilized pure and mixed cultures for atrazine degradation. *Water, Air, and Soil Pollution: Focus* 8, 257-266.
- Smidsrod, O., Skjak-Braek, G., 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology* 8, 71-78.
- Wu, P., Xie, R., Imlay, K., Shang, J.K., 2010. Visible-light-induced bactericidal activity of titanium dioxide codoped with nitrogen and silver. *Environmental Science and Technology* 44, 6992-6997.
- Yoon, H.J., Kim, D.J., 2003. Nitrification and nitrite accumulation characteristics of high strength ammonia wastewater in a biological aerated filter. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 78, 377-383.
- Zhang, Y., Peng, H., Huang, W., Zhou, Y., Yan, D., 2008. Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles. *Journal of Colloid Interface Science* 325, 371-376.

Table 1 Oxygen uptake rates by free NAS

Table 2 Oxygen uptake rate by entrapped NAS

Figure 1 TEM images of AgNPs

Figure 2 Dissolved oxygen concentrations from the tests by free cells (FC) at ammonia concentrations of 28 and 70 mg/L and AgNP concentrations of 0.00, 0.05, 0.050, and 5.00 mg/L

Figure 3 Dissolved oxygen concentrations from the tests by small and large matrices of CA-entrapped cells (SCA and LCA)

Figure 4 Dissolved oxygen concentrations from the tests by small and large matrices of PVA-entrapped cells (SPVA and LPVA)

Figure 5 SEM images of a) CA-entrapment matrix at 150× and b) cells inside the CA matrix at 10,000× (Both figures were from the test with the entrapped NAS at AgNPs of 0.05 mg/L)

Figure 6 SEM images of a) PVA-entrapment matrix at 1,500×, b) AgNP agglomeration in PVA-entrapment matrix (no NAS) at 1,000×, and c) AgNP agglomeration in PVA-

entrapment matrix at 10,000 $\times$ (Figure 6a was from the test with the entrapped NAS at AgNPs of 1.00 mg/L. Figures 6b and 6c were from the test with AgNPs of 1.00 mg/L)

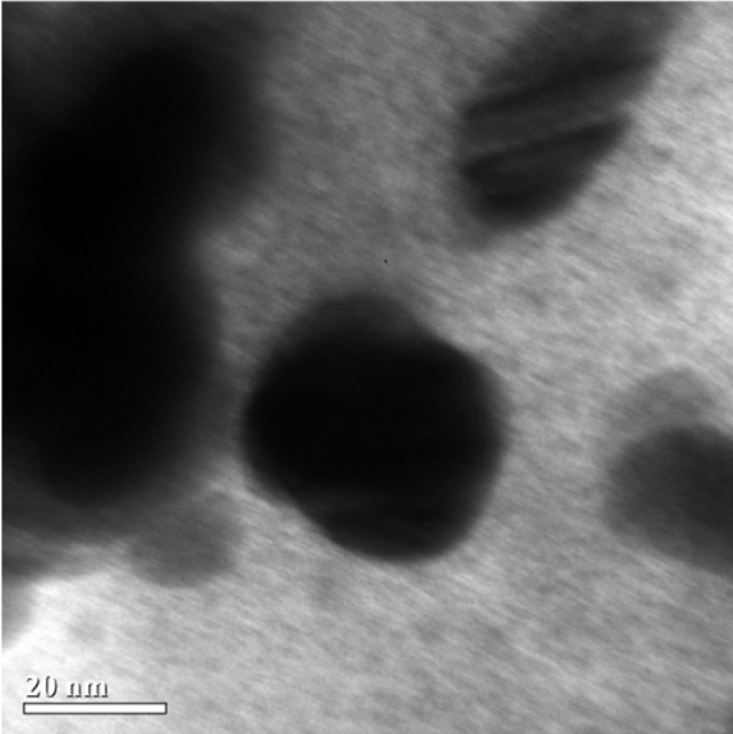
Figure 7 TEM images of a) control cell, b) cell with AgNPs, and c) damaged cell (Figure 7a was the free NAS without AgNP contact. Figure 7b was from the test with the free NAS at AgNPs of 5 mg/L. Figure 7c was from the test with the PVA-entrapped NAS at AgNPs of 5 mg/L.)

Table 1

Test conditions		<i>OUR</i> (mg- O ₂ /L/min)	% Activity (% compared to control)
Initial NH ₃ concentration (mg-N/L)	Initial AgNP concentration (mg/L)		
28	0.00	0.168	100
28	0.05	0.165	98
28	0.50	0.120	71
28	5.00	0.004	2
70	0.00	0.146	100
70	0.05	0.136	93
70	0.50	0.120	82
70	1.00	0.082	56
70	5.00	0.006	4

Table 2

Type of entrapment material	Bead size	Initial AgNP concentration (mg/L)	<i>OUR</i> (mg-O ₂ /L/min)	% Activity (% compared to control)
CA	Small (3 mm in diameter)	0.00	0.014	100
		0.50	0.013	90
		1.00	0.015	110
		5.00	0.009	65
	Large (6 mm in diameter)	0.00	0.024	100
		0.50	0.023	94
		1.00	0.020	84
		5.00	0.019	81
PVA	Small (3 mm in diameter)	0.00	0.006	100
		0.50	0.001	11
		1.00	0.000	5
	Large (6 mm in diameter)	0.00	0.014	100
		0.50	0.013	88
		1.00	0.012	82
		5.00	0.006	44



1

2 Figure 1

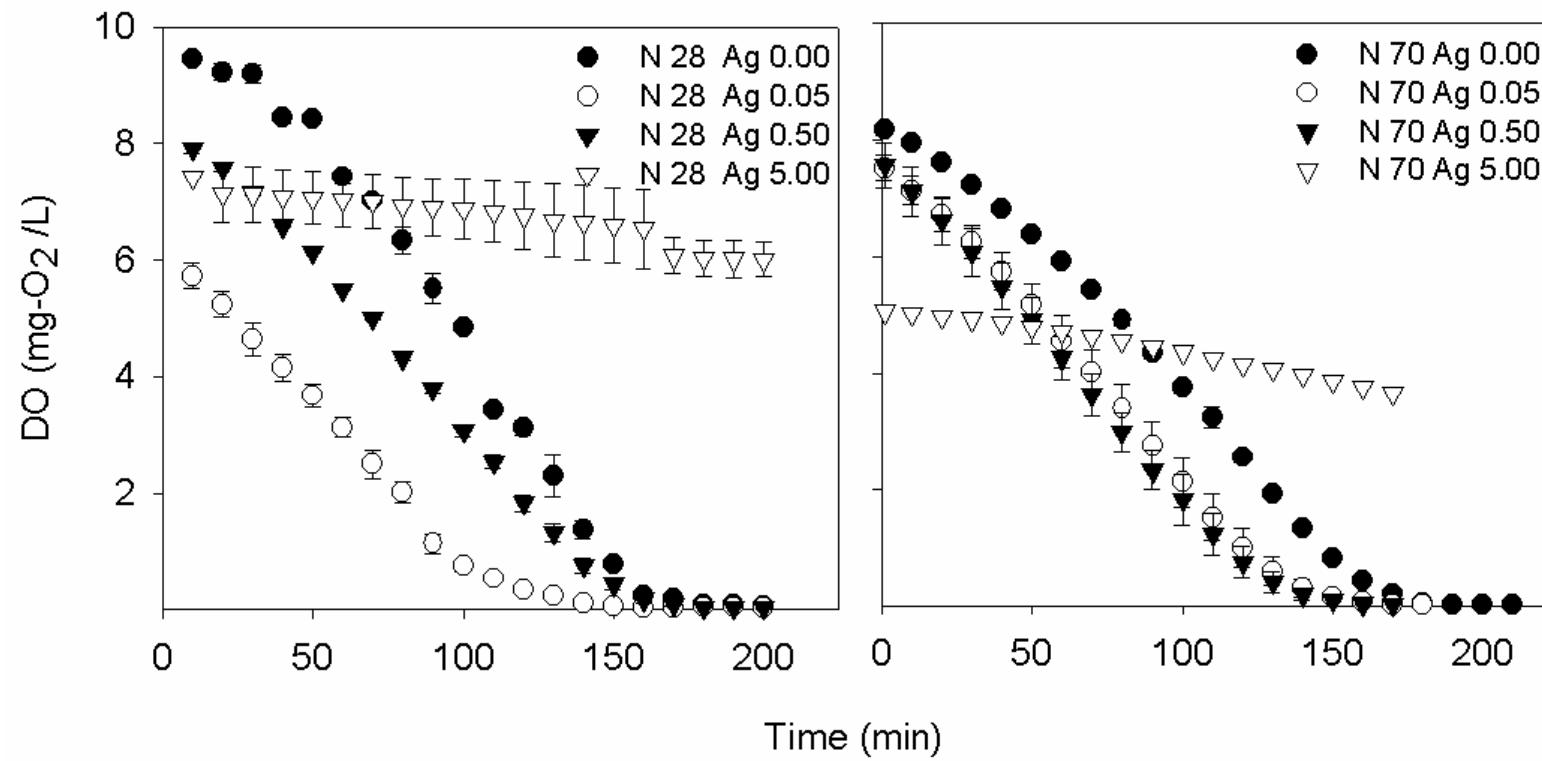


Figure 2

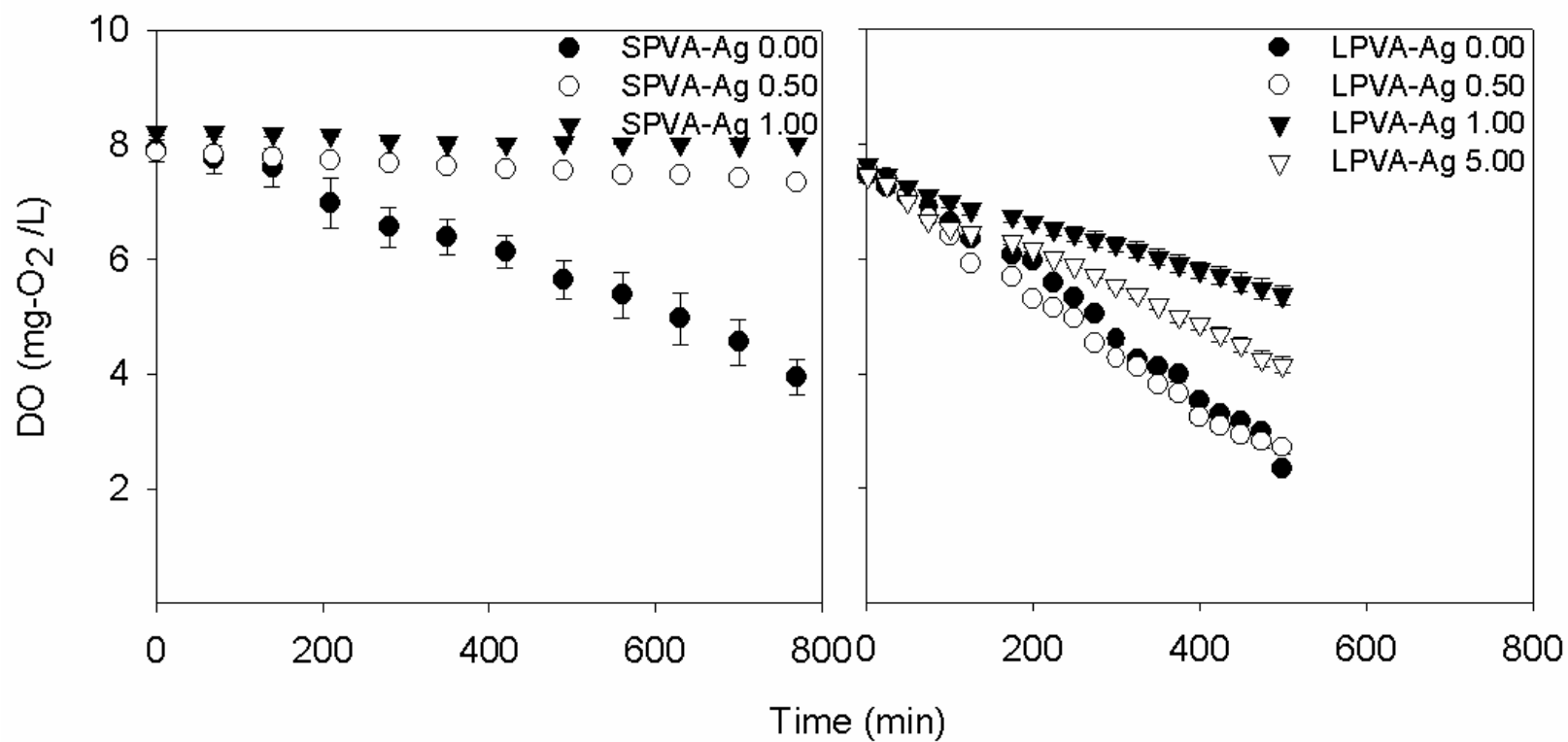


Figure 3

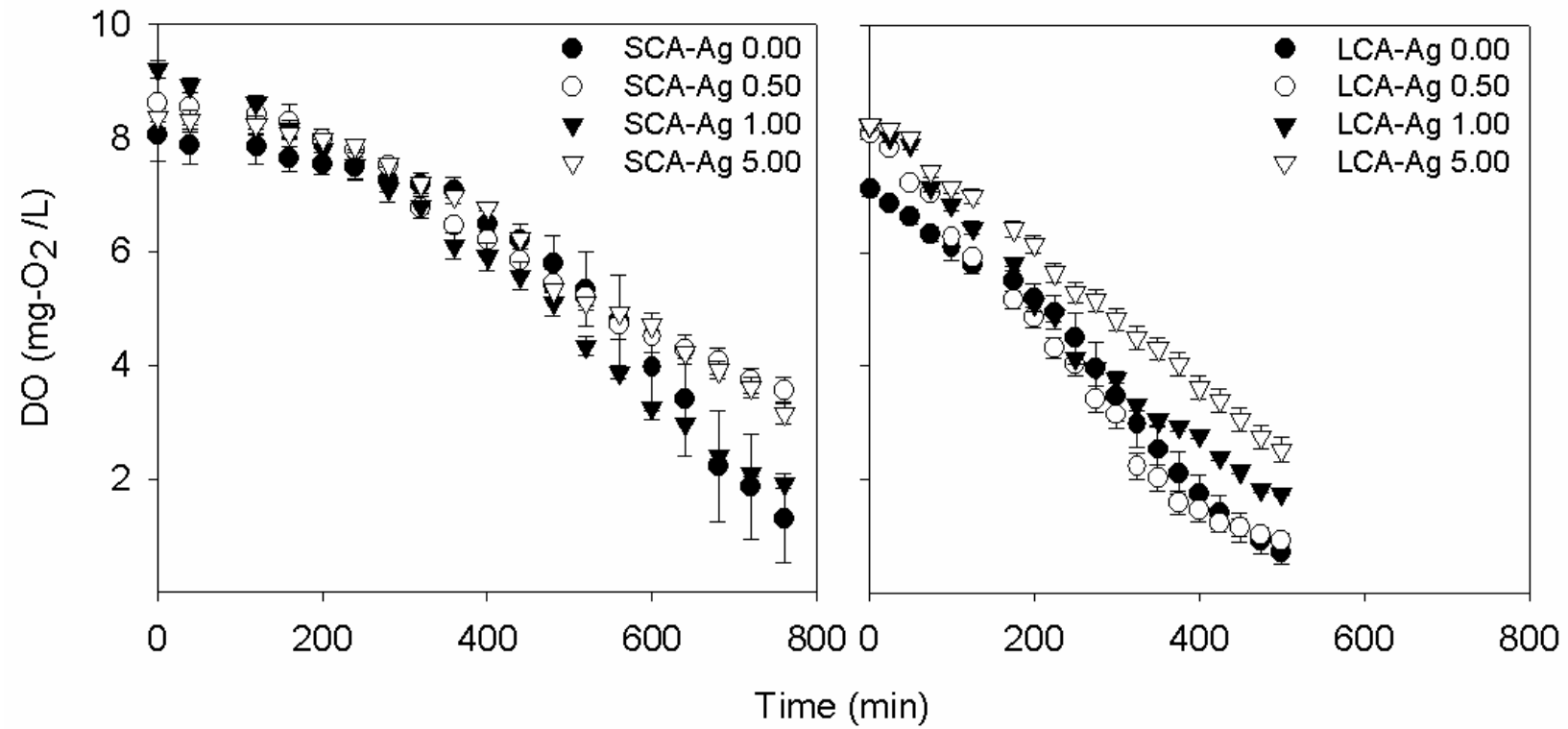


Figure 4

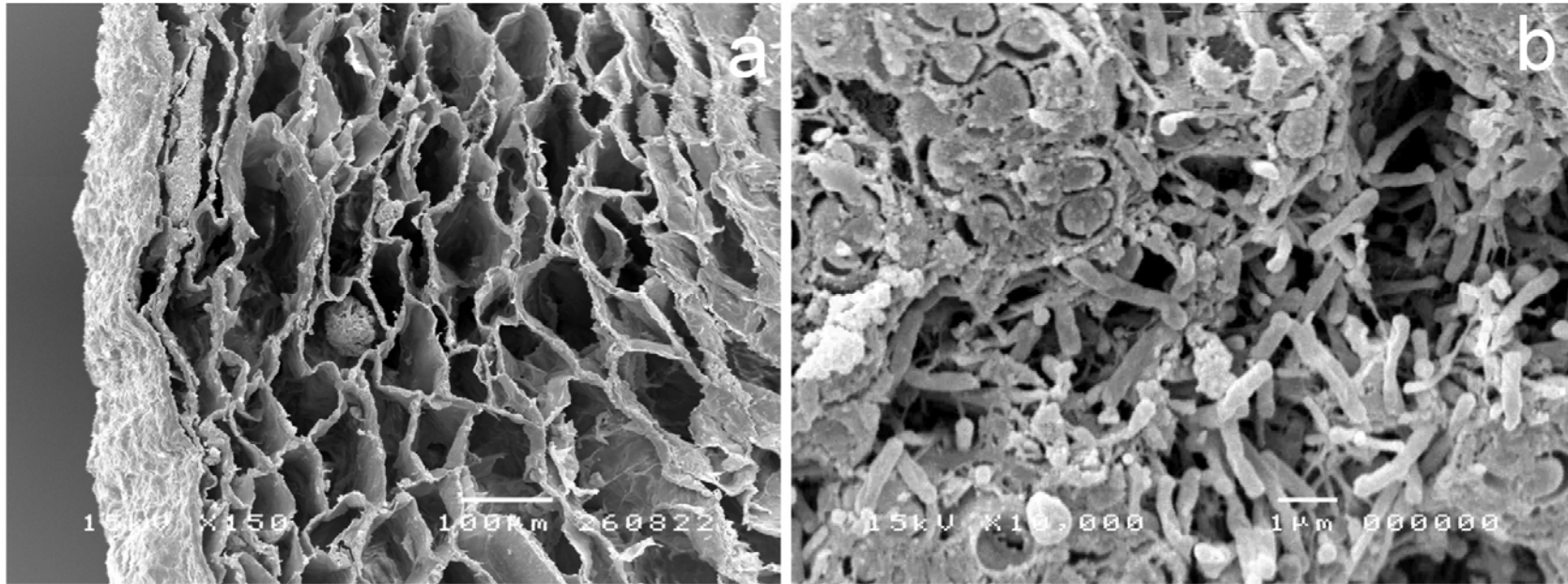


Figure 5

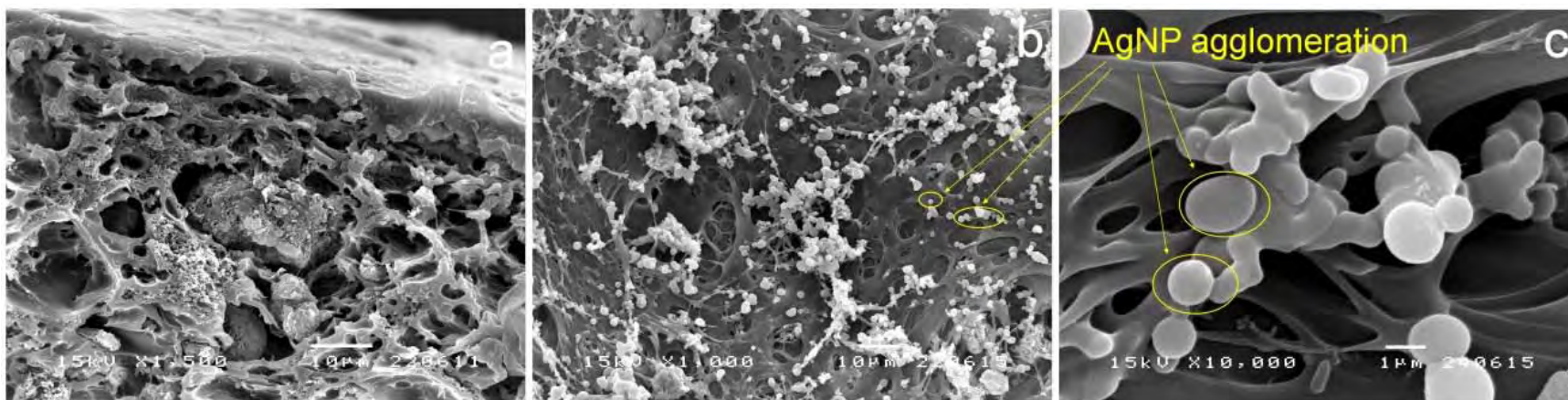


Figure 6

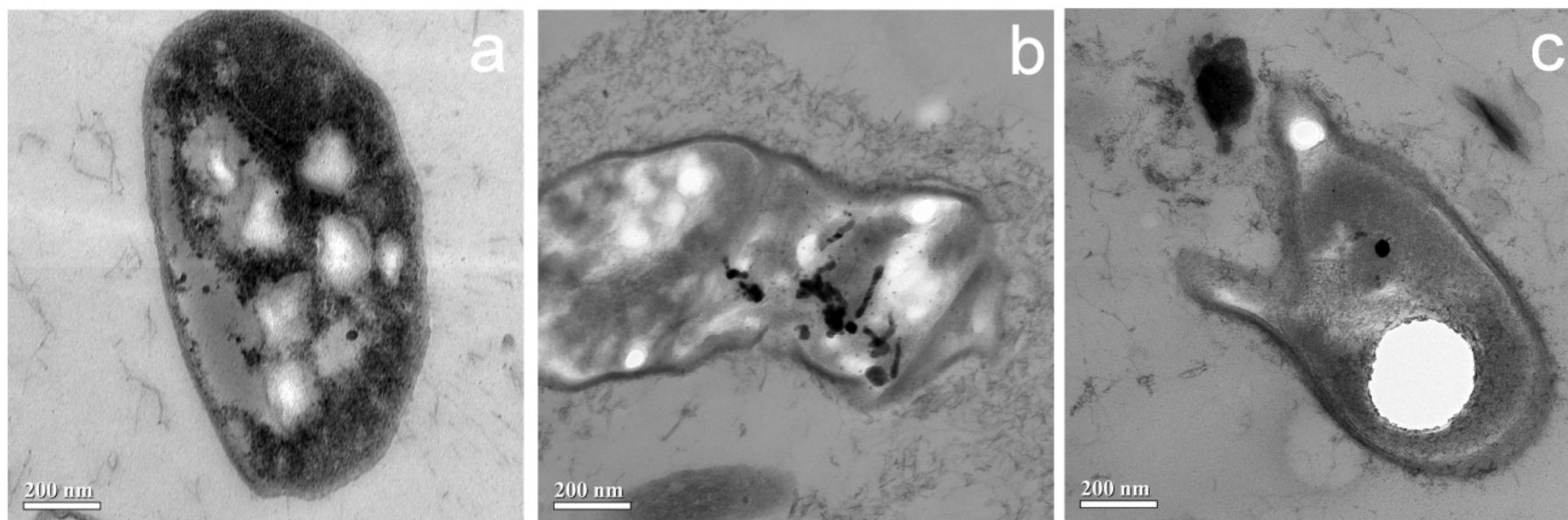


Figure 7

Siripattanakul-Ratpukdi, S., Fürhacker, M., Vangnai, A.S., Khan, E., Silver Nanoparticles Contaminated in Engineered Environmental Treatment Systems, **Prepared for submitting to *Journal of Hazardous material***

Silver Nanoparticles Contaminated in Engineered Environmental Treatment Systems

Sumana Siripattanakul-Ratpukdi^{1*}, MariaFürhacker², Alisa S. Vangnai³, Eakalak Khan⁴

¹Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering and Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management,
UbonRatchathani University, UbonRatchathani, Thailand

²Department of Water, Atmosphere and Environment, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand

⁴Department of Civil Engineering, North Dakota State University,
Fargo, North Dakota, USA

***Corresponding author.** Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, UbonRatchathani University, Satolmark Street, Warinchamrap, UbonRatchathani 34190, Thailand. Phone: 66-45-353300 ext. 3359; Fax: 66-45-353333; E-mail: ensumasi@ubu.ac.th, jeans_sumana@yahoo.com

Highlight

- Silver nanoparticles distribute, deposit in, and influence the engineered environmental treatment systems including wastewater treatment and environmental remediation.
- Silver contamination in the systems could be in particle or ion forms.
- Silver could minimize chemical process performance by chemical reactions.
- Silver could fail biological processes by damaging biological organisms in the systems.
- Effect of silver nanoparticles in the engineered environmental treatment systems varied based on the particle properties and studied conditions.

Abstract

Silver nanoparticles (AgNPs) have been developed and broadly used for various applications, especially biocidal propose. This could lead to contamination of AgNPs in engineered environmental treatment systems which include wastewater treatment and environmental remediation. This review conveys basic knowledge of AgNPs including synthesis techniques, fate and contamination, and toxicity mechanism. The work emphasizes on the influence of AgNPs to the wastewater treatment and environmental remediation system performances. Silver nanoparticles could be synthesized using physical, chemical, or biological methods. After production or utilization, AgNPs distribute into the wastewater treatment and remediation systems *via* wastewater and wastewater treatment excess sludge, respectively. Toxicity of AgNPs including cell surface defection, cell metabolism inhibition, and protein damage by AgNPs, silver ions, or reactive oxygen species is reviewed. In the engineered environmental treatment systems, silver (ions and particles) may substantially influence the chemical and biological processes. For the chemical processes, silver species are able to lessen the process performance by chemical interaction while silver could be toxic to organisms in biological processes and fail the process performance later on. It was found that previous works presented inconsistent results on influence of AgNPs to the engineered environmental treatment systems because of difference in AgNP properties, tested conditions, and environmental conditions.

Keywords: AgNP, biological, chemical, performance, process, remediation, wastewater treatment

1. Introduction

Silver is a metal which has been known to be useful for medical, industrial, and household applications, such as biocides, electrical conductors, currency coins, and ornaments for long time (Arvizo et al., 2012). Recently, nanotechnology has been developed and silver was also synthesized in nano size (1-100 nm), called silver nanoparticle (AgNP). Silver nanoparticles are broadly used because of its higher effectiveness compared to traditional silver (Ray et al., 2009; Rai et al., 2009; Guzman, 2012).

Silver nanoparticles have been normally applied for biocidal purpose in various applications, such as a component in wound dressings, medical device coatings, textile fabrics, cosmetic products, and detergents (Ray et al., 2009; Rai et al., 2009). This leads to a large amount of the AgNP utilization. Blaser et al. (2008) claimed that the biocidal silver use increased for up to 30 to 230 ton/year in 2004 and 2010, respectively. It was also reported that up to 15% of total silver in the form of monovalent silver ions (Ag^+) or AgNPs could be released from biocidal plastics and textile into water. Another recent study confirmed that AgNPs were easily released from AgNP-coated socks during washing process (Benn and Westerhoff, 2008). Based on a large amount of AgNP utilization and the AgNP release information from the earlier studies, AgNPs are likely to be spread over and might cause a problem in aquatic, terrestrial, or atmospheric environments in the near future (Blaser et al., 2008; Lapresta-Fernández et al., 2012).

According to silver fate and transport reported by Blaser et al. (2008), the silver residue after production or utilization mostly went to solid waste management systems including solid waste landfill and incineration. Incinerators may create tiny portion of silver in smoke moving out to atmosphere. The incineration ashes and fresh solid waste (from the areas where do not incinerate the waste) are disposed in landfills. The landfills which line by

impermeable materials then compactly restrict the silver-containing waste at the waste disposal site. Therefore, the rest of silver residue distributing in the environment was in wastewater. This residue then passed through natural receiving water and soil *via* treated wastewater and sludge, respectively.

As known, engineered environmental treatment systems include water treatment, wastewater treatment, air pollution control, solid waste management, and site remediation systems. The engineered environmental treatment systems related to silver fate are wastewater treatment and site remediation which receive AgNPs from wastewater and sludge, respectively. Especially, biological treatment processes (biological wastewater treatment and bioremediation) could be substantially influenced because AgNPs damage microorganisms in the systems leading to failure of the treatment.

Thus far, there was no published review focusing on the influence of AgNPs to the engineered environmental systems. Previously, review studies mainly concentrated on AgNP syntheses, applications, toxicities (Sharma et al., 2009; Abou El-Nour et al., 2010; Durán et al., 2010; Marambio-Jones and Hoek, 2010; Arvizo et al., 2012; Guzman, 2012). From previous works, it was clear that AgNPs are toxic to microorganisms, plants, and animals; however, the particles are very useful and likely remain as an important composition in daily life products in the long run. Therefore, along with the development of AgNP-containing products, knowledge of AgNP fate in the engineered environmental treatment systems is also needed. Consequently, this study emphasizes on the influence of AgNP on the wastewater treatment system (WWTS) and environmental remediation system (ERS) performances. The work also includes information of AgNP synthesis, utilization, fate, contamination, toxicity mechanism, and potential AgNP control techniques. This work should assemble the knowledge related to AgNPs and give perspective to deal with the influence of AgNPs in the future.

2. Silver nanoparticle synthesis, utilization, and contamination

2.1 Silver nanoparticle synthesis and utilization

Several synthesis methods have been developed to achieve desired characteristics (sizes, shapes, and surfaces) (Xu et al., 2006; Choi and Hu, 2008; Durán et al., 2010; Marambio-Jones and Hoek, 2010). The AgNP synthesis methods could be divided into 3 approaches including physical, chemical, and biological approaches. Details of the methods are presented in Table 1. The physical approach uses minimal or no chemicals but the approach consumes a lot of energy and time (Abou El-Nour et al., 2010). The chemical approach is the most common technique to synthesize silver materials (Marambio-Jones and Hoek, 2010). This approach can use various chemicals and easily modifies the method to accomplish target properties. However, the approach deals with many hazardous chemicals (Marambio-Jones and Hoek, 2010). Lately, a biological approach which applies extracts from organisms as reducing agents and/or capping agents was developed. This technique is a green synthesis but biological reaction rate sometimes is slow resulting in the need of accelerators (Darroudi et al., 2010).

Silver nanoparticles have been developed and used in various applications, such as medical, residential, and industrial applications (Abou El-Nour et al., 2010; Arvizo et al., 2012). For medical application, AgNPs have been applied for disinfection and therapeutics, such as infected burn and wound reduction, medical device sterilization, tumor therapy, and cardiovascular implant (Atiyeh et al., 2007; Tian et al., 2007; Chen and Schluesener, 2008; Rai et al., 2009; Chaloupka et al., 2010; Arvizo et al., 2012). Silver nanoparticles are also incorporated in daily life products, such as apparel, cosmetics, and plastics for antimicrobial property (Benn and Westerhoff, 2008; Blaser et al., 2008; Chaudhry et al., 2008; Kokura et al., 2010). Moreover, in industrial sector, AgNPs are used as sensors and a component in biosensors (McFarland and Van Duyne, 2003; Ren et al., 2005; Zheng et al., 2008). The

particles also begin to apply in water and wastewater treatments, such as for pesticide and bacterial removals (Lv et al., 2009; Wu et al., 2010; Dankovich and Gray, 2011; Manimegalai et al., 2011).

2.2 Silver nanoparticle fate and contamination

Silver nanoparticles are new components in real practice; therefore, fate and contamination of AgNPs are not well understood. The published information mostly is estimated from computer models and detected from laboratory or pilot results (Blaser et al., 2008; Benn and Westerhoff, 2008; Kaegi et al., 2010; Kim et al., 2010). Currently, there is no complete mass balance of AgNPs in the environment.

Fate of AgNPs related to textiles and plastics from a study by Blaser et al. (2008) was calculated. It was reported that the silver residues from many countries in Asia, North America, and Europe generally went to solid waste management and retained in solid waste landfill. The rest of silver residues (approximately 190-410 ton/yr) passed to WWTs and distributed to natural water and soil (Table 2). Otherwise, small portion of silver could be released to the atmosphere via stack gas from solid waste incineration (Table 2). Based on the silver flow mentioned above, the potential AgNP fate in the environment including the engineered environmental treatment systems is presented in Figure 1. It is noticed that after passing the processes, AgNPs may change their form (Figure 1) (Nowack, 2010). Recently, Kim et al. (2010) found nanosized silver sulfide particles (Ag_2SP) in sludge from a AgNP-contaminated wastewater treatment plant in USA. It was implied that AgNPs could change their form to be Ag^+ and Ag_2SP . Later, Kaegi et al. (2011) confirmed that most AgNPs transformed to Ag_2SP in the non-aerated wastewater treatment tank. This resulted in Ag_2SP s suspended in the treated effluent or sorbed on sludge.

Table 3 is a summary of silver contamination related to AgNPs from previous works. Most studies reported the contamination in term of total silver due to quick and

reversible transformation of silver species and limitation of detection method. Table 3 shows that the silver contamination was varied. This caused by AgNP-incorporated technology used in each product, wastewater collection and treatment systems, and wastewater compositions (Benn and Westerhoff, 2008; Kim et al., 2010; Nowack, 2010; Hoque et al., 2012).

3. Silver nanoparticle toxicity and resistance

3.1 Toxicity and resistance mechanism

Numerous previous studies informed toxicity of AgNPs to microbial, plant, or animal cells (Lok et al., 2006; Choi et al., 2008; Damm et al., 2008; Marambio-Jones and Hoek, 2010; Guzman, 2012; Lapresta-Fernández et al., 2012). The silver nanoparticles could damage the cells by AgNPs themselves and Ag^+ and/or reactive oxygen species (ROS) created by AgNP oxidation (Choi et al., 2008; Asharani et al., 2009; Marambio-Jones and Hoek, 2010). These three species could: i) defect cell wall, membrane, and components, ii) inhibit cell metabolism, and iii) damage cell DNA. Generally, biological cells correlated to the engineered environmental treatment systems is microorganisms, especially bacteria. Consequently, in this review, the mechanism of AgNP toxicity to microorganisms was focuses.

Defection of cell wall, membrane, and components--Silver nanoparticles could attach on cell membrane and penetrate into and damage the cells. This action varied based on microbial species. Mostly, gram-positive bacteria had higher resistant to AgNPs compared to gram-negative bacteria (Jung et al., 2008; Guzman, 2012). The previous results suggested that gram-positive bacteria had thick peptidoglycan layer resulted in high tolerance of AgNP toxicity (Jung et al., 2008; Guzman, 2012).

Silver (AgNPs and Ag^+) was likely to bind/attach to proteins containing sulphur at the cell surface (Morones et al. 2005; Hwang et al., 2008). Another explanation was about

electrostatic attractive force (Raffi et al. 2008; Dasari et al., 2010). The positively charged particles could easily attach onto the microbial cells which normally are negative charge. The particles were then interact to cell membrane and caused broken walls and membranes. Some portion of cellular content disappeared thereafter (Smetana et al., 2008). Figure 2 presents an example of the cell damage by AgNPs. The activated sludge after nitrification process in presence of AgNPs (5 mg/L) was studied. The cell envelope obviously damaged and cellular content released out.

Inhibition of cell metabolism and Damaging of DNA--Silver ions could interact with enzymes involving respiration in the microbial cells (Marambio-Jones and Hoek, 2010; Lapresta-Fernández et al., 2012). Silver had high affinity to react with thiol group (-SH) of respiratory proteins locating at the cell membrane (Durán et al., 2010; Marambio-Jones and Hoek, 2010). Silver ions could also inhibit ATP synthesis and phosphate uptake and increase DNA mutation. Furthermore, free radicals caused by ROS could damage membrane lipid resulting in membrane collapse, protein malfunction, and DNA damage (Mendis et al., 2005; Nel et al., 2006; Choi et al, 2008; Marambio-Jones and Hoek, 2010).

For AgNP resistance, like silver microparticles, silver ions, and other biocidal agents, some microorganisms could tolerate some toxic substances naturally (Marambio-Jones and Hoek, 2010). Most previous works involving the AgNP-resistant strains focused on the use of the strains for the AgNP biosynthesis (Parikh et al., 2008; Suresh et al., 2010; Saravanan et al. 2011). The prior works emphasizing mechanism of silver resistance was on silver ion (Gupta et al., 2001; Silver, 2003). The silver ion resistance was encoded in both chromosome and plasmid genes, such as *sil* and *agr* gene series in *Salmonella* and *Escherichia coli*, respectively (Gupta et al., 2001; Silver, 2003). These genes brought Ag^+ out by pumping H^+ into the cells resulting in Ag-resistant property.

In overall, thus far, AgNP toxicity and resistance mechanisms mostly depended on the mechanism of Ag^+ . Even though AgNPs were likely to dissolve in an aqueous solution, the portion of Ag^+ was varied ranged from 0.1% to 70% (Lok et al., 2007; Choi et al., 2008; Liu and Hurt, 2010; Sotiriou and Pratsinis, 2010; Hou et al., 2012). Previous works reported less Ag dissolution (0.1 to 4.0% of total Ag) found that AgNP toxicity was higher than that of Ag^+ (Lok et al., 2007; Choi et al., 2008; Liu and Hurt, 2010; Hou et al., 2012). This indicated that AgNPs themselves were also toxic to microorganisms. Contrarily, a few studies presented that toxicity of AgNPs was from Ag^+ only (Navarro et al., 2008; Sotiriou and Pratsinis, 2010). The different results should be due to high Ag dissolution took place in the cases leading to insignificant toxicity of AgNPs. Currently, direct toxicity mechanism of AgNPs was proved only the cell surface damage by microscopic imaging. No publication on the functional genes (or protein) involving in the direct AgNP toxicity and resistance mechanisms was clearly proposed. The continued work on these mechanisms to microorganisms should be conducted.

3.2 Toxicity influencing factors

Factors influencing toxicity could be divided into two main groups: i) AgNP properties and ii) environmental conditions. Silver nanoparticle properties related to toxicity included physical properties (size, shape, crystallinity, and surface charge) and chemical properties (surface coating, elemental composition, and solubility) (Morones et al., 2005; Pal et al. 2007; Choi and Hu, 2008; Somasundaran et al., 2010; Marambio-Jones and Hoek, 2010; Lapresta-Fernández et al., 2012). Environmental conditions, such as pH, ionic strength, organic matters (OM), dissolved oxygen concentration (DO), and light affected the AgNP toxicity (Dasari et al., 2010; Marambio-Jones and Hoek, 2010; Lapresta-Fernández et al., 2012). Table 4 presents the summary of the factors on AgNP toxicity.

Based on the information from previous works, cytotoxicity caused by the above factor has been inconsistently presented. For example, earlier, Choi and Hu (2008) reported that the AgNP sizes significantly affected toxicity level of nitrifying microorganisms. Later, another study by Suresh et al. (2012) found that the sizes did not influence AgNP toxicity but the particle surface (coating type) played an important role in the cytotoxicity. The inconsistent results were due to the tested AgNPs and environmental conditions performed by each research group were varied. In this context, it could state that toxicity mechanism and toxicity influencing factors could be generally described as mentioned above but the relatively exact prediction needs to estimate case by case.

4. Influence of AgNPs to engineered environmental treatment systems

4.1 Wastewater treatment systems

Based on fate of AgNPs shown in Figure 1, the engineered environmental treatment systems include wastewater treatment and site remediation could be noticeably influenced by AgNPs. General wastewater treatment comprises physical, chemical, and biological processes.

Physical processes--The physical processes normally apply for preliminary and primary treatments to remove debris, grit, large particles, such as screening, sedimentation, flocculation, and filtration. Since, as known, the physical processes are gravity and/or size separation processes, the physical processes should not be obviously disturbed by AgNPs (small and light weight). Nevertheless, these processes may be able to remove some portion of AgNPs sorbing on the large particles (Brar et al., 2010). The particles (mono-dispersed particles or aggregates) could attach on general particles in the wastewater but opportunity of aggregation and attachment depended on wastewater characteristics, such as alkalinity, NOM concentration, and solids concentration (Huang and Wang, 2001). However, slight efficiency (approximately 10%) of AgNP treatment by the physical process (simulated primary clarifier

by jar test) was reported (Hou et al., 2012). This could imply that AgNPs should not substantially affect the physical processes, and vice versa.

Chemical processes--The chemical processes involving chemical reactions, such as adsorption, coagulation, ion exchange, precipitation target for reducing small particles or dissolved solids. Silver nanoparticles could play a role in the chemical processes. Silver may compete with other particles (with similar surface charge) in the chemical processes resulting in lower treatment efficiency. Figure 3 is a schematic diagram of potential reactions related to AgNPs. Reactions including dissolution/oxidation, precipitation, sulfidation, complexation, aggregation, attachment/adsorption, and sedimentation (physical process) may take place. Silver nanoparticles could dissolve or oxidize and convert to Ag^+ . Along with the oxidation, ROS may be created. These dissolution and oxidation are important processes which normally occur in all WWTs (Lok et al., 2007; Choi et al., 2008; Liu and Hurt, 2010; Hou et al., 2012). The reaction may decrease amount of oxidizing agent (such as O_2 or H_2O_2) in the systems.

Precipitation and sulfidation (precipitation by sulfide) are to form Ag insoluble species, such as Ag_2S . It was reported that AgNPs directly and indirectly precipitated to Ag_2S which is less toxicity and more stable (highly insoluble) compared to AgNPs as shown in Figure 3 (Kim et al., 2010; Liu et al., 2011). These reactions depended on wastewater characteristics, such as pH, DO, NOM concentration, and ionic strength. For sulfidation, even though the reaction needs O_2 , this chemical reaction will arise in the incompletely anaerobic treatment systems (slight oxygen concentration). This is due to in aerobic environment sulphur normally is in sulfate and sulfite forms (mainly sulfate) which were proved no reaction to AgNPs while the sulfidation was also inhibited in oxygen-absent condition (Liu et al., 2011). Aggregation is AgNP self complexation which could lead to higher (or easier) Ag sedimentation. Complexation and attachment/adsorption are to bind Ag species to solids,

such as debris and biosolids. These reactions are important process to remove Ag from the wastewater; however, Ag in biosolids could be toxic to microorganisms as mentioned in the previous section (details on the effect to biosolids in the WWTSs presented in later content).

In practice, AgNPs are likely to contaminate in environment at low concentration. The AgNP concentrations in WWTS of 2-18 $\mu\text{g/L}$ was estimated (Blaser et al, 2008). In this context, AgNPs may not greatly impact the chemical processes. On the other hand, the chemical processes could reduce or detoxify AgNPs contaminated the wastewater via sulfidation, complexation and sorption.

Biological processes--The biological processes normally used for secondary or advanced wastewater treatment. The processes are to remove organic, nutrient, and specific organic compounds by microorganisms. Previously, it was reported that AgNPs in the contaminated wastewater after passing a simulated first clarifier (physical process) were removed for only 10% (Hou et al., 2012). Therefore, microorganisms in the biological processes could be noticeably influenced by AgNPs leading to lower performance of the treatment systems. The examples of the affected systems were summarized in Table 5. It is notice that the environmental studies mostly applied AgNPs with spherical shape at average size of 5-30 nm (Table 5). This is because the particles with this shape and sizes are likely to use in commercial products. Hence, in the case of utilized AgNPs are in other shapes, such as triangular shape, the toxicity and influence should be higher than those of spherical AgNPs (information of shape-dependent toxicity is reviewed earlier). Based on the information in Table 5, the summary suggested that the biological processes could be either totally inhibited or uninhibited. The results from each study obviously varied.

In aerobic biological process, autotrophs are responsible for nitrification while heterotrophs are organic carbon oxidizers. Among the studies, it was found that trend of AgNP effect to autotrophs and nitrification activities was higher than that of heterotrophs

(Table 5). Unsurprisingly, nitrification is known as a sensitive process. This is because the nitrifying microorganisms are slow growing and sensitive to environmental stresses, such as temperature, DO, pH, and toxic substances. The nitrification inhibition could be due to the damage of cell surface and protein by AgNPs, Ag^+ , and ROS. Moreover, ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase which were enzymes governing ammonia oxidation, located in cell membrane and periplasm (Chain et al., 2003; Choi et al., 2008). Therefore, AgNPs and Ag^+ not only damage the cell viability but also the nitrification process performance.

In the aerobic heterotrophic process, the AgNP toxicity action on aerobic heterotrophs was similar to autotrophs stated above. It was found either substantial or slight effects by AgNPs (Choi et al., 2008; Liang et al., 2010; García et al., 2012). This conflict results could be from two reasons as follows. The first reason is the difference in tested environmental conditions and cultures. For example, Choi et al. (2008) found the heterotrophic process inhibition of 55% from the test with AgNPs of 1 mg/L while García et al. (2012) reported slight significant inhibition from the test with AgNPs of 0.17 mg/L. The tested concentrations were much different (approximately 6 times). Additionally, the test with the low concentration of AgNPs may be not over susceptibility of the microbial cultures leading to stable wastewater treatment performance. Another reason is different interaction of AgNPs to WWTSs. Numerous studies reported the difference of the AgNP dissolution or agglomeration magnitudes as stated in previous section. For example, Wang et al. (2012) found the AgNP sorption of 88% onto microbial sludge while Kiser et al. (2010) reported the AgNP biosorption of 97%. This could result in different biological performance. The more sorption may cause the more toxicity to microbial cells and the less AgNP distribution in the WWTS. Also, in the long term, this may cause the accumulation of AgNP in returned sludge resulting lower wastewater treatment efficiency thereafter.

In the anaerobic heterotrophic process, theoretically, the AgNP toxicity action should be similar to autotrophs and aerobic heterotrophs stated above. However, there was a report of no to moderate effect of AgNP to the anaerobic WWTs (García et al., 2012; Yang et al., 2012). This may be due to the occurrence of AgNP sulfidation resulting in lower AgNP bioavailability. A good illustration of this situation is the work by Yang et al. (2012). The study reported the stable anaerobic treatment and microbial community from the experiment at the AgNP concentration of up to 40 mg/L.

For comparative study of suspended microbial cells and biofilm performance, interestingly, the cells in biofilm form performed much better than the suspended microbial cells in the test at AgNP concentration of 200 mg/L (Sheng and Liu, 2011). This is because of a role of EPS and physical protection by the layer of the cells. The result suggested that the microorganisms themselves have their own protection system. However, based on overall of the AgNP effect to biological process, it could say that the biological process could be severely affected by AgNPs. The exact biological wastewater treatment response mechanism to AgNPs is still inconclusive. The continued work on the point is needed.

4.2 Environmental remediation systems

Environmental remediation systems involve pollutant detoxification in soil, groundwater, surface water, and sediment. In general, the pollutants go to environment via direct wastewater discharge, treated wastewater discharge, sludge, and runoff as shown in Figure 1. The two main sources of AgNPs polluted in environment are the treated wastewater (to surface water) and the sludge (to soil). As referred formerly, most AgNPs were probable to sorb on sludge resulting in low AgNP concentrations in the treated effluent (Kiser et al., 2010; Wang et al., 2012). It was estimated that only 10% of Ag would be in the treated wastewater while 90% of Ag was in the sludge applying in soil later (Whiteley et al., 2011). Therefore, in this case, soil and groundwater contamination and remediation should be more

concerned. Table 5 presents previous studies on effect of AgNPs related to ERSs. Similar to the wastewater treatment processes, general environmental remediation comprises physical, chemical, and biological processes. Details of the processes and AgNP effect are follows.

Physical processes--Physical processes for ERSs include the application of physical techniques, such as in-situ grouting, soil washing, and air sparging/air stripping. The physical processes are only physical separation, such as the in-situ grouting is to restrict the pollutants by cement wall or containment. Hence, the physical processes should not be visibly influenced by AgNPs. It is notice that the particles could physically attach to soil on the top soil layer (Bradford et al., 2009; Coutris et al., 2012).

Chemical processes--Chemical processes are the main remediation process in practice. The processes involve the application of chemicals to immobilize or extract the pollutants off the soil and groundwater. There are several techniques, such as pump and treat, surfactant enhanced aquifer remediation (to use surfactant to increase pollutant solubility before removal), chemical stabilization, and chemical oxidation.

In the environment, Ag may be in various forms. Silver has four oxidation states (0, +1, +2, and +3) and can exist in the forms of silver oxide, silver nitrate, silver halides (Fluoride, Chloride, Bromide), silver sulfate, silver thiosulfate complexes and silver sulfide also. But Ag^0 and Ag^+ typically found in the environment (Purcell and Peters, 1998). In remediation systems, Ag species distributing in the system should be rely on the species in sludge. Silver species including AgNPs, Ag^+ , and Ag_2SPs are expected. All Ag species could then respond to chemical processes.

All reactions which could occur in WWTs, may take place in the remediation systems (Figure 3). It was reported that the Ag species could sorb on soil (Ag fixation) but with different degrees of sorption (Coutris et al., 2012). Silver sulfide particles are known about their low toxicity and reactivity. Physical sorption of Ag_2SPs was believed. Silver ions are

possible to sorb quicker and higher than AgNPs. Hou et al. (2005) reported that 88% of Ag^+ (at 3 mg/kg soil) was sorbed on the top soil (0-2 cm). It can be said that the sorbed Ag is an inactive (fixed) form. Therefore, among Ag^+ , AgNPs, and Ag_2SPs , AgNPs (with the lowest sorption) are possible to cause the most influence to the chemical process.

Thus far, there was no report on direct effect of AgNPs to the chemical process performance. However, apparently, silver residues could respond the chemicals on chemical processes. For example, AgNPs can be oxidized by H_2O_2 used in the in-situ catalyzed peroxide remediation resulting in lower remediation efficiency. However, factors associated the level of influence, such as soil characteristics (organic content, soil composition, and pH) and chemicals used in the systems are needed for consideration.

Biological processes--Biological processes are important processes for removing contaminants in soil or groundwater by organisms (microorganisms called microbial remediation and plants called phytoremediation). Normally, the processes are applied for degrading organic compound to be less mobility or toxicity, such as carbon dioxide and water.

Effect of AgNPs (and all other transformed species) to bioremediation process is similar to that of WWTSS which were inconsistent as shown in Table 5 (Bradford et al., 2009; Kumar et al., 2011). This mainly caused by different environmental conditions and microbial community tolerance. The studied conditions with organic matter or salt-rich environments are likely to lessen silver-biocidalability leading to lower effect on the bioremediation performance (Bradford et al., 2009; Dasari et al., 2010). However, in the bioremediation systems, the microbial community is more complex than one in the WWTSS. Whether some microbial cultures are sensitive and could not survive in the Ag contaminated environment, this may contribute to failure for entire of the ecosystems. For example, Kumar et al. (2011) reported that in arctic soil, bacteria under order of Bacillales were growing better in presence

of AgNPs but *Bradyrhizobium*, a nitrogen-fixing species, was noticeably influenced. This situation could cause the impact to nitrogen cycle at the arctic ecosystem.

5. Potential AgNP control alternatives

Silver nanoparticle contamination control strategy could be completed in two incorporated ways: policies and technical alternatives. For policies, regulations, environmental standards, or economic incentives could be set. In this review, the alternatives in technical point of view are focused. The technical AgNP control alternatives have considered recently. Table 6 is a summary of the control alternatives presented earlier. Based on Table 6, natural/existing and modified/additional control techniques were proposed.

It can be seen that the AgNP control alternatives could be divided into 2 main processes: chemical and biological processes. Note that the physical processes (gravity separation) may not be appropriate for AgNP removal except the case of AgNP macro-aggregates. For the chemical processes, precipitation and sorption were proposed based on previous investigation (Choi et al., 2009; Kim et al., 2010; Kiser et al., 2010; Elmachli et al., 2011; Hou et al., 2012; Liu et al., 2012; Wang et al., 2012). Precipitation by sulfide is to convert Ag^+ and AgNPs to Ag_2S as referred in earlier section. Biosorption on biomass or plant was another efficient chemical process to remove Ag species. Although these two techniques provide efficient Ag species, there is a drawback needed to consider before real practice. Earlier, Ag precipitation in anaerobic biological reactors was proposed (Liu et al., 2012). After precipitation, Ag in solid forms (such as Ag_2S) will attach on sludge. Therefore, it could say that AgNPs end up associated in biosludge for both control techniques. These techniques could affect biological process performance after Ag accumulation for the long time. Also, excess biosludge with contaminated Ag may cause the problem during land application later

on. However, the additional precipitation or sorption tank before secondary treatment may be better alternatives (Figure 4).

For the biological processes, Ag-detoxifying species, such as *Chromobacterium violaceum* were isolated for cell bioaugmentation (Durán et al., 2010). Cell bioaugmentation, addition of pollutant-detoxifying microorganisms, is one of the efficient engineered environmental treatment techniques which could apply for both wastewater treatment and environmental remediation (Siripattanakul and Khan, 2010).

Alternatively, cell entrapment technique may apply for this situation. The technique is to immobilize microorganism in a porous polymeric matrix. The technique was successfully applied for either removal of hazardous substances or minimization of hazardous substance-cell contact (Cassidy et al., 1996; Siripattanakul et al., 2008; Siripattanakul-Ratpukdi, *in press*). The technique may combine to bioaugmentation, called entrapped cell bioaugmentation. The combined technique is an efficient and economical alternative because the pollutant-detoxifying in the entrapped cell form can be reused. Figure 4 presents the application of cell bioaugmentation and cell entrapment for Ag control. Lastly, phytoremediation could apply for nano-size Ag similar to traditional metal remediation (Bech et al., 2002; Archer and Caldwell, 2004).

6. Conclusion and future perspectives

Silver nanoparticles have been developed to serve various applications. Also, influence of AgNPs in the environment including the engineered environmental treatment systems has been considered and studied lately. In conclusion, what can state here is inconclusive. Numerous questions on AgNPs versus speciation, transport, and influence mechanism to engineered environmental treatment systems arise. This is because a number of factors involving in this issue. Thus far, the issue is critical because of its unpredictability.

Silver nanoparticles enter WWTs and remediation systems *via* wastewater and sludge, respectively. Silver nanoparticles could dissolve and re-precipitate definitely. Silver in nano sizes (ions and particles) spreads over and deposits in the engineered environmental treatment systems. This circumstance could substantially influence the chemical and biological processes. For the chemical processes, Ag species are able to lessen the process performance by their substitution of chemical reaction components or as interference in chemical reaction. In biological processes, a role of Ag toxicity to biological organisms in the systems is considered. This affects biological process performance eventually. Up to now, potential AgNP control techniques are not well proposed since Ag influence mechanisms are limited. However, the chemical processes (precipitation and sorption) and biological processes (cell bioaugmentation and cell entrapment) may be considered.

Further required works are listed below.

- i) Fate of AgNPs in the engineered environmental treatment systems including AgNP dissolution, Ag re-precipitation, AgNP aggregation and sorption, and interaction to chemical processes
- ii) Operating and environmental conditions affecting the systems in presence of AgNPs, such as hydraulic retention time, solid retention time, substrate concentration, biomass concentration, pH, and temperature
- iii) Insight AgNP influence mechanism on microbial community and microbial response (toxicity and resistance related to corresponded functional genes, enzymes, and proteins)

Acknowledgment

This material is based upon work supported by Thailand Research Fund, Office of the Higher Education Commission, and UbonRatchathani University, Thailand under New Researchers Grant (MRG5380280). The work is also supported by Office of the Higher Education Commission, Thailand and Austrian Agency for International Cooperation in Education and Research (OeAD-GmbH) under ASEA-Uninet Staff Exchange fellowship (2011-2012). This work was conducted as a part of the research cluster “Fate and Removal of Emerging Micropollutants in Environment” granted by Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management, Thailand. Any opinions, findings, and conclusions or recommendations expressed in this material are those of the author and do not necessarily reflect the views of the grant/scholarship providers.

References

- Abou El-Nour, K.M.M., Eftaiha, A., Al-Warthan, A., Ammar, R. 2010. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*. 3, 135-140.
- Amendola, V., Polizzi, S., Meneghetti, M. 2007. Free silver nanoparticles synthesized by laser ablation in organic solvents and their easy functionalization. *Langmuir*, 23 (12), 6766–6770.
- Archer, M.J.G., Caldwell, R.A. 2004. Response of six Australian plant species to heavy metal contamination at an abandoned mine site. *Water, Air, and Soil Pollution* 157 (1-4), 257-267.
- Arvizo, R.R., Bhattacharyya, S., Kudgus, R.A., Giri, K., Bhattacharyya, R., Mukherjee, P. 2012. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chemical Society Reviews*. 41, 2943-2970.

- Asharani, P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P., Valiyaveetil, S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 3, 279-290.
- Atiyeh, B.S., Costagliola, M., Hayek, S.N., Dibo, S.A. 2007. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns* 33, 139-148.
- Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan Darrin, J., Ismat Shah S. 2005. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5 (2), 244-249.
- Bech, J., Poschenrieder, C., Barceló, J., Lansac, A. 2002. Plants from mine spoils in the South American Area as potential sources of germplasm for phytoremediation technologies. *Acta Biotechnologica*. 22 (1-2), 5-11.
- Becker, M.F., Brock, J.R., Cai, H., Henneke, D.E., Keto, J.W., Lee, J., Nichols, W.T., Glicksman, H.D. 1998. Metal nanoparticles generated by laser ablation. *Nanostructured Materials*. 10 (5), 853-863.
- Benn, T.M., Westerhoff, P. 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabric. *Environmental Science and Technology*. 42, 4133-4139.
- Blaser, S.A., Scheringer, M., MacLeod, M., Hungerbühler, K. 2008. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nanofunctionalized plastics and textiles. *Journal of the Total Environment* 390, 396-409.
- Bokshits, Yu., V., Shevchenko, A.N., Ponyavina, A.N., Rakhmanov, S.K. 2004. Formation of silver and copper nanoparticles upon the reduction of their poorly soluble precursors in aqueous solution. *Colloidal Journal*. 66 (5), 517-522.
- Bradford, A., Handy, R.D., Readman, J.W., Atfield, A., Mühling, M. 2009. Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments. *Environmental Science and Technology*. 43 (12), 4530-4536.

- Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. 2010.Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge - Evidence and impacts.Waste Management. 30 (3), 504-520.
- Carlson, C., Hussein, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J.J. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. Journal of Physical Chemistry B. 112 (43), 13608-13619.
- Cassidy, M.B., Lee, H., Trevors, J. T. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. Journal of Industrial Microbiology, 16, 79-101.
- Chain, P., Lamerdin, J., Larimer, F., Regala, W., Lao, V., Land, M., Hauser, L., Hooper, A., Klotz, M., Norton, J., Sayavedra-Soto, L., Arciero, D., Hommes, N., Whittaker, M., Arp, D. 2003.Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. Journal of Bacteriology. 185 (9), 2759-2773.
- Chaudhry, Q., Scotter, M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A., Castle, L., Aitken, R., Watkins, R. 2008.Applications and implications of nanotechnologies for the food sector.Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment.25 (3), 241-258.
- Chaloupka, K., Malam, Y., Seifalian, A.M. 2010. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications.Trends in Biotechnology. 28 (11) , 580-588.
- Chen, X. Schluesener, H.J. 2008.Nanosilver: a nanoproduct in medical application. Toxicology Letters. 176, 1-12.
- Chinnapongse, S.L., MacCuspie, R.I., Hackley, V.A. 2011.Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters.Science of the Total Environment. 409 (12), 2443-2450.

- Choi, O., Cleuenger, T., Deng, B., Surampalli, R., Ross, L., Hu, Z. 2009. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Research*. 43, 1879-1886.
- Choi, O., Deng, K.K., Kim, N.J., Ross, L., Surampalli, R.Y., Hu, Z. 2008. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, 42, 3066-3074.
- Choi, O.K., Hu, Z.Q. 2008. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental Science and Technology*, 42, 4583-4588.
- Choi, O., Yu, C.-P., Esteban Fernández, G., Hu, Z. 2010. Interactions of nanosilver with *Escherichia coli* cells in planktonic and biofilm cultures. *Water Research*. 44 (20), 6095-6103.
- Coutris, C., Joner, E.J., Oughton, D.H. 2012. Aging and soil organic matter content affect the fate of silver nanoparticles in soil. *Science of the Total Environment*. 420, 327-333.
- Damm, C., Munstedt, H., Rosch, A. 2008. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites. *Materials Chemistry and Physics*. 108, 61-66.
- Dankovich, T.A., Gray, D.G. 2011. Bactericidal paper impregnated with silver nanoparticles for point-of-use water treatment. *Environmental Science and Technology*. 45 (5), 1992-1998.
- Darroudi, M., Ahmad M.B., Abdullah A.H., Ibrahim N.A., Shameli K. 2010. Effect of accelerator in green synthesis of silver nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 11, 3898-3905.
- Dasari, T.P., Hwang, H.-M. 2010. The effect of humic acids on the cytotoxicity of silver nanoparticles to a natural aquatic bacterial assemblage. *Science of the Total Environment*. 408 (23), 5817-5823.
- Durán, N., Marcato, P.D., Alves, O.L., Da Silva, J.P.S., De Souza, G.I.H., Rodrigues, F.A., Esposito, E. 2010. Ecosystem protection by effluent bioremediation: Silver nanoparticles

- impregnation in a textile fabrics process. *Journal of Nanoparticle Research*. 12 (1), 285-292.
- Durán, N., Marcato, P.D., De Conti, R., Alves, O.L., Costa, F.T.M., Brocchi, M. 2010. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 21 (6), 949-959.
- El Badawy, A.M., Silva, R.G., Morris, B., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., Tolaymat, T.M. 2011. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environmental Science and Technology*. 45(1), 283-287.
- Elmachli, S., Chefetz, B., Tel-Or, E., Vidal, L., Canals, A., Gedanken, A. 2011. Removal of silver and lead ions from water wastes using *Azolla filiculoides*, an aquatic plant, which adsorbs and reduces the ions into the corresponding metallic nanoparticles under microwave radiation in 5 min. *Water, Air, and Soil Pollution*. 218 (1-4), 365-370.
- El-Temsah, Y.S., Joner, E.J. 2010. Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environmental Toxicology*. 27 (1), 42-49.
- Gao, J., Youn, S., Hovsepyan, A., Llaneza, V.L., Wang, Y., Bitton, G., Bonzongo, J.C.J. 2009. Dispersion and toxicity of selected manufactured nanomaterials in natural river water samples: effects of water chemical composition. *Environmental Science and Technology*. 43, 3322-3328.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental Science and Technology*. 43 (24), 9216-9222.
- García, A., Delgado, L., Torà, J.A., Casals, E., González, E., Puentes, V., Font, X., Carrera, J., Sánchez, A. 2012. Effect of cerium dioxide, titanium dioxide, silver, and gold

- nanoparticles on the activity of microbial communities intended in wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials*. 199-200, 64-72.
- Gupta, A., Phung, L.T., Taylor, D.E., Silver, S. 2001. Diversity of silver resistance genes in *IncH* incompatibility group plasmids. *Microbiology*. 147, 3393-3402.
- Guzman, M., Dille, J., Godet, S. 2012. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 8, 37-45.
- He, B., Tan, J.J., Liew, K.Y., Liu, H., 2004. Synthesis of size controlled Ag nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 221, 121-126.
- Hoque, M.E., Khosravi, K., Newman, K., Metcalfe, C.D. 2012. Detection and characterization of silver nanoparticles in aqueous matrices using asymmetric-flow field flow fractionation with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1233, 109-115.
- Hou, L., Li, K., Ding, Y., Li, Y., Chen, J., Wu, X., Li, X. 2012. Removal of silver nanoparticles in simulated wastewater treatment processes and its impact on COD and NH_4 reduction. *Chemosphere*. 87 (3), 248-252.
- Hou, H., Takamatsu, T., Koshikawa, M.K., Hosomi, M. 2005. Migration of silver, indium, tin, antimony, and bismuth and variations in their chemical fractions on addition to uncontaminated soils. *Soil Science*. 170, 624-39.
- Hsu, S.L., Wu, R. 2007. Synthesis of contamination-free silver nanoparticle suspensions for micro-interconnects. *Materials Letters*. 61(17), 3719-3722.
- Huang, C.P., Wang, J.M. 2001. Factors affecting the distribution of heavy metals in wastewater treatment processes: Role of sludge particulate. *Water Science and Technology*. 44 (10), 47-52.

- Hwang, E., Lee, J., Chae, Y., Kim, Y., Kim, B., Sang, B., Gu, M. 2008. Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. *Small*. 4, 746-750.
- Jung, W.K., Koo, H.C., Kim, K.W., Shin, S., Kim, S.H., Park, Y.H. 2008. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, 74(7), 2171-2178.
- Kaegi, R., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Mueller, E., Vonbank, R., Boller, M., Burkhardt, M. 2010. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environmental Pollution*. 158 (9), 2900-2905.
- Kaegi, R., Voegelin, A., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Burkhardt, M., Siegrist, H. 2011. Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environmental Science and Technology*. 45 (9), 3902-3908.
- Khan, S.S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. 2012. Adsorptive removal of silver nanoparticles (SNPs) from aqueous solution by *Aeromonas punctata* and its adsorption isotherm and kinetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 92, 156-160.
- Kim, B., Park, C.-S., Murayama, M., Hochella, M.F. 2010. Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products. *Environmental Science and Technology*. 44 (19), 7509-7514.
- Kokura, S., Handa, O., Takagi, T., Ishikawa, T., Naito, Y., Yoshikawa, T. 2010. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 6 (4), 570-574.
- Kvitek, L., Panacek, A., Soukupova, J., Kolar, M., Vecerova, R., Prucek, R., Holecova, M., Zboril, R. 2008. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *The Journal of Physical Chemistry C*, 112, 5825-5834.

- Kumar, N., Shah, V., Walker, V.K. 2011. Perturbation of an arctic soil microbial community by metal nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*. 190 (1-3), 816-822.
- Lapresta-Fernández, A., Fernández, A., Blasco, J. 2012. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends in Analytical Chemistry*. 32, 40-59.
- Lehtinen, K.E.J., Backman, U., Jokiniemi, J.K., Kulmala, M. 2004. Three-body collisions as a particle formation mechanism in silver nanoparticle synthesis. *Journal of Colloid and Interface Science*. 274(2), 526-530.
- Liang, Z., Das, A., Hu, Z. 2010. Bacterial response to a shock load of nanosilver in an activated sludge treatment system. *Water Research*. 44 (18), 5432-5438.
- Liu, J., Hurt, R.H. 2010. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental Science and Technology*. 44 (6), 2169-2175.
- Liu, J., Pennell, K.G., Hurt, R.H. 2011. Kinetics and mechanisms of nanosilver oxysulfidation. *Environmental Science and Technology*. 45 (17), 7345-7353.
- Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Tam, P.K.-H., Chiu, J.-F., Che, C.-M. 2006. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research*. 5 (4), 916-924.
- Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 101(1), 13-30.
- Lv, Y., Liu, H., Wang, Z., Liu, S., Hao, L., Sang, Y., Liu, D., Wang, J., Boughton, R.I. 2009. Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment. *Journal of Membrane Science*. 331 (1-2), 50-56.
- Mafuné, F., Kohno, J., Takeda, Y., Kondow, T., Sawabe, H. 2000. Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry B*. 104, 9111-9117.

- Manimegalai, G., Shantha Kumar, S., Sharma, C. 2011. Pesticide mineralization in water using silver nanoparticles. *International Journal of Chemical Sciences*. 9 (3), 1463-1471.
- Marambio-Jones, C., Hoek, E.M.V. 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1531-1551.
- Maretti, L., Billone, P.S., Liu, Y., Scaiano, J.C. 2009. Facile photochemical synthesis and characterization of highly fluorescent silver nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 131 (39), 13972-13980.
- McFarland, A.D., Van Duyne, R.P. 2003. Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity. *Nano Letters*, 3 (8), 1057-1062.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H., Kim, S. 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Science*. 77, 2166-2178.
- Mitrano, D.M., Leshner, E.K., Bednar, A., Monserud, J., Higgins, C.P., Ranville, J.F. 2011. Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31(1), 115-121.
- Morones, J., Elechiguerra, J., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J., Ramirez, J., Yacaman, M. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 16, 2346-2353.
- Mueller, N.C., Nowack, B. 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science and Technology*. 42 (12), 4447-4453.
- Murray, B.J., Li, Q., Newberg, J.T., Menke, E.J., Hemminger, J.C., Penner, R.M. 2005. Shape- and size-selective electrochemical synthesis of dispersed silver(I) oxide colloids. *Nano Letters*. 5 (11), 2319-2324.

- Musee, N. 2010. Simulated environmental risk estimation of engineered nanomaterials: A case of cosmetics in Johannesburg City. *Human and Experimental Toxicology*. DOI: 10.1177/0960327110391387.
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R. 2008. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology*. 42 (23), 8959-8964.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 311, 622-627.
- Nel, A.E., Madler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M.V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*. 8, 543-557.
- Nowack, B. 2010. Nanosilver revisited downstream. *Science*. 330 (6007), 1054-1055.
- Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? a study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (6), 1712-1720.
- Parikh, R.Y., Singh, S., Prasad, B.L.V., Patole, M.S., Sastry, M., Schouche, Y.S. 2008. Extracellular synthesis of crystalline silver nanoparticles and molecular evidence of silver resistance from *Morganella* sp.: Towards understanding biochemical synthesis mechanism. *ChemBioChem*. 9 (9), 1415-1422.
- Pietrobon, B., Kitaev, V. 2008. Photochemical synthesis of monodisperse size-controlled silver decahedral nanoparticles and their remarkable optical properties. *Chemistry of Materials*. 20 (16), 5186-5190.
- Purcell, T.W., Peters, J.J. 1998. Sources of silver in the environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17 (4), 539-546.

- Pyatenko, A., Shimokawa, K., Yamaguchi, M., Nishimura, O., Suzuki, M. 2004. Synthesis of silver nanoparticles by laser ablation in pure water. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*. 79 (4-6), 803-806.
- Raffi, M., Hussain, F., Bhatti, T., Akhter, J., Hameed, A., Hasan, M. 2008. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224. *Journal of Materials Science and Technology*. 24, 192-196.
- Raffi, M., Rumaiz, A.K., Hasan, M.M., Ismat Shah, S. 2007. Studies of the growth parameters for silver nanoparticle synthesis by inert gas condensation. *Journal of Materials Research*, 22, 3378-3384.
- Rai, M., Yadav, A., Gade, A. 2009. Silver Nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. 27, 76-83.
- Ray, P.C., Yu, H.T.M., Fu, P.P. 2009. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 27, 1-35.
- Ren, X., Meng, X., Chen, D., Tang, F., Jiao, J. 2005. Using silver nanoparticle to enhance current response of biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 21 (3), 433-437.
- Rodríguez-Sánchez, L., Blanco, M.C., López-Quintela, M.A. 2000. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 104, (41), 9683-9688.
- Saravanan, M., Vemu, A.K., Barik, S.K. 2011. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles from *Bacillus megaterium* (NCIM 2326) and their antibacterial activity on multi drug resistant clinical pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 88 (1), 325-331.
- Sharma, V.K., Yngard, R.A., Lin, Y. 2009. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*. 145, 83-96.
- Sheng, Z., Liu, Y. 2011. Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. *Water Research* 45 (18), 6039-6050.

- Silver, S. 2003. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Review*. 27, 341-353.
- Siripattanakul, S. and Khan, E. 2009. Fundamentals and Applications of Entrapped Cell Bioaugmentation for Contaminant Removal. In Shah, V. *Emerging Environmental Technologies*, Volume II, Springer Science, Berlin, Germany. pp. 147-170.
- Siripattanakul, S., Wirojanagud, W., McEvoy, J., Khan, E. 2008. Effect of cell-to-matrix ratio in polyvinyl alcohol immobilized pure and mixed cultures for atrazine degradation. *Water, Air, and Soil Pollution: Focus*, 8, 257-266.
- Siripattanakul-Ratpukdi, S. Entrapped cell system for decentralized hospital wastewater treatment: inhibitory effect of disinfectants. *Environmental Technology*. *in press*.
- Smetana, A., Klabunde, K., Marchin, G., Sorensen, C. 2008. Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles. *Langmuir*. 24, 7457-7464.
- Somasundaran, P., Fang, X., Ponnuram, S., Li, B. 2010. Nanoparticles: characteristics, mechanisms and modulation of biotoxicity. *KONA Powder and Particle Journal*. 28, 38-49.
- Sotiriou, G.A., Pratsinis, S.E. 2010. Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environmental Science and Technology*. 44 (14), 5649-5654.
- Suresh, A.K., Pelletier, D.A., Wang, W., Moon, J.-W., Gu, B., Mortensen, N.P., Allison, D.P., Joy, D.C., Phelps, T.J., Doktycz, M.J. 2010. Silver nanocrystallites: Biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria. *Environmental Science and Technology*. 44 (13), 5210-5215.
- Suresh, A.K., Pelletier, D.A., Wang, W., Morrell-Falvey, J.L., Gu, B., Doktycz, M.J. 2012. Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types. *Langmuir*. 28 (5), 2727-2735.

Tian, J., Wong, K.K.Y., Ho, C., Lok, C., Yu, W., Che, C., Chiu, J., Tam, P.K.H. 2007.

Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*. 2, 129-136.

Wang, Y., Westerhoff, P., Hristovski, K.D. 2012. Fate and biological effects of silver, titanium dioxide, and C₆₀ (fullerene) nanomaterials during simulated wastewater treatment processes. *Journal of Hazardous Materials*. 201-202, 16-22.

Wang, H., Qiao, X., Chen, J., Ding, S. 2005. Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 256, 111-115.

Whiteley, C.M, Valle, M.D., Jones, K.C., Sweetman, A.J. 2011. Challenges in assessing the environmental fate and exposure of nano silver. *Journal of Physics: Conference Series*. 304, doi:10.1088/1742-6596/304/1/012070.

Wu, Z., Zhang, Y., Tao, T., Zhang, L., Fong, H. 2010. Silver nanoparticles on amidoxime fibers for photo-catalytic degradation of organic dyes in waste water. *Applied Surface Science*. 257 (3), 1092-1097.

Xu, R., Wang, D., Zhang, J., Li, Y. 2006. Shape-dependent catalytic activity of silver nanoparticles for the oxidation of styrene. *Chemistry - An Asian Journal*. 1 (6), 888-893.

Yang, Y., Chen, Q., Wall, J.D., Hu, Z. 2012. Potential nanosilver impact on anaerobic digestion at moderate silver concentrations. *Water Research* 46 (4), 1176-1184.

Yin, B., Ma, H., Wang, S., Chen, S. 2003. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles under protection of poly(*N*-vinylpyrrolidone). *The Journal of Physical Chemistry B*. 107 (34), 8898-8904.

Zheng, X., Guo, D., Shao, Y., Jia, S., Xu, S., Zhao, B., Xu, W., Corredor, C., Lombardi, J.R. 2008. Photochemical modification of an optical fiber tip with a silver nanoparticle film: A SERS chemical sensor. *Langmuir*. 24 (8), 4394-4398.

Table 1. AgNP synthesis methods

Table 2. Calculated amount of silver from textile and plastic industry in each environmental medium

Table 3. Summary of silver contaminations related to AgNPs

Table 4. Factors influencing AgNP toxicity

Table 5. Engineered environmental treatment systems affected by AgNPs

Table 6. Potential AgNP control alternatives

Figure 1. Silver nanoparticle fate in environment

Figure 2. Example of damaged microbial cells by AgNPs (a microbial cell from nitrification system contaminated by AgNPs of 5 mg/L)

Figure 3. Schematic diagram of potential reactions related to AgNPs

Figure 4. Potential chemical and biological processes for Ag control in the wastewater treatment systems

Table 1.

Method	Method description	Examples
<u>Physical approach</u>		
Evaporation/condensation	Silver ion solution is vaporized into a carrier gas and then cooled for nucleation and nanoparticle formation.	Lehtinen et al. (2004) Baker et al. (2005) Raffi et al. (2007)
Irradiation	Silver nanoparticles are produced by irradiating (laser, microwave, or ionization) silver solution. The particle size could be controlled by variation of irradiation time and laser power.	Becker et al. (1998) Mafuné et al. (2000) Pyatenko et al. (2004) Amendola et al. (2007)
<u>Chemical approach</u>		
Chemical reduction	Silver ion in a solution is reduced by a reducing agent (such as borohydride, citrate, poly (vinylpyrrolidone), and poly (ethylene glycol)) and formed silver atom (Ag^0). The silver atoms agglomerate and become particles. Also, a capping agent (such as surfactant) might be used to stabilize AgNPs.	Bokshits et al. (2004) He et al. (2004) Wang et al. (2005) Hsu and Wu (2007)

Electrochemical reduction	A silver anode is electrochemically dissolved in a solvent. The silver nanoparticles are then separated from the solvent.	Rodríguez-Sánchez et al. (2000) Yin et al. (2003) Murray et al. (2005)
Photochemical reduction	Silver ion in a solution is reduced by a reducing agent and then irradiated to form silver nanoparticles.	Pietrobon and Kitaev (2008) Maretti et al. (2009)
<u>Biological approach</u>	The method is biochemical reduction. It is similar to chemical reduction method but use extracts from organisms (microorganisms and plants) as reducing agents and/or capping agents. The well-known biological extracts used for AgNP synthesis are proteins, amino acids, and polysaccharides.	Sharma et al. (2009) Darroudi et al. (2010) Marambio-Jones and Hoek (2010)

Table 2.

Environmental medium	Amount of silver	
	ton/yr	%
WWTSs	190-410	100.00
Natural receiving water (from treated wastewater)	20-130	11.53-31.70
Soil (from wastewater treatment sludge for agricultural purpose)	80-190	42.10-46.34
Atmosphere (from solid waste incineration smoke)	8-17	4.06-4.21
Remark: silver entered solid waste landfill is neglect		

Table 3.

Study description	Silver detected form	Contaminated concentration	Location	Reference
Silver released from nanoparticles incorporated into textiles and plastics and risk freshwater ecosystems were determined.	Total Ag (model)	Predicted silver concentrations in WWTS and sludge were 2-18 µg/L and 7-39 mg/kg, respectively. The silver concentrations in Rhine river were estimated at up to 148 ng/L.	Switzerland	Blaser et al. (2008)
Quantities of AgNPs released into environment and their risk were modelled.	AgNP (model)	Predicted AgNP concentrations in air, water, and soil ranged 0.002-0.004 µg/m ³ , 0.03-0.08 µg/L, 0.02-0.1 µg/kg, respectively.	Switzerland	Muller and Nowack (2008)
Probabilistic material flow analysis was used to model AgNP concentrations in environment.	AgNP (model)	Predicted AgNP concentrations in soil, sludge treated soil, surface water, WWTS effluent, WWTS sludge, sediment, and air in Europe were 22.7 ng/kg/yr, 1,581 ng/kg/yr, 0.8 ng/L, 42.5 ng/L, 1.7 mg/kg, 952 ng/kg/yr, and 0.008 ng/m ³ ,	Europe, USA, and Switzerland	Gottschalk et al. (2009)

respectively.

Predicted AgNP concentrations in soil, sludge treated soil, surface water, WWTS effluent, WWTS sludge, sediment, and air in USA were 8.3 ng/kg/yr, 662 ng/kg/yr, 0.1 ng/L, 21 ng/L, 1.6 mg/kg, 195 ng/kg/yr, and 0.002 ng/m³, respectively.

Predicted AgNP concentrations in soil, surface water, WWTS effluent, WWTS sludge, sediment, and air in Switzerland were 11.2 ng/kg/yr, 0.7 ng/L, 38.7 ng/L, 1.9 mg/kg, 1,203 ng/kg/yr, and 0.021 ng/m³, respectively.

Release of AgNPs from paints used for outdoor applications <i>via</i> rain was investigated.	Total Ag	Silver nanoparticles could leach at the concentration of up to 145 µg-Ag/L during the initial runoff event.	Switzerland	Kaegi et al. (2010)
--	----------	---	-------------	---------------------

Predicted AgNP concentrations releasing from cosmetic-based nano-products to environment were predicted and used for risk assessment.	AgNP (model)	Silver nanoparticles released into wastewater were 7.8-306.6 kg/annum while AgNPs in WWTSSs were 6.2-184.2 kg/annum. Silver nanoparticles of 2.8-183.2 kg/annum were released into aquatic systems. The predicted AgNP concentration in aquatic ecosystem were 0.003 to 0.619 µg/L.	Johannesburg, South Africa	Musee et al. (2010)
Silver nanoparticle analysis by an inductively coupled plasma–mass spectrometry, operated in a single-particle counting mode technique was developed. Influent and effluent samples from a wastewater treatment in Boulder, CO, USA were detected for AgNP concentrations.	Dissolved silver (dAg) and AgNP	In influent, dAg of 520 ng/L and AgNPs of 200 ng/L were detected while dAg of 60 ng/L and AgNPs of 100 ng/L were measured in the final effluent.	Boulder, CO, USA	Mitrano et al. (2011)

Novel detection method for AgNPs	AgNP	The concentration and size of AgNPs in the	Ontario,	Hoque et al.
was developed. The		influent from a wastewater treatment in	Canada	(2012)
AgNPconcentratons in surface water		Peterborough, Ontario, Canada were 1.90 ng/mL		
and influent of a wastewater treatment		and 9.3 nm, reespectively. Surface water samples		
plant were detected.		collected from Plastic Lake, Chemong Lake, and		
		Otonabee River in central Ontario, Canada did not		
		detect AgNPs at detection limit of 0.8 ng/mL.		

Table 4.

Factor	Description	Examples
<u>Silver nanoparticle properties</u>		
Physical properties (size, shape, and surface)	AgNPs synthesized to different shapes (such as truncated triangular, spherical, and rod-shapes) had different active facets. Silver nanoparticles with a {111} lattice plane as the basal plane (like truncated triangular shape) showed the highest biocidal property compared to others. For size, it is obvious that the particles at smaller size had higher surface area resulting in higher biocidal activities. Furthermore, the AgNP surface physical properties including surface charge, surface curvature, crystallinity, porosity, heterogeneity, and roughness influenced toxicity but degree of toxicity was varied.	Pal et al. (2007) Carlson et al. (2008) Choi and Hu (2008) Somasundaran et al. (2010) El Badawy et al. (2011)
Chemical properties (surface coating, elemental composition, and stability)	Among various AgNP synthesis methods, several reducing and capping agents and synthesis techniques were applied and resulted in different particle surface properties. These properties significantly affected the microbial cell surface and membrane causing cell death or malfunction. Moreover, the factors also influenced AgNP stability; the more particle stability (less aggregation) led to	Kvitek et al. (2008) El Badawy et al. (2011) Suresh et al. (2012)

to the more toxicity.

<u>Environmental conditions</u>	Environmental conditions, such as pH, light, ionic strength, salinity, OM, and	Lok et al. (2007)
	DO affected the AgNP toxicity. The pH close to the isoelectric point and OM	Choi and Hu (2008)
	(including natural OM and exopolymeric substances (EPS) released during cell	Choi et al. (2009)
	lysis) could stimulate AgNP aggregation resulting in lower toxicity. For DO and	Gao et al. (2009)
	light, these parameters promoted ROS attributing to higher AgNP toxicity.	Nel et al. (2009)
	Natural chemicals related to ionic strength and salinity (such as cysteine ligands	Dasari et al (2010)
	and chloride) influence both AgNP dissolution and re-precipitation. Therefore,	Lushchak (2011)
	these factors could either promote or decrease the AgNP toxicity.	

Table 5.

System description	Effect on system performance and microbial community	Reference
<u>Wastewater treatment systems</u>		
The inhibitory effect by AgNPs at concentration of 1 mg/L on the autotrophic and heterotrophic growth was determined in bench scale. The commercial AgNPs at 14 nm were applied but the measured size of AgNPs was approximately 200 nm because of their aggregation.	Growth of autotrophic nitrifying organisms (86%) was inhibited more than that of heterotrophic <i>Escherichia coli</i> PHL628-gfp (55%). EPS was observed. AgNPs attached to cell surface might cause the damage on cell membrane.	Choi et al. (2008)
The study was to determine inhibition of nitrifying organism growth by AgNPs at different sizes (9-21 nm) in bench scale.	Sizes of AgNPs played an important role in nitrifying organism growth inhibition. The effective concentration of AgNPs causing 50% inhibition (EC_{50}) was 0.14 mg/L. The intracellular ROS generation by AgNPs was observed and likely to influence inhibition of the cell growth.	Choi and Hu (2008)
The research was to study the impact of ligands (Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , $EDTA^{4-}$, and S^{2-}) on AgNP (at average size of 6-24 nm) toxicity to nitrification.	- Nitrification inhibition of 100% occurred at AgNPs of 1 mg/L. Sulfide effectively reduced AgNP toxicity (by 80%). - Ammonia-oxidizing microorganisms (related to ammonia	Choi et al. (2009)

monooxygenase enzyme) were more sensitive than nitrite-oxidizing microorganisms.

Planktonic and biofilm activities from AgNP (at average size of 15-21 nm) contaminated wastewater treatment were determined.	• Biofilms were four-time higher resistance to AgNPs compared to planktonic cells. • Silver ion was more toxic to <i>E. coli</i> because AgNPs were aggregated and resulted in lower toxicity.	Choi et al. (2010)
Sorption of AgNPs (at average size of 13 nm) onto activated sludge was studied.	• Sorption of AgNPs on HIV-1 virus (39% removal) should cause by binding of AgNPs and glycoprotein from the viral lipid membrane. Sorption, aggregation, and sedimentation promoted AgNP removal of 97% in total.	Kiser et al. (2010)
The inhibitory effect from shock loading of AgNPs (at average size of 1-29 nm and concentration of 1 mg/L) to autotrophs and heterotrophs was evaluated.	• Silver nanoparticles and Ag⁺ (total Ag of 1 mg/L) inhibited nitrification for 41.4% and 13.5%, respectively. • Silver significantly affected nitrifying microorganisms (both ammonia and nitrite-oxidizing microorganisms) resulting in lower nitrification performance while heterotrophs could resist in the Ag-contaminated wastewater and maintain organic removal performance.	Liang et al. (2010)

Effect of AgNPs on biofilm and planktonic pure culture in wastewater treatment was performed. The study was conducted at AgNPs of 200 mg-Ag/L and average size of < 5 nm.	• Biofilm well grew in the contaminated wastewater which was promoted by EPS. • In comparison to planktonic pure culture, biofilm microbial community was much more tolerant. Among bacteria in biofilm, <i>Thiotrichales</i> more sensitive to AgNPs than others.	Sheng and Liu (2011)
Effect of AgNPs on activated sludge process was studied. Sequencing batch reactors were operated under sludge retention time, AgNP loadings and biomass concentrations of 6 d, 0.5-1.5 mg/L, and 1,500-2,500 mg/L, respectively similar to a WWTS in Arizona, USA.	• Silver nanoparticles did not present effect on WWTS performance. Also, AgNPs of 88% was removed during the treatment. The result revealed that AgNPs should accumulate in biomass rather than treated effluent.	Wang et al. (2012)
The work determined effect of AgNPs on aerobic and anaerobic wastewater treatment. The study was conducted at AgNPs of 0.17 mg/L and average size of 30 nm.	• Silver nanoparticles caused biogas production inhibition of 33 to 50% and a slight inhibition in aerobic heterotrophic treatment and nitrification.	García et al. (2012)
Fate and impact of AgNPs (0.1-1.0 mg/L)	• Silver nanoparticles of 90% remained in the wastewater after simulated	Hou et al. (2012)

insimulated wastewater treatment processes were determined.

primary clarification. In sequencing batch reactor processes, AgNPs were completely removed. Removal of COD remained stable while reduction of NH_4 was inhibited in early period and then fully recovered in later period of the experiment.

Impact of AgNPs on anaerobic glucose degradation and sludge digestion was performed. The study was conducted at AgNPs of 40 mg /L and average size of 21 nm.

- There was no significant difference in biogas and methane production between the sludge treated with AgNPs at the concentrations up to 40 mg-Ag/L. In treated wastewater, more than 90% of AgNPs was removed into sludge. Almost no silver ions were released from AgNPs under the tested conditions.
- The microbial community which *Methanosaeta* and *Methanomicrobiales* were dominant remained unchanged.

Yang et al. (2012)

Environmental remediation systems

Effects of AgNPs on natural bacterial community in estuarine environment were studied. The study was conducted at AgNPs of 0-1 mg/L and average size of <100 nm.

- It was found that AgNPs accumulated in the surface layer of the sediment (approximately 3 mm from top).
- No or little significant AgNP impacts on the prokaryotic abundance were detected. Possible reasons for inactive (non-toxic) AgNPs could be due to

Bradford et al.
(2009)

environmental factors, especially chloride ions in estuary water. This could affect the chemistry and behavior of AgNPs.

The effect of humic acid (HA) on the AgNP cytotoxicity to aquatic bacterial community was studied. The study was conducted at AgNPs of 0-5 μM and average size of 15-25 nm and HA of 0-40 ppm.	• In river water, AgNPs were reduced to Ag^+ up to 33% but HA could bind Ag^+ and reduce Ag^+ toxicity. • Concentrations of AgNP, types of HA, and light influenced the cytotoxicity.	Dasari et al. (2010)
The influence of AgNPs on arctic soil microbial Diversity was investigated. The study was conducted at AgNP average size of 20 nm.	• Silver nanoparticles significantly reduced the recovery of 16S sequences (13–70%) in orders of Solirubrobacterales, Actinomycetales, Rhizobiales, Acidobacteriales and Clostridiales. Bacillales relatively increased in number. This may be because Bacillales are spore-formers which are well survived under extreme conditions. Moreover, nitrogen-fixing <i>Bradyrhizobium</i> species found to be susceptible to AgNPs may impact to biogeochemical cycles and arctic ecosystem.	Kumar et al. (2011)
The work was to assess the colloidal stability and agglomeration of AgNPs in aquatic ecosystem.	• Silver nanoparticles partially agglomerated in the pond water. Degree of agglomeration and sedimentation depended on water hardness or salinity	Chinnapongse et al. (2011)

The study was conducted at AgNP average size of 20 nm.	(high agglomeration at high hardness or salinity)	
	• It was also found that NOM promoted colloidal stabilization.	
The study was to compare soil-binding behavior of silver nitrate, citrate-stabilized Ag NPs (5 nm) and uncoated Ag NPs (19 nm) in two soils (organic and mineral soils).	• All types of silver were more mobile in the mineral soil than in the organic soil. Silver nitrate and citrate-stabilized Ag NPs were rapidly immobilized in soil (low bioaccessibility) while the uncoated AgNP bioaccessibility increased over time.	Coutris et al. (2012)

Table 6.

Control technique	Reference
<u>Natural / existing control techniques</u>	
• Transformation of AgNPs to Ag ₂ SP which less toxicity and more stable by anaerobic wastewater treatment systems with sulphur-rich environments	Kim et al. (2010)
• Sorption on biomass during biological treatment process	Hou et al. (2012)
	Wang et al. (2012)
<u>Modified/additional control techniques</u>	
• Addition of sulfide to form Ag ₂ SP which less toxic and stable in an aqueous solution	Choi et al. (2009)
	Liu et al. (2012)
• Isolation of Ag-detoxifying species, such as <i>Chromobacterium violaceum</i> to augment in contaminated wastewater or soil.	Durán et al. (2010)
• Sorption on biomass in biological treatment process	Kiser et al. (2010)
	Khan et al. (2012)
• Microwave radiation and plant biosorption as an additional (advanced) treatment	Elmachli et al. (2011)

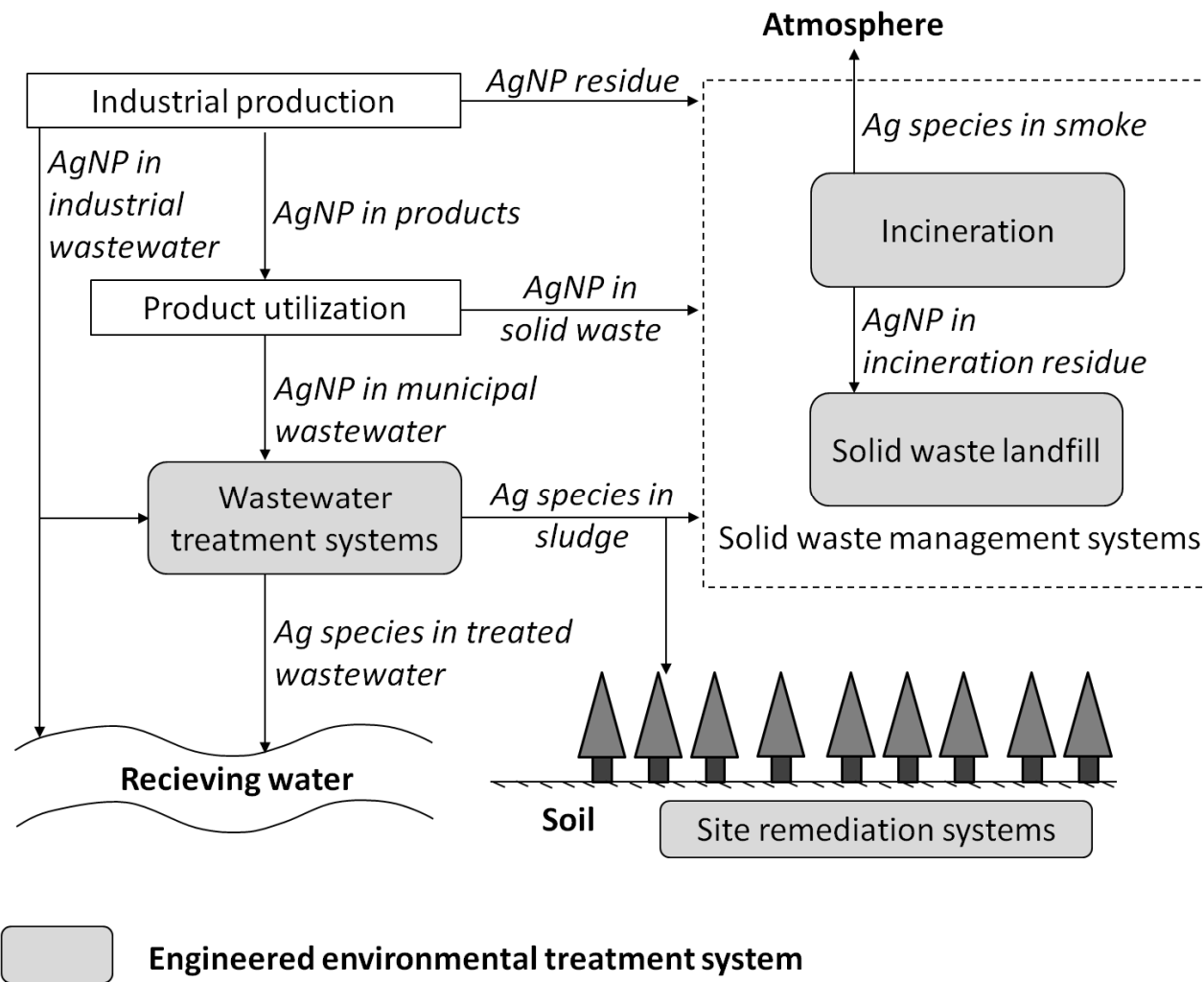


Figure 1.

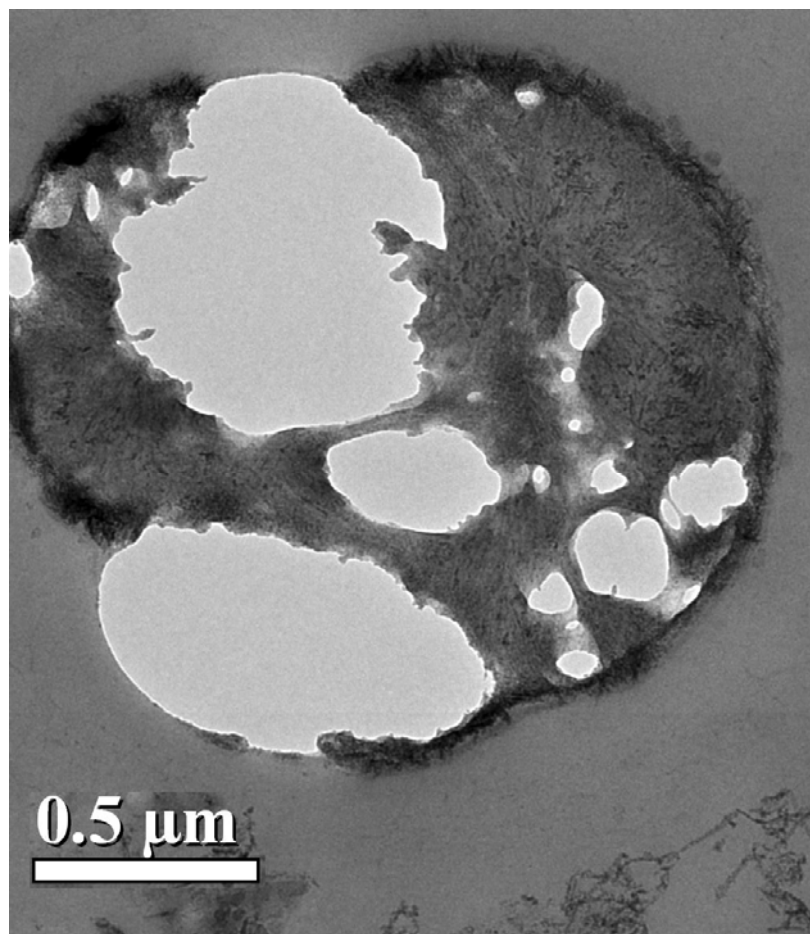


Figure 2.

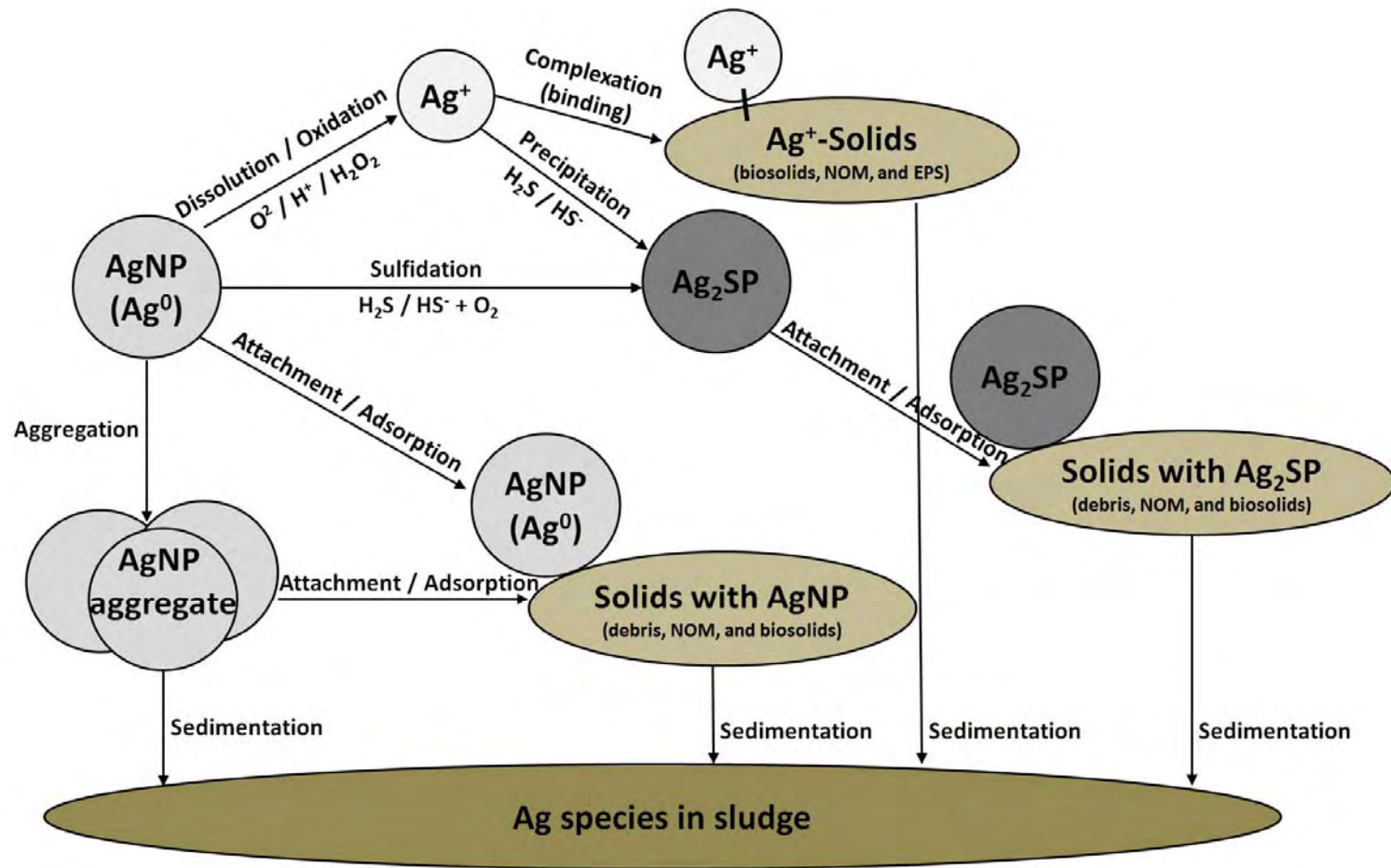
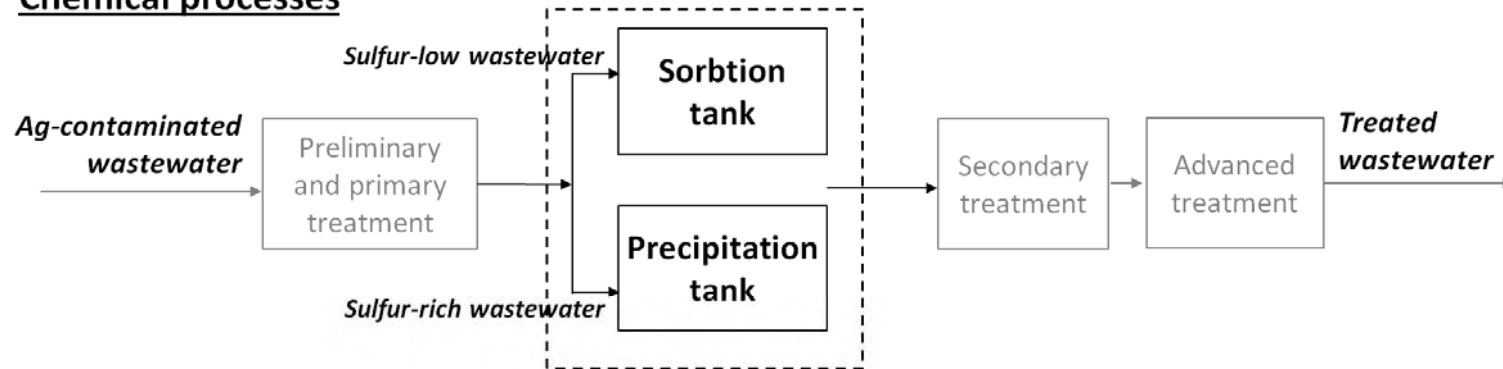


Figure 3.

Chemical processes



Biological processes

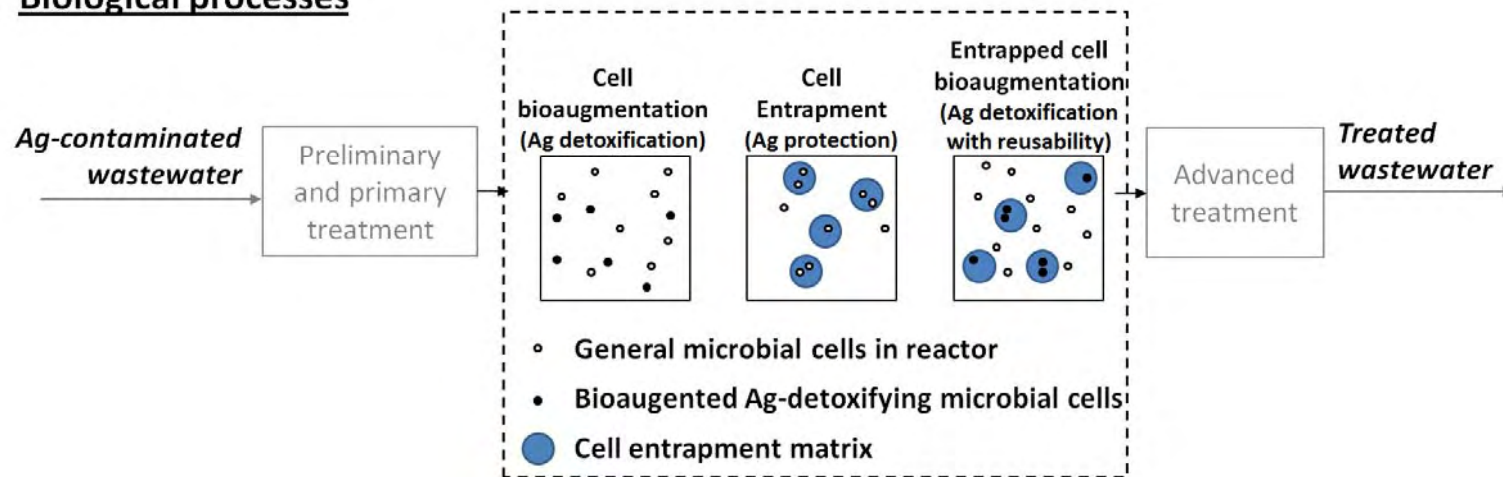


Figure 4