



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการจัดแมงกานีสในกระบวนการผลิตน้ำ
ด้วยการกรองชีวภาพแบบเซลล์ดักติด

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. สุนหา ราษฎร์ภักดี

พฤษภาคม 2563

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการจัดแมงกานีสในกระบวนการผลิตน้ำ
ด้วยการกรองชีวภาพแบบเซลล์ดักติด

รองศาสตราจารย์ ดร. สุนหา ราชภูริภักดี

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ดำเนินการภายใต้ทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นกลาง (เมธีวิจัย สกว.) ประจำปี พ.ศ. 2560 ซึ่งสนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย และ สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน สำหรับความอนุเคราะห์ใช้สถานที่และเครื่องมือต่าง ๆ

นอกจากนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.ดร.ธัญลักษณ์ ราษฎร์ภักดี และ Prof. Dr. Eakalak Khan ที่ให้คำแนะนำแนวทางการดำเนินงานวิจัยและการจัดเตรียมบทความเพื่อการตีพิมพ์เผยแพร่ ผู้วิจัยขอขอบคุณคุณนรินทร์ เทิดเกียรติกุล และ คุณอัจฉราพร ยังวิลัย นักศึกษาปริญญาเอก ผู้ร่วมดำเนินงานวิจัยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

รศ.ดร. สุมณา ราษฎร์ภักดี

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA6080054

ชื่อโครงการ: การกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนในกระบวนการผลิตน้ำด้วยการกรองชีวภาพ
แบบเซลล์ดักติด

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: รศ.ดร. สุมนา ราษฎร์ภักดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อีเมล: sumana.r@kku.ac.th; jeans_sumana@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

บทคัดย่อ: การเจือปนของแอมโมเนียไนโตรเจนในน้ำใต้ดินเป็นสาเหตุของน้ำที่มีสีและท่อน้ำอุดตันทั้งในระบบผลิตน้ำประปาและระบบกระจายน้ำ นอกจากนี้การบริโภคน้ำเจือปนแอมโมเนียไนโตรเจนสามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบประสาทในมนุษย์และสัตว์ได้ โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาการกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนด้วยระบบกรองชีวภาพเดิมเซลล์ การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ตอน คือ 1) การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจน และ 2) การศึกษาการกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนด้วยระบบกรองชีวภาพเดิมเซลล์ สำหรับตอนที่หนึ่งแบคทีเรียที่สามารถกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนคัดแยกจากพื้นที่ปนเปื้อนในจังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย แบคทีเรียที่คัดเลือก ได้แก่ แบคทีเรียที่สามารถกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนได้ดีที่สุดซึ่งระบุว่าเป็นสายพันธุ์ *Streptomyces violaceus* strain SBP1 (SBP1). SBP1 สามารถกำจัดสารได้สูงถึงร้อยละ 46 การศึกษาจุลนาสตร์เป็นไปตามแบบจำลอง Aiba โดยมีค่าพารามิเตอร์จลนาสตร์ซึ่งประมาณจากแบบจำลองดังกล่าว ซึ่งได้แก่ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ค่าคงที่ความเร็วครึ่ง และค่าคงที่การยับยั้ง เท่ากับ 0.095 1/h, 0.453 mg/L และ 37.975 mg/L ตามลำดับ การวิเคราะห์สเปกโตรสโคปีขั้นสูงชี้ชัดว่า SBP1 กำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนด้วยกระบวนการออกซิเดชันทางชีวภาพเสริมด้วยการดูดซับ

สำหรับการเลือกวัสดุดักติดเซลล์แล้วแบเรียมแอลจิเนตเติมถ่านกัมมันต์ร้อยละ 5 ให้ผล การกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนสูงสุด (ร้อยละ 42) รวมทั้งวัสดุมีกำลังสูงและคงทน เซลล์ดักติดด้วยสาร แบเรียมแอลจิเนตเติมถ่านกัมมันต์ ณ ความหนาแน่นของเซลล์จุลชีพ 200 mg/L มีประสิทธิภาพ ในการกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนสูงสุด (ร้อยละ 51) การศึกษาด้วยคอลัมน์ระยะยาวพบว่าระบบกรอง เดิมเซลล์ที่มีแอนทราไซต์เป็นวัสดุกรองคงประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนได้ถึงร้อยละ 85 ตลอดช่วงการทดลอง ผลการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงคุณภาพ น้ำและการพัฒนาเป็นนวัตกรรมการปรับปรุงคุณภาพน้ำต้นทุนต่ำได้ในอนาคต

คำหลัก : แอลจิเนต การเติม การกรองทางชีวภาพ การดักติด แอมโมเนีย

Abstract

Project Code: RSA6080054

Project Title: Removal of Manganese in Water Treatment Process
Using Entrapped-cell Biofilter

Investigator: Assoc.Prof. Sumana Ratpukdi, Ph.D. Khon Kaen University

E-mail Address: sumana.r@kku.ac.th; jeans_sumana@yahoo.com

Project Period: 3 years

Abstract: Occurrence of manganese in groundwater causes colored water and pipe rusting in water treatment and distribution systems. Consumption of manganese-contaminated water promotes neurotoxicity in human and animals. This research project aims to investigate manganese removal by entrapped-cell biofilter system. The study comprises 2 main parts: 1) isolation of manganese-removing bacteria and 2) determination of manganese removal using entrapped-cell biofilter system. For the first part, manganese-oxidizing bacteria were isolated from contaminated areas in Khon Kaen, Thailand. The selected culture was the best manganese-oxidizing bacterium, identified as *Streptomyces violaceus* strain SBP1 (SBP1). SBP1 achieved up to 46 % removal. The kinetics best fit with Aiba model. Kinetic parameters estimated from the model, including a specific growth rate, half-velocity constant, and inhibitory constant were 0.095 1/h, 0.453 mg/L, and 37.975 mg/L, respectively. Advanced spectroscopic analyses indicated that SBP1 removed manganese via bio-oxidation with supplementary adsorption.

For cell entrapment material, barium alginate with 5% activated carbon supplement provided the highest manganese adsorption (42%) with high bead strength and durability. The activated carbon-barium alginate-entrapped cells at microbial cell density of 200 mg/L gave the best manganese removal (51%). During the long-term column investigation, the entrapped-cell biofilter with anthracite as a filter bed could keep high manganese removal (more than 85%) for entire of the experiment. The result from this study could be used as fundamental information for water treatment and further developed to be low cost water treatment innovation.

Keywords: alginate; augmentation; biofiltration; cell entrapment; manganous

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบัญ	iv
1. บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	4
2. วิธีการทดลอง	5
2.1 กรอบการวิจัย	5
2.2 วิธีการดำเนินการวิจัย	7
3. ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล	20
3.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนีย	20
3.1.1 การเพาะและคัดแยกแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมที่มีสารแอมโมเนียปนเปื้อน	20
3.1.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้กำจัดแอมโมเนีย	28
3.2 การเตรียมวัสดุและเซลล์ตรึงที่เหมาะสมสำหรับระบบกรองชีวภาพ	33
3.2.1 การพัฒนาปรับแต่งวัสดุตกติดให้เหมาะสมสำหรับใช้ในระบบกรองชีวภาพ	33
3.2.2 การทดลองใช้เซลล์ตกติดในงานสิ่งแวดล้อม	35
3.2.3 การกำจัดแอมโมเนียด้วยเซลล์ตกติด วัสดุตกติด และเซลล์อิสระ	36
3.2.4 การกำจัดแอมโมเนียระบบกรองชีวภาพเติมเซลล์	42

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4. สรุปผล	44
4.1 สรุปผลการทดลอง	44
4.2 ข้อเสนอแนะ	44
เอกสารอ้างอิง	45
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	47
ภาคผนวก บทความจากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	49

1. บทนำ

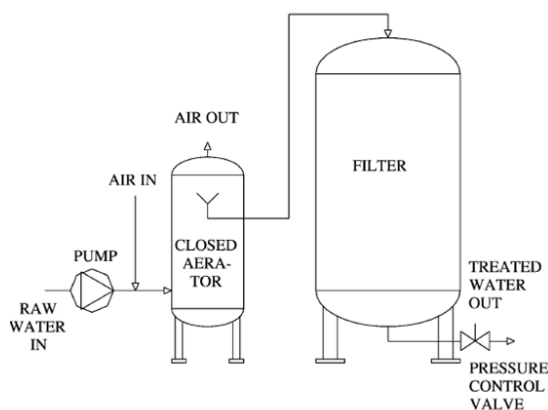
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

น้ำใต้ดิน หรือ น้ำบาดาล เป็นแหล่งน้ำที่สำคัญในการผลิตน้ำใช้สำหรับชุมชนหรืออุตสาหกรรม เป็นที่รู้กันว่าแหล่งน้ำใต้ดินที่มีปัญหาการเจือปนจากเหล็กและแมงกานีสในธรรมชาติจำนวนมากและกระจายตัวอยู่ทั่วไปในโลก สำหรับประเทศไทยก็เช่นกันพื้นที่ซึ่งมีแมงกานีสเจือปนมีกระจายอยู่ทั่วประเทศ โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทั้งนี้เหล็กและแมงกานีสในน้ำส่งผลให้เกิดการอุดตันระบบท่อและทำให้น้ำมีสีและความขุ่นส่งผลต่อการใช้งาน (รูปที่ 1) รวมทั้งในการอุปโภคบริโภคน้ำเจือปนสารดังกล่าวเป็นเวลายาวนานอาจเกิดผลกระทบต่อสุขภาพได้ การรับสัมผัสเหล็กและแมงกานีสปริมาณไม่สูงในระยะยาวก่อให้เกิดพิษสะสมเรื้อรังต่อสุขภาพร่างกายและจิตใจ ส่งผลให้เกิดอาการทางจิต มีผลต่อระบบสายตา รวมทั้งทำให้เม็ดเลือดขาวถูกทำลาย (กรมทรัพยากรน้ำบาดาล, 2555)



รูปที่ 1 ลักษณะการเกิดคราบสนิมของแมงกานีสและการอุดตันท่อ
(ที่มา กรมทรัพยากรน้ำบาดาล, 2555)

โดยทั่วไปแล้วระบบผลิตน้ำใช้นิยมกำจัดเหล็กและแมงกานีสออกจากน้ำด้วยการเติมอากาศ (aeration) หรือ ปฏิกริยาออกซิเดชันทางเคมี (chemical oxidation) วิธีการดังกล่าวเป็นการเปลี่ยนรูปโลหะละลายน้ำให้เป็นโลหะแขวนลอยแล้วจึงมีระบบกรอง (filtration) เพื่อแยกของแข็งแขวนลอยดังกล่าวในรูปที่ 2 วิธีการนี้สามารถกำจัดเหล็กได้แต่ไม่สามารถกำจัดแมงกานีสได้ดีนัก ตัวอย่างเช่น จากการศึกษาของกรมทรัพยากรน้ำบาดาลพบว่าในการเติมอากาศเพื่อกำจัดเหล็กและแมงกานีสละลายน้ำความเข้มข้น 5.0 และ 3.0 ppm ตามลำดับ มีปริมาณเหล็กและแมงกานีสคงเหลือ 0.1 และ 3.0 mg/L ตามลำดับ และถึงแม้ปรับเปลี่ยนวิธีการกำจัดสารเป็นปฏิกริยาออกซิเดชันทางเคมียังคงมีแมงกานีสคงเหลือถึง 2.8-3.0 mg/L (กรมทรัพยากรน้ำบาดาล, 2555) ซึ่งค่าความเข้มข้นของแมงกานีสตามมาตรฐานคุณภาพน้ำประปาของการประปาส่วนภูมิภาคไม่เกิน 0.4 mg/L และน้ำดื่มไม่เกิน 0.05 mg/L ด้วยเหตุผลดังกล่าวส่งผลให้ควรมีการปรับปรุงประสิทธิภาพการกำจัดแมงกานีสด้วยวิธีการอื่นเพิ่มเติม



รูปที่ 2 ตัวอย่างระบบผลิตน้ำใช้ที่มีการเติมอากาศเพื่อกำจัดเหล็กและแมงกานีส
(ที่มา Štembal et al., 2005)

จากรูปที่ 2 พบว่าตามธรรมชาติมีจุลินทรีย์ที่สามารถกำจัดสารเจือปนเจริญในระบบกรองดังกล่าวได้ ซึ่งในเวลาต่อมาจึงมีการศึกษาและการใช้งานระบบกรองร่วมกับกระบวนการทางชีววิทยา เรียกระบบดังกล่าวว่า **Biologically Active Filter (BAF)** (Zhu et al., 2010) กระบวนการกรองทางชีวภาพ (bio-filtration) เป็นการบูรณาการกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพร่วมกับการแยกอนุภาคเจือปนด้วยวิธีการทางกายภาพในชั้นกรอง (Pujol et al., 1994) ระบบนี้จุลินทรีย์เจริญและเกาะตัวเป็นชั้นบนวัสดุกรอง (ที่เรียกกันว่า ไบโอฟิล์ม (biofilm)) ในการผลิตน้ำประปาและน้ำดื่มมีการประยุกต์ใช้ระบบบีเอเอฟเพื่อกำจัดสารเจือปนหลายชนิด เช่น เหล็ก แมงกานีส สารหนู ไนเตรต หรือสารอินทรีย์พิษบางชนิด เป็นต้น (Zhu et al., 2010) ตัวอย่างการประยุกต์ใช้งานระบบบีเอเอฟสำหรับกำจัดแมงกานีส เช่น Han et al. (2013) ได้ศึกษาการกำจัดแมงกานีสร่วมกับแอมโมเนียในระบบผลิตน้ำดื่ม ผลการศึกษาพบว่าระบบบีเอเอฟสามารถกำจัดแมงกานีสที่ความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 1 mg/L ได้มากกว่าร้อยละ 70

ระบบบีเอเอฟมีข้อดีหลายประการ คือ ระบบไม่จำเป็นต้องเติมสารเคมีใด ๆ เพิ่มเติมเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถใช้สารอินทรีย์ในน้ำเป็นแหล่งคาร์บอนได้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเนื่องจากจุลินทรีย์ย่อยสลายสารเจือปนได้ทำให้ไม่เกิดการสะสมของสารส่งผลให้ระบบบีเอเอฟนี้ไม่จำเป็นต้องติดตามจุดอิ่มตัว (breakthrough point) หรือมีการฟื้นฟู (regeneration) เหมือนกับระบบกรองหรือดูดซับทั่วไป แต่อย่างไรก็ตามระบบบีเอเอฟมีข้อจำกัด คือ การเกิดไบโอฟิล์มตามธรรมชาติเป็นไปได้ช้าและมีปริมาณน้อย นอกจากนี้การควบคุมประสิทธิภาพของระบบขึ้นอยู่กับเสถียรภาพของไบโอฟิล์ม โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อชั้นไบโอฟิล์มมีหลากหลาย อาทิ อัตราการสะสมอาหาร ปริมาณออกซิเจน ค่าพีเอช ความถี่ของการล้างย้อน เป็นต้น (Simpson, 2008) ตัวอย่างเช่น Bai et al. (2005) รายงานว่าปริมาณไบโอฟิล์มลดลงถึงร้อยละ 50 ภายหลังการล้างย้อนซึ่งปัจจัยดังกล่าวนี้ส่งผลถึงประสิทธิภาพการกำจัดสารเจือปน

เทคโนโลยีชีวภาพสามารถช่วยเพิ่มศักยภาพของระบบบีเอเอฟได้ คือ **กระบวนการเติมเซลล์ (cell bioaugmentation)** (สุมนา ราษฎร์ภักดี, 2558) กล่าวคือ กระบวนการนี้เป็นการเติมเซลล์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารเจือปนในน้ำ ซึ่งเมื่อจุลินทรีย์มีจำนวนมากขึ้นส่งผลให้ความสามารถในการกำจัดสารเจือปนเพิ่มขึ้น ปัจจุบันเทคโนโลยีนี้ได้รับการพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียและฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนเป็นส่วนมาก (Siripattanakul and Khan, 2010) นอกจากนี้ยังมีเทคนิคการตรึงเซลล์จุลินทรีย์เพื่อลดทอนปัญหาเสถียรภาพของไบโอฟิล์ม ได้แก่ **การดักติดเซลล์ (cell entrapment)** ซึ่งเป็นการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวัสดุพอลิเมอร์ทำให้สามารถควบคุมปริมาณและกิจกรรมของจุลินทรีย์ได้ดี ในงานบำบัดน้ำเสียและฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนมีการใช้งานกระบวนการเติมเซลล์ทั้งที่เป็นเซลล์อิสระและเซลล์ดักติดสำหรับสารพิษหลายชนิด เช่น สารกำจัดศัตรูพืช สารแอมโมเนีย เป็นต้น (Hill and Khan, 2008; Siripattanakul et al., 2009) แต่ปัจจุบันยังไม่มียานวิจัยศึกษาการประยุกต์เทคโนโลยีการเติมเซลล์และเทคนิคการดักติดในงานผลิตน้ำใช้ โดยเฉพาะเพื่อการกำจัดแมลงกานีส

ด้วยปัญหาการจัดแมลงกานีสเจือปนในระบบผลิตน้ำใช้ และแนวทางการประยุกต์ใช้ระบบบีเอเอฟและปรับปรุงประสิทธิภาพระบบด้วยเทคโนโลยีการเติมเซลล์และเทคนิคการดักติดเซลล์ งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อพัฒนาระบบการจัดแมลงกานีสสำหรับการผลิตน้ำใช้ ด้วยกระบวนการกรองเติมเซลล์ การศึกษาครอบคลุมงานวิจัยหลักสองส่วน คือ 1) การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถกำจัดแมลงกานีสสำหรับระบบบีเอเอฟ โดยงานในส่วนนี้มุ่งเน้นเพื่อหาแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงกานีสสูงและมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้ดี และ 2) การศึกษาการจัดแมลงกานีสด้วยระบบกรองเติมเซลล์อิสระและเซลล์ดักติด งานในส่วนนี้มุ่งเน้นเพื่อศึกษาปัจจัยการเดินระบบกรองสำหรับการผลิตน้ำใช้ต่อประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงกานีสด้วยระบบเอบีเอเอฟ (Augmented-Biologically Active Filter; ABAF) โดยการศึกษาครอบคลุมการเติมเซลล์ทั่วไปและเซลล์ดักติด รวมทั้งการทดลองจะได้มีการขยายสู่ระบบน้ำกรองเพื่อศึกษาแนวทางการใช้งานจริงในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อคัดแยกและศึกษาสมบัติของแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์แมลงกานีสได้
- 2) เพื่อศึกษาการจัดแมลงกานีสละลายโดยใช้ระบบ BAF (traditional BAF), ABAF (free augmented BAF) และ EBAF (entrapped augmented BAF)

1.3 ขอบเขตการวิจัย

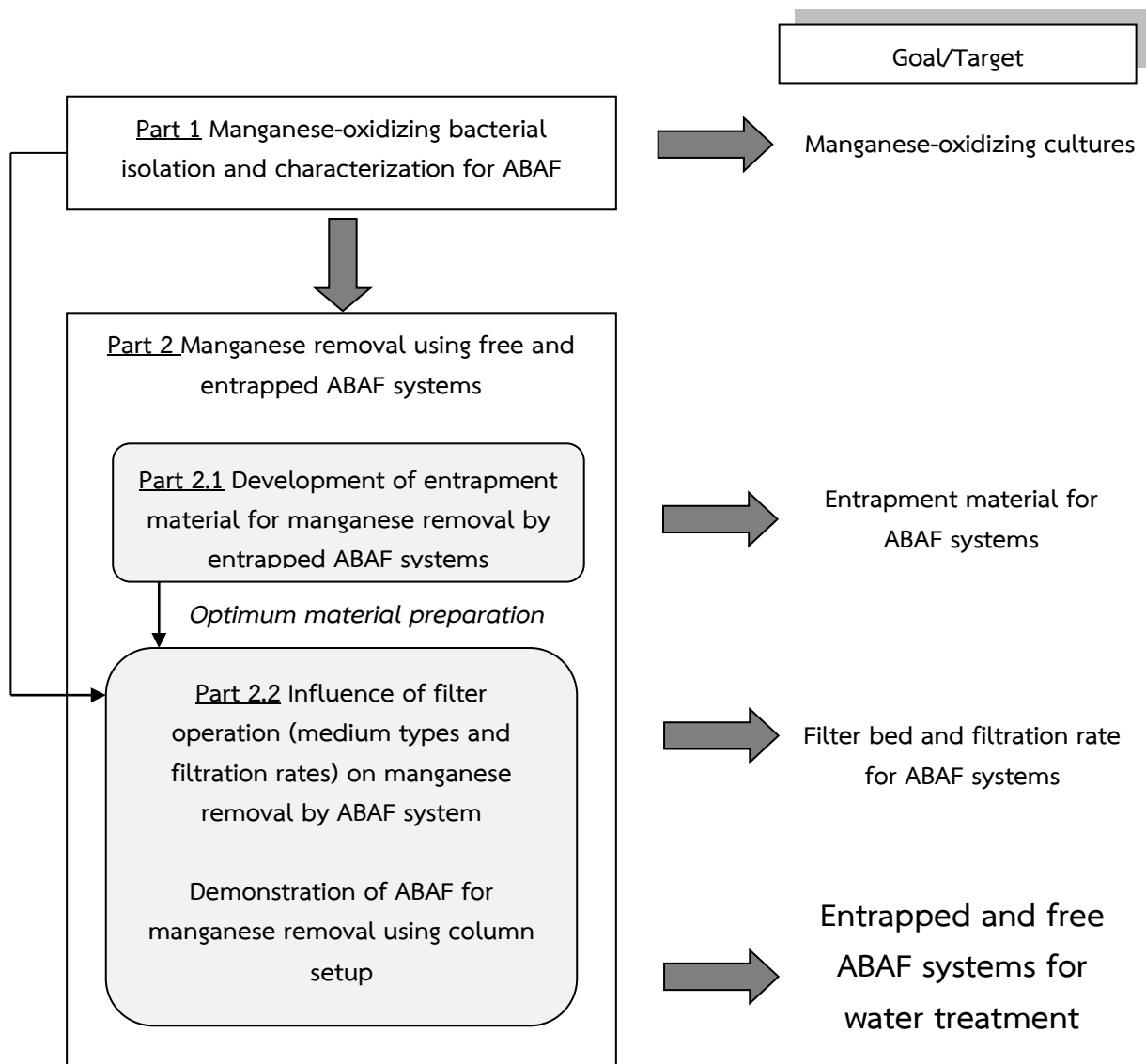
- 1) จุลินทรีย์คัดแยกจากดินและวัสดุกรองจากพื้นที่ที่น้ำใต้ดินปนเปื้อนแมงกานีส
- 2) การทดลองเป็นแบบกะ (batch) และคอลัมน์ในระดับห้องปฏิบัติการ
- 3) วิธีการดักติดเซลล์ในงานวิจัยนี้ คือ การดักติดด้วยแบรียมแอลจิเน็ต
- 4) การศึกษาปริมาณแมงกานีสวิเคราะห์ด้วยเครื่อง AAS ส่วนการศึกษาลักษณะแมงกานีสวิเคราะห์ด้วยเทคนิค XAS, XPS และ μ XRF

2. วิธีการทดลอง

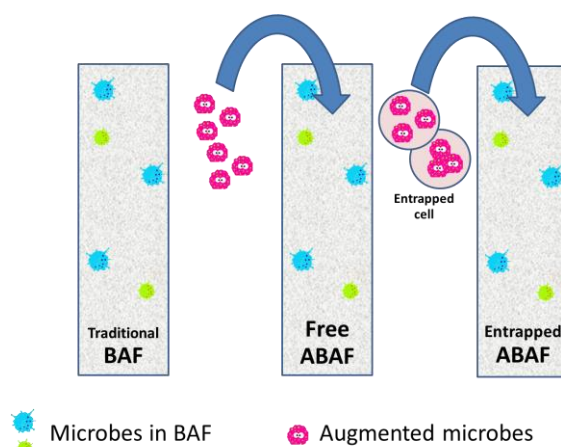
2.1 กรอบการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน (ดังรูปที่ 3) ได้แก่

- **ขั้นตอนที่ 1 การคัดแยกและการศึกษาลักษณะแบคทีเรียที่สามารถกำจัดแมลงกานีสสำหรับระบบเอบีเอเอฟ** ในขั้นตอนนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์แมลงกานีส แบคทีเรียดังกล่าวจะคัดแยกแบคทีเรียท้องถิ่น (indigenous bacterium) จากดินและระบบกรองในจังหวัดขอนแก่นเพื่อให้ในแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้ในอนาคต
- **ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาการกำจัดแมลงกานีสด้วยระบบเอบีเอเอฟเติมเซลล์อิสระและเซลล์ดักติด** โดยในส่วนที่สองนี้มีภาระงานหลัก 2 งาน ได้แก่
 - **ขั้นตอนที่ 2.1 การพัฒนาวัสดุดักติด (entrapment material) ที่เหมาะสมสำหรับระบบกรองเติมเซลล์ดักติด** ในขั้นตอนนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวัสดุดักติดที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานในระบบกรอง กล่าวคือ การวัสดุที่มีความคงทน มีความพรุนเพื่อให้เกิดการแพร่ของออกซิเจน (oxygen diffusion) และดักติดเซลล์ได้ดีส่งผลให้การกำจัดสารเจือปนเป็นไปได้ด้วยดี
 - **ขั้นตอนที่ 2.2 การศึกษาปัจจัยการเดินระบบกรองที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดแมลงกานีสด้วยระบบกรองเติมเซลล์** ในขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญในงานวิจัยนี้ การทดลองประกอบด้วยชุดทดลองหลัก 3 ชุด คือ 1) ชุดทดลองระบบบีเอเอฟทั่วไป (traditional BAF) ซึ่งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในชุดทดลองนี้เป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ 2) ชุดทดลองระบบเอบีเอเอฟอิสระ (free ABAF) ซึ่งได้แก่ ระบบบีเอเอฟที่มีการเติมเซลล์ซึ่งคัดแยกมาจากขั้นตอนแรก และ 3) ชุดทดลองระบบเอบีเอเอฟดักติด (Entrapped ABAF) ซึ่งได้แก่ ระบบบีเอเอฟที่มีการเติมเซลล์ที่ตรึงในวัสดุดักติด (ดังรูปที่ 4) การทดลองนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาผลของชั้นกรองชนิดเดี่ยว (single medium) และสองชนิด (dual media) และอิทธิพลของอัตราการกรองต่อการกำจัดแมลงกานีสละลายและการเจริญของแบคทีเรียในชั้นกรอง จากนั้นในขั้นตอนนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดแมลงกานีสด้วยระบบกรองเติมเซลล์ในคอลัมน์ในระยะเวลายาวนานเพื่อศึกษาสมรรถนะการทำงานของระบบกรองที่คัดเลือก



รูปที่ 3 กรอบแนวคิดงานวิจัย



รูปที่ 4 ชุดทดลองการศึกษาปัจจัยการเดินระบบกรอง

2.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการและภาคสนามโดยศึกษาทดลองที่ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และระบบผลิตน้ำใช้จากน้ำบาดาลซึ่งมีปัญหาการเจือปนของแมงกานีสในจังหวัดขอนแก่นการดำเนินงานแบ่งออกเป็น 5 ช่วง คือ

1. การศึกษาและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง โดยขั้นตอนนี้เป็นการรวบรวมข้อมูลทฤษฎี การงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในอดีต
2. การออกแบบการทดลอง ขั้นตอนนี้เป็นการวางแผนและออกแบบการทดลอง โดยมุ่งเน้นให้ออกแบบให้ครอบคลุมวัตถุประสงค์ของการศึกษาทั้งหมด และมีชุดเปรียบเทียบเพื่อสามารถบ่งชี้ความเชื่อมั่นของผลการศึกษาได้
3. การทดลองและการอภิปรายผล ขั้นตอนนี้เป็นการทดลองตามแผนการที่วางไว้และวิเคราะห์ผลการศึกษา การทดลองทั้งหมดกระทำซ้ำ 3 รอบ เพื่อให้เกิดความน่าเชื่อถือของข้อมูล รายละเอียดการทดลองแสดงในหัวข้อต่อไป
4. สรุปผลการศึกษา ขั้นตอนนี้เป็นการสรุปผลการศึกษาทั้งหมด และเสนอแนะแนวทางในการศึกษาต่อในอนาคต
5. การเผยแพร่ผลงานและการประยุกต์ใช้ในอนาคต ผลการศึกษานี้จะได้นำเสนอให้ชุมชน นอกจากนี้ผลการศึกษาจะยังได้รับการเผยแพร่ในวงวิชาการผ่านทางการประชุมวิชาการ หรือบทความวิจัยในวารสารวิชาการได้ต่อไป

การดำเนินการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลักตามกรอบการวิจัย ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์แมงกานีส

ในขั้นตอนประกอบด้วยการทำงาน 2 งาน คือ

งานที่ 1 การเพาะและคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์จากสิ่งแวดล้อมที่มีสารแมงกานีสปนเปื้อน

- การเพาะและคัดแยกแบคทีเรีย

การเพาะเชื้อ (enrichment) ได้เก็บตัวอย่างวัสดุกรองน้ำและดินที่มีการตรวจพบแมงกานีสในเขตพื้นที่อำเภอบ้านไผ่ และ อำเภอกะนวน จังหวัดขอนแก่น ซึ่งมีรายละเอียดตัวอย่างดังตารางที่ 1 น้ำใต้ดินบริเวณพื้นที่ดังกล่าวได้ตรวจวัดปริมาณแมงกานีสแล้วพบการปนเปื้อนประมาณ 2.5-4.1 mg/L จากนั้นคัดแยกแบคทีเรียโดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตาม Cerrato et al. (2010) อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย 0.15 g $\text{Mn}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.001 g $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 g Peptone, 2.38 g Hepes buffer, และ 0.5 g Yeast extract สำหรับอาหารแข็งเติม 1.5 % Agar สำหรับวิธีการคัดแยกเริ่มจากนำวัสดุกรองและดินแห้งปริมาณ 10 g เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 100 mL แล้วบ่มตัวอย่างด้วยการเขย่า 150 rpm ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ถ่ายเชื้อแบคทีเรียต่อเนื่องจำนวน 4 รอบ จากนั้นจึงเขี่ยเชื้อลงอาหารแข็งจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์

ตารางที่ 1 ตัวอย่างวัสดุกรองน้ำและดิน

ชื่อตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง	ตำแหน่งที่เก็บ
SCP	ดินบริเวณบ่อบาดาล	อำเภอบ้านไผ่ (16°4'42"N, 102°38'40"E) จังหวัดขอนแก่น
FCP	วัสดุกรองน้ำ	อำเภอบ้านไผ่ (16°4'42"N, 102°38'40"E) จังหวัดขอนแก่น
SNA	ดินบริเวณบ่อบาดาล	อำเภอกะนวน (16°40'52"N, 103°8'57"E) จังหวัดขอนแก่น

สำหรับขั้นตอนการจำแนกเบื้องต้น (pre-screening) ว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถออกซิไดซ์แมงกานีสใช้วิธีการ leucoberbelin blue (LBB) spot test วิธีการนี้ใช้สำหรับจำแนกแมงกานีสละลาย (soluble manganese) ซึ่งได้แก่ Mn^{2+} และแมงกานีสรูปออกซิไดซ์ (oxidized manganese) ซึ่งได้แก่ Mn^{3+} และ Mn^{4+} วิธีการนี้เป็นการหยด leucoberbelin blue reagent (0.04 % (w/v) ใน 10 mM acetic acid) ลงบนโคโลนีแบคทีเรีย จากนั้นบ่มตัวอย่างเป็นเวลา 20 min ในที่มืดและอยู่ในอุณหภูมิห้อง หากตัวอย่างมีแมงกานีสรูปออกซิไดซ์อาหารแข็งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ในการทดลองขั้นตอนนี้กระทำซ้ำ 5 รอบ เพื่อยืนยันความถูกต้อง ผลการ

ทดลอง LBB spot test ใช้คัดแบคทีเรียที่มีความเป็นไปได้เพื่อไปศึกษาคุณสมบัติการออกซิเดชันแมงกานีสในขั้นต่อไป

- การศึกษาคุณสมบัติการออกซิเดชันแมงกานีสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกมาได้
แบคทีเรียที่มีความเป็นไปได้จากขั้นตอนที่ผ่านมาได้ศึกษาความสามารถในการกำจัดแมงกานีส วิธีการเริ่มต้นจากบ่มแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแมงกานีสความเข้มข้น 1-5 mg/L เป็นเวลา 1 สัปดาห์ในระหว่างทดลองชักตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นแมงกานีสละลายลงเหลือด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrometer (The PerkinElmer AAnalyst™ 800, Singapore) และวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยการนับจำนวนในจานเพาะเชื้อ สำหรับการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นแมงกานีสละลายเป็นไปตามวิธีมาตรฐาน (APHA et al., 2017) ทั้งนี้ตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยวัสดุกรองขนาดรูพรุน 0.22 μm ถูกย่อยด้วย HNO_3 ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrometer ผลการทดลองนำมาคำนวณหาค่าอัตราการกำจัดแมงกานีสและการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในขั้นตอนนี้จะได้คัดแบคทีเรียบริสุทธิ์ (pure culture) ที่มีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์แมงกานีสได้ดี (สมการที่ 1) และเจริญเติบโตดีไปศึกษาต่อในขั้นต่อไป แบคทีเรียที่เลือกในขั้นตอนนี้จะได้รับสายพันธุ์จากการระบุ 16S rRNA gene ต่อไป

$$\text{Manganese removal efficiency} = \left(\frac{\text{Initial conc.} - \text{Remaining conc.}}{\text{Initial conc.}} \right) \times 100 \quad \text{สมการที่ 1}$$

Initial conc. = Initial manganese concentration (mg/L)

Remaining conc. = Remaining manganese concentration (mg/L)

งานที่ 2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้กำจัดแมงกานีส

- การคัดเลือกแบคทีเรียบริสุทธิ์สำหรับกำจัดแมงกานีสละลาย
ในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาการกำจัดแมงกานีสละลายในน้ำใต้ดินสังเคราะห์ วิธีการเริ่มต้นจากบ่มแบคทีเรียในน้ำใต้ดินสังเคราะห์ที่มีแมงกานีสความเข้มข้น 5 mg/L ในระหว่างทดลองชักตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นแมงกานีสละลายลงเหลือด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrometer (The PerkinElmer AAnalyst™ 800, Singapore) และวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยการนับจำนวนในจานเพาะเชื้อ ผลการทดลองนำมาคำนวณหาค่าอัตราการกำจัดแมงกานีสและการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในขั้นตอนนี้จะได้คัดเลือกแบคทีเรียบริสุทธิ์สำหรับกำจัดแมงกานีสละลายในขั้นต่อไป จากนั้นจึงได้ศึกษาจลนศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่กำจัดแมงกานีสตามสมการ Monod (สมการที่ 2 และ 3) และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาจลนศาสตร์การเจริญเติบโตแบบมีการยับยั้งด้วยสารอาหาร

(self-substrate inhibition kinetics) ตามสมการ Haldane, Andrews, Edwards, Aiba, and Yano (ตารางที่ 2)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$$

สมการที่ 2

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{\mu_{\max}}$$

สมการที่ 3

μ = Specific growth rate of the microorganisms

μ_{\max} = Maximum specific growth rate of the microorganisms

S = Concentration of the limiting substrate for growth

K_S = Half-velocity constant

ตารางที่ 2 Self-substrate inhibition kinetic equations applied in this study

Model	Equation	Reference
Haldane	$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(S + (\frac{S^2}{K_i}) + K_S + (\frac{S K_S}{K_i}))}$	Haldane (1965)
Andrews	$\mu = \frac{\mu_{\max}}{(1 + (\frac{K_S}{S}) + (S + K_i))}$	Andrews (1968)
Edwards	$\mu = \mu_{\max} (\exp^{-\frac{S}{K_i}} - \exp^{-\frac{S}{K_S}})$	Edwards (1970)
Aiba	$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(S + K_S)} (\exp^{-\frac{S}{K_i}})$	Aiba et al. (1968)
Yano	$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(S + K_S + (\frac{S^2}{K_i}) + (\frac{S}{K}))}$	Yano et al. (1966)

หมายเหตุ μ = Predicted specific growth rate (1/h)

μ_{\max} = Predicted maximum specific growth rate (1/h)

S = Substrate concentration (mg/L)

K_S = Half-velocity constant (mg/L)

K_i = Substrate inhibition constant (mg/L)

K = Yano constant.

- การคาดการณ์กระบวนการกำจัดแอมโมเนียโดยแบคทีเรียที่คัดเลือก

ในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาการคาดการณ์กลไกการกำจัดแอมโมเนียในเบื้องต้นโดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีขั้นสูงดังรายละเอียดในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เทคนิคสเปกโตรสโคปีที่ใช้ในการศึกษา

เทคนิค	การคาดการณ์
Scanning Electron Microscopy with energy dispersive spectroscopy technique (SEM-EDS)	SEM-EDS was expected to characterize morphology of bacteria and element (manganese) on bacterial sample.
X-ray Absorption Spectroscopy technique (XAS)	Synchrotron light could separate oxidation state of each element in sample via XAS method. Two techniques of XAS were selected: X-ray Absorption Near Edge Structure (XANES) for finding oxidation states of element and Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS) for investigating species of neighbor atoms in sample.
X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)	The technique was applied to measure the elemental compositions and portions in sample.

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาการจัดเรียงทางเคมีด้วยระบบเอปียเอเอฟเดิมเซลล์อิสระและเซลล์ ดักติด

2.1 การเตรียมวัสดุและเซลล์ที่ตรงที่ที่เหมาะสมสำหรับระบบกรองชีวภาพ

ในขั้นตอนประกอบด้วยการทดลอง 2 งาน คือ

งานที่ 1 การพัฒนาปรับแต่งวัสดุที่ตรงที่ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในระบบกรองชีวภาพ

- การเตรียมวัสดุและน้ำใต้ดินสังเคราะห์

ในขั้นตอนนี้ประกอบด้วยการเตรียมสารละลายโซเดียมแอลจิเนตในน้ำดีไอที่ผ่านการฆ่าเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4) กวนผสมด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็กโดยการให้ความร้อน 40-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้โซเดียมแอลจิเนตละลายและผงถ่านกัมมันต์ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นซึ่งเป็นการไล่ฟองอากาศที่อยู่ภายในสารละลายอย่างน้อย 1 ชั่วโมง และการเตรียมสารละลายแบเรียมคลอไรด์ในน้ำดีไอที่ผ่านการฆ่าเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ขั้นตอนถัดมาเป็นการหยดการละลายโซเดียมแอลจิเนตและผงถ่านกัมมันต์ลงในสารละลายแบเรียมคลอไรด์ จากนั้นทิ้งไว้เป็น

เวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดวัสดุมีความแข็งแรงขึ้น และทำการล้างแบเรียมคลอไรด์ที่ติดกับเม็ดวัสดุด้วยน้ำดีไอ 2 รอบ ชุดการทดลองตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 3 ส่วนการเตรียมน้ำใต้ดินสังเคราะห์ประกอบด้วยสาร K_2HPO_4 0.0001 mg Na_2SO_4 0.01 mg $NaHCO_3$ 0.008 mg $Mn_2SO_4 \cdot H_2O$ 0.0154 mg $Fe_2SO_4 \cdot H_2O$ 0.00005 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.00067 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02 mg NH_4Cl 0.002 mg peptone 1 mg และ yeast extract 0.25 mg ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ตารางที่ 4 รายละเอียดสัดส่วนผสมวัสดุ

Name	Barium chloride (%, w/v)	Sodium alginate (%, w/v)	Powdered activated carbon (%, w/v)
BA	3	3	0
BAPAC01	3	3	1
BAPAC05	3	3	5
BAPAC10	3	3	10

- การทดสอบการใช้งานของวัสดุตกติด

การทดสอบการใช้งานของวัสดุตกติดเพื่อใช้งานในระบบกรองชีวภาพมีเป้าหมายหลัก 3 ประการ คือ วัสดุมีความคงทน สามารถเคลื่อนที่ในระบบกรองด้วยอัตราเร็วใกล้เคียงกับวัสดุกรอง และสามารถใช้งานทางสิ่งแวดล้อมได้ ดังนั้นในขั้นตอนนี้ ประกอบด้วยการทดสอบดังต่อไปนี้

การทดสอบความคงทนทางกายภาพและเคมี การทดสอบความแข็งแรงทางกายภาพเพื่อหาการรับแรงอัดของเม็ดวัสดุด้วยเครื่อง universal testing machine (UTM) โดยวัดค่าการรับแรงอัด (compressive strength) ที่การยุบตัวของวัสดุร้อยละ 10 30 และ 50 ตามลำดับ และใช้อัตราเร็วของการอัด 10 มิลลิเมตรต่อนาที โดยตัวอย่างแบ่งเป็น 3 ชุดตัวอย่าง ได้แก่ เม็ดวัสดุเตรียมเริ่มต้น เม็ดวัสดุที่แช่ในน้ำกลั่นและน้ำใต้ดินสังเคราะห์ที่ค่า pH 6 7 และ 8 ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน และเม็ดวัสดุที่แช่ในน้ำกลั่นและน้ำใต้ดินสังเคราะห์ที่ pH ปกติด้วยเครื่องเขย่า shaker machine ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน การคำนวณแสดงดังสมการที่ 4

$$\sigma \text{ (compressive strength)} = \frac{\text{Force (N)}}{\text{Area (m}^2\text{)}}$$

สมการที่ 4

การทดสอบการเสื่อมสภาพทางเคมี เพื่อหาการเสื่อมสภาพของเม็ดวัสดุ ได้แก่ การบวม การแตก การอ่อนนุ่ม และการสลายตัว โดยแบ่งเป็น 2 ตัวอย่าง ได้แก่ เม็ดวัสดุที่แช่ในน้ำกลั่นและน้ำใต้ดินสังเคราะห์ที่ค่า pH 6 7 และ 8 ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน และเม็ดวัสดุที่แช่ในน้ำกลั่นและน้ำใต้ดินสังเคราะห์ที่ pH ปกติด้วยเครื่องเขย่า shaker machine ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน การคำนวณแสดงดังสมการที่ 5

$$\text{Deterioration} = \frac{\text{Number of deterioration}}{\text{Number of total}} \times 100 \quad \text{สมการที่ 5}$$

การทดสอบการเคลื่อนที่ในระบบกรองชีวภาพ การทดสอบการเคลื่อนที่ในระบบกรองชีวภาพ เพื่อทดสอบความเร็วในการตกกลับของเม็ดวัสดุเปรียบเทียบกับวัสดุกรองทั่วไป เช่น ทรายกรอง และแอนทราไซต์ โดยปล่อยวัสดุเคลื่อนที่ในหลอดแก้วอะคริลิคบรรจุน้ำที่มีความสูง 1 เมตร จากนั้นจับเวลาเพื่อคำนวณหาความเร็วการตกตะกอนดังสมการที่ 6 เพื่อใช้ป้องกันการตกจมในระบบกรองชีวภาพกรณีเมื่อมีการล้างย้อนระบบ

$$\text{Settling velocity} = \frac{\text{Distance (m)}}{\text{Time period (s)}} \quad \text{สมการที่ 6}$$

งานที่ 2 การทดลองใช้เซลล์ดักติดในงานสิ่งแวดล้อม

ภายหลังจากการเตรียมวัสดุที่เหมาะสมแล้วจึงได้การทดลองศึกษาการใช้งานวัสดุในที่มีสารปนเปื้อนอินทรีย์และอนินทรีย์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้งานเบื้องต้น เนื่องจากในการใช้งานจริงน้ำธรรมชาติมีสารอื่น ๆ เจือปนหลากหลายชนิด จากนั้นจึงทดลองใช้งานเซลล์ดักติดด้วยวัสดุดังกล่าวสำหรับการกำจัดสารเมแทบอลิซึมในน้ำใต้ดินสังเคราะห์ต่อไป

2.2 การศึกษาปัจจัยการเดินระบบกรองที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดเมแทบอลิซึมด้วยระบบ

กรองเติมเซลล์

- การเตรียมเซลล์จุลินทรีย์

การเตรียมเซลล์จุลินทรีย์เริ่มต้นจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งประกอบด้วย $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0154 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/L, Hepes buffer 2.383 g/L, Peptone 1 g/L และ Yeast extract 0.25 g/L จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเติมแบคทีเรีย SBP1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราส่วนหัวเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ต่อ 10 โดยปริมาตร และเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เพื่อให้เข้าสู่ช่วงท้ายของระยะเอ็กซ์โปเนน

เซียล (Exponential phase)) จากนั้นวัดปริมาณเซลล์จุลชีพในขวดหัวเชื้อในรูปปริมาณของแข็งแขวนลอย (Mixed liquor Suspended Solids (MLSS)) แล้วจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์จุลชีพไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หัวเชื้อเข้มข้นนี้ใช้การศึกษาในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ดักติดในขั้นต่อไป

- การเตรียมน้ำไต้ดินสังเคราะห์

การเตรียมน้ำไต้ดินสังเคราะห์จากสูตรที่มีรายงานในอดีต (Ito et al., 2012) ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.0001 g/L, Na_2SO_4 0.01 g/L, $NaHCO_3$ 0.008 g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.0154 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.00005 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.00067 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02 g/L, NH_4Cl 0.002 g/L, Peptone 1 g/L และ Yeast extract 0.25 g/L จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยหม้อหนึ่ง ความดันไต่ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที น้ำไต้ดินสังเคราะห์ดังกล่าวมีความเข้มข้นแมงกานีส 5 mg/L

- การเตรียมวัสดุดักติดและเซลล์ดักติด

การเตรียมวัสดุดักติดเริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายโซเดียมแอลจิเนตร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ในกรณีแบบเดิมผงถ่านกัมมันต์ (ถ่านกัมมันต์ที่ใช้เป็นเกรดการค้าสำหรับระบบกรองน้ำใช้ โดยมีค่าไอโอดีนนับเบอร์ 900 mg/L และขนาดอนุภาคเฉลี่ย 60 ถึง 125 μm) ให้เติมผงถ่านกัมมันต์ตามสัดส่วนที่กล่าวไว้ในหัวข้อต่อไป) ต่อมารวส่วนผสมและให้ความร้อนเป็นเวลา 30 นาที นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยดโซเดียมแอลจิเนตลงในสารละลายแบเรียมคลอไรด์ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ให้แอลจิเนตขึ้นรูปในสารละลายแบเรียมคลอไรด์ต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ ตัวอย่างดังกล่าวเรียกว่า BA

การเตรียมเซลล์ดักติดมีขั้นตอนคล้ายกับการเตรียมวัสดุดักติด ยกเว้นมีขั้นตอนการเติมเซลล์ SBP1 หลังจากละลายผงโซเดียมแอลจิเนต โดยปริมาณแบคทีเรียให้เติมตามสัดส่วนที่กล่าวไว้ในหัวข้อต่อไป

- การกำจัดแมงกานีสด้วยวัสดุดักติดเติมผงถ่านกัมมันต์อัตราส่วนต่าง ๆ

การกำจัดแมงกานีสด้วยวัสดุดักติดและวัสดุดักติดเติมผงถ่านกัมมันต์ (วัสดุดักติดเติมผงถ่านกัมมันตร้อยละ 1 5 และ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตัวอย่างดังกล่าวเรียกว่า BAAC1 BAAC5 และ BAAC10 ตามลำดับ) เริ่มต้นจากการเติมวัสดุดักติดตามวิธีการจากหัวข้อที่ผ่านมาลงในน้ำไต้ดินสังเคราะห์ ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 10 และเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุนที่อุณหภูมิห้อง

จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำที่เวลา 0 6 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง และวัดความเข้มข้นของแมงกานีส ค่าที่ได้จากการทดลองนี้นำมาคำนวณหาร้อยละการกำจัดแมงกานีสดังแสดงในสมการที่ 7 จากนั้นนำค่าที่ได้ดังกล่าวมาหาความสัมพันธ์ของการกำจัดแมงกานีสทางสถิติ โดยคัดเลือกร้อยละของการเติมผงถ่านกัมมันต์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป การศึกษานี้ทดลองจำนวน 3 รอบ เพื่อหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$$\text{Manganese removal (\%)} = \left(\frac{\text{Mn}_0 - \text{Mn}_t}{\text{Mn}_0} \right) \times 100 \quad \text{สมการที่ 7}$$

โดย Mn_0 คือ ค่าความเข้มข้นของแมงกานีสเริ่มต้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) และ Mn_t คือ ค่าความเข้มข้นของแมงกานีสคงเหลือจากการทดลอง ณ เวลาใด ๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

- การกำจัดแมงกานีสด้วยเซลล์ตกติดที่ความหนาแน่นของเซลล์จุลินทรีย์ต่อวัสดุตกติดต่าง ๆ

การกำจัดแมงกานีสด้วยเซลล์ตกติดที่ความหนาแน่นของเซลล์จุลินทรีย์ต่อวัสดุตกติดต่าง ๆ ประกอบด้วย การทดลอง 8 ชุดทดลอง (ตารางที่ 5) การศึกษานี้ทดลองจำนวน 3 รอบ เพื่อหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ขั้นตอนการทดลองเป็นไปตามลักษณะที่กล่าวไว้ในหัวข้อที่ผ่านมา ค่าที่ได้จากการทดลองนี้นำมาคำนวณหาร้อยละการกำจัดแมงกานีส (สมการที่ 7) และหาค่าจลนศาสตร์ของการกำจัดแมงกานีสด้วยแบบคิรีเรีย SBP1 ตามกฎอัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับที่ 0 1 และ 2

นอกจากการทดลองที่แสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 5 ยังได้ศึกษาทดลองการกำจัดแมงกานีสด้วยเซลล์อิสระ 200 มิลลิกรัม-MLSS ต่อลิตร เพิ่มเติมเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบผลการทดลองด้วย

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบในชุดทดลองการกำจัดแอมโมเนียด้วยเซลล์ตกติดที่ความหนาแน่นของเซลล์จุลชีพต่อวัสดุตกติดต่าง ๆ

ชุด ที่	ชื่อ	รายละเอียด	เซลล์จุลชีพ (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	ปริมาณน้ำ 30 มิลลิเมตร		ปริมาณน้ำ ปนเปื้อน (มิลลิเมตร)
				แบเรียม แอลจิเนต (กรัม)	ผงถ่านกัม มันต์ (กรัม)	
1	EC-0	เซลล์ตกติดด้วยแบเรียม	0	0.9	0	300
2	EC-100	แอลจิเนตที่ความ	100	0.9	0	300
3	EC-200	หนาแน่นของเซลล์จุลชีพ	200	0.9	0	300
4	EC-500	ต่างกัน	500	0.9	0	300
5	ECAC-0	เซลล์ตกติดด้วยแบเรียม	0	0.9	ร้อยละที่	300
6	ECAC-100	แอลจิเนตเติมผงถ่านกัม	100	0.9	เหมาะสม	300
7	ECAC-200	มันต์ที่ความหนาแน่น	200	0.9	จากการ	300
8	ECAC-500	ของเซลล์จุลชีพต่างกัน	500	0.9	ทดลองที่	300
					ผ่านมา	

-
- การศึกษาปัจจัยการเดินระบบกรองที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดแอมโมเนียด้วยระบบกรองเติมเซลล์

การทดลองขั้นตอนนี้เป็นทดลองด้วยแบบจำลองคอลัมน์ขนาดเล็กที่จัดเตรียมตามหลักการ Rapid small-scale column tests (RSSCTs) การทดลองนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาผลของชั้นกรองและอิทธิพลของอัตราการกรองซึ่งเป็นปัจจัยหลักของระบบกรอง ในการทดลองคัดเลือกวัสดุกรอง 2 ชนิด ที่นิยมใช้ในกระบวนการกรองสำหรับการผลิตน้ำใช้ ซึ่งได้แก่ทรายและแอนทราไซด์ การเตรียมวัสดุกรองจะได้เตรียมให้มีขนาดประสิทธิภาพและค่าสัมประสิทธิ์ของความสม่ำเสมอตามเกณฑ์การออกแบบกระบวนการกรองเพื่อการผลิตน้ำใช้ ส่วนอัตราการกรองเลือกใช้ตามเกณฑ์การออกแบบการกรองช้าและเร็ว คือ 1 และ 4 m³/m²•hr ซึ่งเมื่อย่อขนาดตามหลักการ RSSCTs แล้วอัตราการกรองในคอลัมน์ เท่ากับ 0.1 และ 0.4 m³/m²•s ตามลำดับ การเดินระบบและข้อมูลของชุดทดลองแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเดินระบบและข้อมูลของชุดทดลอง

ชุดทดลอง	ชนิดวัสดุ กรอง	วัสดุกรอง	ความสูง (cm)	อัตราการกรอง (m ³ /m ² •s)	การเติมเซลล์
Traditional BAF	1	ทราย	30	0.1 และ 0.4	ไม่มีการเติมเซลล์เพิ่ม
	1	แอนทราไซต์	30	0.1 และ 0.4	
	2	ทราย+แอนทราไซต์	15+15	0.1 และ 0.4	
Free ABAF	1	ทราย	30	0.1 และ 0.4	มีการเติมเซลล์ด้วยการผสมกับวัสดุกรองก่อนเริ่มการทดลอง ทั้งนี้ผสมเซลล์ให้มีปริมาณเซลล์ 10 ⁷ CFU/mL ในปริมาตรทำงาน (working volume) ของคอลัมน์
	1	แอนทราไซต์	30	0.1 และ 0.4	
	2	ทราย+แอนทราไซต์	15+15	0.1 และ 0.4	
Entrapped ABAF	1	ทราย	30	0.1 และ 0.4	มีการเติมเซลล์ดักติด (ตามวิธีการที่ได้จากหัวข้อที่ผ่านมา) ด้วยการผสมกับวัสดุกรองก่อนเริ่มการทดลอง ทั้งนี้ผสมเซลล์ให้มีปริมาณเซลล์ 10 ⁷ CFU/mL ในปริมาตรทำงาน (working volume) ของคอลัมน์
	1	แอนทราไซต์	30	0.1 และ 0.4	
	2	ทราย+แอนทราไซต์	15+15	0.1 และ 0.4	

การทดลองในตอนนี้จะได้ศึกษาการกำจัดแมงกานีสละลายโดยชุดทดลองตามตารางที่ 4 การทดลองจะดำเนินการต่อเนื่อง 4 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาค่าแมงกานีสทั้งหมด แมงกานีสละลาย (Mn(II)) ค่าไออาร์พี และค่าพีเอชที่จุดเก็บตัวอย่างกลางและด้านล่างคอลัมน์ทุกวัน นอกจากนี้มีการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาทางด้านจุลชีววิทยา 2 สัปดาห์ต่อครั้ง ด้วยการศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มโดยใช้ของจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) รวมทั้งการศึกษาปริมาณเซลล์มีชีวิต (cell viability) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์คอนโฟคอล (confocal fluorescence) ซึ่งในการศึกษาด้วยวิธีนี้มีการย้อมเซลล์จุลินทรีย์ด้วยสีเรืองแสง รายละเอียดของวิธีการทดลองแสดงใน Delatolla et al. (2016)

- การศึกษาลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์ดักติดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การศึกษาลักษณะโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเป็นการศึกษาลักษณะพื้นผิวภายในของเซลล์ดักติดเต็มและไม่เต็มผงถ่านกัมมันต์ ซึ่งขั้นตอนการเตรียมเป็นแบบเดียวกัน ได้แก่ 1) นำตัวอย่างแช่ลงในสารละลายแบเรียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที 2) แช่ลงในสารละลายแบเรียมคลอไรด์ที่ผสมสารกลูตารัลแอลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 3) แช่ลงในสารละลายแบเรียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที 4) แช่เอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 30 50 70 80 90 และ 99 ตามลำดับ โดยใช้เวลา 15 นาทีต่อรอบ 5) ทำแห้งแบบวิกฤต (Critical point dryer) (Quorum, K850, Canada) จากนั้นนำไปเคลือบด้วยทอง (Cressington, 108 auto, England) และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (1450VP, Zeiss LEO, USA)

- วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

การหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์อ้างอิงวิธีการวิเคราะห์ MLSS ด้วยการชั่งน้ำหนักตามวิธีมาตรฐาน 2540D (APHA, 2017) เริ่มต้นจากการอบกระดาศกรองที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างจากการเลี้ยงเชื้อเซลล์จุลชีพ 100 มิลลิลิตร หยดลงบนกระดาศกรองใยแก้ว GF/C ขนาด 1.2 ไมครอน (Whatman, UK) และนำกระดาศกรองไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง อีกครั้ง

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแมงกานีสอ้างอิงตามวิธีมาตรฐาน 3030E (APHA, 2017) ซึ่งประกอบด้วยการย่อยสารคาร์บอนในน้ำตัวอย่างด้วยกรดไนตริกเข้มข้น และวิเคราะห์แมงกานีสด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงของอะตอม (Atomic absorption spectrophotometer (AAS)) (AAAnalyst™ 800, Perkin Elmer, Singapore) การย่อยเริ่มต้นจากนำน้ำตัวอย่างที่ได้จากข้อที่ 2.4 และ 2.5 กรองด้วยวัสดุกรองแบบไนลอน ขนาด 0.22 ไมครอน (Agela Technologies, USA) จากนั้นใส่น้ำตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์และวางลงบนแผ่นให้ความร้อน ต้มจนน้ำระเหยจนเหลือปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไนตริกเข้มข้นลงไป 10 มิลลิลิตร แล้วต้มต่อจนเหลือปริมาตร 5 มิลลิลิตร 2 รอบ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตร (การย่อยอาจต้องเติมกรดหลายครั้ง โดยสังเกตจากตัวอย่างไม่ปรากฏควันสีน้ำตาล) แล้วจึงนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง AAS

- การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าร้อยละแมงกานีสคงเหลือวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติด้วย one-way ANOVA และหาความแปรปรวนของข้อมูลและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าสังเกตระหว่างคู่ด้วยวิธี the Duncan's multiple range test โดยใช้ค่านัยสำคัญทางสถิติที่ระดับร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ STATA (STATA, Version 14, USA)

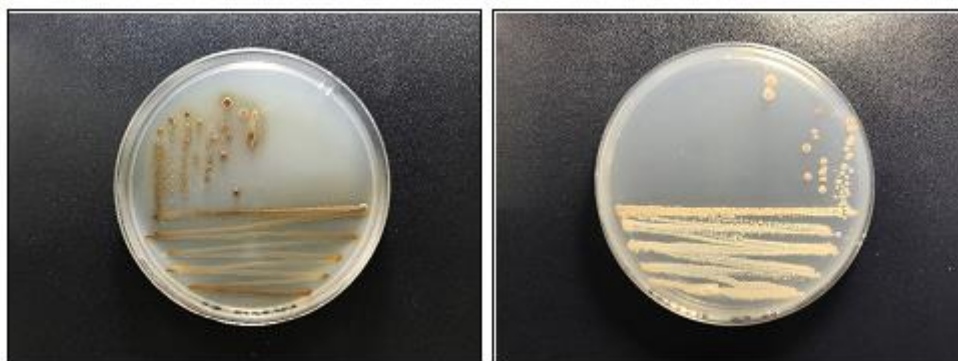
3. ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนีย

3.1.1 การเพาะและคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์จากสิ่งแวดล้อมที่มีสารแอมโมเนียปนเปื้อน

ในขั้นตอนนี้คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างทั้งหมดได้รวมเป็น 21 ตัวอย่าง โดยจำแนกได้เป็นตัวอย่างจากดินปนเปื้อน SCP และวัสดุกรอง FCP จากอำเภอบ้านไผ่มี 8 และ 9 ตัวอย่าง ตามลำดับ ส่วนดินปนเปื้อน SNA มีแบคทีเรียบริสุทธิ์ 4 ตัวอย่าง โดยเมื่อพิจารณาจากลักษณะทางกายภาพของโคโลนีแล้วพบว่าแบคทีเรียมีความหลากหลาย (ตารางที่ 7) ซึ่งบ่งชี้ถึงโอกาสที่พบแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียได้หลากหลายเช่นกัน

แบคทีเรียทั้ง 21 ตัวอย่าง ส่วนมากมีโคโลนีกลม หนูน และขอบเรียบ รวมทั้งเมื่อทิ้งไว้เวลายาวนานพบว่าแบคทีเรียบางตัวอย่างเปลี่ยนสีโคโลนีจากเหลืองเป็นน้ำตาลซึ่งเป็นลักษณะเบื้องต้นของการเกิดแอมโมเนียออกซิเดชัน (รูปที่ 5) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับ Cerrato et al. (2010) ที่พบการเปลี่ยนของโคโลนีแบคทีเรียบางชนิด ทั้งนี้เมื่อทดลอง LBB spot test พบว่ามีแบคทีเรีย 6 ตัวอย่างที่ยืนยันความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย (ตารางที่ 8) ดังนั้นจึงคัดแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อศึกษาขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 5 ตัวอย่างโคโลนี FCP-7 (ซ้าย) และ SCP-1 (ขวา) ที่เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล

ตารางที่ 7 ลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

No.	Name	Colony morphology at 48 h				
		Size (mm.)	Form	Color	Elevation	Margin
1	SCP-1	1.0	Circular	White	Umbonate	Entire
2	SCP-2	1.0	Circular	White	Umbonate	Entire
3	SCP-3	1.0	Circular	White	Umbonate	Entire
4	SCP-4	1.0	Irregular	Yellow	Flat	Undulate
5	SCP-5	1.0	Circular	Yellow	Convex	Entire
6	SCP-6	1.5	Circular	Yellow	Convex	Entire
7	SCP-7	1.0	Circular	Yellow	Convex	Entire
8	SCP-8	0.3	Circular	Yellow	Convex	Entire
9	FCP-1	0.5	Circular	Orange	Convex	Entire
10	FCP-2	1.5	Circular	Yellow	Convex	Entire
11	FCP-3	1.0	Circular	White	Convex	Entire
12	FCP-4	1.5	Circular	Yellow	Convex	Entire
13	FCP-5	0.5	Circular	Yellow	Convex	Entire
14	FCP-6	1.0	Circular	Yellow	Convex	Entire
15	FCP-7	1.0	Circular	Brown	Pulvinate	Entire
16	FCP-8	0.5	Irregular	Yellow	Flat	Undulate
17	FCP-9	1.0	Circular	Brown	Pulvinate	Entire
18	SNA-1	0.5	Circular	Yellow	Convex	Entire
19	SNA-2	0.5	Circular	White	Convex	Entire
20	SNA-3	1.0	Circular	White	Convex	Entire
21	SNA-4	0.5	Irregular	Yellow	Flat	Undulate

ตารางที่ 8 แบคทีเรียยืนยันความสามารถในการออกซิไดส์แมงกานีสด้วย LBB spot test

No.	Name	LBB spot test 5 times					Indication
		1	2	3	4	5	
1	SCP-1	+	+	+	+	+	Confirmed
2	SCP-2	+	+	+	+	+	Confirmed
3	SCP-3	+	+	+	+	+	Confirmed
4	SCP-4	-	-	-	+	-	
5	SCP-5	-	-	-	-	-	
6	SCP-6	-	-	-	-	-	
7	SCP-7	+	+	+	+	+	Confirmed
8	SCP-8	-	-	-	-	-	
9	FCP-1	-	-	-	-	-	
10	FCP-2	-	-	-	-	-	
11	FCP-3	+	+	+	+	+	Confirmed
12	FCP-4	-	-	+	-	-	
13	FCP-5	-	-	-	-	-	
14	FCP-6	-	-	-	-	-	
15	FCP-7	-	-	+	+	-	
16	FCP-8	-	-	-	-	-	
17	FCP-9	-	+	-	+	-	
18	SNA-1	-	-	-	-	+	
19	SNA-2	-	-	-	-	-	
20	SNA-3	+	+	+	+	+	Confirmed
21	SNA-4	-	-	-	-	-	

(+) indicated blue color appear in agar plate (potential manganese oxidation)

(-) indicated no blue color appear in agar plate (no potential manganese oxidation)

จากขั้นตอนที่ได้คัดเลือกแบคทีเรียจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งได้แก่ SCP-1 SCP-2 SCP-3 SCP7 FCP-3 และ SNA-3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่แสดงในรูปที่ 6 และ ตารางที่ 9 จากผลการทดลองพบว่าภายหลังการศึกษากำจัดแอมโมเนียเป็นเวลา 7 d แบคทีเรีย SCP-1 SCP-2 และ SCP-3 กำจัดแอมโมเนียได้ร้อยละ 24 22 และ 28 ตามลำดับ ส่วน SCP7 FCP-3 และ SNA-3 สามารถกำจัดแอมโมเนียได้เพียงร้อยละ 6-10 สำหรับผลการศึกษากำจัดแอมโมเนียพบว่าแบคทีเรียทั้งหมดเจริญมากขึ้นอย่างชัดเจนภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 h โดยการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะคงตัว (stationary phase) ประมาณ 0.5-3.0 d

จากผลการทดลองในรูปที่ 6 และ ตารางที่ 9 แบคทีเรีย SCP-1 SCP-3 และ SCP-7 มีประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียและเจริญเติบโตดีกว่า ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้น (1-5 mg/L) ผลการกำจัดแอมโมเนียและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่แสดงในรูปที่ 7 และ ตารางที่ 10 ภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (7 d) แบคทีเรีย SCP-1 SCP-3 และ SCP-7 มีประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียร้อยละ 24-49 28-50 และ 10-20 ตามลำดับ จากผลการระบุสายพันธุ์ด้วย 16S rRNA gene ซึ่งแสดงในรูปที่ 8 พบว่าแบคทีเรีย SCP-1 และ SCP-3 สามารถระบุได้เป็น *Streptomyces violarius* ส่วน SCP-7 เป็น *Chryseobacterium bernardetii* ทั้งนี้แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ผลการระบุสายพันธุ์สอดคล้องกับประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนีย กล่าวคือ SCP-1 และ SCP-3 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันจึงมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน

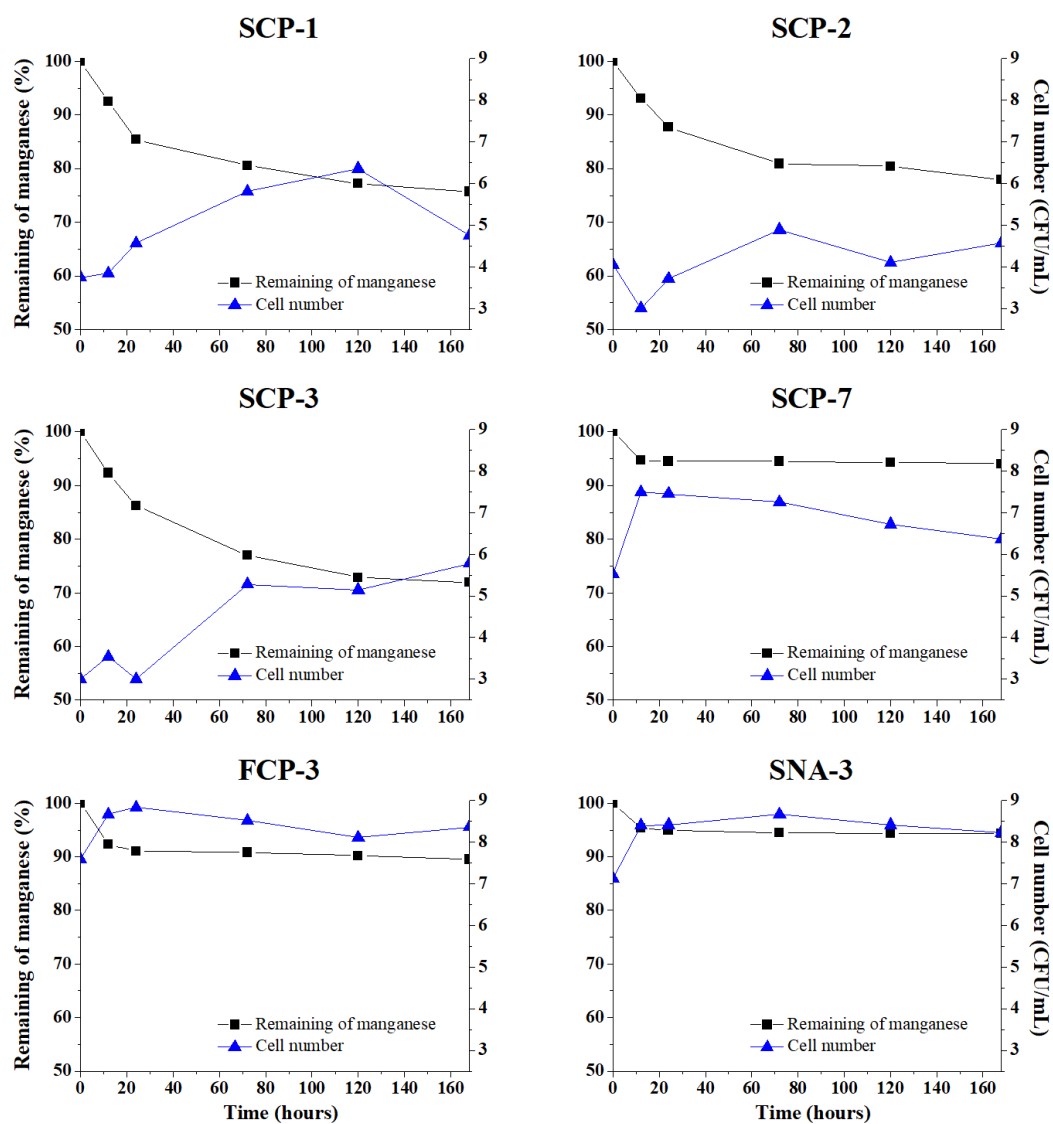
ผลการทดลองดังกล่าวสามารถชี้ให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นมีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนีย โดยเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นประสิทธิภาพการกำจัดลดลงตามลำดับ ทั้งนี้ในสภาพแวดล้อมจริงส่วนมากแล้วการปนเปื้อนแอมโมเนียมีประมาณ 1 mg/L จากผลการทดลองนี้พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ สามารถกำจัดแอมโมเนียได้สูงถึงร้อยละ 50 ผลการศึกษาแสดงถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการกำจัดแอมโมเนียได้ต่อไป

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพการกำจัดแมงกานีส ณ เวลาต่าง ๆ

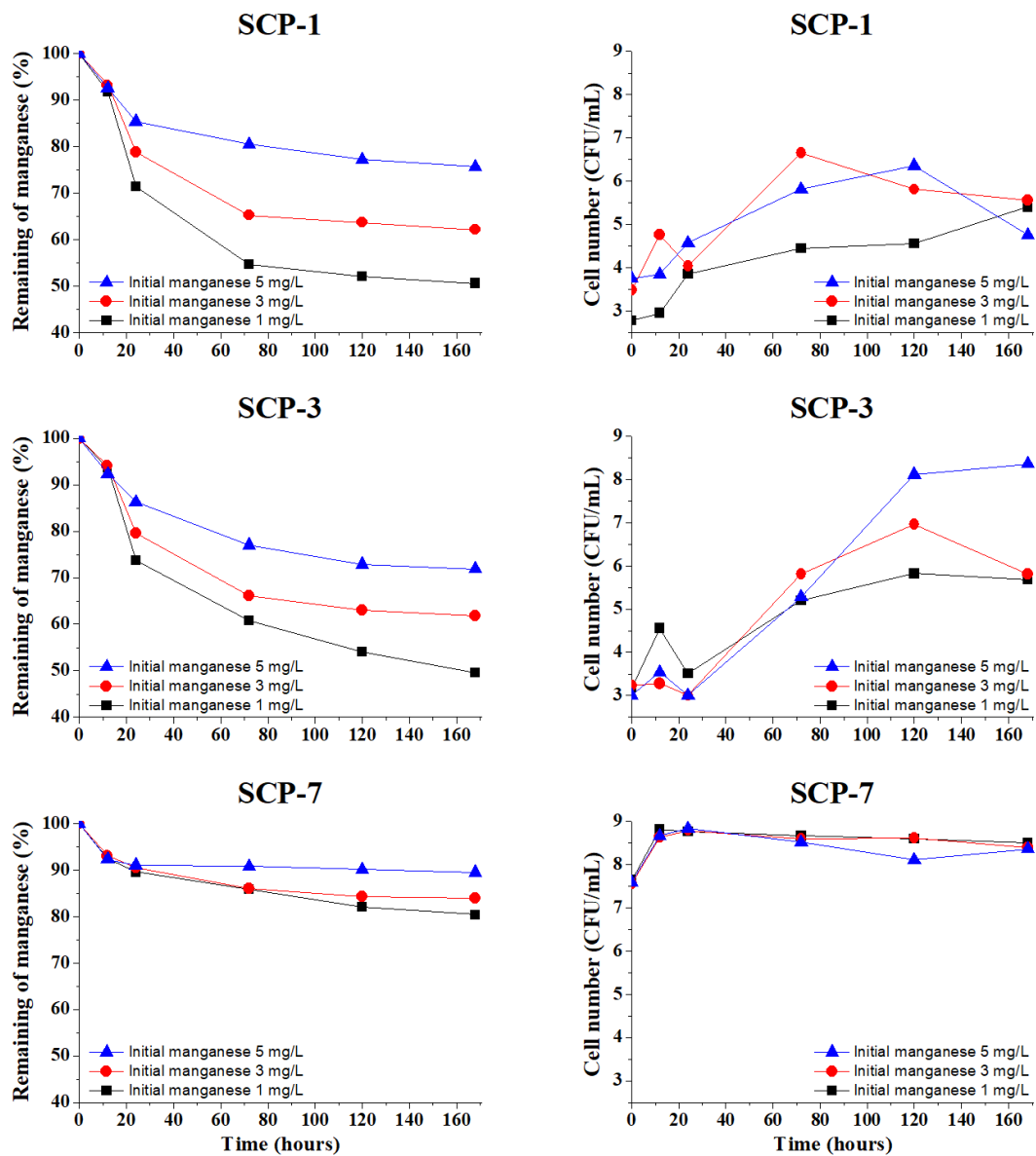
Name	Manganese removal (%) at		
	0 h	12 h	168 h
SCP-1	0.00	7.45	24.30
SCP-2	0.00	6.91	22.03
SCP-3	0.00	7.67	28.08
SCP-7	0.00	7.67	10.48
FCP-3	0.00	5.29	5.94
SNA-3	0.00	4.64	5.72
Control	0.00	0.11	-0.54

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพการกำจัดแมงกานีส ณ ความเข้มข้นเริ่มต้นต่าง ๆ ภายหลังการทดลอง 7 d

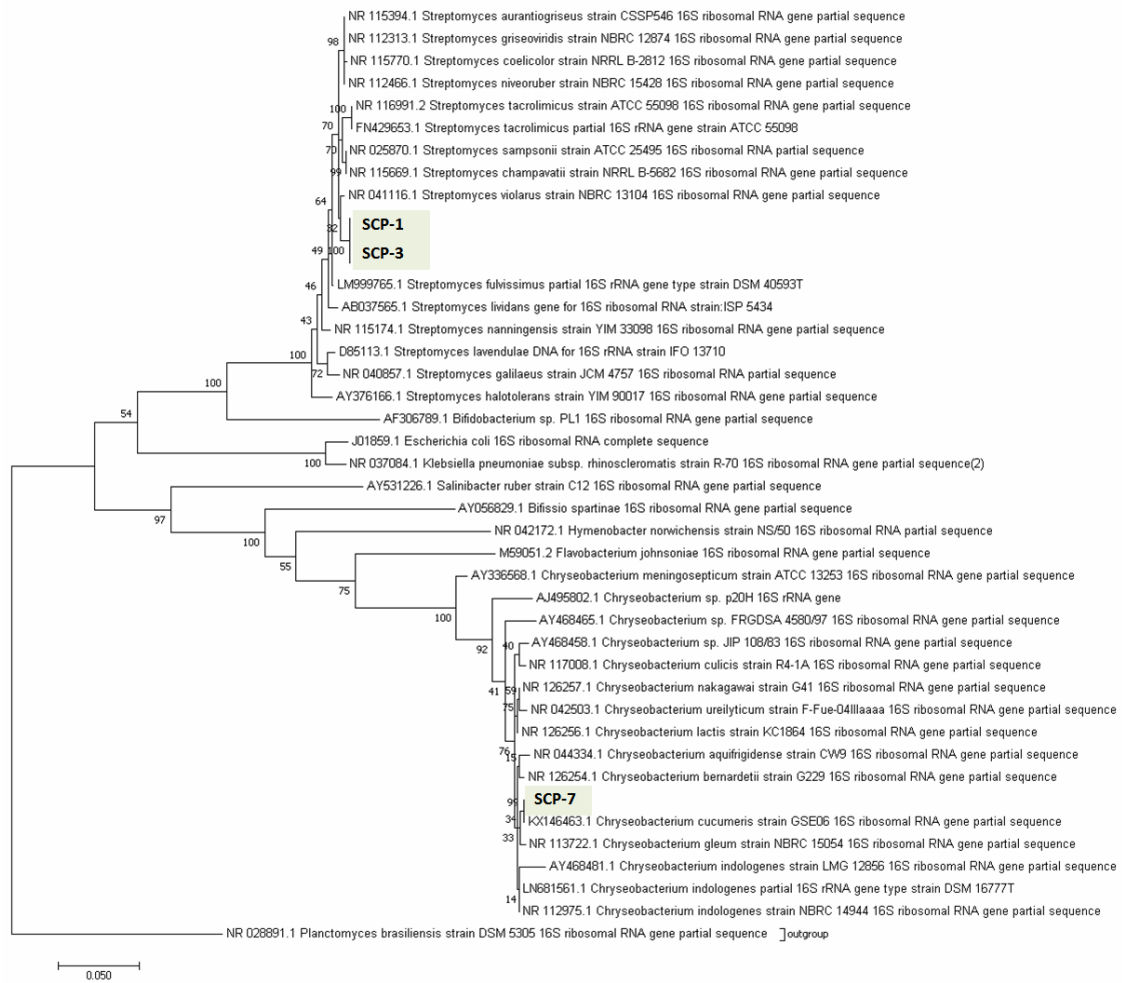
Name	Manganese removal (%) at initial manganese concentration of		
	1 mg/L	3 mg/L	5 mg/L
SCP-1	49.39	37.83	24.30
SCP-3	50.41	38.15	28.08
SCP-7	19.59	16.01	10.48



รูปที่ 6 การกำจัดแมงกานีสและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่คัดแยกได้



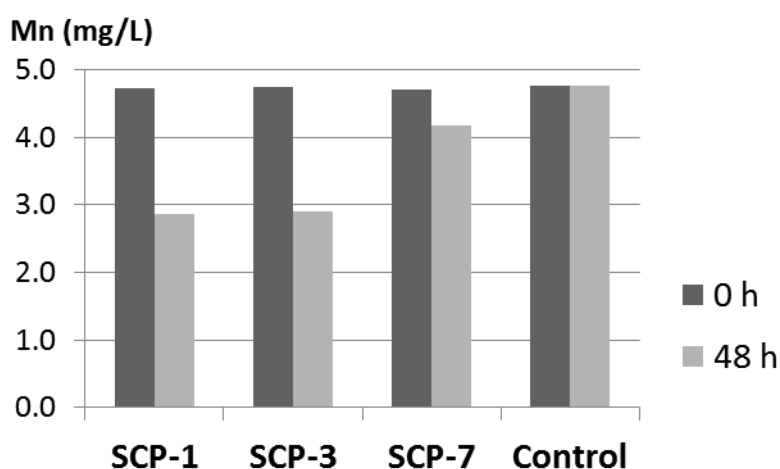
รูปที่ 7 การกำจัดแมงกานีสและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่คัดแยกได้



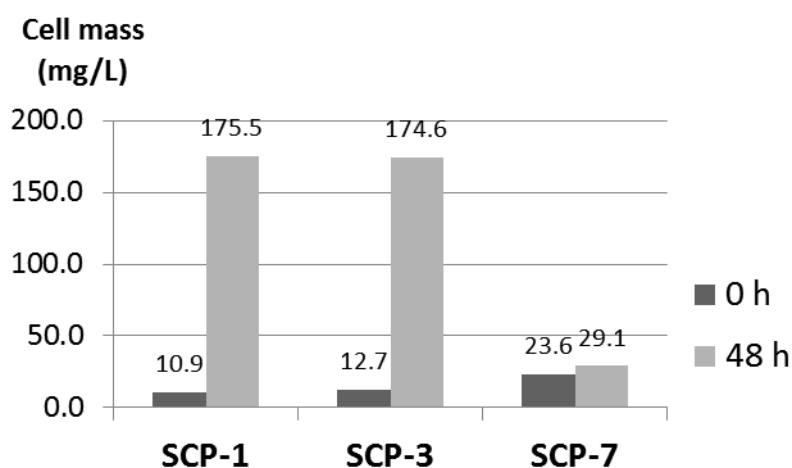
รูปที่ 8 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.1.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้กำจัดแมงกานีส

จากผลการศึกษาในขั้นตอนที่ผ่านมาเป็นการทดลองด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแมงกานีสเพื่อคัดแบคทีเรียในเบื้องต้น ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงเป็นการศึกษาการกำจัดแมงกานีสในน้ำใต้ดินสังเคราะห์เพื่อศึกษาแนวโน้มการกำจัดแมงกานีสในสภาพแวดล้อมจริง ในขั้นตอนนี้พิจารณาเปรียบเทียบทั้งประสิทธิภาพการกำจัดแมงกานีสและแนวโน้มการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในการทดลองควบคุมให้มีแมงกานีสเริ่มต้น 5 mg/L เป็นเวลา 48 h ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 9 และ 10 และตารางที่ 11



รูปที่ 9 การกำจัดแมงกานีสปนเปื้อนในน้ำใต้ดินสังเคราะห์

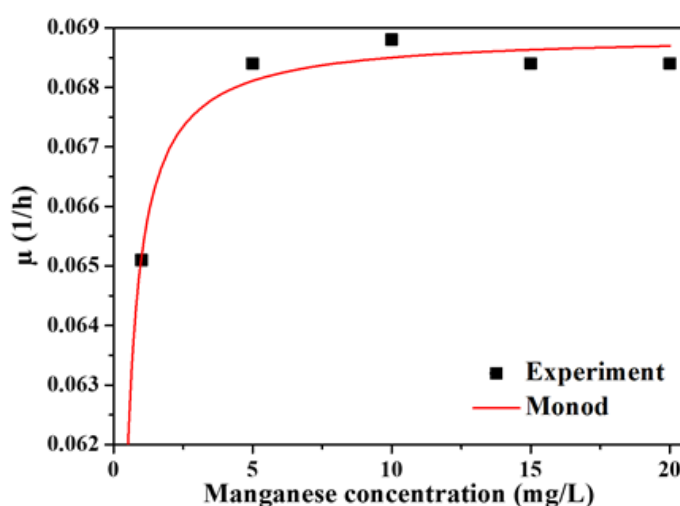


รูปที่ 10 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียในระหว่างกำจัดแมงกานีสปนเปื้อนในน้ำใต้ดินสังเคราะห์

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพการกำจัดแมงกานีสปนเปื้อนในน้ำใต้ดินสังเคราะห์

Name	Manganese removal (%)
SCP-1	39.41
SCP-3	38.74
SCP-7	11.25

จากผลการทดลองยืนยันผลการกำจัดแมงกานีสได้ว่า SCP-1 มีความสามารถในการกำจัดแมงกานีสได้สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำสังเคราะห์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงจะได้คัดเลือก SCP-1 เพื่อใช้ในการศึกษาจลนศาสตร์และการศึกษาขั้นต่อ ๆ ไป สำหรับการศึกษาจลนศาสตร์การเจริญเติบโตของ SBP1 ตาม Monod model พบว่าการทดลองที่มีความเข้มข้นแมงกานีสเริ่มต้น 1-20 mg/L จลนศาสตร์เป็นไปตาม Monod model (รูปที่ 11) จาก Lineweaver-Burk plot สามารถคำนวณหาค่า μ_{\max} เท่ากับ 0.069 1/h และ K_s เท่ากับ 0.057 mg/L ($R^2 = 0.969$) แต่เมื่อความเข้มข้นแมงกานีสเริ่มต้นสูงขึ้น (30-100 mg/L) พบว่าเกิดปรากฏการณ์การยับยั้งจากสารอาหาร (self-substrate inhibition) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยในอดีตที่รายงานความเป็นพิษของแมงกานีสที่มีความเข้มข้นสูง จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถกล่าวได้ว่าการรายงานจลนศาสตร์ตาม Monod model ไม่เหมาะสมในกรณีนี้



รูปที่ 11 จลนศาสตร์การเจริญเติบโตของ SBP1 ตาม Monod model

ดังนั้นจึงได้มีการคำนวณจลนศาสตร์ตามสมการอื่น ๆ ที่แสดงไว้ในตารางที่ 12 ผลการทำนายเป็นไปตามรูปที่ 12 ซึ่งผลการคำนวณค่าคงที่ต่าง ๆ จากวิธี non-linear regression (Generalized reduced gradient methodology) และค่า root mean square error (RMSE)

แสดงไว้ในตารางที่ 13 ผลการทำนายสามารถระบุได้ว่าจลนศาสตร์การยับยั้งจากสารอาหารในการศึกษานี้เป็นไปตาม Aiba model (รูปที่ 13) ในอดีตมีการศึกษาหลากหลายที่พบผลการทดลองเป็นไปตาม Aiba model อาทิ การหมักแอลกอฮอล์ (alcohol fermentation) การออกซิเดชันแอมโมเนีย (ammonia oxidation) และการย่อยสลายสารเบนซีน (Aiba et al., 1968; Carrera et al., 2004) การศึกษานี้เป็นการรายงานผลการเปลี่ยนรูปแมงกานีสทางชีวภาพ (manganese biotransformation) เป็นครั้งแรก

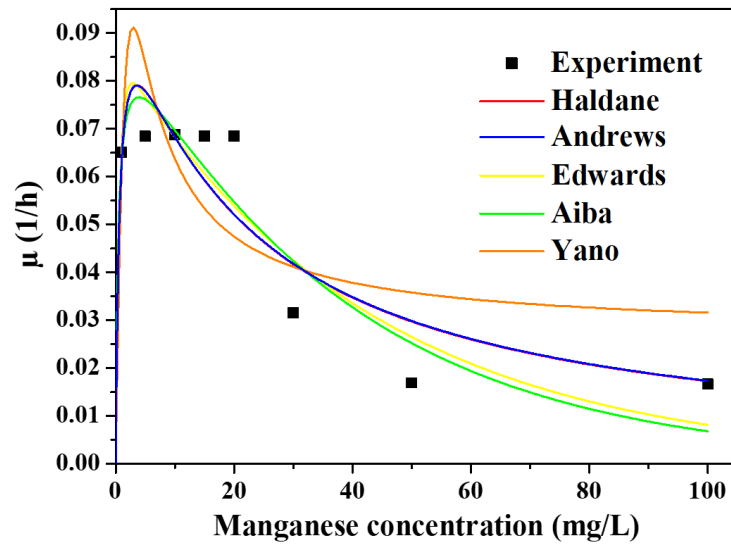
ตารางที่ 12 สมการจลนศาสตร์การยับยั้งจากสารอาหาร

Model	Equation	Reference
Haldane	$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(S + (\frac{S^2}{K_i}) + K_s + (\frac{S K_s}{K_i}))}$	Haldane (1965)
Andrews	$\mu = \frac{\mu_{\max}}{(1 + (\frac{K_s}{S}) + (S + K_i))}$	Andrews (1968)
Edwards	$\mu = \mu_{\max} (\exp^{-\frac{S}{K_i}} - \exp^{-\frac{S}{K_s}})$	Edwards (1970)
Aiba	$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(S + K_s)} (\exp^{-\frac{S}{K_i}})$	Aiba et al. (1968)
Yano	$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(S + K_s + (\frac{S^2}{K_i}) + (\frac{S}{K}))}$	Yano et al. (1966)

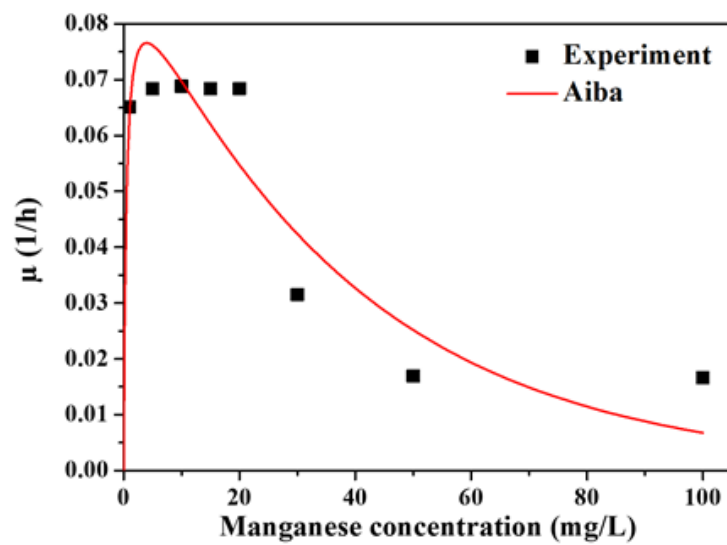
μ = Predicted specific growth rate (1/h); μ_{\max} = Predicted maximum specific growth rate (1/h); S = Substrate concentration (mg/L); K_s = Half-velocity constant (mg/L); K_i = Substrate inhibition constant (mg/L); K = Yano constant.

ตารางที่ 13 ค่าคงที่จลนศาสตร์การยับยั้งจากสารอาหารและค่า RSME

Model	Kinetic parameters				RMSE
	μ_{\max} (1/h)	K_s (mg/L)	K_i (mg/L)	K (mg/L)	
Haldane	0.113	0.701	18.091	-	0.0095
Andrews	0.109	0.668	19.005	-	0.0094
Edwards	0.086	0.671	42.257	-	0.0088
Aiba	0.095	0.453	37.975	-	0.0084
Yano	0.273	6.028	1.707	17.123	0.0148

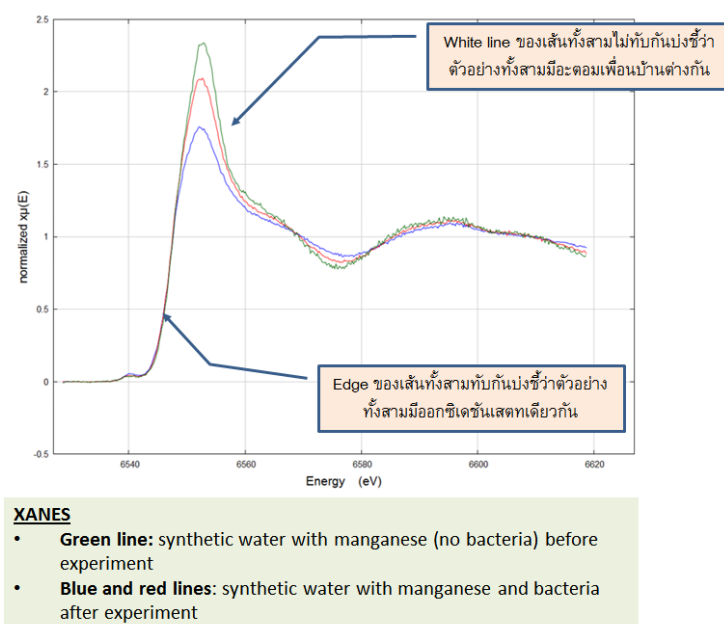


รูปที่ 12 จลนศาสตร์การเจริญเติบโตของ SBP1 ตามสมการต่าง ๆ เปรียบเทียบกับผลการทดลอง

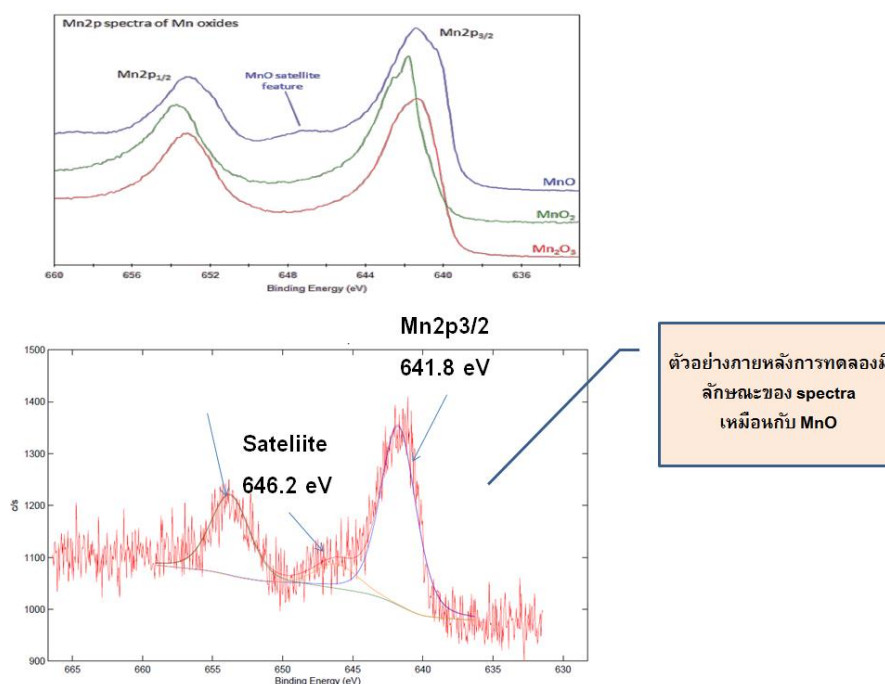


รูปที่ 13 จลนศาสตร์การเจริญเติบโตของ SBP1 ตาม Aiba model

ในการทดลองที่ผ่านมาสามารถระบุได้อย่างชัดเจนว่า SCP-1 สามารถกำจัดแมงกานีสละลายได้ แต่ทั้งนี้ก็ก่อให้เกิดจากการดูดซับแมงกานีสละลายที่ผิวแบคทีเรียหรือเกิดการออกซิเดชันแมงกานีส ในขั้นตอนนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคสเปกโตรสโคปีขั้นสูง ซึ่งได้แก่ XAS และ XPS ผลการศึกษาพบว่าในเบื้องต้นจากการประมวลผลการศึกษาธาตุแมงกานีสในตัวอย่างก่อนและหลังการทดลอง รูปที่ 14 สามารถชี้ให้เห็นได้ว่าตัวอย่างก่อนและหลังการทดลองมี Edge ทับกันแต่มี White line สูงไม่เท่ากัน ผลการทดลองนี้สามารถกล่าวได้ว่าตัวอย่างก่อนและหลังการทดลองมีแมงกานีสที่มีออกซิเดชันสเตตเดียวกัน (Mn^{2+}) แต่มีอะตอมใกล้เคียงซึ่งบ่งชี้สภาวะออกซิเดชันต่างกัน ทั้งนี้ White line ของตัวอย่างภายหลังการทดลองซึ่งมีความสูงน้อยกว่าแสดงลักษณะที่เกิดออกซิเดชันขึ้น ผลดังกล่าวยืนยันการเกิดพันธะของแมงกานีสดังรูปที่ 15 รูปดังกล่าวนี้เป็นผลจากการทดลองด้วย XPS ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบ spectra ของสารมาตรฐานพบว่าในตัวอย่างภายหลังการทดลองเกิด MnO อย่างชัดเจน ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับ XANES กล่าวคือ MnO มีออกซิเดชันสเตตเดียวกับสารละลาย Mn^{2+} แต่มีลักษณะที่เกิด complexation กับออกซิเจน หรืออาจกล่าวได้ในอีกลักษณะหนึ่งว่าเกิดออกซิเดชันไม่สมบูรณ์ จากผลการศึกษาในขั้นตอนนี้สามารถชี้ชัดได้ว่ากลไกการกำจัดแมงกานีสเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันร่วมด้วยแต่ยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากในการทดลองไม่ได้เติมออกซิเจนเพิ่มลงในถังปฏิกรณ์



รูปที่ 14 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างก่อน (เส้นสีเขียว) และหลังการทดลอง (เส้นสีน้ำเงินและแดง) ด้วยเทคนิค XANES



รูปที่ 15 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างแบคทีเรียหลังการทดลองด้วยเทคนิค XPS

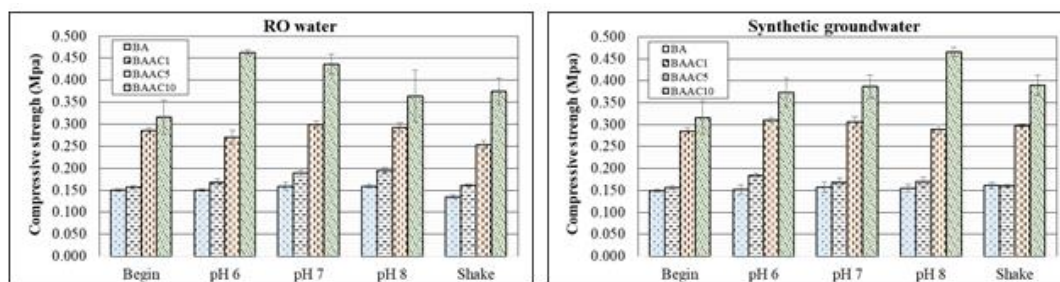
3.2 การเตรียมวัสดุและเซลล์รีกที่ที่เหมาะสมสำหรับระบบกรองชีวภาพ

3.2.1 การพัฒนาปรับแต่งวัสดุตกติดให้เหมาะสมสำหรับใช้ในระบบกรองชีวภาพ

ขั้นตอนการเตรียมของเม็ดวัสดุแบเรียมแอลจิเนต BA BAPAC01 BAPAC05 และ BAPAC10 พบว่ามีขนาดของเม็ดวัสดุที่ใกล้เคียงกัน ได้แก่ 3.8-4.1, 3.8-4.1, 3.8-4.2 และ 4.2-4.8 mm ตามลำดับ

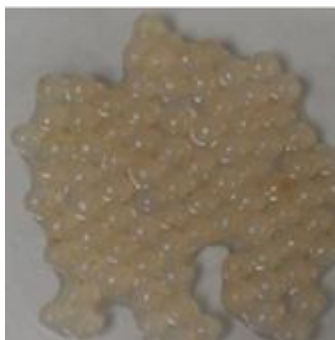
การทดสอบความแข็งแรงทางกายภาพ ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 16 ผลการศึกษาพบว่า เม็ดแอลจิเนตที่ผสมผงถ่านกัมมันต์มีค่าการรับแรงอัดเพิ่มขึ้นในทุกความเข้มข้น โดยที่ร้อยละ 50 ของการยุบตัวพบว่า BA BAPAC01 BAPAC05 และ BAPAC10 มีค่าการรับแรงอัดที่ 0.150 ± 0.003 0.156 ± 0.004 0.285 ± 0.007 และ 0.316 ± 0.038 MPa ตามลำดับ เมื่อแช่ในน้ำกลั่น ตัวอย่าง BA BAPAC01 BAPAC05 และ BAPAC10 มีค่าการรับแรงอัดอยู่ในช่วง 0.150-0.159 0.156-0.194 0.285-0.299 และ 0.316-0.463 MPa ตามลำดับ ในชุดตัวอย่างนี้พบว่า BA BAPAC01 BAPAC05 มีแนวโน้มการรับแรงอัดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อ pH ของน้ำเพิ่มขึ้น ส่วน BAPAC10 มีแนวโน้มลดลง ส่วนตัวอย่างที่เขยามีค่าการรับแรงอัดที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างแช่ที่ pH 7.0 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า pH เริ่มต้นของตัวอย่างเขย่า (รูปที่ 16 (ซ้าย)) และเมื่อแช่ในน้ำใต้ดินสังเคราะห์ BA BAPAC01 BAPAC05 และ BAPAC10 มีค่าการรับแรงอัดอยู่ในช่วง

0.150-0.159 0.156-0.184 0.285-0.310 และ 0.316-0.466 MPa ตามลำดับ ในชุดตัวอย่างนี้พบว่า BA BAPAC01 BAPAC05 มีแนวโน้มการรับแรงอัดที่ใกล้เคียงกันในแต่ละ pH ส่วน BAPAC10 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้น ส่วนตัวอย่างที่เขยามีค่าการรับแรงอัดที่ใกล้เคียงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างแช่ที่ pH 7.0 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า pH เริ่มต้นของตัวอย่างเขย่า (รูปที่ 16 (ขวา))



รูปที่ 16 ผลการทดลองตัวอย่างในน้ำกลั่น (ซ้าย) และน้ำใต้ดินสังเคราะห์ (ขวา)

การทดสอบการเสื่อมสภาพทางเคมี เม็ดวัสดุทั้งแบบเรียมแอลจินेटที่ใส่และไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ พบว่าไม่มีการเสื่อมสภาพในลักษณะการบวม การแตก การย่อยยุ่ย หรือการสลายตัวตลอดเวลาระยะเวลา 7 วัน ในทุกชุดการทดลองในการศึกษาต่อเนื่องยาวนานขึ้นเป็นเวลา 30 วัน พบการบวมเล็กน้อย (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 ลักษณะการบวมของวัสดุักติด

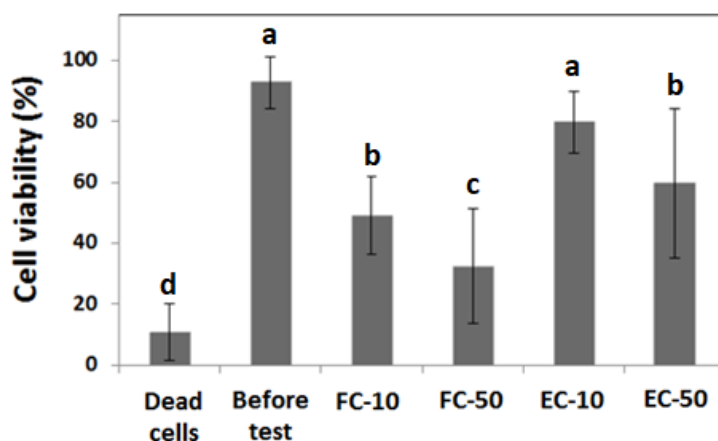
การทดสอบการเคลื่อนที่ในระบบกรองชีวภาพ พบว่าเม็ดวัสดุ BA BAPAC01 BAPAC05 และ BAPAC10 มีค่าความเร็วในการตก 0.014 ± 0.001 0.053 ± 0.001 0.069 ± 0.001 และ 0.085 ± 0.004 m/s ตามลำดับ ขณะที่ทรายกรองขนาด 0.8-1.0 mm และแอนทราไซต์ มีความเร็วในการตก 0.106 ± 0.003 และ 0.075 ± 0.010 m/s ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าเม็ดวัสดุ BAPAC05 มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในในระบบกรองชีวภาพ เนื่องจากมี

การรับแรงอัดเริ่มต้นที่ใกล้เคียงกับ BAPAC10 มีความทนทานต่อสารเคมี มีความเร็วในการตกใกล้เคียงกับแอนทราไซต์ ทำให้มีโอกาสมันต์วัสดุจะกระจายตัวในชั้นกรองแอนทราไซต์เมื่อมีการตกจมกลับ และการเตรียมวัสดุกระทำได้ง่ายกว่า และวัสดุมีขนาดสม่ำเสมอ รวมทั้งวัสดุดังกล่าวมีความเร็วในการตกจมช้ากว่าทรายกรองแต่เร็วกว่าแอนทราไซต์ ทำให้วัสดุจะไม่ถูกกระจายตัวในชั้นใดชั้นหนึ่ง

3.2.2 การทดลองใช้เซลล์ตกติดในน้ำปนเปื้อนสารอินทรีย์เลือกใช้สารไตรโคลคาร์บาน

ในการศึกษาการใช้เซลล์ตกติดในน้ำปนเปื้อนสารอินทรีย์เลือกใช้สารไตรโคลคาร์บาน (triclocarban (TCC)) เป็นสารอินทรีย์ตัวอย่างเนื่องจากการปนเปื้อนสารดังกล่าวในแหล่งน้ำผลิตน้ำประปา (Sabaliunas et al., 2003) ผลการศึกษาพบว่าระบบเซลล์ตกติดและเซลล์อิสระสามารถกำจัดสาร TCC (ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 mg/L) ได้ร้อยละ 72 และ 45 ตามลำดับ ผลการศึกษายังชี้ให้เห็นว่าในกรณีที่สารปนเปื้อนเป็นพิษวัสดุตกติดสามารถปกป้องจุลินทรีย์จากความเครียดทางสิ่งแวดล้อม (environmental stress) และส่งผลให้จุลินทรีย์ถูกทำลายน้อยลง (รูปที่ 18)

ส่วนในกรณีของสารอินทรีย์เลือกใช้ซิลเวอร์นาโนขนาดนาโนเป็นสารปนเปื้อนตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าระบบเซลล์ตกติดสามารถลดปัญหาความเป็นพิษลงได้มากกว่าร้อยละ 90 เนื่องจากมีจุลินทรีย์อยู่รอดในวัสดุตกติดสูงเช่นกัน

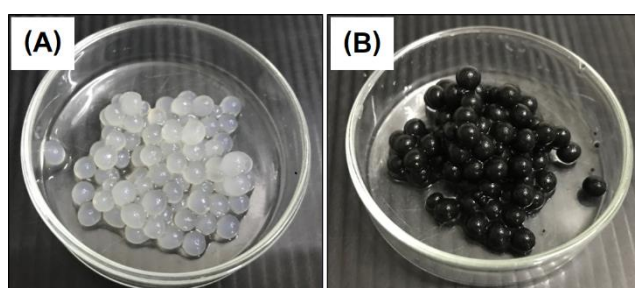


รูปที่ 18 การอยู่รอดของจุลินทรีย์ในน้ำปนเปื้อนสารอินทรีย์ TCC (A) dead cells (control), (B) before test, (C) free cells after exposure of TCC 10 mg/L, (D) free cells after exposure of TCC 50 mg/L, (E) de-entrapped cells after exposure of TCC 10 mg/L, (F) de-entrapped cell after exposure of TCC 50 mg/L

Note: Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$). Letters from a to d indicated the from highest percentage of cell viability to the lowest one.

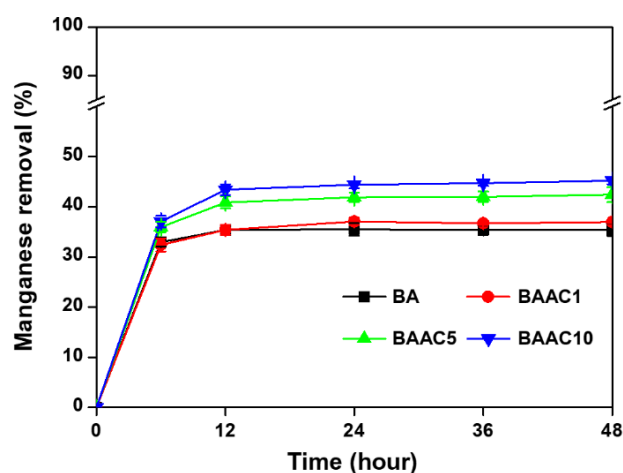
3.2.3 การกำจัดแมงกานีสด้วยเซลล์ดักติด วัสดุดักติด และเซลล์อิสระ

BA BAAC1 BAAC5 และ BAAC10 มีรูปร่างเป็นทรงกลมคล้ายเม็ดสาหร่าย มีสีขาวขุ่นในตัวอย่าง BA (รูปที่ 19A) และมีสีดำในตัวอย่าง BAAC1 BAAC5 และ BAAC10 (รูปที่ 19B) ซึ่งตัวอย่าง BA BAAC1 BAAC5 และ BAAC10 มีขนาด 4.02 ± 0.071 4.05 ± 0.065 4.06 ± 0.054 และ 4.37 ± 0.170 mm (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ตามลำดับ ทั้งนี้ขนาดของวัสดุดักติดทั้งสี่ใกล้เคียงกัน แต่ในตัวอย่าง BAAC10 มีขนาดใหญ่กว่าวัสดุอื่น ๆ เล็กน้อย เนื่องจากผนังถ่านกัมมันต์ทำให้สารละลายโซเดียมแอลจิเนตมีความหนืดเพิ่มขึ้น จึงทำให้ค่าเฉลี่ยของ BAAC10 เพิ่มขึ้น



รูปที่ 19 (A) แบริยมแอลจิเนต (B) แบริยมแอลจิเนตเติมผนังถ่านกัมมันต์

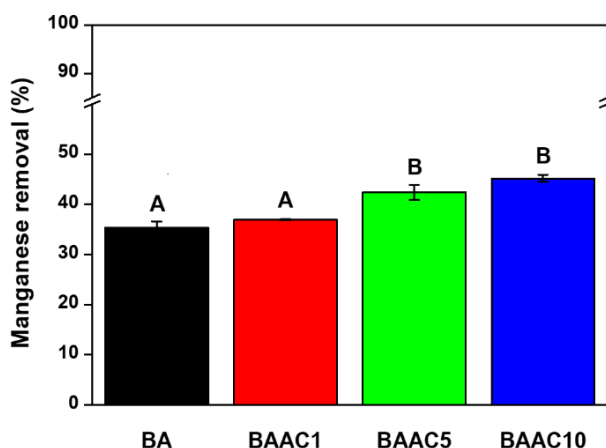
สำหรับผลการกำจัดแมงกานีสด้วยวัสดุดักติดต่าง ๆ พบว่าค่าแมงกานีสในน้ำลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก แล้วจึงเริ่มคงที่ (รูปที่ 20) โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ชุดทดลองวัสดุดักติด BA BAAC1 BAAC5 และ BAAC10 มีค่าร้อยละการกำจัดแมงกานีส เท่ากับ 35.36 ± 1.24 36.94 ± 0.14 42.40 ± 1.50 และ 45.20 ± 0.73 (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ตามลำดับ



รูปที่ 20 การกำจัดแมงกานีสของวัสดุดักติดและวัสดุดักติดแบบเติมผนังถ่านกัมมันต์

เมื่อเปรียบเทียบผลการกำจัดแมงกานีสของวัสดุต่าง ๆ ทางสถิติดังแสดงในรูปที่ 3 พบว่าร้อยละการกำจัดแมงกานีสของ BA กับ BAAC1 (แทนด้วย A) และ BAAC5 กับ BAAC10 (แทนด้วย B) ไม่มีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ ชุดทดลอง BA (ไม่เติมผงถ่านกัมมันต์) วัสดุแบเรียมแอลจิเนตสามารถดูดซับแมงกานีสได้ประมาณร้อยละ 35 ปรากฏการณ์การดูดซับสารปนเปื้อนด้วยวัสดุักติดได้มีรายงานไว้ในงานวิจัยในอดีตเช่นกัน [19] แต่ในชุดทดลอง BAAC1 ปริมาณผงถ่านกัมมันต์น้อยจนทำให้ประสิทธิภาพการดูดซับแมงกานีสเพิ่มขึ้นน้อยมากจนไม่มีนัยสำคัญ (รูปที่ 21) เมื่อเติมผงถ่านกัมมันต์มากขึ้นในชุดการทดลอง BAAC5 และ BAAC10 ประสิทธิภาพการกำจัดแมงกานีสเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณร้อยละ 42-45) ซึ่งการเติมผงถ่านกัมมันต์ส่งผลให้ดูดซับสารปนเปื้อนเพิ่มสูงขึ้น ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยในอดีตที่พบว่าการใช้วัสดุักติดเติมผงถ่านกัมมันต์ในการกำจัดโลหะหนักอย่างมีประสิทธิภาพ เช่น สังกะสี (Zn^{2+}) และแคดเมียม (Cd^{2+}) (Choi et al., 2009; Sigdel et al., 2017)

ผลจากการทดลองขั้นตอนนี้สามารถกล่าวได้ว่าการเติมผงถ่านกัมมันต์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสารปนเปื้อนได้ โดยในการศึกษานี้วัสดุักติดเติมผงถ่านกัมมันต์ร้อยละ 5 หรือตัวอย่าง BAAC5 มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมงกานีสสูงและมีความเหมาะสมในเชิงปฏิบัติ โดยวัสดุไม่มีความหนืดมากส่งผลให้ผลิตได้ง่าย และเติมผงถ่านกัมมันต์ไม่มากจึงมีความเหมาะสมในเชิงเศรษฐศาสตร์ด้วยเช่นกัน สำหรับงานในขั้นตอนต่อไปได้เลือกวัสดุ BAAC5 ในการผลิตเซลล์ักติด



รูปที่ 21 การเปรียบเทียบการกำจัดแมงกานีสเฉลี่ยของ BA BAAC1 BAAC5 และ BAAC10

การศึกษาขั้นตอนนี้เป็นการทดลองโดยชุดทดลองที่มีเซลล์จุลชีพปริมาณ 100 200 และ 500 mg-MLSS/L (คิดจำนวนแบคทีเรีย SBP1 ประมาณ 1 ถึง 5×10^4 CFU/mL) ในการทดลองนี้มุ่งเน้นการเปรียบเทียบผลการกำจัดแอมโมเนียด้วยเซลล์ดักติดเดิม (ผงถ่านกัมมันต์ร้อยละ 5) และไม่เติมผงถ่านกัมมันต์ที่ความหนาแน่นของเซลล์จุลชีพต่าง ๆ และวัสดุดักติดที่ไม่เติมเซลล์จุลชีพ (EC-0 และ ECAC-0) โดยมีเซลล์อิสระศึกษาคู่ขนานไปด้วย

จากการทดลองเซลล์ดักติด EC-0 พบว่ากำจัดแอมโมเนียได้ร้อยละ 37 ขณะที่ EC-100 EC-200 และ EC-500 กำจัดแอมโมเนียได้ร้อยละ 46 49 และ 46 ตามลำดับ (ตารางที่ 14) โดยผลจากการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเซลล์จุลชีพช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนีย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในอดีตที่พบว่าการใช้เซลล์จุลชีพร่วมกับแอลจินेटสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสารพิษ อาทิ แคดเมียม (Cd^{2+}) และนิเกิล (Ni^{2+}) (Arica et al., 2004; Bayramoglu et al., 2009) จากการทดลองด้วยเซลล์ดักติดที่ความหนาแน่นของเซลล์จุลชีพต่างกันพบว่าชุดการทดลอง EC-200 มีการกำจัดแอมโมเนียที่ดีที่สุด ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแม้ชุดการทดลอง EC-500 มีเซลล์จุลชีพมากที่สุดแต่เซลล์ดักติดที่สัดส่วนดังกล่าวอาจมีความหนาแน่นมากเกินไปและส่งผลต่อการแพร่และการสัมผัสสารผ่านวัสดุพอร์ (วัสดุดักติด)

ส่วนเซลล์ดักติดเติมผงถ่านกัมมันต์ ECAC-0 พบว่ากำจัดแอมโมเนียได้ร้อยละ 43 ขณะที่ ECAC-100 ECAC-200 และ ECAC-500 กำจัดแอมโมเนียได้ร้อยละ 48 51 และ 46 ตามลำดับ (ตารางที่ 14) โดยผลจากการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเซลล์จุลชีพช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนีย และจากการทดลองด้วยเซลล์ดักติดเติมผงถ่านกัมมันต์ที่ความหนาแน่นของเซลล์จุลชีพต่างกันพบว่าชุดการทดลอง ECAC-200 มีการกำจัดแอมโมเนียที่ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับชุดการทดลองก่อนหน้านี้ โดยเซลล์ดักติดที่ความหนาแน่นเซลล์จุลชีพ 500 mg-MLSS/L มีประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียต่ำกว่าเซลล์ดักติดที่ความหนาแน่นเซลล์จุลชีพ 200 mg-MLSS/L (ตารางที่ 14) ความหนาแน่นของเซลล์จุลชีพที่มากเกินไปร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ในเซลล์ดักติดอาจส่งผลโดยตรงต่อการแพร่ของสาร ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดไม่ดีนัก

แนวโน้มการกำจัดแอมโมเนียของเซลล์อิสระ 200 mg-MLSS/L พบว่าร้อยละการกำจัดแอมโมเนียมีค่าน้อยในช่วง 12 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นร้อยละการกำจัดแอมโมเนียมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ถึง 36 ชั่วโมง และคงที่ในช่วง 36 ถึง 48 ชั่วโมง (รูปที่ 22) สอดคล้องกับหลักการเจริญเติบโตของเซลล์จุลชีพ กล่าวคือ ช่วงแรกเซลล์จุลชีพมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำในระยะพัก (Lag phase) จากนั้นเซลล์จุลชีพมีอัตราการเติบโตอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วในระยะเอ็กโปเนนเชียล (Exponential phase) และคงที่ในระยะคงที่ (Stationary phase) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) เซลล์อิสระมีค่าการกำจัดแอมโมเนียร้อยละ 57

ตารางที่ 14 การกำจัดแมงกานีสต่อความหนาแน่นของเซลล์จุลชีพ

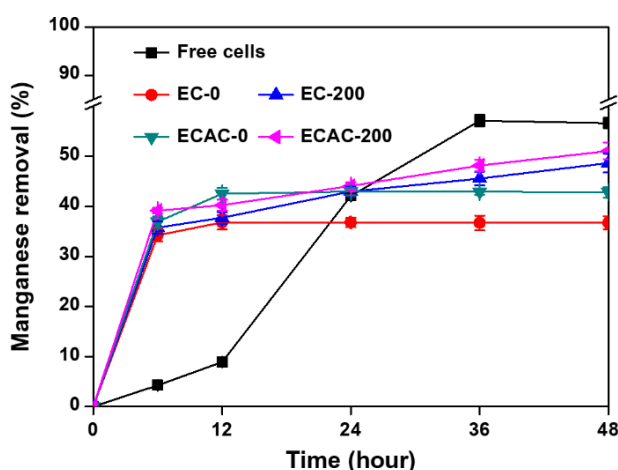
ชุดที่	ชื่อชุดการทดลอง	ร้อยละประสิทธิภาพการกำจัดแมงกานีส ณ เวลา 48 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
1	EC-0	36.71 \pm 1.33
2	EC-100	45.95 \pm 1.66
3	EC-200	48.65\pm1.89
4	EC-500	46.30 \pm 1.56
5	ECAC-0	42.80 \pm 1.06
6	ECAC-100	48.16 \pm 1.10
7	ECAC-200	51.07\pm1.66
8	ECAC-500	46.29 \pm 1.23

ส่วนแนวโน้มการกำจัดแมงกานีสของชุดการทดลอง EC-0 และ ECAC-0 มีร้อยละการกำจัดแมงกานีสอย่างรวดเร็วและคงที่ในช่วง 12 ชั่วโมงแรก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระบวนการดูดซับสิ้นสุดแล้ว ขณะที่เวลา 12 ชั่วโมง ชุดการทดลอง EC-200 และ ECAC-200 มีร้อยละการกำจัดแมงกานีสใกล้เคียง EC-0 และ ECAC-0 แต่หลังจากนั้น (24 ถึง 48 ชั่วโมง) พบว่าชุดการทดลอง EC-200 และ ECAC-200 มีร้อยละการกำจัดแมงกานีสที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (รูปที่ 4) ซึ่งเป็นผลจากกระบวนการทางชีวภาพของเซลล์จุลชีพที่เกิดขึ้นในเซลล์ดักติด ทั้งนี้เซลล์จุลชีพที่อยู่ในวัสดุดักติดอาจได้รับสัมผัสแมงกานีสช้ากว่าเซลล์อิสระเนื่องจากมีข้อจำกัดเรื่องการแพร่ของสารผ่านวัสดุพอร์เป็นเหตุให้กระบวนการทางชีวภาพของเซลล์ดักติดเกิดได้ช้ากว่าเซลล์อิสระ

โดยภาพรวมเมื่อเปรียบเทียบแนวโน้มการกำจัดแมงกานีสด้วยเซลล์อิสระและเซลล์ดักติด (EC-200 และ ECAC-200) พบว่าเซลล์ดักติดกำจัดแมงกานีสได้รวดเร็วกว่า (รูปที่ 22) เนื่องจากกระบวนการดูดซับเกิดขึ้นเร็วกว่ากระบวนการทางชีวภาพ ดังนั้นในแง่ของการประยุกต์ใช้งานจริงการใช้เซลล์ดักติดมีข้อดีในการออกแบบและใช้งานระบบที่มีระยะเวลาในการบำบัดน้ำ (Hydraulic retention time) สั้น รวมทั้งสามารถออกแบบให้เป็นระบบที่มีถึงปฏิกรณ์ขนาดเล็กได้

สำหรับประสิทธิภาพการกำจัดแมงกานีส ณ เวลา 48 ชั่วโมง ของชุดทดลองเซลล์ดักติดต่าง ๆ (EC-200 และ ECAC-200) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ 200 mg-MLSS/L พบว่าเซลล์อิสระมีค่าการกำจัดแมงกานีสดีกว่า EC-200 และ ECAC-200 เล็กน้อย (รูปที่ 22) เนื่องจากแมงกานีสมีโอกาสสัมผัสกับเซลล์จุลชีพได้มากกว่าเซลล์ดักติด แต่ในแง่ของการประยุกต์ใช้งานจริงเซลล์ดักติดมีศักยภาพในการกำจัดมลสารในสิ่งแวดล้อมซึ่งอาจมีสารเจือปนหลายชนิดหรือมีความเครียดจากสิ่งแวดล้อม (Environmental stress) ได้มากกว่า

ผลการศึกษาในรูปที่ 22 แสดงให้เห็นว่าเซลล์จุลชีพในรูปแบบเซลล์ดักติดสามารถเจริญเติบโตและกำจัดแมงกานีสได้ดี เซลล์จุลชีพสามารถกำจัดแมงกานีสได้ด้วยกระบวนการออกซิเดชันทางชีวภาพ (Biological oxidation) จากงานวิจัยในอดีตระบุว่าเซลล์จุลชีพสามารถเปลี่ยนรูปแมงกานีสละลายน้ำ (Mn^{2+}) เป็นรูปของแข็ง (Mn^{3+} หรือ Mn^{4+}) ดังนั้นผลการทดลองนี้คาดการณ์ว่าแมงกานีส Mn^{2+} ที่ถูกกำจัดได้เปลี่ยนรูปเป็นแมงกานีส Mn^{3+} และ Mn^{4+} การใช้งานเซลล์ดักติดด้วยแบคทีเรียแอโรบิกเติมผงถ่านกัมมันต์เป็นการปรับปรุงคุณภาพน้ำที่ใช้กระบวนการดูดซับร่วมกับการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ (Bio-transformation) ส่งผลให้ชุดการทดลองดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูง การศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยาพบว่าโดยภาพรวมแล้วการกำจัดแมงกานีสในการศึกษานี้เป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับที่ 2 (ตารางที่ 15) โดยค่าที่ได้จากการศึกษาสามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาและออกแบบการทดลองต่อไป



รูปที่ 22 การกำจัดแมงกานีสของเซลล์อิสระ (Free cells) วัสดุดักติด (EC-0 และ EC-200) และเซลล์ดักติด (ECAC-0 และ ECAC-200)

ตารางที่ 15 จลนศาสตร์การจัดแมงกานีส

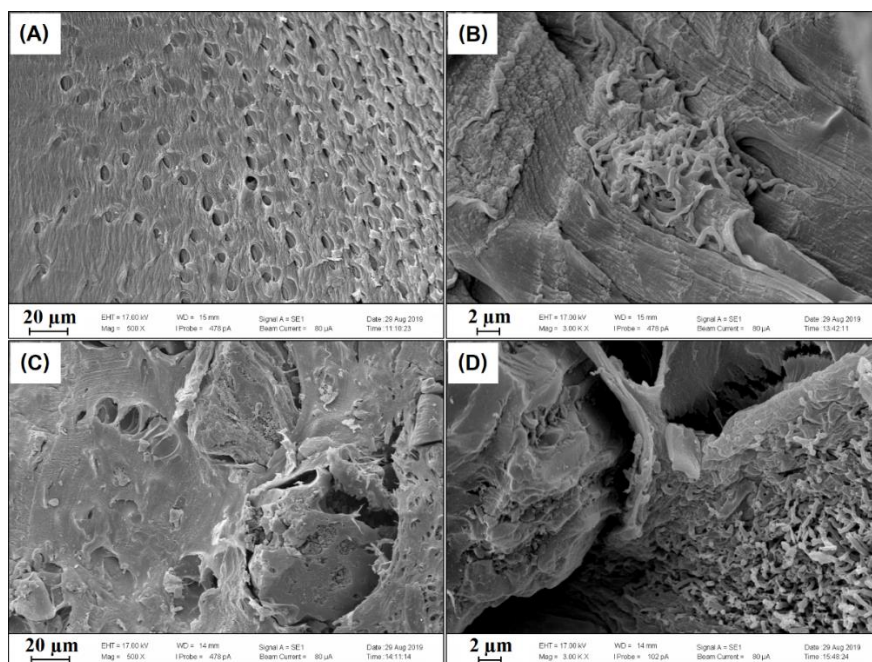
ชุดที่	ชื่อชุดการทดลอง	สมการจลนศาสตร์ ^a	R ²	ค่าคงที่จลนศาสตร์ ^b
1	EC-0	$Y=0.248x+0.016$	0.83	0.248
2	EC-100	$Y=0.260x+0.019$	0.81	0.260
3	EC-200	$Y=0.267x+0.019$	0.81	0.267
4	EC-500	$Y=0.273x+0.018$	0.82	0.273
5	ECAC-0	$Y=0.319x+0.015$	0.90	0.319
6	ECAC-100	$Y=0.337x+0.023$	0.82	0.337
7	ECAC-200	$Y=0.295x+0.022$	0.78	0.294
8	ECAC-500	$Y=0.264x+0.019$	0.81	0.264

หมายเหตุ : ^a สมการจลนศาสตร์ โดย X คือ เวลา (วัน) Y คือ 1/ความเข้มข้นของแมงกานีส (มิลลิกรัมต่อลิตร)

: ^b ค่าคงที่จลนศาสตร์ของปฏิกิริยอันดับที่ 2 (ลิตรต่อมิลลิกรัม-วัน)

การศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์ดักติดเต็มและไม่เต็มผงถ่านกัมมันต์ เพื่อศึกษาผลกระทบของผงถ่านกัมมันต์ต่อโครงสร้างของแบรียมแอลจิเนตเจล (รูปที่ 23) จากรูปที่ 23A และ 23B พื้นผิวภายในเซลล์ดักติดด้วยแบรียมแอลจิเนตมีผิวเรียบและมีรูพรุนจำนวนมากกระจายทั่วไปอย่างสม่ำเสมอ เป็นผลที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาเชื่อมแบบไขว้ (Cross-linking) ระหว่างโซ่พอลิเมอร์แอลจิเนตและแบรียมคลอไรด์เกิดเป็นโครงสร้างตาข่าย 3 มิติ และเมื่อขยายภาพโครงสร้างเป็น 3,000 เท่า พบว่าเซลล์แบคทีเรีย SBP1 ถูกดักติดกระจายตัวอยู่ทั้งบริเวณภายนอกและภายในของโครงสร้างตาข่ายเป็นจำนวนมาก ซึ่งลักษณะเซลล์แบคทีเรีย SBP1 เป็นแบบแท่ง (รูปที่ 23B)

ส่วนลักษณะโครงสร้างเซลล์ดักติดด้วยแบรียมแอลจิเนตเต็มผงถ่านกัมมันต์เป็นดังรูปที่ 23C และ 23D พื้นผิวภายในเซลล์ดักติดด้วยแบรียมแอลจิเนตเต็มผงถ่านกัมมันต์มีความขรุขระเนื่องจากผงถ่านกัมมันต์แทรกตัวตามโครงตาข่ายแบรียมแอลจิเนต แต่ทั้งนี้ผงถ่านกัมมันต์ไม่ได้ทำปฏิกิริยาเชื่อมแบบไขว้โดยตรงกับแบรียมแอลจิเนต ดังนั้นคาดการณ์ว่าผงถ่านกัมมันต์ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อความแข็งแรงของวัสดุดักติด (รูปที่ 23C) ส่วนการกระจายของแบคทีเรียมีลักษณะคล้ายกับเซลล์ดักติดด้วยแบรียมแอลจิเนตทั่วไป (รูปที่ 23D)



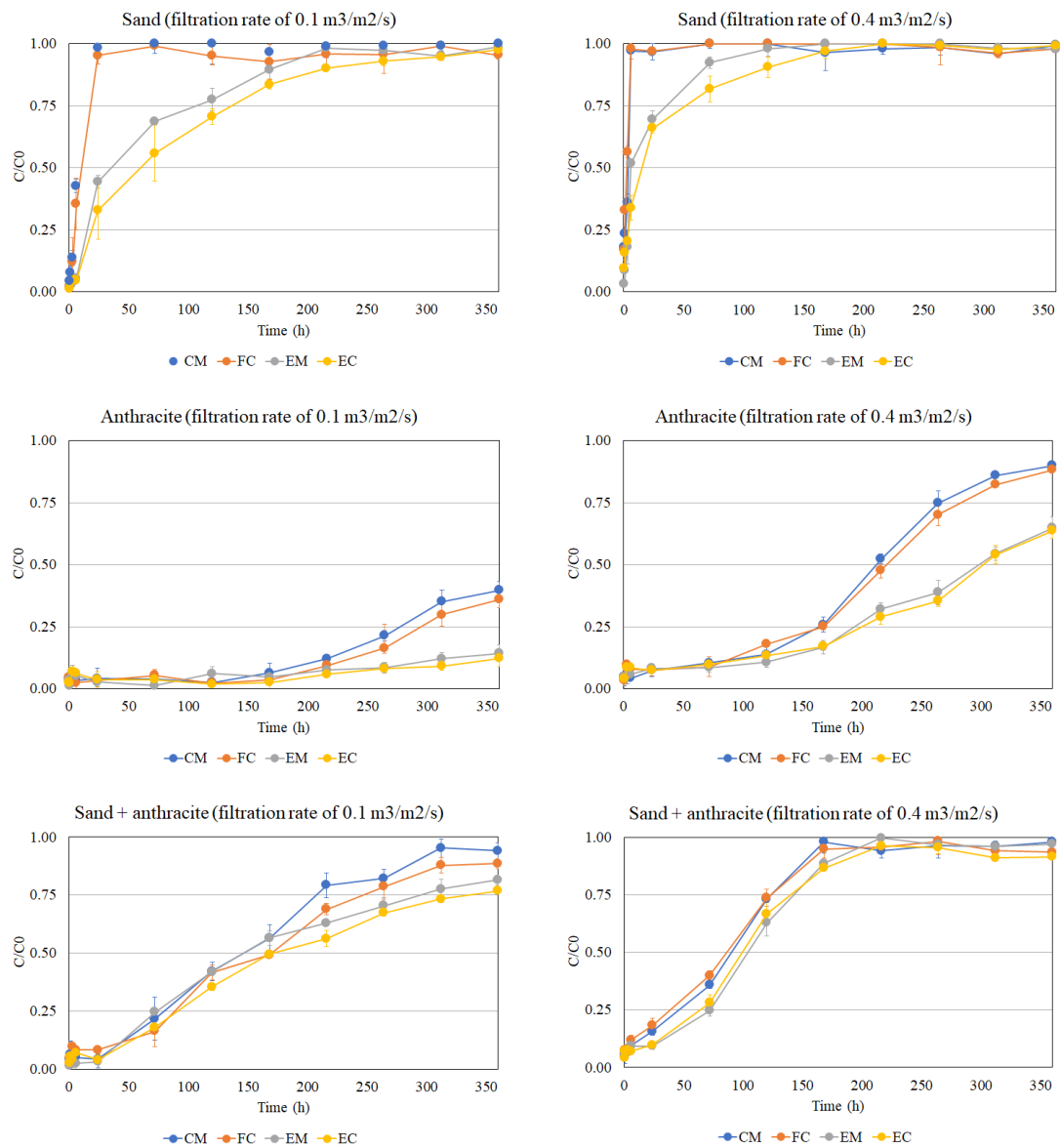
รูปที่ 23 ลักษณะภายในของเซลล์ดักติด EC-200 (A) กำลังขยาย 500 เท่า (B) กำลังขยาย 3,000 เท่า และลักษณะภายในของเซลล์ดักติดเติมผงถ่านกัมมันต์ ECAC-200 (C) กำลังขยาย 500 เท่า (D) กำลังขยาย 3,000 เท่า

3.2.4 การกำจัดแอมโมเนียในระบบกรองชีวภาพเติมเซลล์

สำหรับผลการกำจัดแอมโมเนียด้วยระบบกรองชีวภาพแบบทั่วไปไม่เติมเซลล์ (CM) ระบบกรองเติมเซลล์อิสระ (FC) ระบบกรองเติมวัสดุดักติด (EM) และระบบกรองเติมเซลล์ดักติด (EC) แสดงดังรูปที่ 24 โดยการทดลองกระทำภายในระบบกรองที่มีวัสดุกรองแบบเดี่ยว (ทราย หรือ แอโนทราไซด์) และแบบคู่ (ทรายและแอโนทราไซด์) อัตราการกรองที่ 0.1 และ 0.4 m³/m²/s เป็นตัวแทนอัตราการกรองช้าและเร็วตามลำดับ

โดยภาพรวมพบว่าระบบทรายกรองเสื่อมสภาพกำจัดแอมโมเนียส (Exhaustion) ช่วงการกรองวันแรก ในขณะที่แอโนทราไซด์มีความสามารถในการดูดซับแอมโมเนียส่งผลให้แอมโมเนียสหลุดออกจากระบบช้ากว่าทรายมาก วัสดุตรึงและเซลล์ส่งผลให้กำจัดแอมโมเนียสดีขึ้น โดยสามารถเห็นผลได้อย่างชัดเจนในการทดลองที่อัตราการกรองช้า (0.1 m³/m²/s) โดยเมื่อสิ้นสุดการชุดการทดลองระบบกรองแอโนทราไซด์ที่เติมเซลล์ดักติดยังคงสามารถกำจัดแอมโมเนียสได้ถึงร้อยละ 85 ในขณะที่ระบบกรองทั่วไปกำจัดแอมโมเนียสได้ร้อยละ 60

ข้อมูลจากการศึกษานี้บ่งชี้ได้ว่าระบบกรองชีวภาพที่เติมเซลล์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพระบบกรองได้แต่ยังจำเป็นต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพิ่มมากขึ้นก่อนนำไปใช้งานจริงต่อไป



รูปที่ 24 การกำจัดแอมโมเนียด้วยระบบกรองแบบทั่วไปไม่เติมเซลล์ (CM) ระบบกรองเติมเซลล์อิสระ (FC) ระบบกรองเติมวัสดุตกติด (EM) และระบบกรองเติมเซลล์ตกติด (EC)

4. สรุปผล

4.1 สรุปผลการทดลอง

1. แบคทีเรีย SCP-1 และ SCP-3 สามารถระบุได้เป็น *Streptomyces violaceus* ส่วน SCP-7 เป็น *Chryseobacterium bernardetii* มีประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนได้ร้อยละ 24-49 28-50 และ 10-20 ตามลำดับ โดยแบคทีเรียทั้งหมดคัดแยกจากดินในบริเวณบ่อน้ำบาดาลที่มีแอมโมเนียไนโตรเจน
2. SCP-1 มีความสามารถในการกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนได้สูงที่สุด การศึกษาจลนศาสตร์การเจริญเติบโตของ SBP1 ตาม Monod model พบว่าการทดลองที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียไนโตรเจนเริ่มต้น 1-20 mg/L จลนศาสตร์เป็นไปตาม Monod model โดยมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.069 1/h และ K_s เท่ากับ 0.057 mg/L แต่เมื่อความเข้มข้นแอมโมเนียไนโตรเจนสูงขึ้น (30-100 mg/L) พบว่าเกิดปรากฏการณ์การยับยั้งจากสารอาหาร (self-substrate inhibition) ตาม Aiba model
3. วัสดุ BAPAC05 (แบเรียมแอลจิเนตเติมผงถ่านกัมมันต์ร้อยละ 5) มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในในระบบกรองชีวภาพ เนื่องจากการรับแรงอัดได้ดี มีความเร็วในการตกไถ่เคียงกับวัสดุกรอง และสามารถดูดซับแอมโมเนียไนโตรเจนได้มากกว่าร้อยละ 40
4. เซลล์ดักติดด้วยแบเรียมแอลจิเนตเติมผงถ่านกัมมันต์ร้อยละ 5 สามารถกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนได้ร้อยละ 51 โดยกลไกการกำจัดเกิดจากกระบวนการดูดซับร่วมกับการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ
5. ในการกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนด้วยระบบกรองชีวภาพพบว่าระบบทรายกรองทั่วไปเสื่อมสภาพกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจน (Exhaustion) ในช่วงการกรองวันแรก ในขณะที่แอนทราไซด์ยังคงมีความสามารถในการดูดซับแอมโมเนียไนโตรเจนส่งผลให้แอมโมเนียไนโตรเจนหลุดออกจากระบบช้ากว่าทรายมาก แต่เมื่อเติมเซลล์ตรึงส่งผลให้การกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนดีขึ้น โดยสามารถเห็นผลได้อย่างชัดเจนในการทดลองที่อัตราการกรองช้า เมื่อสิ้นสุดการชุดการทดลอง (มากกว่า 1,500 bed volume) ระบบกรองแอนทราไซด์ที่เติมเซลล์ดักติดมีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือ ยังคงสามารถกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนได้ถึงร้อยละ 85

4.2 ข้อเสนอแนะ

1. ข้อมูลจากการศึกษานี้บ่งชี้ได้ว่าระบบกรองชีวภาพที่เติมเซลล์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพระบบกรองได้แต่ยังจำเป็นต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพิ่มมากขึ้นก่อนนำไปใช้งานจริงต่อไป
2. ควรการศึกษาในประเด็นอิทธิพลของกลุ่มจุลินทรีย์ (microbial community) ต่อระบบกรองชีวภาพและระบบกรองชีวภาพเติมเซลล์

เอกสารอ้างอิง

- กรมทรัพยากรน้ำบาดาล. โครงการศึกษาเพิ่มประสิทธิภาพของระบบปรับปรุงคุณภาพน้ำบาดาล. กรมทรัพยากรน้ำบาดาล กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ, 2555.
- สุนนา ราษฎร์ภักดี. เทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น, 2558.
- Aiba, S., Shoda, M., Nagalani, M. "Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation". Biotechnology and Bioengineering 10(1968): 845-864.
- Andrews, J.F. "A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates". Biotechnology and Bioengineering 10 (1968): 707-723.
- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WEF (Water Environment Federation). Standard methods for the examination of water and wastewater 23rd ed. APHA, AWWA, WEF, Washington, D, USA, 2017.
- Arica MY, Bayramoglu G, Yilmaz M, Bektaş S, Genç O. "Biosorption of Hg^{2+} , Cd^{2+} , and Zn^{2+} by Ca-alginate and immobilized wood-rotting fungus *Funalia troglis*". Journal of Hazardous Materials. 109(2004): 191-199.
- Bai, Y., Zhang, J. Li, Y.-F., Gao, Y.-N., Li, Y. "Biomass and microbial activity in a biofilter during backwashing". Journal of Zhejiang University SCIENCE B 6(2005): 427-432.
- Bayramoglu G, Yakup Arica M. "Construction a hybrid biosorbent using *Scenedesmus quadricauda* and ca-alginate for biosorption of Cu(II), Zn(II) and Ni(II): Kinetics and equilibrium studies". Bioresource Technology. 100(2009): 186-193.
- Cerrato, J.M., Falkinham, J.O., Dietrich, A.M., Knocke, W.R., McKinney, C.W., Pruden, A. "Manganese-oxidizing and -reducing microorganisms isolated from biofilms in chlorinated drinking water systems". Water Research 44(2010): 3935-3945.
- Choi J-W, Yang K-S, Kim D-J, Lee CE. "Adsorption of zinc and toluene by alginate complex impregnated with zeolite and activated carbon". Current Applied Physics 9(2009): 694-697.
- Delatolla, R., Séguin, C., Springthorpe, S., Gorman, E., Campbell, A., Douglas, I. "Disinfection byproduct formation during biofiltration cycle: Implications for drinking water production". Chemosphere 136(2016): 190-197.

- Edwards, V.H. "The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics". Biotechnology and Bioengineering 12 (1970): 679-712.
- Haldane, J.B.S. Enzymes, MIT Press, Cambridge, 1965.
- Han, M., Zhao, Z.-W., Gao, W., Cui, F.-Y. "Study on the factors affecting simultaneous removal of ammonia and manganese by pilot-scale biological aerated filter (BAF) for drinking water pre-treatment". Bioresource Technology 145 (2013): 17-24.
- Hill, C.B., Khan, E. "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(2008): 23-33.
- Pujol, R., Hamon, M., Kandel, X., Lemmel, H. "Biofilters-flexible, reliable biological reactors". Water Science and Technology 29(1994):33-38.
- Sabaliunas, D., Webb, S.F., Hauk, A., Jacob, M., Eckhoff, W.S. "Environmental fate of triclosan in the river Aire basin, UK". Water Research 37(2003): 3145-3154.
- Sigdel A, Jung W, Min B, Lee M, Choi U, Timmes T, Kimb S-J, Kang C-U, Kumar R, Jeon B-H. "Concurrent removal of cadmium and benzene from aqueous solution by powdered activated carbon impregnated alginate beads". Catena. 147 (2017): 101-107.
- Simpson, D.R. "Biofilm processes in biologically active carbon water purification". Water Research 42 (2008) 2839- 2848.
- Siripattanakul, S., Khan, E. "Fundamentals and applications of entrapped cell bioaugmentation for contaminant removal". in Shah, V. (ed.) Emerging Environmental Technologies. Volume 2. Springer. 2010.
- Siripattanakul, S., Wirojanagud, W., McEvoy, J., M., Casey, F., X., M., and Khan, E. "Bioaugmentation of immobilized and free mixed cultures for removing atrazine in agricultural infiltrate and its bacterial community structural change". Journal of Hazardous Materials 168(2009): 1373-1379.
- Yano, T., Nakahara, T., Kamiyama, S., Yamada, K. "Kinetic studies on microbial activities in concentrated solutions. I. Effect of excess sugars on oxygen uptake rate of a cell-free respiratory system". Agricultural and biological chemistry 30 (1966): 42-48.
- Zhu, I.X., Getting, T., Bruce, D. "Review of biologically active filters in drinking water applications". American Water Works Association Journal 102(2010): 67-77.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- Taweetanawanit, P., Ratpukdi, T., **Siripattanakul-Ratpukdi, S.** 2019. Performance and kinetics of triclocarban removal by entrapped *Pseudomonas fluorescens* strain MC46. **Bioresource Technology**, 274:113-119 (IF@2018 = 6.669)
- Giao, N.T., Limpiyakorn, T., Thuptimrang, P., Ratpukdi, T., **Siripattanakul-Ratpukdi, S.** 2019. Reduction of silver nanoparticle toxicity affecting ammonia oxidation using cell entrapment technique. **Water Science and Technology**, 79(5):1007-1016. (IF@2018 = 1.624)
- Youngwilai, A., Kidkhunthod, P., Jearanaikoon, N., Chaiprapa, J., Supanchaiyamat, N., Hunt, A.J., Ngernyen, Y., Ratpukdi, T., Khan, E., **Siripattanakul-Ratpukdi, S.** 2020. Simultaneous manganese adsorption and biotransformation by *Streptomyces violaceus* strain SBP1 cell-immobilized biochar. **Science of The Total Environment**, 713: 136708. (IF@2018 = 5.589)
- Therdkiatikul, N., Ratpukdi, T., Kidkhunthod, P., Chanlek, N., **Siripattanakul-Ratpukdi, S.** Manganese-contaminated groundwater treatment by novel bacterial isolates: kinetic study and mechanism analysis using synchrotron-based techniques, **Scientific Reports**, Submitted อยู่ระหว่างรอผลหลังจาก Revision (IF@2018 = 4.011)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ ดังนี้

- การใช้ผลงานวิจัยในการเรียนการสอนในระดับอุดมศึกษา
 1. Biology of Environmental Engineers มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 2. Special Topic: Environmental Nanotechnology จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- การสร้างนักวิจัยใหม่ระดับปริญญาเอก
 - Mr. Nguyen Thanh Giao จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 - นายนครินทร์ เทิดเกียรติกุล มหาวิทยาลัยขอนแก่น (คาดว่าจะสำเร็จ ส.ค. 63)
 - นางสาวอัจฉราพร ยังวิสัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น (คาดว่าจะสำเร็จ ธ.ค. 64)

3. อื่น ๆ

- Therdkiatikul, N., **Siripattanakul-Ratpukdi, S.** Screening of manganese-oxidizing bacteria from sand filter and soil, Khon Kaen, Thailand. IWA World Water Congress & Exhibition 2018, Tokyo, Japan, September 16-21, 2018.
- Giao, N.T., Limpiyakorn, T., Kunapongkiti, P., Thuptimrang, P., **Siripattanakul-Ratpukdi, S.** 2018. Reduction of silver nanoparticle toxicity affecting ammonia oxidation using cell entrapment technique. The 3rd Regional IWA Diffuse Pollution Conference, November 19-22, 2018, Chiang Mai, Thailand.
- Yangwilai, A., Kidkhunthod, P. Jearanaikoon, N. Chaiprapa, J., Supanchaiyamat, N., Hunt, A.J., **Siripattanakul-Ratpukdi, S.** 2019. Simultaneous manganese adsorption and biotransformation by bacterial cell-immobilized biochar: removal kinetics and mechanism The 3rd International Conference on Bioresources, Energy, Environment, and Materials Technology 2019, June 12-15, 2019, Hong Kong, China.
- นครินทร์ เทิดเกียรติกุล และ สุนา สิริพัฒนานกุล-ราษฎร์ภักดี. 2563. การกำจัดแมงกานีสในน้ำใต้ดินโดยเซลล์ดักติดด้วยแบคทีเรียแอสซิเนตเติมผงถ่านกัมมันต์. *วารสารวิชาการ วิศวกรรมศาสตร์ ม.อบ.* 13. in press

ภาคผนวก

บทความจากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

- Taweetanawanit, P., Ratpukdi, T., **Siripattanakul-Ratpukdi, S.** 2019. Performance and kinetics of triclocarban removal by entrapped *Pseudomonas fluorescens* strain MC46. **Bioresource Technology**, 274:113-119
- Giao, N.T., Limpiyakorn, T., Thuptimrang, P., Ratpukdi, T., **Siripattanakul-Ratpukdi, S.** 2019. Reduction of silver nanoparticle toxicity affecting ammonia oxidation using cell entrapment technique. **Water Science and Technology**, 79(5):1007-1016.
- Youngwilai, A., Kidkhunthod, P. Jearanaikoon, N. Chaiprapa, J., Supanchaiyamat, N., Hunt, A.J., Ngernyen, Y., Ratpukdi, T., Khan, E., **Siripattanakul-Ratpukdi, S.** 2020. Simultaneous manganese adsorption and biotransformation by *Streptomyces violaceus* strain SBP1 cell-immobilized biochar. **Science of The Total Environment**, 713: 136708.
- Therdkiatikul, N., Ratpukdi, T., Kidkhunthod, P., Chanlek, N., **Siripattanakul-Ratpukdi, S.** Manganese-contaminated groundwater treatment by novel bacterial isolates: kinetic study and mechanism analysis using synchrotron-based techniques, **Scientific Reports**, Submitted อยู่ระหว่างรอผลหลังจาก Revision



Performance and kinetics of triclocarban removal by entrapped *Pseudomonas fluorescens* strain MC46

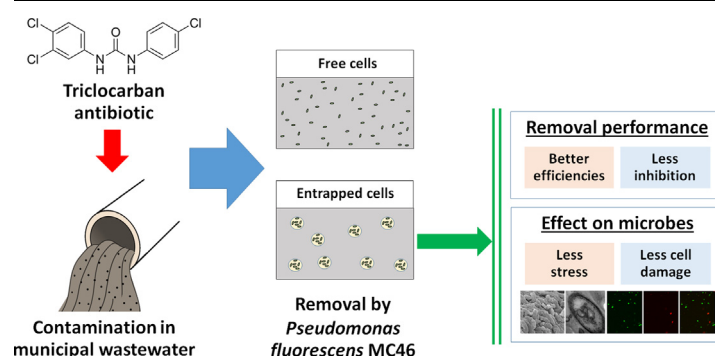
Pongsatorn Taweetanawanit^a, Thunyalux Ratpukdi^{a,b}, Sumana Siripattanakul-Ratpukdi^{a,b,*}

^a Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering and Research Center for Environmental and Hazardous Substance Management, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^b Center of Excellence on Hazardous Substance Management (HSM), Bangkok 10330, Thailand



GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

Antibiotic
Barium alginate
Cell immobilization
Cell viability

ABSTRACT

This study investigated removal of triclocarban (TCC) from contaminated wastewater by *Pseudomonas fluorescens* strain MC46 entrapped in barium alginate. Appropriate entrapped cell preparation conditions (cell-to-entrainment material ratio and cell loading) for removing TCC were examined. The highest TCC removal by the entrapped and free cell systems at the initial TCC concentration of 10 mg/L was 72 and 45%, respectively. TCC was degraded to less toxic compounds. Self-substrate inhibition was found at TCC concentration of 30 mg/L. The kinetics of TCC removal by entrapped and free cells fitted well with Edwards model. Scanning and transmission electron microscopic observations revealed that entrapment matrices reduced TCC-microbe contact, which lessened TCC inhibition. A live/dead cell assay also confirmed reduced microbial cell damage in the entrapped cell system compared to the free cell system. This study reveals the potential of entrapment technology to improve antibiotic removal from the environment.

1. Introduction

Triclocarban ($C_{13}H_9Cl_3N_2O$; TCC) is an antibiotic found predominantly in dermal cleaning products such as antibacterial bar/liquid

soap, hand wash, body lotion, deodorants, and aftershave; its concentration in the products can be as high as 1.5% (Musee, 2018). TCC is a high volume usage chemical with an estimated annual global production as high as 10,000,000 kg (Musee, 2018). Due to global usage of

* Corresponding author at: Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University, 123 Mittapap Road, Muang District, Khon Kaen 40002, Thailand.

E-mail addresses: pongsatorn.t@kkumail.com (P. Taweetanawanit), thunyalux@kku.ac.th (T. Ratpukdi), sumana.r@kku.ac.th (S. Siripattanakul-Ratpukdi).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.085>

Received 27 September 2018; Received in revised form 21 November 2018; Accepted 23 November 2018

Available online 24 November 2018

0960-8524/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

TCC-containing products, evidence of TCC contamination at hundred nanogram to microgram per liter levels in raw/treated domestic wastewater and natural water has been reported in many countries including China, Canada, USA, and the UK (Sabaliunas et al., 2003; Hua et al., 2005; Ahn et al., 2012). TCC is a toxic multi-chlorinated aromatic compound and persistent in the environment (half-life of up to 540 d) (Halden and Paull, 2005; Brausch and Rand, 2011). Its accumulation not only is toxic to organisms in the ecosystem but also causes endocrine disruption, infertility, cancer, and hormone dysfunction (Halden and Paull, 2005; Brausch and Rand, 2011). As wastewater treatment plants are the major TCC discharge source into natural water, it is important to develop TCC removal technologies to protect the natural water supply.

Biodegradation is an effective technique to remove toxic organic contaminants. The key strategy of this technique is to use contaminant-degrading microorganisms to transform toxic contaminants into lesser or non-toxic substances. Three efficient TCC-degrading bacteria including *Ochrobactrum* sp. strain MC22, *Sphingomonas* sp. strain YL-LM2C, and *Pseudomonas fluorescens* strain MC46 (MC46) have been identified (Mulla et al., 2016; Sipahutar and Vangnai, 2017; Sipahutar et al., 2018). TCC removal efficiencies from bacterial salt medium for these isolates were 35–76% at initial TCC concentrations of 4–10 mg/L (Mulla et al., 2016; Sipahutar and Vangnai, 2017; Sipahutar et al., 2018). TCC can be detoxified via several biodegradation steps, such as hydrolysis, dehalogenation, deoxygenation, hydroxylation, and ring cleavage (Gledhill, 1975; Zeyer et al., 1985; Balajee and Mahadevan, 1990; Surovtseva et al., 1992; Noh et al., 2000; Radianingtyas et al., 2003; Travkin et al., 2003; Hongsawat and Vangnai, 2011). TCC is degraded to 3,4-dichloroaniline and/or 4-chloroaniline in the first step of the degradation pathway; 4-chloroaniline is further degraded to aniline or 4-chlorocatechol (Mulla et al., 2016; Sipahutar and Vangnai, 2017; Sipahutar et al., 2018).

In practice, wastewater is augmented with degrading microorganisms to remove specific contaminants. In the case of TCC, even though antibiotics can be biodegradable, high concentrations of antibiotic can inhibit the degrading cultures. Therefore, this situation may upset biological wastewater treatment systems (Du et al., 2018). In addition, free antibiotic-degrading microorganisms may be washed out of the system via waste sludge.

Cell entrapment technique offers a promising method to resolve cell inhibition and washout. Entrapment involves immobilizing microbial cells inside polymeric materials, which protect the microbes from high concentrations of contaminant and/or environmental stresses and results in less microbial inhibition (Siripattanakul and Khan, 2010). Additionally, the microbial cells are retained within the entrapment matrix, which is beneficial in reducing cell washout from biological wastewater treatment systems. Cell entrapment has been successfully applied to treat wastewater contaminated with toxic substances such as pesticides and pharmaceuticals (Siripattanakul-Ratpukdi et al., 2009; Ruan et al., 2018; Khalid et al., 2018). Thus far, no work on antibiotic removal (including TCC) from wastewater by entrapped bacterial cells has been reported.

This study aimed to investigate the use of entrapped cells to enhance TCC removal from wastewater. Entrapped cell preparation conditions (cell-to-entrapment material ratio and cell loading) for removing TCC were investigated. *P. fluorescens* strain MC46 (the most effective TCC-degrading bacterium compared to the isolates mentioned earlier) was chosen. Barium alginate entrapment was selected because of its high gel strength (Taweetanawanit et al., 2017). A free cell experiment was included along with the entrapped cell test for comparative purpose. The efficiencies and kinetics of TCC removal were analyzed. TCC degradation products and pathway were assessed. In addition, microscopic analyses were performed. Microbial cell morphological changes were observed using scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Microbial viability was assessed using a live/dead assay with confocal laser scanning microscopy

(CLSM).

2. Material and methods

2.1. Chemicals, bacterial medium, and bacterial cultivation

Triclocarban and degradative intermediates including 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA), 4-chloroaniline (4-CA), and aniline (99% purity (analytical grade), Sigma-Aldrich, MO, USA) were obtained. Acetonitrile (HPLC grade, RCI Labscan, Thailand) and other chemicals were acquired from local chemical suppliers.

P. fluorescens MC46 was isolated previously (Sipahutar et al., 2018). The medium formulation and cultivation procedure were as follows (Sipahutar et al., 2018). MC46 cultivation involved enrichment and culturing using TCC-supplemented lysogeny broth medium (LBT), and TCC-supplemented minimal salt medium (MSMT), respectively. Formulation of MSMT (1 L) included 0.66 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.58 g Na_2HPO_4 , 0.5 g NaCl, 2 g NH_4Cl , 3 g KH_2PO_4 , and 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in de-ionized water (approximately pH 7.0). The medium was autoclaved and spiked with a filter-sterilized TCC solution at concentration of 9.4 mg/L. For enrichment, the culture (1 loop) was activated in 5 mL LBT containing 31 mg/L TCC. MC46 was incubated by shaking at 250 rpm for 14 h at room temperature. Then, the enriched culture (8% by volume) was inoculated into MSMT and shaken at 250 rpm and room temperature for 12 h. Subsequently, the culture was centrifuged at 6,000 rpm for 10 min and washed using 0.85% NaCl (w/v) twice and resuspended in MSMT to obtain the concentrated MC46 for the experiment.

2.2. Cell entrapment

Cells were entrapped in barium alginate. It is noted that calcium and barium alginate beads have been used for medical, food, and environmental purposes (Mørch et al., 2012; Taweetanawanit et al., 2017). Barium alginate beads are much stronger than calcium alginate beads, but leaching of toxic barium ion could be a concern (Mørch et al., 2012). In this study, a low concentration of barium chloride was used and barium alginate gel beads were strong, which resulted in negligible barium ion release.

Initially, sodium alginate (3% w/v) and barium chloride solutions (3% w/v) were used to for cell entrapment. The concentrated MC46 culture was mixed with the sodium alginate solution. Then, the mixture was dropped into the barium chloride solution for 1 h to form and harden the gel beads. The entrapped cells were prepared at different cell-to-barium alginate ratios and entrapped cell loadings (listed in Section 2.3).

2.3. Effect of entrapped cell preparation (cell-to-matrix ratios and cell loadings) on TCC removal

It is known that the cell entrapment conditions play a pivotal role in microbial cell growth (inside the beads) and contaminant removal performance (Siripattanakul-Ratpukdi et al., 2008). The concentrations of entrapment material were optimized in previous work (Taweetanawanit et al., 2017). This study focused on influences directly related to microbial cells. Firstly, cell-to-barium alginate ratio was tested to determine an optimum microbial cell density inside the matrices. Then, the effect of entrapped cell loading (quantity) in the reactors was investigated.

All TCC degradation experiments in this section were carried out in 500 mL Erlenmeyer flask with 200 mL of MSMT. MSMT was used in this study to determine the potential of the entrapped MC46 for TCC removal. No additional micro- and/or macro-nutrients were applied.

TCC in wastewater treatment systems (wastewater and sludge) can accumulate up to approximately 50 mg/kg (Snyder et al., 2010). Some portion of the accumulated TCC could be released into the wastewater.

In this experiment, a TCC concentration of 10 mg/L in MSMT was chosen. To determine the effect of cell-to-barium alginate ratios, seven reactors (three entrapped cells, one free cell, and three controls (only barium alginate)) were tested. For the three entrapped cell reactors, 0.3 g of wet MC46 cells (approximately 10^9 CFU/mL) was entrapped in 6, 3, and 1.5 g alginate designated as C:B-1:20, C:B-1:10, and C:B-1:05, respectively. The free cell reactor containing 0.3 g of wet MC46 cells without the entrapment material was called C:B-1:00. Three control reactors containing only the entrapment material of 6, 3, and 1.5 g alginate (no MC46) were labeled C:B-0:20, C:B-0:10, and C:B-0:05, respectively. The initial concentration of mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS) in both the entrapped and free cell reactors was 1200 mg/L. All reactors were aerated at a dissolved oxygen concentration of approximately 4 mg/L for 8 h. An aliquot of the water sample (1 mL) was taken continuously every 2 h to measure the TCC concentration. The best cell-to-barium alginate ratio based on TCC removal efficiency was chosen for the cell loading experiment.

To determine the ideal cell loading, nine reactors (three entrapped cells, three free cells, and three controls (barium alginate only)) were tested. For three entrapped cell reactors, 0.06, 0.18, and 0.3 g of MC46 wet cells were entrapped and placed in the reactors at 10, 30, and 50% (v/v, by material/reactor) and labeled as EC-10, EC-30, and EC-50, respectively. Three free cell reactors contained only 0.06, 0.18, 0.3 g wet cells and were labeled FC-10, FC-30, and FC-50, respectively. These quantities of wet cells (0.06, 0.18, 0.3 g) represent initial concentrations of MLVSSs in the entrapped and free cell reactors of 240, 720, and 1200 mg/L, respectively. Three control reactors contained similar components to the entrapped cells except with no MC46 added (designated as BA-10, BA-30, and BA-50, respectively). The best loading based on TCC removal efficiencies was chosen for the kinetics experiment.

2.4. Effect of initial TCC concentration on TCC removal kinetics and monitoring of TCC intermediate products

The kinetics of TCC removal by the entrapped MC46 cells was determined. The entrapped cells were prepared based on the optimum cell-to-barium alginate ratios and cell loading conditions from Section 2.3. TCC degradation at initial concentrations of 5, 10, 20, 30, 40 and 50 mg/L was determined in a batch reactor similar to that described in the previous subsection. Experiments using free cells and controls (only barium alginate beads) were also performed for comparative purposes. All reactors were aerated at a dissolved oxygen concentration of 4 mg/L for 8 h. TCC and the selected intermediates (3,4-DCA, 4-CA, and aniline) were continuously measured throughout the experiment. Some entrapped and free cell samples were taken for cell physiology and viability test using microscopy techniques.

TCC removal efficiency was determined based on remaining TCC concentrations. For kinetic analyses, the traditional Monod model based on microbial growth did not apply because of immobilized cell count limitations. The specific TCC removal rates (q) were calculated (Eq. (1)). Substrate inhibition was observed at high TCC concentrations. Inhibitory TCC biodegradation kinetics were assessed using Haldane, Aiba, and Edwards models (Sahoo and Panigrahy, 2018). It was found that Edwards model provided the best fit for this study. For estimated TCC removal kinetics, a modified Edwards model is presented in Eq. (2).

$$q = \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (1)$$

$$q = q_{max} \cdot \left(e^{\left(-\frac{S}{K_i} \right)} - e^{\left(-\frac{S}{K_s} \right)} \right) \quad (2)$$

q and q_{max} are the specific TCC removal rate and the maximum specific TCC removal rate (mg TCC/g VSS·h), respectively. X is the initial biomass concentration (as MLVSS) applied in this study (mg VSS/

L). S is the TCC concentration (mg/L). t is time of TCC removal (h). K_s is the half-saturation constant or Monod constant for TCC removal (mg/L). K_i is the substrate inhibition constant (mg/L). For estimation of the kinetic parameters, non-linear regression using the Solver supplement of Microsoft Office Excel was used.

2.5. Microscopic observation

2.5.1. Cell morphology observed by SEM and TEM

For SEM analyses, entrapped cells were observed for cell growth and microstructural changes after TCC degradation. Entrapped cell beads from the kinetic tests at the lowest and the highest TCC concentrations (10 and 50 mg/L, respectively) were selected. The entrapped cell beads were soaked five times in a barium chloride solution of 3.5% (w/v) for 15 min for hardening. Then, the beads were fixed using glutaraldehyde solution (2.5% v/v glutaraldehyde in a 3.5% w/v barium chloride solution) for 5 days. The fixed beads were soaked in a barium chloride solution for 20 min (3 times) and cut into two sections. Next, the beads were dehydrated in serial ethanol solutions of 30, 50, 70, 80, 90%, and absolute ethanol solution for 20 min in each solution. The beads were dried in a critical point dryer (Balzers, CPD 020, Liechtenstein) and coated with gold by spraying ion (Balzers, SCD 040, Liechtenstein). The beads were then analyzed using SEM (JEOL, JSM-5410LV, Tokyo, Japan).

For TEM, entrapped and free MC46 cells were selected from experiments at the TCC concentration of 50 mg/L. This observation was performed to characterize TCC-mediated bacterial cell damage. MC46 cells were removed from the matrix before TEM preparation. The entrapped cells were cut into two parts and bacterial cells were manually removed from the entrapment material using sterile forceps. The free and de-entrapped cells were then centrifuged at 10,000 rpm for 5 min at 4 °C. The concentrated cells were washed with 0.85% NaCl (w/v) then fixed the washed cells with 2.5% (v/v) glutaraldehyde solution. The fixed cells were mixed with liquid agar (1.5% w/v) at 45–50 °C to form a gel. The agar was cut into 0.5 mm cubes and the cubes dehydrated with a series of solutions from 35 to 95% (v/v) ethanol. The dehydrated cubes were saturated in propylene oxide and spur resin. The saturated cubes were baked for 8–10 h at 70 °C. Then, the baked cubes were cut using an ultramicrotome. Cubes of 60–90 nm thickness were placed onto a copper grid, dyed with uranyl acetate, and the contrast was enhanced with lead citrate. Finally, the samples were observed by TEM (JEOL, JEM-2100, Tokyo, Japan).

2.5.2. Cell viability

Cell viability was determined after the TCC removal experiment. Five samples from the experiments including MC46 before test, the free and de-entrapped MC46 cells after the experiment at 10 and 50 mg/L TCC (called Before test, FC-10, FC-50, EC-10, and EC-50, respectively) were compared. The assay was performed in accordance with the manufacturer's instructions (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability, Molecular Probes, Invitrogen, USA). Cell samples were washed with 0.85% (w/v) NaCl and centrifuged at 4 °C and 10,000 rpm for 5 min.

The concentrated cells (500 µL volume) were stained using 200 µL of LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability dye mixture (SYTO 9 and propidium iodide 1:1 by volume). The stained sample was kept in the dark for 10 min then observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) (FluoView FV10i, Olympus, Japan). The excitation/emission maxima for SYTO 9 and propidium iodide dyes were 480/500 and 490/635 nm, respectively. Image analyzer software (ImageJ 1.4.3.67, Broken Symmetry Software) was used to calculate live and dead cell portions in at least 10 images for each sample. Differences in live and dead cell percentages were statistically analyzed. A control test (only dead (autoclaved) cells, called Dead Cells) was also performed to validate the method before use with samples from the experiments.

2.6. Analytical procedure for TCC and its intermediates

The concentrations of TCC and its degradation intermediates (3,4-DCA, 4-CA, and aniline) were analyzed by reverse phase HPLC (LC-20A, Shimadzu, Japan). A water sample (1 mL) was centrifuged 10,000 rpm for 10 min and filtered using a syringe filter (nylon with pore size of 0.2 µm). The filtered sample (20 µL) was injected into an HPLC equipped with a C18 column (5 µm, 250 mm × 4.6 mm; Hyperclone, Phenomenex, USA) and a UV detector at 265 nm. A mixture of acetonitrile and water (70:30%, v/v) as a mobile phase at flow rate of 1 mL/min was run for 15 min. The retention times of 3,4-DCA, aniline, 4-CA, and TCC were 3.8 ± 0.2 , 4.5 ± 0.2 , 5.7 ± 0.5 , and 12.9 ± 0.3 min, respectively. The detection limits of TCC and its intermediate products were 0.1 mg/L.

2.7. Data and statistical analysis

Triplicate experiments were performed throughout the study. Average results (\pm standard deviation) are presented. SPSS statistical software (version 19.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for data analysis. Differences were considered significant at $p < 0.05$ by one-way ANOVA. The Duncan multiple range test was performed for multiple comparisons.

3. Results and discussion

3.1. Effect of cell-to-matrix ratios and cell loadings on TCC removal

The composition of the entrapped cell material and quantity of entrapped cells in reactors influenced microbial cell growth and contaminant removal efficiency. The effects of cell-to-barium alginate ratios and entrapped cell loadings on TCC removal efficiency over 8 h in batch reactors are presented in Table 1 (TCC removal versus time is shown in the Supplementary material).

Entrapped MC46 removed 43–72% of TCC, while the free MC46 and control (no cells) reduced TCC by 39% and 7–20%, respectively. The removal of TCC in the control tests was due to adsorption by the barium alginate matrices (Siripattanakul-Ratpukdi et al., 2008). For the entrapped and free MC46 reactors, TCC removal was much higher than for the controls. Therefore, TCC biodegradation by MC46 is important for TCC removal. As TCC was the sole carbon source for MC46, this suggested that the culture used TCC as the main substrate for metabolism.

Table 1

Performance of TCC removal under different cell-to-barium alginate and cell loading (8 h).

Cell mode	Reactor name	TCC removal (%)
<i>Influence of cell-to-barium alginate ratios</i>		
Entrapped cells	C:B-1:20	48.31 \pm 1.46
	C:B-1:10	72.25 \pm 1.40
	C:B-1:05	43.51 \pm 2.09
Free cells	C:B-1:00	39.71 \pm 0.23
Control (only barium alginate matrices)	C:B-0:20	19.38 \pm 2.85
	C:B-0:10	7.74 \pm 2.06
	C:B-0:05	5.93 \pm 1.04
<i>Influence of cell loadings</i>		
Entrapped cells	EC-10	34.57 \pm 1.12
	EC-30	66.47 \pm 1.63
	EC-50	61.50 \pm 0.86
Free cells	FC-10	26.38 \pm 1.05
	FC-30	39.94 \pm 0.29
	FC-50	45.06 \pm 0.25
Control (only barium alginate matrices)	BA-10	8.32 \pm 0.33
	BA-30	10.75 \pm 1.22
	BA-50	13.95 \pm 0.67

TCC removal by the entrapped cells was much better than that of the free cells due to the entrapment material protecting the microbial cells from the stress (toxic substance) (Siripattanakul-Ratpukdi et al., 2008; Bramhachari et al., 2016).

Among the cell-to-matrix ratios, the C:B-1:10 reactor had the highest TCC removal percentage and was significantly higher than the others ($p < 0.05$). The entrapped cells at C:B-1:05 (high cell density inside the beads) may have had insufficient entrapment material, which resulted in a limited area for the cells to attach and grow. In contrast, the entrapped cells at C:B-1:20 may be limited by oxygen diffusion because of the bead structure being too dense, and resulted in lower TCC removal efficiency (Pramanik and Khan, 2008). At the optimum ratio (C:B-1:10), the entrapped MC46 successfully reduced TCC. This is because transportation of the toxic substance through the porous entrapment matrices was limited, resulting in lower toxic contaminant reaching to the microbial cells (Siripattanakul-Ratpukdi et al., 2014; Ruan et al., 2018; Khalid et al., 2018). At the low antibiotic concentration (10 mg/L), the microbial cells tolerated and degraded the compound well. Therefore, this cell-to-matrix ratio (C:B-1:10) was used to investigate the effect of cell loading.

Cell loadings (amounts) in the reactors were studied. Table 1 presents that the entrapped MC46 removed 35–66% of TCC while the free MC46 reduced 26–45% of TCC. The control tests adsorbed 8–14% of the TCC. For the free cell reactors, TCC removal efficiency increased with cell number (Table 1). The FC-50 reactor significantly reduced TCC compared to the FC-30 reactor ($p < 0.05$).

Overall, TCC removal was better for the entrapped cells than the free cells. However, the TCC removal trend by the entrapped cells was different from the free cells. At the highest cell loading (EC-50), TCC removal was slightly lower than for the EC-30 reactor. Non-uniform mixing was observed in the EC-50 reactor caused by too many entrapped cell beads. This likely impacted the TCC removal performance. Therefore, the number of bacterial cells loaded affects TCC degradation performance in different ways depending on the type of reactors. For the free cell systems, greater cell number loading offered greater TCC removal.

To-date, no previous work has focused on entrapped cell loading in completely mixed reactors. Luo et al. (2014) studied a sponge-based moving bed bioreactor for treating micro-pollutants at different cell loadings (0–30% of sponge volume to reactor volume). Heterogeneous mixing was reported during the moving bed (complete mixed) bioreactor test at 30% sponge volume (Luo et al., 2014). This may suggest that performance of the immobilized cell systems is related to the immobilized cell volume. For the entrapped cell application, too many entrapped cell beads might be unfavorable for a completely mixed system, but it may be applicable to the packed bed system.

3.2. Effect of initial TCC concentrations on TCC removal kinetics by the entrapped and free cells

TCC removal efficiency and kinetics at initial concentrations of 5–50 mg/L TCC were determined (TCC removal versus time is shown in the Supplementary material). The concentration range was determined based on TCC accumulation in wastewater treatment systems (wastewater and sludge) up to approximately 50 mg/kg (Snyder et al., 2010). TCC removal efficiencies by the entrapped (8–78%) and free (4–55%) cells are summarized in Table 2. Removal efficiency decreased with increasing initial TCC concentration in both the entrapped and free cell systems. Even though TCC was the sole carbon source for MC46, TCC was toxic to the microbial cells. The entrapment material adsorbed some of the contaminant and reduced the microbial cell contact with the toxic compound leading to greater TCC removal performance by the entrapped cells (Siripattanakul-Ratpukdi et al., 2014; Ruan et al., 2018).

Compared to a previous study by Sipahutar et al. (2018), TCC removal by MC46 in this study was much better. For example, TCC

Table 2
Performance of TCC removal by the entrapped and free MC46 at 8 h.

Cell mode	Initial TCC concentration (mg/L)	TCC removal (%)
Entrapped cells	5	73.97 ± 0.03
	10	78.26 ± 0.14
	20	50.98 ± 0.27
	30	27.05 ± 0.71
	40	10.54 ± 0.10
	50	7.88 ± 0.66
Free cells	5	54.52 ± 0.06
	10	44.73 ± 0.20
	20	22.45 ± 0.27
	30	16.98 ± 0.13
	40	6.74 ± 0.01
	50	4.30 ± 0.02

(10 mg/L) removal in this study was 18-times faster than observed in the previous study. The previous study reported approximately 70% TCC removal after six days, while the same reduction was observed within 8 h in this study. This difference should be due to the different experimental conditions. In this study, the dissolved oxygen concentration of 4 mg/L was provided by aeration while oxygen was introduced by orbital shaking (dissolved oxygen concentration of 1 mg/L) in Sipahutar et al. (2018). Heterotrophic bacteria (including MC46) generally use organic carbons (such as TCC) as their energy source (an electron donor) while oxygen acts as an electron acceptor. Therefore, the amount of the electron acceptor influenced the biodegradation performance. This suggests that MC46 could be used for TCC decontamination in typical aerobic wastewater treatment, as oxygen is well supplied. However, future work on the effect of oxygen concentrations and other electron acceptors is recommended.

The kinetics of TCC removal by the entrapped and free cells is presented in Fig. 1. At TCC concentrations of higher than 30 mg/L, self-substrate inhibition occurred and was more severe on free cells. TCC removal by both entrapped and free cells fitted with a modified Edwards model. The result suggests that in addition to TCC toxicity, toxic degradative intermediates were produced and influenced TCC biodegradation and microbial growth (Sahoo and Panigrahy, 2018).

Table 3 summarizes the kinetic parameters for TCC removal by the entrapped and free cells. q_{max}/K_s refers to contaminant removal affinity. The q_{max}/K_s values for the entrapped and free cells were similar because the same culture (MC46) was used. The K_i value for the entrapped cells was higher than the free cells. This implies that the entrapment matrix protected MC46 from stress (TCC exposure) resulting in better cell growth or greater TCC removal activity. The values reported in this study may not be directly comparable to previous work, as q_{max}/K_s is unique based on microorganisms, contaminants, and environmental

Table 3
Kinetic parameters of TCC removal by the entrapped and free MC46.

Kinetic parameters	Unit	Cell mode	
		Entrapped cells	Free cells
q_{max}	mg-TCC/g-VSS·h	3.46	2.49
K_s	mg-TCC/L	7.23	5.13
q_{max}/K_s	L/g-VSS·h	0.48	0.48
K_i	mg-TCC/L	119.27	70.80

conditions. However, kinetic parameter trend for the entrapped and free cells was similar. Entrapped cells have been shown to have a contaminant removal preference (higher q_{max}/K_s values) for contaminants such as benzene and toluene (Robledo-Ortiz et al., 2011; Kureel et al., 2017). However, more research on cell growth and stress responses inside matrices is required for more mechanistic insight.

3.3. TCC intermediate products and potential degradation pathway

During the removal experiment, TCC intermediate products were monitored. Fig. 2 is an example of TCC degradation and intermediate production during the TCC removal by entrapped and free MC46 at the initial TCC concentration of 10 mg/L. The TCC concentration decreased dramatically in the first 6 h. Intermediate products including 3,4-DCA, 4-CA, and aniline were present at low concentrations in the second hour and decreased thereafter (after 4 h). TCC intermediate production and degradation by the free and entrapped cells were similar. This is because MC46 survived well and was active in both free and entrapped forms. The result shows much lower intermediate product concentrations (3,4-DCA, 4-CA, and aniline) relative to the TCC concentration. This is likely because the intermediate products were further degraded.

This result confirms that TCC can be transformed into 3,4-DCA or 4-CA via hydrolysis (Miller et al., 2010; Sipahutar et al., 2018). Subsequently, 3,4-DCA is degraded to 4-CA via dehalogenation and hydroxylation processes (Travkin et al., 2003). 4-CA is transformed to aniline by dechlorination (Hongsawat and Vangnai, 2011). Since aniline did not appear to accumulate, it would further degrade to catechol via deoxygenation (Hongsawat and Vangnai, 2011). It is expected that catechol may then be metabolized through a ring cleavage reaction (*ortho*-cleavage or *meta*-cleavage) (Hongsawat and Vangnai, 2011). However, it is unclear if complete TCC mineralization is achieved by MC46 and continued study on TCC degradation pathways should be performed. A TCC degradation pathway by the entrapped and free MC46 is proposed in supplementary material.

Numerous studies on aniline and chloroaniline biodegradation by isolated microorganisms have been reported (Travkin et al., 2003; Hongsawat and Vangnai, 2011; Takeo et al., 2013). Only two previous studies have focused on TCC biodegradation by isolated bacteria (Miller et al., 2010; Mulla et al., 2016). Previous work on TCC degradation by Alcaligenaceae (Miller et al., 2010) and *Sphingomonas* sp. strain YL-JM2C (Mulla et al., 2016) have only suggested degradation from TCC to 4-chlorocatechol. This study is the first report extending the microbial TCC degradation pathway to catechol.

Sipahutar et al. (2018) compared cytogenotoxicity and phytotoxicity between TCC and each intermediate. It was reported that TCC has higher toxicity than the intermediates. Based on EC50 values, 3,4-DCA was more highly toxic than 4-CA, while aniline was much less toxic (Argese et al., 2001; Bendary et al., 2013). Overall, toxicity of TCC and its intermediate products is in the following order: TCC > 3,4-DCA > 4-CA > aniline (highest to lowest). MC46 successfully detoxifies the environment from the TCC contaminant. Results from this study can be used to inform future studies of complete TCC fate and degradation pathways in the environment.

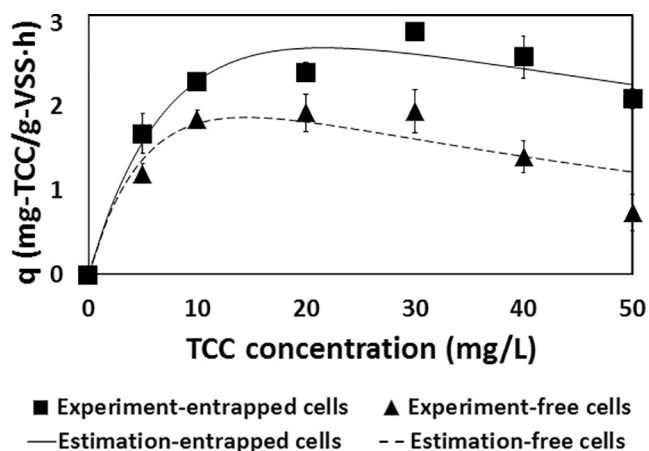


Fig. 1. Estimation of TCC removal kinetics by entrapped and free MC46.

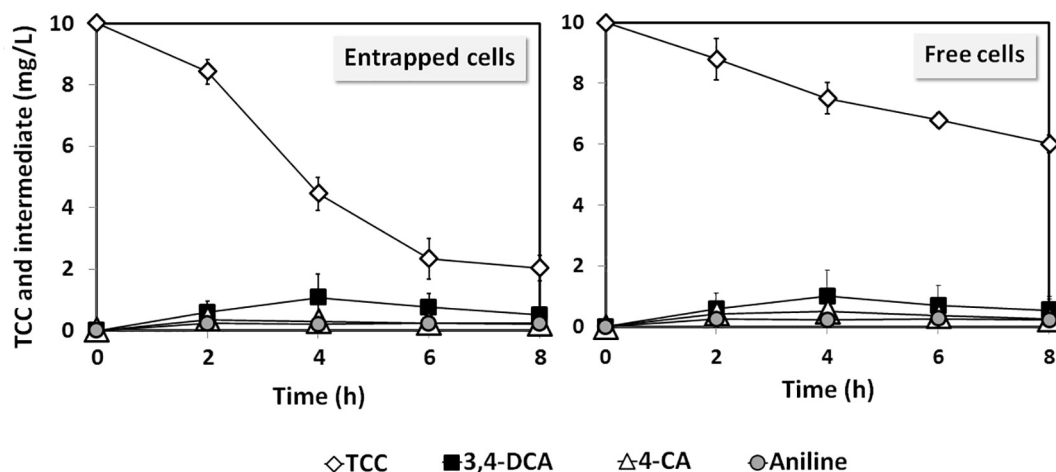


Fig. 2. TCC and degradative intermediates during TCC removal by entrapped and free MC46 at an initial TCC concentration of 10 mg/L.

3.4. Microscopic observations

The entrapped and free MC46 after the TCC degradation experiment by SEM and TEM were observed. During the experiment at the low TCC concentration (10 mg/L), numerous bacteria were found on both the bead surface and core. In contrast, no bacterial cells were observed on the outer bead layer at 50 mg/L TCC. This suggests that MC46 suffered from TCC toxicity and moved inside the bead. The SEM result was consistent with the kinetic data. Self-substrate inhibition occurred at TCC concentrations ≥ 30 mg/L. The bead structure (dense barium-alginate cross-linking) could reduce MC46 and TCC contact resulting in a slightly lower q at high TCC concentrations (Fig. 1).

The MC46 shape changed from a long to shorter rod during the tests at high TCC concentration (50 mg/L) (images shown in the [supplementary material](#)). This is only a preliminary examination of cell evolution in response to environmental TCC contamination. Thus far, attention has focused on cell physiological and molecular changes related to antibiotic resistance (Carey and McNamara, 2014; Gao et al., 2015). Cell morphological adaptations and stress responses to TCC contamination should be further investigated.

TEM revealed damage to membrane of the free MC46 (image shown in the [supplementary material](#)). TCC has been reported to inhibit bacterial fatty acid synthesis during enzymatic processes (Heath et al., 1999; Christen et al., 2010). Such inhibition occurring at the cell membrane would result in cell surface destruction. The entrapment process could lessen the severity of the damage.

A bacterial viability (live/dead) assay, based on cell membrane damage, was performed (percentages of viable cells are shown the [supplementary material](#)). The “Dead cells” sample (autoclaved MC46) had few viable cells (less than 10%). The “Before test” sample (MC46 without TCC exposure) had 93% cell viability. The free and entrapped MC46 cells after TCC treatment at concentrations of 10 and 50 mg/L including FC-10, FC-50, EC-10, and EC-50 had cell viabilities of 49, 32, 80, and 60%, respectively. Based on Duncan’s multiple range test, the percentage of viable cells from reactors could be grouped (as shown in the [supplementary material](#)). For the free cell systems (FC-10 and FC-50), the bacterial viability after TCC treatment was significantly reduced at all tested concentrations ($p < 0.05$) while EC-10 gave similar cell viability percentage compared to one without TCC treatment (“Before test”).

The TEM and live/dead assay results indicate that environmental TCC contamination could interfere with microorganisms in natural and wastewater treatment systems by damaging cell membranes and ultimately causing cell death. The cell entrapment technique could minimize this problem. The viability of the entrapped MC46 cells at 10 mg/L TCC (EC-10) was not significantly different than untreated MC46

(Before test) ($p > 0.05$). This demonstrated the potential of the entrapped cell system for removing toxic substance contamination.

4. Conclusions

Environmental TCC contamination is a growing concern. This study shows the utilization of combined biodegradation and cell entrapment processes. Entrapped MC46 cells significantly detoxified TCC-contaminated wastewater. Both cell-to-entrapment material ratio and cell loading played important roles in TCC removal. The TCC removal kinetics fitted well with a modified Edwards model. Self-substrate inhibition occurred at TCC concentrations of higher than 30 mg/L. The entrapment material minimized inhibition by reducing cell stress and membrane damage. Future work should examine TCC removal by entrapped cells in actual wastewater and stress responses and cell damage imparted by TCC on entrapped cells.

Acknowledgment

This work was conducted under a research program granted by the Center of Excellence on Hazardous Substance Management, Thailand. The authors would like to thank the Research Center for Environmental and Hazardous Substance Management (Khon Kaen University, Thailand), Farm Engineering and Automation Technology Research Group (Khon Kaen University, Thailand), and Research Career Development Grant RSA6080054 (Thailand Research Fund (TRF) and Khon Kaen University) for financial and equipment support. 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 grant agencies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.085>.

References

- Ahn, K.C., Kasagami, T., Tsai, H.J., Schebb, N.H., Ogunyoku, T., Gee, S.J., Young, T.M., Hammock, B.D., 2012. An immunoassay to evaluate human/environmental exposure to the antimicrobial triclocarban. *Environ. Sci. Technol.* 46, 374–381.
- Argese, E., Bettoli, C., Agnoli, F., Zamboni, A., Mazzola, M., Ghirardini, A.V., 2001. Assessment of chloroaniline toxicity by the submitochondrial particle assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (4), 826–832.
- Balajee, S., Mahadevan, A., 1990. Utilization of aromatic substances by *Azotobacter chroococcum*. *Res. Microbiol.* 14, 577–584.
- Bendary, E., Francis, R.R., Ali, H.M.G., Sarwat, M.I., Hady, S.E., 2013. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Ann. Agric. Sci.* 58 (2), 173–181.

- Bramhachari, P.V., Rama Sekhara Reddy, D., Kotresha, D., 2016. Biodegradation of catechol by free and immobilized cells of *Achromobacter xylosoxidans* strain 15DKVB isolated from paper and pulp industrial effluents. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7, 36–44.
- Brausch, J.M., Rand, G.M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82, 1518–1532.
- Carey, D.E., McNamara, P.J., 2014. The impact of triclosan on the spread of antibiotic resistance in the environment. *Front. Microbiol.* 5, 1–11.
- Christen, V., Crettaz, P., Oberli-Schrammli, A., Fent, K., 2010. Some flame retardants and the antimicrobials triclosan and triclocarban enhance the androgenic activity in vitro. *Chemosphere* 81, 1245–1252.
- Du, L., Cheng, S., Hou, Y., Sun, X., Zhou, D., Liu, B., 2018. Influence of sulfadimethoxine (SDM) and sulfamethazine (SM) on anammox bioreactors: performance evaluation and bacterial community characterization. *Bioresour. Technol.* 267, 84–92.
- Gao, L., Yuan, T., Cheng, P., Bai, Q., Zhou, C., Ao, J., Wang, W., Zhang, H., 2015. Effects of triclosan and triclocarban on the growth inhibition, cell viability, genotoxicity and multixenobiotic resistance responses of *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere* 139, 434–440.
- Gledhill, W.E., 1975. Biodegradation of 3,4,4-trichlorocarbanilide, TCC, in sewage and activated-sludge. *Water Res.* 9, 649–654.
- Halden, R.U., Paull, D.H., 2005. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in U.S. water resources. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1420–1426.
- Heath, R.J., Rubin, J.R., Holland, D.R., Zhang, E., Snow, M.E., Rock, C.O., 1999. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 274, 11110–11114.
- Hongsawat, P., Vangnai, A.S., 2011. Biodegradation pathways of chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2. *J. Hazard. Mater.* 186, 1300–1307.
- Hua, J.Y., Smear, M.C., Baier, H., Smith, S.J., 2005. Regulation of axon growth in vivo by activity-based competition. *Nature* 434 (7036), 1022–1026.
- Khalid, S., Han, J.I., Hashmi, I., Hasnain, G., Ahmed, M.A., Khan, S.J., Arshad, M., 2018. Strengthening calcium alginate microspheres using polysulfone and its performance evaluation: preparation, characterization and application for enhanced biodegradation of chlorpyrifos. *Sci. Total Environ.* 631–632, 1046–1058.
- Kureel, M.K., Geed, S.R., Giri, B.S., Rai, B.N., Singh, R.S., 2017. Biodegradation and kinetic study of benzene in bioreactor packed with PUF and alginate beads and immobilized with *Bacillus* sp. M3. *Bioresour. Technol.* 242, 92–100.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Kang, J., Xia, S., Zhang, Z., Price, W.E., 2014. Removal and fate of micropollutants in a sponge-based moving bed bioreactor. *Bioresour. Technol.* 159, 311–319.
- Miller, T.R., Colquhoun, D.R., Haldena, R.U., 2010. Identification of wastewater bacteria involved in the degradation of triclocarban and its non-chlorinated congener. *J. Hazard. Mater.* 183, 766–772.
- Mørch, Y.A., Qi, M., Gundersen, P.O., Formo, K., Lacik, I., Skjåk-Bræk, G., Oberholzer, J., Strand, B.L., 2012. Binding and leakage of barium in alginate microbeads. *J. Biomed. Mater. Res. A* 100 (11), 2939–2947.
- Mulla, S.I., Hu, A., Wang, Y., Sun, Q., Huang, S.L., Wang, H., Yu, C.P., 2016. Degradation of triclocarban by a triclosan-degrading *Sphingomonas* sp. strain YL-JM2C. *Chemosphere* 144, 292–296.
- Musee, N., 2018. Environmental risk assessment of triclosan and triclocarban from personal care products in South Africa. *Environ. Pollut.* 242, 827–838.
- Noh, S.J., Kim, Y., Min, K.H., Karegoudar, T.B., Kim, C.K., 2000. Cloning and nucleotide sequence analysis of xylE gene responsible for meta-cleavage of 4-chlorocatechol from *Pseudomonas* sp. S-47. *Mol. Cell.* 10 (4), 475–479.
- Pramanik, S., Khan, E., 2008. Effects of cell entrapment on growth rate and metabolic activity of mixed cultures in biological wastewater treatment. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 245–251.
- Radianingtyas, H., Robinson, G.K., Bull, A.T., 2003. Characterization of a soil-derived bacterial consortium degrading 4-chloroaniline. *Microbiology* 149, 3279–3287.
- Robledo-Ortiz, J.R., Ramírez-Arreola, D.E., Pérez-Fonseca, A.A., Gómez, C., González-Reynoso, O., Ramos-Quirarte, J., González-Núñez, R., 2011. Benzene, toluene, and o-xylene degradation by free and immobilized *P. putida* F1 of postconsumer agave-fiber/polymer foamed composites. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 539–546.
- Ruan, B., Wu, P., Chen, M., Lai, X., Chen, L., Yu, L., Gong, B., Kang, C., Dang, Z., Shi, Z., Liu, Z., 2018. Immobilization of *Sphingomonas* sp. GY2B in polyvinyl alcohol-alginate-kaolin beads for efficient degradation of phenol against unfavorable environmental factors. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 162, 103–111.
- Sabalunas, D., Webb, S.F., Hauk, A., Jacob, M., Eckhoff, W.S., 2003. Environmental fate of triclosan in the river Aire basin, UK. *Water Res.* 37, 3145–3154.
- Sahoo, N.K., Panigrahy, N., 2018. Biodegradation and kinetic study of 4-chlorophenol in bioreactor packed with stabilized bacteria entrapped in calcium alginate beads system. *Environ. Process.* 5 (2), 287–302.
- Sipahutar, M.K., Piapukiew, J., Vangnai, A.S., 2018. Efficiency of the formulated plant-growth promoting *Pseudomonas fluorescens* MC46 inoculant on triclocarban treatment in soil and its effect on *Vigna radiata* growth and soil enzyme activities. *J. Hazard. Mater.* 344, 883–892.
- Sipahutar, M.K., Vangnai, A.S., 2017. Role of plant growth-promoting *Chrobactrum* sp. MC22 on triclocarban degradation and toxicity mitigation to legume plants. *J. Hazard. Mater.* 329, 38–48.
- Siripattanakul-Ratpukdi, S., Khan, E., 2010. Fundamentals and Applications of Entrapped Cell Bioaugmentation for Contaminant Removal. In: *Emerging Environmental Technologies, Volume 2*. Springer.
- Siripattanakul-Ratpukdi, S., Ploychankul, C., Limpiyakorn, T., Vangnai, A.S., Rongsayamanont, C., Khan, E., 2014. Mitigation of nitrification inhibition by silver nanoparticles using cell entrapment technique. *J. Nanopart. Res.* 16, 1–10.
- Siripattanakul-Ratpukdi, 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 Soil Pollut.* 8, 257–266.
- Siripattanakul-Ratpukdi, S., Wirojanagud, W., McEvoy, J.M., Casey, F.X.M., Khan, E., 2009. Bioaugmentation of immobilized and free mixed cultures for removing atrazine in agricultural infiltrate and its bacterial community structural change. *J. Hazard. Mater.* 168, 1373–1379.
- Snyder, E.H., O'Connor, G.A., McAvoy, D.C., 2010. Measured physicochemical characteristics and biosolids-borne concentrations of the antimicrobial Triclocarban (TCC). *Sci. Total Environ.* 408 (13), 2667–2673.
- Surovtseva, E.G., Vasil'eva, G.K., Ivoilov, V.S., Karasevich, Y.N., 1992. Chlorinated anilines as sources of carbon, nitrogen, and energy for *Pseudomonas diminuta*. *Mikrobiologiya* 54, 948–952.
- Takeo, M., Ohara, A., Sakae, S., Okamoto, Y., Kitamura, C., Kato, D., Negro, S., 2013. Function of a glutamine synthetase-like protein in bacterial aniline oxidation via γ -glutamyl anilide. *J. Bacteriol.* 195, 4406–4414.
- Taweetanawanit, P., Radpukdee, T., Gao, N.T., Siripattanakul-Ratpukdi, S., 2017. Mechanical and chemical stabilities of barium alginate gel: influence of chemical concentrations. *Key Eng. Mater.* 718, 62–66.
- Travkin, V.M., Solyanikova, I.P., Rietjens, I.M., Vervoort, J., van Berkel, W.J., Golovleva, L.A., 2003. Degradation of 3, 4-dichloro- and 3, 4-difluoroaniline by *Pseudomonas fluorescens* 26-K. *J. Environ. Sci. Health B* 38, 121–132.
- Zeyer, J., Allen, A.W., Timmis, K.N., 1985. Microbial mineralization of ring-substituted anilines through an ortho-cleavage pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (2), 447–453.

Reduction of silver nanoparticle toxicity affecting ammonia oxidation using cell entrapment technique

Nguyen Thanh Giao, Tawan Limpiyakorn, Pumis Thuptimrang,
Thunyalux Ratpukdi and Sumana Siripattanakul-Ratpukdi

ABSTRACT

Occurrence of silver nanoparticles (AgNPs) in wastewater treatment systems could impact the ammonia oxidation (AO). This study investigated the reduction of AgNPs and dissociated silver ion (Ag^+) toxicity on nitrifying sludge using cell entrapment technique. Three entrapment materials, including barium alginate (BA), polyvinyl alcohol (PVA), and a mixture of polyvinyl alcohol and barium alginate (PVA-BA), were applied. The BA beads provided the highest reduction of silver toxicity (up to 90%) and durability. Live/dead assays showed fatality of entrapped cells after exposure to AgNPs and Ag^+ . The maximum AO rate of the BA-entrapped cells was 5.6 mg-N/g-MLSS/h. The AO kinetics under the presence of silver followed an uncompetitive inhibition kinetic model. The experiments with AgNPs and Ag^+ gave the apparent maximum AO rates of 4.2 and 4.8 mg-N/g-MLSS/h, respectively. The apparent half-saturation constants of the BA-entrapped cells under the presence of silver were 10.5 to 13.4 mg/L. Scanning electron microscopic observation coupled with energy-dispersive X-ray spectroscopy indicated no silver inside the beads. This elucidates that the silver toxicity can be reduced by preventing silver penetration through the porous material, leading to less microbial cell damage. This study revealed the potential of the entrapment technology for mitigating the effect of silver species on nitrification.

Key words | entrapped cells, nitrifying activated sludge, silver nanoparticles

Nguyen Thanh Giao
International Program in Hazardous Substance and
Environmental Management, Graduate School,
Chulalongkorn University,
Bangkok 10330,
Thailand
and
Department of Environmental Management,
College of Environment and Natural Resources,
Can Tho University,
Can Tho 90000, Viet Nam

Nguyen Thanh Giao
Tawan Limpiyakorn
Thunyalux Ratpukdi
Sumana Siripattanakul-Ratpukdi (corresponding
author)
Center of Excellence on Hazardous Substance
Management,
Bangkok 10330, Thailand
E-mail: sumana.r@kku.ac.th;
jeans_sumana@yahoo.com

Tawan Limpiyakorn
Department of Environmental Engineering, Faculty
of Engineering and Research Unit Control of
Emerging Micropollutants in Environment,
Chulalongkorn University,
Bangkok 10330, Thailand
and
Research Network of Chulalongkorn University and
National Nanotechnology Center (RNN),
Bangkok, Thailand

Pumis Thuptimrang
Department of Chemistry, Faculty of Science and
Environmental Science Research Center (ESRC),
University of Chiang Mai,
Chiang Mai 56000, Thailand

Thunyalux Ratpukdi
Sumana Siripattanakul-Ratpukdi
Department of Environmental Engineering, Faculty
of Engineering and Research Center for
Environmental and Hazardous Substance
Management,
Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, Thailand

INTRODUCTION

Silver nanoparticles (AgNPs) have been used in many applications, such as textile, medical, and plastic products (Pantic 2014). The large amount of AgNPs used resulted in residue being deposited in wastewater treatment plants (WWTPs)

(Mitrano *et al.* 2011; Hoque *et al.* 2012; Li *et al.* 2013). With the superior antimicrobial ability of the particles, microorganisms in WWTPs, including nitrifying microorganisms, might be inhibited (Chopra 2007). Previous works reported

that ammonia oxidation (AO) activity of nitrifying sludge could be seriously inhibited by silver species, including AgNPs and liberated Ag^+ (Choi *et al.* 2008; Jeong *et al.* 2012; Giao *et al.* 2017). The silver species that partially inhibited the AO process followed uncompetitive inhibition-like kinetics with the AgNPs and liberated Ag^+ inhibitory constants of 73.5 and 0.29 mg/L, respectively (Giao *et al.* 2017).

The potential of the cell entrapment technique to alleviate the negative impact of toxic substances on microbial activity has been studied. Cell entrapment materials reduce cell exposure to toxic chemicals leading to lower microbial inhibition (Saez *et al.* 2012; Siripattanakul-Ratpukdi 2012; Siripattanakul-Ratpukdi *et al.* 2014; Lucchesi *et al.* 2015). Prior studies have also indicated that the entrapment materials assist living microorganisms to resist adverse environmental conditions (e.g. pH and temperature changes) and to retain higher cell numbers in the system without reducing the microbial activity (Siripattanakul & Khan 2010; Hu & Yang 2015). Siripattanakul-Ratpukdi *et al.* (2014) found much lower inhibition of nitrification in the entrapped cell system influenced by AgNPs. The previous work preliminarily proved the feasibility of the entrapped cell application. However, the treatment performance and the durability of entrapped cells depended on the entrapment materials (Paul & Vignais 1980; Liu *et al.* 2012). For example, changing salt solutions (from calcium chloride to barium chloride) during the preparation of gel beads could significantly improve the physical and chemical properties. This, in turn, could lead to higher yield and activity of the entrapped cells (Paul & Vignais 1980). The addition of sodium alginate to polyvinyl alcohol (PVA) could also enhance the stability of the produced beads (Liu *et al.* 2012).

This study investigated the reduction of AgNP toxicity affecting AO using cell entrapment techniques. The screening of the entrapment materials (barium alginate (BA), polyvinyl alcohol (PVA), and mixture of polyvinyl alcohol and barium alginate (PVA-BA)) was based on nitrification performance and bead durability. The influence of silver species (AgNPs and Ag^+) on the inhibition of AO was evaluated. The AO kinetics of selected entrapped cells were also investigated. Microbial cell viability and morphology were observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and scanning electron microscopy coupled with an energy dispersive X-ray (SEM-EDX). This primarily elucidated the mechanism of silver toxicity reduction. The results of this study could be used as fundamental information for AgNP contaminated wastewater treatment in the future.

MATERIALS AND METHODS

AgNPs and Ag^+

Silver nanoparticles (5,000 mg/L) were obtained from PrimeNANO technology (Prime Nanotechnology Co. Ltd, Chulalongkorn University, Thailand). Transmission electron microscopy showed spherical AgNP sizes in the range of 2–12 nm (Giao *et al.* 2017). AgNP suspensions prepared in inorganic synthetic wastewater (SWW) peaked at a wavelength of 400 nm, which indicated that AgNPs were well dispersed in the experimental condition. Additionally, the residue of Ag^+ from AgNPs of 10 mg/L was found to be less than the method detection limit (3 µg/L). Silver nitrate (AgNO_3 , Merck, Darmstadt, Germany) was used as a source of Ag^+ .

Nitrifying sludge acclimation

The seed sludge was taken from a continuous-flow enriching nitrifier reactor. The continuous reactor had been operating for more than five years with equal hydraulic (HRT) and solid (SRT) retention times of four days. During nitrifying sludge acclimation, SWW was comprised of 1.9821 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 g/L NaCl, 0.2 g/L K_2HPO_4 , 0.4 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L KCl, and 1.0 g/L NaHCO_3 with an addition of 1 mL of inorganic salt solution. The inorganic salt solution contained 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 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. The $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration of 429 ± 62 mg-N/L was maintained. For the silver exposure experiment, wastewater was comprised of 1.9821 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L NaHCO_3 , 0.1 g/L K_2HPO_4 , 0.025 g/L MgSO_4 , and 0.025 g/L NaCl with AgNPs and Ag^+ at 10 mg/L and 0.1 mg/L, respectively.

Entrapped cell preparation

The enriched nitrifying sludge was harvested and centrifuged at 5,000 rpm for 20 min and the clear supernatant was removed. The concentrated cells were re-suspended, well-mixed, and centrifuged in SWW as a washing process five times. The washed cells were used for preparing the entrapped cells. The washed cells were added to the entrapment matrices to reach a final cell concentration in the matrix of 2,000 mg-MLSS/L.

Preparation of the BA and PVA-entrapped cells followed previous works (Siripattanakul-Ratpukdi & Tongkhang 2012; Siripattanakul-Ratpukdi *et al.* 2014). To prepare BA-entrapped cells, 2% (w/v) alginic acid sodium salt and 5% (w/v) barium chloride were used. The alginic acid sodium salt solution and the nitrifying sludge were homogeneously mixed and then dropped into the barium chloride solution using a peristaltic pump at 20 rpm. The gel beads were hardened in the barium chloride solution for 1 h. BA gel beads with diameters of 3–6 mm were formed.

For the PVA-entrapped cells, 10% (w/v) polyvinyl alcohol (PVA, 99%, fully hydrolyzed) was applied. The mixture of the PVA solution and the nitrifying sludge was dropped into a saturated boric acid solution for 30 min before it was transferred to a 1 M sodium phosphate buffer for 2 h to harden the produced gel beads. PVA gel beads of 3–6 mm diameters were formed. The other entrapment material applied in this study was a PVA-BA matrix. The combination of PVA and alginate was developed and successfully applied for entrapping phenol-degrading bacteria (Wu & Wisecarver 1992). The PVA-BA-entrapped cells were prepared by using 10% (w/v) polyvinyl and 1% (w/v) alginic acid sodium salt. The combined gel solution was mixed with the sludge. The preparation protocol for PVA-BA-entrapped cells followed that of the PVA gel, as described above.

Experimental setup and procedure

AO batch experiments were performed. A glass reactor with 100 mL working volume was applied. The reactor was operated under room temperature and 2 mg/L dissolved oxygen (DO). The study was divided into two parts: (1) inhibited AO by entrapped cells and (2) kinetics of AO by selected entrapped cells. The first part emphasized on selection of appropriate entrapment material (among BA, PVA, and PVA-BA) for the situation. The selection was based on AO percentage, bacterial viability, and material durability. For the second part, AO kinetics by selected entrapped cells was performed. This part focused on AO modeling based on Monod equation. Also, bacterial cell and bead morphology after the experiment was investigated using SEM-EDX. Figure 1 is summarized overall experiments.

Inhibited AO by entrapped cells

AO experiments on free cells, entrapped cells, and only materials were performed under the absence and presence of silver species. $\text{NH}_4^+\text{-N}$, Ag^+ , and AgNP concentrations of 70, 0.1, and 10 mg/L, respectively, were applied. The

Part 1: Inhibited AO by entrapped cells

Test name	BA matrix	BA-entrapped cells
	PVA matrix	PVA-entrapped cells
	PVA-BA matrix	PVA-BA-entrapped cells
	Blank	Free cells

Experiment	- Inhibited AO by AgNP and Ag^+ experiment
	- Material durability monitoring
	- Bacterial viability assay



Part 2: Kinetics of AO by entrapped cells

Test name	Selected entrapped cells
-----------	--------------------------

Experiment	- Inhibited AO by AgNP and Ag^+ under various NH_4^+ concentrations
	- AO modeling based on Monod equation
	- Microbial cell observation by SEM

Figure 1 | Experimental procedure for AO by entrapped and free cells under presence of silver.

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration was selected following the concentrations reported in municipal wastewater (Bai *et al.* 2012). The Ag^+ and AgNP concentrations were chosen based on the inhibition information reported previously (Giao *et al.* 2017). In the previous work, AO with AgNP concentrations of 0, 1, 10, and 100 mg/L was tested. The tests with AgNPs of 10 and 100 mg/L gave similar inhibition (63 and 76% compared to the test without AgNP, respectively). Therefore the AgNP concentration at 10 mg/L was chosen for this study. The selected Ag^+ concentration (0.1 mg/L) was the released concentration from 10 mg/L AgNP suspension (Giao *et al.* 2017). A nitrifying sludge of 50 mg-MLSS/L was used. The AO experiments were conducted with cells entrapped in BA, PVA, and PVA-BA. 100 mL of the reactor with different entrapped cells was aerated to obtain DO at 2 mg/L. Water samples were taken after a 60-h test. The

selected period (60 hour) was preliminarily tested and AO had completely reached a plateau (the preliminary result shown in Figure S1 in the supplementary material, available with the online version of this paper). Inhibition percentage of AO was estimated and compared to the reactors without silver. The inhibition percentage of AO activity was calculated based on Equation (1).

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{AR_C - AR_i}{AR_C} \times 100 \quad (1)$$

where AR_C is the percentage of ammonia reduction in the controls (free or entrapped cell reactor with no silver) and AR_i is percentage of ammonia reduction under the presence of AgNPs or Ag^+ .

Kinetics of AO by selected entrapped cells

For the kinetic experiments, the 60-h AO tests with $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (10 to 180 mg-N/L) and silver (AgNPs of 10 mg/L, Ag^+ of 0.1 mg/L, and no silver addition) were performed. The $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentrations were selected to represent the concentrations reported in municipal and industrial wastewater, such as coking and rubber production wastewater (Limpiyakorn *et al.* 2005; Chaiprapat & Sdoodee 2007; Bai *et al.* 2012). The selected silver concentrations previously reported a similar AO inhibition percentage from the free nitrifying sludge (Giao *et al.* 2017). 100 mL of the reactors and the selected entrapped and free cells were aerated for 60 h. The aqueous samples were collected at 0, 5, 17, 42, and 60 h to monitor AO rate. The concentration of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ was measured using the salicylate-hypochlorite method (Bower & Holm-Hansen 1980). The $\text{NH}_4^+\text{-N}$ measurement method was selected because it is more suitable when several ions, such as Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Cl^- , are present in the sample (Le & Boyd 2012). This method is frequently used for the analysis of ammonia in seawater.

The $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration was used to calculate the AO rate and kinetics. Reduction of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration was plotted versus time to calculate the AO rate in mg-N/L/h. The specific AO (q) was estimated as follows in Equation (2).

$$q = \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (2)$$

where q is the specific AO rate (mg-N/g-MLSS · h), X is the initial biomass concentration applied in this study (mg-MLSS/L), S is the initial $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration (mg/L), and t is the time elapsed during the AO experiment (h).

The specific AO rate was then calculated for the kinetic parameters based on the Monod model. The traditional Monod equation depends on microbial growth. However, in this study, the microbial cells were entrapped in the matrices. Thus, the modified Monod equation based on substrate utilization was applied. Theoretically, the Monod model cannot directly be applied under inhibitory conditions. In previous work, an uncompetitive-like inhibition model was proposed (Giao *et al.* 2017). The q and the half-saturation constant (or Monod constant) for AO (K_s) were calculated based on the inhibitory constant (K_i) and the inhibitor concentration (I), as presented in Equation (3). To determine K_i , experiments under various inhibitor concentrations were required. In this study, the focus was only on the treatment by different entrapped cells. Therefore, complete uncompetitive-like kinetics of AO under the presence of silver species might be further investigated. In this study, the apparent specific AO rate (q') and half-saturation constant (K'_s) for AO were proposed (Equation (4)).

$$q = \frac{(q_{\max}/(1 + (I/K_i))) \cdot S}{K_s/(1 + (I/K_i)) + S} \quad (3)$$

$$q' = \frac{q'_{\max} S}{K'_s + S} \quad (4)$$

q' and q'_{\max} are the apparent specific AO rate and the apparent maximum specific AO rate (mg-N/g-MLSS · h), respectively. K'_s is the apparent half-saturation constant (or Monod constant) for AO (mg/L). For estimation of the kinetic parameters, q'_{\max} and K'_s were calculated using a linear plot that followed the Lineweaver-Burk equation (Equation (5)). Triplicate experimental data were used for kinetic parameter estimation. Experimental and model data were statistically confirmed by non-linear regression analysis using Sigma Plot software provided by Khon Kaen University, Thailand (R^2 of 0.86–0.96, $p < 0.0001$).

$$\frac{1}{q'} = \frac{K'_s}{q'_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{q'_{\max}} \quad (5)$$

Free and entrapped cell viability using live/dead assay

Free and entrapped cell viability was investigated. Ten entrapped cell beads after the experiment were collected. The bead sample was washed five times with de-ionized water and five times with a NaCl solution (0.85%). The washed beads were cut using a pair of tweezers. The tweezed beads were dipped in 10 mL of NaCl (0.85%) and

then gently squeezed to let the cells out of the entrapment matrices. The suspended cells (free and de-entrapped cells) were centrifuged at 5,000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded, and the pellets were collected. The pellets were re-suspended and concentrated to obtain the free and de-entrapped cell samples for the live/dead assay.

The staining procedure was performed using a staining kit (LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability, Molecular Probes, Invitrogen). The samples were observed under CLSM (FluoView FV10i, Olympus, Japan). The following two samples were compared: (1) microbial cells directly taken from the nitrifying reactor and (2) killed cells (autoclaved at 121 °C, at 100 kPa for 15 min), stained for estimation of microbial viability. The percentage of live and dead cells was estimated based on 30 CLSM-images. The results were presented as % dead cells (\pm standard deviation).

Scanning electron microscopic observation

After the kinetic experiment, microbial cells and bead physiology were observed using SEM-EDX. The BA-entrapped cells (selected matrix) were prepared for SEM observations according to the procedure by Siripattanakul-Ratpukdi *et al.* (2014). Briefly, the entrapped cell beads from the experiment were collected and washed with de-ionized water. The collected gel beads were fixed using 1% osmium tetroxide for 1 h. The fixed gel beads were then rinsed three times with de-ionized water for 10 min. The beads were dehydrated with a series of ethanol that ranged from 30 to 95%. The absolute ethanol was applied as the last step of the dehydration. The dehydrated beads were dried using a critical point dryer (Balzers, CPD 020, Liechtenstein). The beads were divided into two parts using a razor blade in liquid nitrogen, attached to a stub, and coated with gold. The dried BA, PVA, and PVA-BA beads were observed using SEM with an energy-dispersive spectroscopy attachment (JEOL, JSM-5410LV, Tokyo, Japan). Elemental compositions of selected areas were analyzed using an energy dispersive X-ray (EDX, Oxford Instruments, Model X-MaxN, UK) to identify aggregates of silver.

Statistical analysis

The percentage of AO inhibition and membrane compromised cells caused by AgNPs and Ag⁺ was presented as an averaged percent inhibition (%) \pm standard deviation (SD), regardless of the initial NH₄⁺-N concentrations. A statistical comparison was performed using IBM SPSS statistics for Windows, Version 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

The significance of the differences ($p < 0.05$) was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test (Ahrari *et al.* 2015).

RESULTS AND DISCUSSION

Inhibited AO by entrapped cells

Percentage of AO inhibition

An AO experiment under various conditions was performed. Blank AO test and AO tests by only entrapment matrices (no cells) were conducted (results presented in Figure S2 in the supplementary material, available with the online version of this paper). It was found that natural ammonia removal (based on blank experiment) and ammonia adsorption on entrapment matrices did not obviously occur. For the tests with nitrifying sludge, under the absence of silver contamination, the nitrifying sludge reduced ammonia. Percentages of AO by the free (94.5%) and entrapped (90.2–95.5%) nitrifying sludge were similar (Figure 2). The entrapped cells did not run into limited substrate diffusion problem (Siripattanakul-Ratpukdi *et al.* 2014). This showed potential of entrapped cell utilization in the future.

During the experiments with silver, AO performance was significantly reduced. Under the presence of AgNP (10 mg/L), the free and entrapped cells reduced ammonia by 31.3 and 55.0–70.2%, respectively. With regards to the influence of Ag⁺ (0.1 mg/L), the free and entrapped cells oxidized ammonia by 19.4 and 54.2–75.5%, respectively. Previously, Giao *et al.* (2017) reported that the AO inhibition by silver caused by microbial cell damage. In this study, the entrapment matrix led to tortuosity of silver to reach to

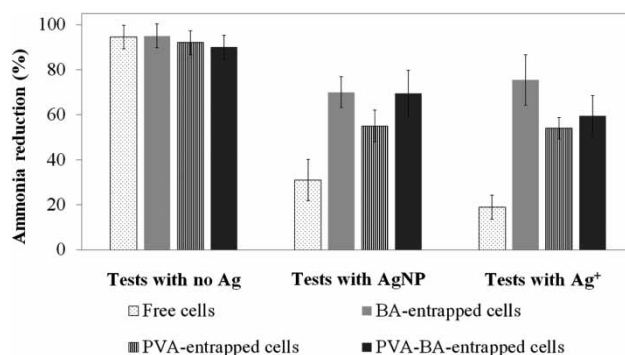


Figure 2 | Percentages of AO by the free and entrapped cells (BA, PVA, and PVA-BA) under the absence (Ag 0 mg/L) and presence of silver species (AgNPs 10 mg/L and Ag⁺ 0.1 mg/L) after the 60-h experiment. The error bar indicates the standard deviation.

Table 1 | Inhibition percentage of AO caused by AgNPs and Ag⁺

Microorganism	Silver species and concentration	Inhibition percentage of AO (%)	Reference
BA-entrapped nitrifying sludge	AgNPs at 10 mg/L	20.8	This study
BA-entrapped nitrifying sludge	Ag ⁺ at 0.1 mg/L	15.0	This study
Free nitrifying sludge	AgNPs at 10 mg/L	63.3	Giao <i>et al.</i> (2017)
Free nitrifying sludge	Ag ⁺ at 0.1 mg/L	75.3	Giao <i>et al.</i> (2017)
Calcium alginate-entrapped nitrifying sludge	AgNPs at 5 mg/L	19.0–35.0	Siripattanakul-Ratpukdi <i>et al.</i> (2014)
PVA-entrapped nitrifying sludge	AgNPs at 1 mg/L	18.0–95.0	Siripattanakul-Ratpukdi <i>et al.</i> (2014)
Free nitrifying sludge	Ag ⁺ at 1 mg/L	13.5	Liang <i>et al.</i> (2010)
Free nitrifying sludge	AgNPs at 1 mg/L	41.4	Liang <i>et al.</i> (2010)
Free nitrifying sludge	AgNPs at 1 mg/L	100.0	Choi <i>et al.</i> (2009)

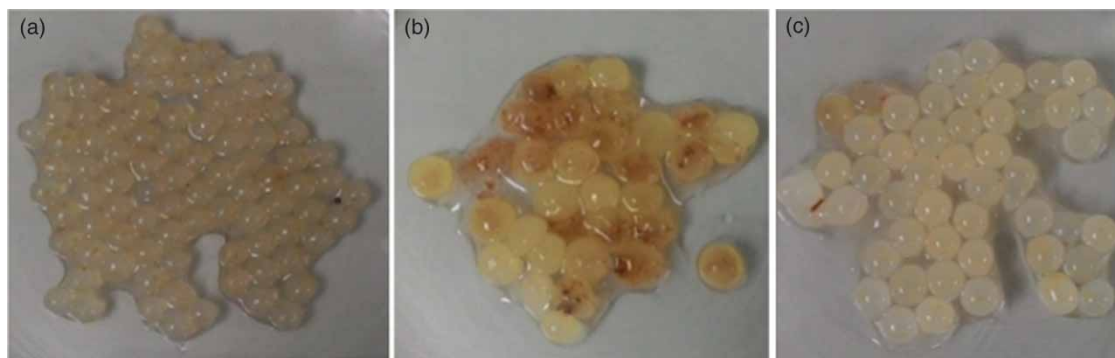
microbial cells resulting better AO by the entrapped cells. Figure 2 clearly shows that AgNPs at 10 mg/L and Ag⁺ at 0.10 mg/L (represented liberated dissolved silver from AgNPs) partially inhibited AO of the BA-entrapped cells by 25.4 and 19.4%, the PVA-entrapped cells by 37.0 and 38.2%, and the PVA-BA-entrapped cells by 20.7 and 30.4%, respectively. The result revealed that the BA and PVA-BA-entrapped cells performed better than the PVA-entrapped cells. The different entrapment materials produced different gel structures resulting in altered AO inhibition. When compared to the result of free cells reported previously, inhibition percentages of AO by AgNPs at 10 mg/L and Ag⁺ at 0.10 mg/L were 63.3% and 75.3%, respectively (Table 1). The results clearly showed lower AO inhibition in the entrapped cell experiment.

We preliminarily monitored NO₂⁻ plus NO₃⁻-N concentration during the experiments as shown in Table S1 (in supplementary material, available online). The result stated that the entrapment material (BA) did not show the ammonia removal and nitrite plus nitrate production. Nitrite plus nitrate accumulated in all tests with microbial cells under

the presence or the absence of silver. However, it was obvious that silver influenced AO and nitrite plus nitrate production. At AgNPs 10 mg/L and Ag⁺ 0.10 mg/L, inhibition of nitrite plus nitrate production was 41% and 56%, respectively.

Durability of entrapped cells

In this sub-section, the stability of the entrapped cell beads was the focus. Only the durability of the entrapped beads after 30 days of exposure to AgNPs and Ag⁺ was observed. Figure 3 preliminarily indicates the durability of the gel beads. During the experiment, damaged beads were quantified based on bead swelling and abrasion compared to beads at the beginning. After 30 days, no damaged BA beads (0%) were observed while the PVA (56%) and PVA-BA (10%) beads were obviously swollen and damaged. This phenomenon was also reported in a previous study (Bach & Dinh 2014). The PVA beads deformed because of the hydrophilic nature. The cross-linking of PVA and boric acid could be reversed, resulting in bead swelling. The results revealed that the addition of

**Figure 3** | Sludge entrapped in (a) BA, (b) PVA, and (c) PVA-BA after shaking for 30 days at 200 rpm with AgNPs at 10 mg/L.

BA into the PVA gel could improve stability in SWW. This result was in line with other studies that showed that a combination of PVA and BA led to higher stability and storage longevity of the produced gel beads (Paul & Vignais 1980; Liu *et al.* 2012). Among the cell entrapment techniques, the BA-entrapped cells were the most stable beads. Similarly, a previous study reported that BA had high gel strength and flexibility (Taweetanawanit *et al.* 2017). The BA-entrapped cells were stable during long-term operation and supported the growth of the entrapped microbes (Siripattanakul-Ratpukdi & Tongkiliang 2012).

The cell viability assay (after the 60-h experiment), based on bacterial cell membrane damage is shown in Figure 4. The proportions of dead cells between the free cells (collected directly from the enriching reactor) and the controlled BA- and PVA-entrapped cells (entrapped cells without AgNPs or Ag⁺ exposure) were insignificantly different ($p > 0.05$). The result revealed that BA and PVA were not toxic to bacterial cells. Prior studies reported that BA and PVA were not harmful to microbes (Siripattanakul & Khan 2010; Wadhawan *et al.* 2011; Vecchiadini *et al.* 2015).

Conversely, the percentage of dead cells from the PVA-BA-entrapped cell test (no silver) was significantly higher than free cells ($p < 0.05$). As discussed earlier, BA and PVA are non-toxic to microbial cells, and likewise the mixture of PVA-BA should not cause toxicity to the entrapped cells. The damaged cells in the PVA-BA test might be due to the viscosity of the material (PVA-BA) resulting in less diffusion of oxygen and ammonia (substrate) into the beads. Among the entrapped cells, BA was the most promising entrapment material for mitigation of the toxicity of

AgNPs and Ag⁺. The BA matrix promoted high treatment performance (low inhibition) and cell viability.

Kinetics of AO by BA-entrapped cells

The kinetics of AO from the BA-entrapped cells are demonstrated in Figure 5. Table 2 is a summary of the AO kinetic parameters. Figure 5 shows that the experimental results well fitted Monod model. Under absence of silver, self-substrate inhibition did not occur, resulting in the steady specific AO rates for the tests with NH₄⁺ higher than 100 mg/L. Based on free ammonia calculation, only 0.56 mg/L free ammonia may form (Anthonisen *et al.* 1976). Free ammonia of 10–150 mg/L could inhibit AO. At the concentration related to this study, no inhibition by free ammonia would take place. The result from this study revealed that the tested NH₄⁺ concentrations (0–180 mg-N/L) did not show adverse effect from nitrogenous species.

Results from the tests with no silver indicated that the entrapped cell system encountered the substrate diffusion problem resulting in much lower q_{\max} values compared to that of the free cells. Under the presence of silver, both K'_s and q'_{\max} values of the free cell systems were much lower than those without silver. This result implied that inhibitors (AgNPs or Ag⁺) obviously influenced AO in the free cell system. The entrapped cell tests with silver (both species) had similar kinetic parameter values (Table 2). This highlights the success of the cell entrapment application for reducing AgNPs and liberated Ag⁺ toxicity. Table 1 confirms that the entrapped cells reduced the influence of AgNPs and Ag⁺ by three and five times, respectively, as compared to those from the suspended cells at the same conditions.

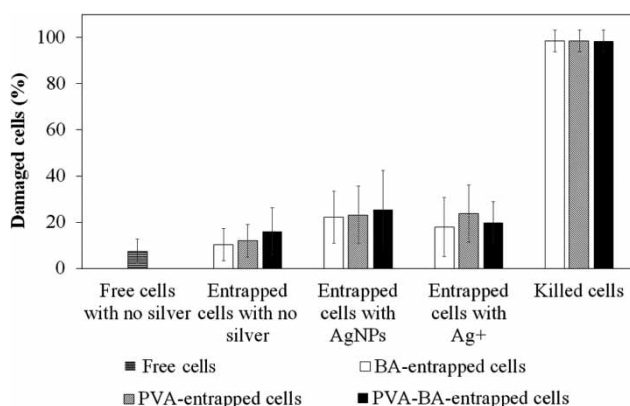


Figure 4 | Percentage of damaged cells from the tests with non-inhibited free cells (free cells with no Ag), non-inhibited entrapped cells (entrapped cells with no Ag), inhibited entrapped cells by 10 mg/L of AgNPs (entrapped cells with AgNPs) and 0.1 mg/L of Ag⁺ (entrapped cells with Ag⁺). Error bars indicate the standard deviation.

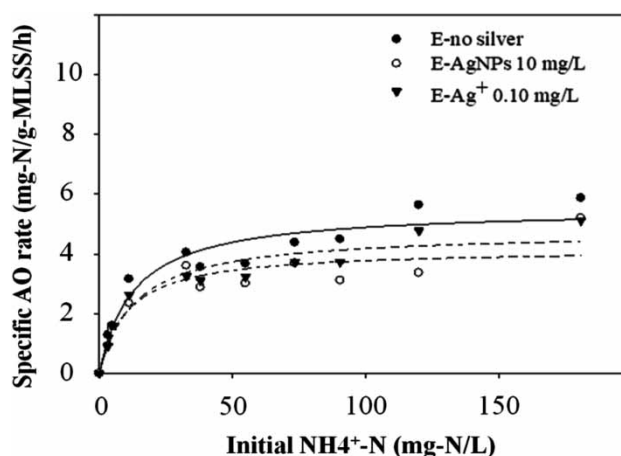


Figure 5 | Kinetics of AO by the nitrifying sludge entrapped in BA with no silver (•), AgNPs at 10 mg/L (○), and Ag⁺ at 0.1 mg/L (▼).

Table 2 | AO kinetic parameters under the absence and presence of silver

Cell mode	Silver species and concentration	Kinetic parameters	
Test with no silver		K_s (mg/L)	q_{\max} (mg-N/g-MLSS · h)
Free cells	No silver	17.8 ^a	12.8 ^a
BA-entrapped cells	No silver	12.9	5.6
Test with silver		K'_s (mg/L)	q'_{\max} (mg-N/g-MLSS · h)
Free cells	AgNPs at 10 mg/L	3.3 ^a	3.3 ^a
	Ag ⁺ at 0.1 mg/L	3.7 ^a	1.3 ^a
BA-entrapped cells	AgNPs at 10 mg/L	10.5	4.2
	Ag ⁺ at 0.1 mg/L	13.4	4.8

^aResults from Giao *et al.* (2017).

Microscopic observation of BA-entrapped cells

Figure 6 presents SEM images of the BA-entrapped cells. As shown in Figure 5(a) and 5(b), several micro-colonies laid on the BA-matrices. A previous study indicated that cross-linking between barium and alginate created a dense network

with an abundance of fine pores (Siripattanakul-Ratpukdi & Tongkiliang 2012). This study also found numerous small pores (Figure 6(c)). The pore sizes ranged from 0.1 to 0.3 µm, which were much smaller than the single cells (1–2 µm), resulting in no micro-colonies in the pores. The small porous structure was related to the low maximum

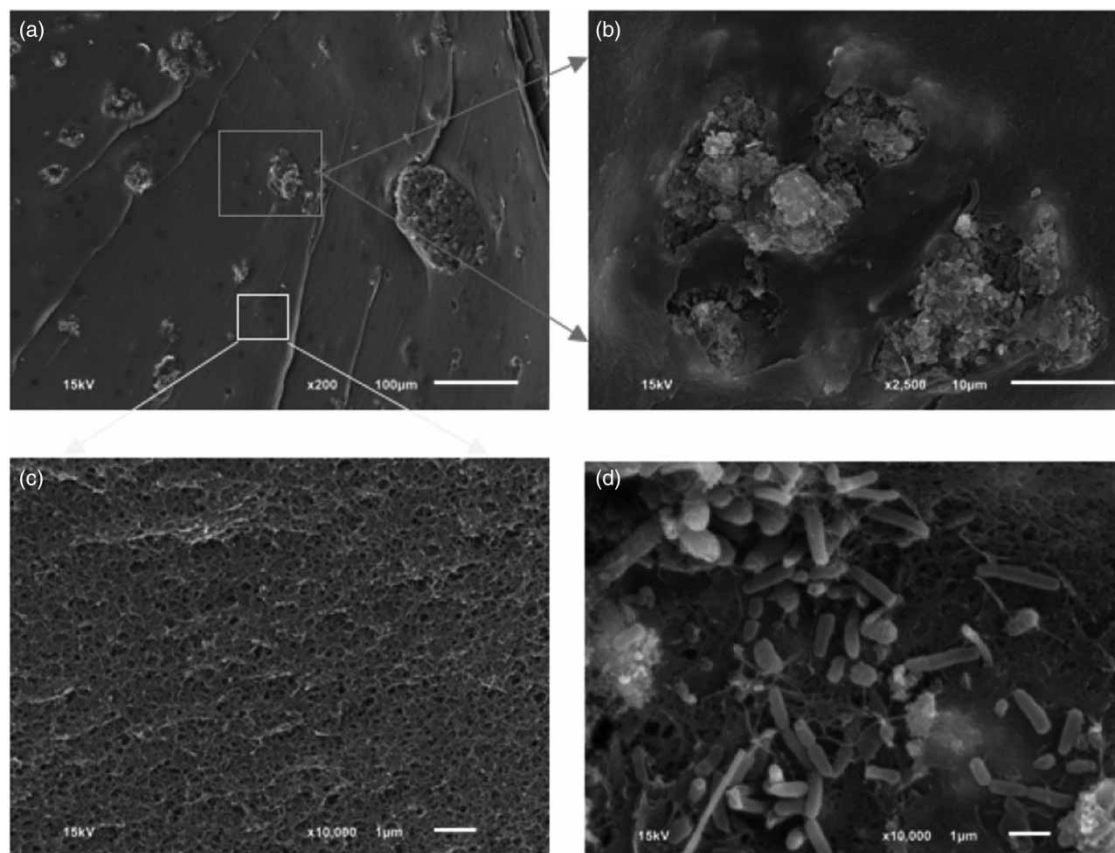


Figure 6 | SEM micrographs for observation of BA-entrapped cells after 60 h of exposure to AgNPs at 10 mg/L. (a) Cross-section of the BA-entrapped beads with several colonies of cells found in the BA matrices, observed at 200 ×. (b) Microbial cells were surrounded by BA-matrices, observed at 2,500 ×. (c) The microporous structures formed by ionic-cross linking between alginate and barium ions. The sizes of the pores were estimated as 0.1–0.3 µm, observed at 10,000 ×. (d) A cluster of cells with long- (majority) and short-rod (minority) shapes, observed at 10,000 ×.

AO rates found in the kinetic experiment of the entrapped cells. This structure was torturous for the substrate to reach the microbial cells inside the BA beads. The dense structure protected the cells from silver species, leading to similar AO rates in the experiments by the entrapped cells under absence and presence of silver species.

It was noted by Giao et al. (2017) that the microbial cells changed from long rod-shaped to shorter rod-shaped in the presence of AgNPs. In this study, most of the cells remained long rod-shaped (Figure 6(d)). This could primarily indicate that the microbial cells were not stressed from the toxic substance; therefore, cell morphological adaptation was not observed. During SEM observation, element (silver) analysis using an EDX technique was also performed. In the entrapped cell experiment, silver clusters were not detected inside the beads. This confirmed that the entrapment matrices reduced AgNPs and liberated Ag⁺ transporting into the beads.

CONCLUSION

The entrapment materials, including BA, PVA, and PVA-BA, were non-toxic to microbial cells. In the short-term AO test, BA was the most promising entrapment material for reduction of AgNPs and Ag⁺ toxicity. The inhibitory kinetics results showed that the cells entrapped in BA maintained high microbial cell viability (approximately 20% dead cells) and AO up to 90% in the presence of AgNPs or Ag⁺. The kinetic parameters confirmed low influence of AgNPs and Ag⁺ on AO by the entrapped cells. Microscopic observation of the entrapped cells suggested that the porous structure of matrices limited penetration of silver, resulting in lower cell damage and AO inhibition. Future study on the long-term impact of AgNPs and Ag⁺ on AO activity and microbial community change in entrapped cells should be investigated.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge financial and equipment support from the Research Center for Environmental and Hazardous Substance Management (Khon Kaen University) and Research Career Development Grant RSA6080054 (Thailand Research Fund (TRF) and Khon Kaen University). This work was supported by the National Nanotechnology Center (NANOTEC), NSTDA, Ministry of Science and Technology, Thailand, through its program of Research Network NANOTEC (RNN). 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 grant agencies.

REFERENCES

- Ahrari, F., Eslami, N., Rajabi, O., Ghazvini, K. & Barati, S. 2015 The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes. *Dental Research Journal* **12** (1), 44–49.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S. & Srinath, E. G. 1976 Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **48** (5), 835–852.
- Bach, L. T. & Dinh, P. V. 2014 Immobilized bacteria by using PVA (polyvinyl alcohol) crosslinked with sodium sulfate. *International Journal of Science and Engineering (IJSE)* **7** (1), 41–47.
- Bai, Y., Sun, Q., Wen, D. & Tang, X. 2012 Abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in industrial and domestic wastewater treatment systems. *FEMS Microbiology Ecology* **80** (2), 323–330.
- Bower, C. E. & Holm-Hansen, T. 1980 A salicylate-hypochlorite method for determining ammonia in seawater. *Fishery and Aquaculture Science* **37**, 794–798.
- Chaiprapat, S. & Sdoodee, S. 2007 Effects of wastewater recycling from natural rubber smoked sheet production on economic crops in southern Thailand. *Resources, Conservation and Recycling* **51**, 577–590.
- Choi, O., Deng, K. K., Kim, N. J., Ross, J., Surampallie, R. Y. & Hua, Z. 2008 The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* **42**, 3066–3074.
- 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.
- Chopra, I. 2007 The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**, 587–590.
- Giao, N. T., Limpiyakorn, T., Kunapongkiti, P., Thuptimrang, P. & Siripattanakul-Ratpukdi, S. 2017 Influence of silver nanoparticles and liberated silver ions on nitrifying sludge: ammonia oxidation inhibitory kinetics and mechanism. *Environmental Science and Pollution Research* **24** (10), 9229–9240.
- 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.
- Hu, J. & Yang, Q. 2015 Microbial degradation of di-N-butylphthalate by *Micrococcus* sp. immobilized with polyvinyl alcohol. *Desalination and Water Treatment* **56**, 2457–2463.

- Jeong, E., Chae, S. R., Kang, S. T. & Shin, H. S. 2012 Effects of silver nanoparticles on biological nitrogen removal processes. *Water Science and Technology* **65** (7), 1298–1303.
- Le, P. T. T. & Boyd, C. E. 2012 Comparison of phenate and salicylate methods for determination of total ammonia nitrogen in freshwater and saline water. *Journal of the World Aquaculture Society* **43** (6), 885–889.
- Li, L., Hartmann, G., Döblinger, M. & Schuster, M. 2013 Quantification of nanoscale silver particles removal and release from municipal wastewater treatment plants in Germany. *Environmental Science and Technology* **47**, 7317–7323.
- Liang, Z., Das, A. & Hu, Z. 2010 Bacterial response to a shock load of nanosilver in an activated sludge treatment system. *Water Research* **44**, 5432–5438.
- Limpiyakorn, T., Shinohara, Y., Kurisu, F. & Yagi, O. 2005 Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS Microbiology Ecology* **54** (2), 205–217.
- Liu, Z.-Q., Zhou, M., Zhang, X.-H., Xu, J.-M., Xue, Y.-P. & Zheng, Y.-G. 2012 Biosynthesis of iminodiacetic acid from iminodiacetonitrile by immobilized recombinant *Escherichia coli* harboring nitrilase. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **22**, 35–47.
- Lucchesi, G. I., Bergero, M. F., Boeris, P. S., López, G. A., Heredia, R. M. & Liffourrena, A. S. 2015 Immobilization of *P. putida* a (ATCC 12633) cells using Ca-alginate: environmental applications for the removal of cationic surfactants pollutants in industrial wastewater. *Alginic Acid: Chemical Structure, Uses and Health Benefits* **2015**, 105–118.
- 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**, 115–121.
- Pantic, I. 2014 Application of silver nanoparticles in experimental physiology and clinical medicine: current status and future prospects. *Reviews on Advanced Materials Science* **2014** (37), 15–19.
- Paul, F. & Vignais, P. M. 1980 Photophosphorylation in bacterial chromatophores entrapped in alginate gel: improvement of the physical and biochemical properties of gel beads with barium as gel-inducing agent. *Enzyme and Microbial Technology* **2** (4), 281–287.
- Saez, J. M., Benimeli, C. S. & Amoroso, M. J. 2012 Lindane removal by pure and mixed cultures of immobilized actinobacteria. *Chemosphere* **89**, 982–987.
- Siripattanakul, S. & Khan, E. 2010 Fundamentals and applications of entrapped cell bioaugmentation for contaminant removal. *Emerging Environmental Technologies* **2**, 147–170.
- Siripattanakul-Ratpukdi, S. 2012 Entrapped cell system for decentralized hospital wastewater treatment: inhibitory effect of disinfectants. *Environmental Technology* **33** (20), 2319–2328.
- Siripattanakul-Ratpukdi, S. & Tongkiliang, T. 2012 Municipal wastewater treatment using barium alginate entrapped activated sludge: adjustment of utilization conditions. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* **3** (5), 328–332.
- Siripattanakul-Ratpukdi, S., Ploychankul, C., Limpiyakorn, T., Vangnai, A. S., Rongsayamanont, C. & Khan, E. 2014 Mitigation of nitrification inhibition by silver nanoparticles using cell entrapment technique. *Journal of Nanoparticle Research* **16**, 2218.
- Taweetanawanit, P., Radpukdee, T., Giao, N. T. & Siripattanakul-Ratpukdi, S. 2017 Mechanical and chemical stabilities of barium alginate gel: influence of chemical concentrations. *Key Engineering Materials* **718**, 62–66.
- Vecchiattini, R., Penolazzi, L., Lambertini, E., Angelozzi, M., Morganti, C., Mazzitelli, S., Trombelli, L., Nastruzzi, C. & Piva, R. 2015 Effect of dynamic three-dimensional culture on osteogenic potential of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells entrapped in alginate microbeads. *Journal of Periodontal Research* **50** (4), 544–553.
- Wadhawan, T., Maruska, Z. B., Siripattanakul, S., Hill, C. B., Gupta, A., Prüb, B. M., McEvoy, J. M. & Khan, E. 2011 A new method to determine initial viability of entrapped cells using fluorescent nucleic acid staining. *Bioresource Technology* **102**, 1622–1627.
- Wu, K.-Y. A. & Wisecarver, K. D. 1992 Cell immobilization using PVA crosslinked with boric acid. *Biotechnology and Bioengineering* **39**, 447–449.



Simultaneous manganese adsorption and biotransformation by *Streptomyces violaceus* strain SBP1 cell-immobilized biochar

Atcharaporn Youngwilai^a, Pinit Kidkhunthod^b, Nichada Jearanaikoon^b, Jitrin Chaiprapa^b, Nontipa Supanchaiyamat^c, Andrew J. Hunt^c, Yuvarat Ngernyen^d, Thunyalux Ratpukdi^{a,e}, Eakalak Khan^f, Sumana Siripattanakul-Ratpukdi^{a,e,*}

^a Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering and Research Center for Environmental and Hazardous Substance Management, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^b Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

^c Materials Chemistry Research Center, Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^d Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

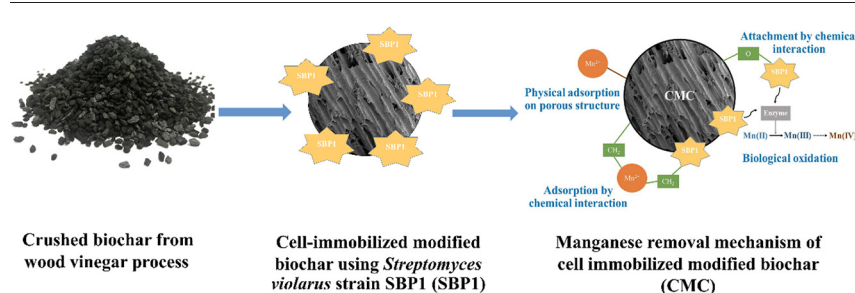
^e Center of Excellence on Hazardous Substance Management (HSM), Bangkok 10330, Thailand

^f Department of Civil and Environmental Engineering and Construction, University of Nevada, Las Vegas, NV 89154, USA

HIGHLIGHTS

- Cell-immobilized biochar removed manganese well (up to 78%).
- Biochar adsorbed Mn (II) and immobilized cells oxidized Mn (II) to Mn (III).
- Biochar adsorbed manganese for 34–63%.
- Manganese adsorption isotherm followed both Langmuir and Freundlich models.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2019

Received in revised form 27 December 2019

Accepted 13 January 2020

Available online 15 January 2020

Editor: Daniel CW Tsang

Keywords:

Biochar

Cell immobilization

Micro X-ray fluorescence spectroscopy

X-ray absorption near edge structure

Wood pyrolysis

ABSTRACT

Consumption of water containing high proportions of manganese could cause Parkinson's like symptoms and damage the central nervous systems. This study aims to investigate the potential of manganese removal through the development of microbial cell-immobilized biochar. The wood vinegar industry generates a large volume of carbonized wood waste (natural biochar) from the pyrolytic process. This is the first investigation utilizing this low value waste combined with biological treatment for water purification. Raw and hydrogen peroxide-modified biochars were used to immobilize an effective manganese-oxidizing bacterium, *Streptomyces violaceus* strain SBP1 (SBP1). The results demonstrated that the modified biochar had a higher proportion of oxygen-containing functional groups leading to better manganese removal. Manganese adsorption by the modified biochar fitted pseudo-second-order and Langmuir models with the maximum adsorption capacity of 1.15 mg g^{-1} . The modified biochar with SBP1 provided the highest removal efficiency at 78%. The advanced synchrotron analyses demonstrated that manganese removal by the biochar with SBP1 is due to the synergistic combination of manganese adsorption by biochars and biological oxidation by SBP1.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University, 123 Mittapap Road, Muang District, Khon Kaen 40002, Thailand.
E-mail address: sumana.r@kku.ac.th (S. Siripattanakul-Ratpukdi).

1. Introduction

Among metallic contaminants, iron and manganese frequently enter water treatment systems and are generally removed by aeration or chemical oxidation (Kouzbou et al., 2017). In practice, soluble manganese is much more difficult to oxidize than iron and needs a higher dose of oxidants (oxygen by aeration, chlorine, or potassium permanganate). This leads to manganese in concentrations up to a milligram per liter remained in the water supply and within drinking water (Abdel-Satar et al., 2017; Gutiérrez et al., 2008). The Safe Drinking Water Act sets the secondary standard for manganese at 0.05 mg L^{-1} . Manganese contamination leads to discolored water, rusted pipes, and clogged plumbing (Tekerekopoulou et al., 2008). High levels of exposure to manganese could create problems for the nervous systems, brain development issues for infants, and lead to Parkinson's like symptoms (Patil et al., 2016). High levels of manganese exposure in children caused learning difficulties such as hyperactivity, pervasive development disorder, and memory issues. Therefore, an alternative technology for manganese removal is needed.

Water filtration using commercial granular activated carbon (GAC) is widely applied to adsorb metallic constituents in water (Babi et al., 2007; Hijnen et al., 2010; Hoslett et al., 2018; Mondal et al., 2007). In practice, biological enhanced GAC filtration (called biological activated carbon (BAC) filtration) is also broadly utilized because of its superior performance and eco-friendly credentials in water treatment (Srivastava and Majumder, 2008). Filtration by BAC integrates adsorption, biotransformation, and physical particle separation in the filter bed. BAC could increase contaminant removal by up to 400% and prolong breakthrough by four times, as compared to GAC (Dianati-Tilaki and Mahmood, 2004). Manganese removal by the BAC system has been studied extensively (Tekerekopoulou et al., 2013; Zhu et al., 2010). Greenstein et al. (2018) achieved successful manganese removal by pilot BAC (>90%). However, the relatively high cost of GAC (or BAC) for water purification (1100–1700 USD for 1 ton of GAC) (Thompson et al., 2016) is a major limitation for BAC technology particularly in developing countries. Therefore, a low cost and environmentally friendly biological filter medium/sorbent is required.

Biochar is a potential alternative since it has a similar adsorption behavior to GAC and could be used to treat trace toxic contaminants in water such as copper, chromium, zinc, arsenic, and phosphate (Rajapaksha et al., 2018; Sun et al., 2019; Vikrant et al., 2018). Biochar has a large pore volume with various surface functionalities. In particular, biochar has a negative charged surface, so it is useful for treating metals, such as copper, nickel, and cadmium (Xu et al., 2013; Xue et al., 2012). It was reported to have 1.4 to 3.1 times lower production cost and to produce less air pollution compared to GAC (Thompson et al., 2016). Biochar is simply produced from biomass carbonization of woods, manures, and agricultural residues under oxygen-limited conditions (Gwenzi et al., 2015). Biochar has been used in various environmental and agricultural applications, such as enhancing plant growth, crop production yield, plant root development, and increasing nutrient availability (Kavitha et al., 2018). To date, no study has focused on the use of natural carbonized by-products from the production of value-added products within the agro-industries, such as bio-oil or wood vinegar productions (Hawash et al., 2017). The wood vinegar industry created a large volume of carbonized wood waste (approximately 20% by raw material weight) (Sangsuk et al., 2018). This biochar contained abundant surface functionalities, high porosity, and significant mineral contents, which promote its use for higher value applications or as a resource for advanced functionalized materials.

A key target for this investigation is the study of manganese removal potential by biochar from the wood vinegar production replacing typical BAC. This study also focused on the enhancement of biochar for water treatment systems. Biochar was modified using hydrogen-peroxide treatment to modify the surface functionality (Vinh et al., 2015; Idrees et al., 2018). To stimulate manganese removal as BAC, a

previously isolated manganese-oxidizing bacterium, *Streptomyces violaceus* strain SBP1, was immobilized as a biofilm on a filter medium (called cell-immobilized biochars).

This study included manganese adsorption kinetics, isotherms, and thermodynamics of the biochar and modified biochar. The performance of the biochars and cell-immobilized biochars were investigated for the removal of manganese. Microscopic and spectroscopic approaches were used to determine the micro-structure of the materials and also postulate potential removal mechanism for manganese by biochars and cell-immobilized biochars. The biochar would adsorb dissolved manganese (Mn^{2+}) while the microbial cells could oxidize dissolved manganese to particulate (Mn^{3+} and/or Mn^{4+}). Characterization was achieved through the use of the following instruments: Fourier transform infrared spectrometer (FTIR), a field emission scanning electron microscope coupled with focused gallium ion beam (FIB-FESEM), X-ray absorption (XAS), and micro-X-ray fluorescence (μXRF) spectroscopic techniques. This work provides the first direct evidence of manganese adsorption distribution and manganese speciation on the biochar using advanced synchrotron (XAS and μXRF) techniques. It elucidates the effectiveness of the manganese removal mechanism by the cell-immobilized biochar.

2. Materials and methods

2.1. Raw and modified biochar production

Raw wood vinegar-production-wasted biochar (BC) was obtained from a wood vinegar production factory in Ubonratchathani, Thailand. Fifteen thousand kilograms of eucalyptus leaves (30–50 cm long) were baked in a carbonization dome kiln under an oxygen-limited condition. The temperature in the kiln was slowly ramped from 300 to 800 °C in 10 days, controlled at 800 °C for 10 days, and slowly cooled down until reaching ambient temperature in 20 days. The BC was crushed and sieved to particle sizes of 2–4 mm. The BC was washed with de-ionized water four times. After that, the BC was oven-dried at 80 °C for 24 h. To preliminarily verify adsorbent, the specific surface area of BC was measured using an automatic volumetric sorption analyzer (Autosorb-1, Quantachrome, USA) at $-196 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (77 K) and interpreted using the Brunner-Emmer-Teller (BET) equation. The surface area of BC was $75 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

Modified biochar (MC) was prepared using H_2O_2 modification (Xue et al., 2012). Three grams of BC was soaked in 20 mL of a 10% (w/w) peroxide (H_2O_2) solution for 2 h at room temperature ($30 \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Then, the soaked biochar was rinsed with de-ionized water and oven-dried at 80 °C for 24 h.

2.2. Material characterization

Materials (the biochars with or without immobilized cells) were characterized for elemental contents, surface functional groups, and micro-structural morphology. Also, manganese oxidation states and manganese distribution on materials were determined. Elemental contents including carbon (C), hydrogen (H), and nitrogen (N) were measured using a CHN elemental analyzer (PE-2400II, Perkin-Elmer, USA). Ash content was measured by residual weight after heating at 800 °C for 4 h in a muffle furnace (Gao et al., 2019). The oxygen (O) content was calculated by mass difference (Munda et al., 2016). Surface functional groups were conducted using FTIR (Tensor 27, Bruker, USA). Micro-structural morphological images of BC and MC were obtained using a FIB-FESEM (Thermo Fisher, USA).

Manganese oxidation states on BC and MC (with and without the immobilized cells) were analyzed using XAS. The X-ray absorption near edge structure (XANES) technique was determined at BL5.2: SUT-NANOTEC-SLRI XAS Beamline SLRI, Thailand (Kidkhunthod, 2017; Klysubun et al., 2017). The samples were detected in a fluorescence mode. Athena programs by the IFEFFIT package were used for

background correction, normalization, and fitting the XANES data. Manganese distributions in biochar and biochar with immobilized cells before and after treatment were observed using the μ -XRF technique. The longitudinal section of biochar sample was prepared and the cross-section from one half was used for μ XRF mapping. The experiments were conducted at beamline BL6b, Synchrotron Light Research Institute (SLRI), Thailand. A Polychromatic X-ray beam with the energy of 2–12 KeV from the bending magnet was focused by a poly-capillary half lens to achieve a beam size of 30 μ m at the sample position. A 2 mm \times 2 mm area of each sample was raster scanned (in air) with a step size of 30 μ m in both X and Y directions and a dwell time of 30 s per point. The vortex silicon drift detector (with a resolution of 160 eV) was used to detect X-ray fluorescence yield from the sample. Spectra obtained were then processed by PyMCA software to create distribution mapping of manganese in the samples (Solé et al., 2007).

2.3. Bacterium, bacterial medium, and synthesized manganese-contaminated water

Streptomyces violaceus strain SBP1 (GenBank is MK212369) was previously isolated for manganese oxidation (Therdkiattikul et al., 2018). Bacterial medium consisted of $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.015 g L^{-1} , 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 2.383 g L^{-1} , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g L^{-1} , peptone 1 g L^{-1} , and yeast extract 0.25 g L^{-1} in de-ionized water 1 L. Test water was synthesized from $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.015 g L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0002 g L^{-1} , D-glucose 0.0015 g L^{-1} , peptone 0.01 g L^{-1} , and yeast extract 0.005 g L^{-1} . This formulation simulated raw water for water treatment as modified from Gai and Kim (2008). Manganese concentration of 3 mg L^{-1} in the synthesized water was selected based on high manganese level in natural groundwater (Meyer et al., 2017).

2.4. Manganese adsorption by biochar and modified biochar

Experiments were performed in triplicate to determine manganese adsorption kinetics, isotherm, and thermodynamics of BC and MC. Kinetic adsorption experiments were conducted in 500 mL Erlenmeyer flasks containing manganese solution 300 mL and BC or MC 0.6 g. The flask was shaken in an incubating shaker at 150 rpm and at temperatures of 20, 30, and 40 $^{\circ}\text{C}$ (293, 303, and 313 K) for 3 days. Water 5 mL was sampled periodically to measure remaining manganese concentration for 3 days. Pseudo-first-order and pseudo-second-order models were applied to interpret adsorption kinetics following Eqs. (1) and (2) while Q_e and Q_t (mg g^{-1}) are the adsorption capacities at equilibrium and time, respectively. k_1 (min^{-1}) and k_2 (g (mg/min) $^{-1}$) are the rate constants of the pseudo-first-order and pseudo-second-order models, respectively.

$$\ln (Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 t \quad (1)$$

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} t \quad (2)$$

Adsorption isotherm experiments were performed in triplicate. The experiment was done in a 250-mL Erlenmeyer flask containing the manganese solution (3 mg L^{-1}) 100 mL and BC or MC at adsorbent doses between 0.2 and 0.9 g. The flask was shaken in an incubating shaker at 150 rpm and temperatures of 20, 30, and 40 $^{\circ}\text{C}$ for 3 days. Water 5 mL was sampled periodically to measure remaining manganese concentration at equilibrium time (3 days). The Langmuir and Freundlich models were applied to estimate manganese adsorption isotherms following Eqs. (3) and (4), respectively. C_e (mg L^{-1}) is manganese concentration at equilibrium period. Q_m (mg g^{-1}), and K_L (L mg $^{-1}$) are the maximum adsorption capacity and Langmuir sorption constant, respectively. K_F ((mg g^{-1}) (mg L^{-1}) $^{-n}$) and n are Freundlich sorption constants which indicate sorption capacity and intensity,

respectively.

$$\frac{1}{Q_e} = \frac{1}{Q_m} + \frac{1}{K_L Q_m C_e} \quad (3)$$

$$\ln Q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (4)$$

The thermodynamics of manganese adsorption by BC and MC was unveiled by using Gibbs free energy (ΔG°), enthalpy (ΔH°), and entropy (ΔS°) following Eqs. (5) and (6). K_L is Langmuir sorption constant (L mol $^{-1}$). R (0.008314 kJ (mol \cdot K) $^{-1}$) is the gas constant and T (K) is temperature.

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_L \quad (5)$$

$$\ln K_L = \left(\frac{-\Delta H^{\circ}}{R} \right) \frac{1}{T} + \left(\frac{\Delta S^{\circ}}{R} \right) \quad (6)$$

2.5. Manganese removal by biochar and cell-immobilized biochar

Experiments described in this subsection focused on manganese removal by the cell-immobilized biochars compared to those by the biochars. They were performed in triplicate. They were divided into two sets. The first set was to investigate the optimum cell immobilization period on BC and MC. The second set was to determine manganese removal by the biochars and the cell-immobilized biochars.

2.5.1. Cell immobilization and investigation of immobilization period on BC and MC

SBP1 in the bacterial medium (100 mL) was centrifuged at 6000 rpm for 15 min. The concentrated SBP1 was inoculated into the fresh bacterial medium. The cell suspension was shaken at 150 rpm at room temperature (30 $^{\circ}\text{C}$) until cell growth reached an exponential growth phase (1 d). The cell suspension was centrifuged at 6000 rpm for 15 min and washed using 10 mM of a HEPES buffer solution. The washed SBP1 was re-suspended in the fresh bacterial medium. Cells in the medium (100 mL) were approximately 9×10^5 CFU mL $^{-1}$. The biochars (BC or MC) 10 g were added to the medium (with SBP1). The biochars were also added to the medium without bacterial cells as a control test. The cell suspension with the biochars was shaken at 150 rpm and room temperature (30 $^{\circ}\text{C}$) for 7 d to determine cell colonization on the biochars. Two pieces of the biochars (20 mg) were sampled once a day.

The biochars were washed HEPES twice. Then, the biochars were soaked in the bacterial medium of 2 mL for 3 min. SBP1 immobilizing on biochars were extracted by sonication (2 min) and vortex mixing (2 min, twice), respectively. The medium (with the extracted cells) 0.1 mL was sampled and plated. The plated sample was incubated at 35 $^{\circ}\text{C}$ for 48 h. The cell number was counted. The cell immobilization period was selected based on the estimated number of cells. It is noted that the cell-immobilized biochars at the selected period were washed using a HEPES buffer twice before further experimentation.

2.5.2. Determination of manganese removal by the biochars and cell-immobilized biochars: batch study

The biochars (BC and MC), cell-immobilized biochar (CBC), cell-immobilized modified biochar (CMC), or free cells (FC) were added to 300 mL of water containing manganese. The experiment was performed with the initial manganese concentration of 3 mg L^{-1} under various adsorbent doses (1.0, 1.5, and 2.0 g). The tests with FC (no adsorbent) and immobilized cells (CBC and CMC) contained SBP1 of 2, 3, and 4 $\times 10^4$ CFU mL $^{-1}$ (representing the cell numbers on biochars of 1.0, 1.5, and 2.0 g, respectively).

The quantity of the free cells varied, with an initial concentration of approximate 2×10^4 , 3×10^4 , and 4×10^4 CFU mL⁻¹, similar to the numbers of cells on CMC. All reactors (BC, MC, CBC, CMC, and FC) were shaken at 150 rpm at room temperature. Water was sampled for manganese monitoring at equilibrium (3–5 days). Biochars before and after the experiment were sampled to determine the manganese removal mechanism. Surface functional groups of the biochars (before and after the experiment) were examined using FTIR. Manganese oxidation states and distribution on the biochars (with and without the immobilized cells) were analyzed using XANES and μ XRF techniques.

2.6. Analytical procedures

For manganese measurement by atomic absorption spectrometer (AAS), the sample preparation and analysis were performed following Standard Method 3030 E (APHA et al., 2017). The sample (5 mL) was digested using nitric acid (conc., RCI labscan, Thailand) (5 mL) on a hot plate under a fume hood until reaching a sample volume of 5 mL, twice. The digested 5 mL sample was adjusted to 25 mL by de-ionized water and the manganese measured using AAS (Perkin-Elmer AAnalyst™ 800, Singapore).

For material characterization using the CHN elemental analyzer, FTIR, μ XRF, and XANES, the biochar was oven-dried at 80 °C for 4 h before instrumental analysis. For morphology analysis by FIB-FESEM, the biochar was washed with a HEPES solution of 10 mM for 30 min. Then, the biochar was fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in a HEPES solution of 10 mM overnight at 4 °C. After fixing, the biochars were dehydrated using a series of ethanol solutions at 30, 50, 70, and 90%, and absolute ethanol (20 min each). The dehydrated sample was dried using a critical point dryer and placed on a stub and gold coated before imaging.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of wood vinegar-wasted biochar and modified biochar

The chemical and physical properties of wood vinegar waste and modified biochars (BC and MC) are shown in Table 1. The hydrogen and nitrogen contents of BC and MC were similar, but MC (70.40%) had less carbon than BC (73.05%). The oxygen content of MC (23.79%) was higher than that of BC (21.13%). This suggests that H₂O₂ oxidized the carbon surfaces of BC, resulting in an increase of oxygen-containing surface functional groups. These could be carboxylic, lactone, and hydroxyl groups (Zuo et al., 2016). After H₂O₂ modification, the pH of biochar declined slightly from 6.07 to 5.95 (Table 1). This could be due to the change of surface functional groups. The FIB-FESEM results in Figs. 1a and b showed similar pore structures of BC and MC.

Typically, H₂O₂-modified biochar is expected to improve surface functional groups (Xue et al., 2012). This modification could increase oxygen-containing functional groups, which are the main metal adsorption sites. Surface functional group analysis using FTIR from this study was presented in the supplementary material. After modification, the FTIR of BC and MC were similar, but the intensities of the FTIR bands at 1375 cm⁻¹ increased, while the intensity of the band at 1423 cm⁻¹ decreased. These band changes (1375 and 1423 cm⁻¹) indicated increasing hydroxyl (O—H) and decreasing C—H (or C=C) bands from aromatic species, respectively (Cho et al., 2017). These bands are

known to correspond to adsorption sites. These results suggest a potential ability of this natural waste material as an adsorbent. Other oxygen-containing functional groups (such as carboxyl group) previously reported as adsorption sites, were not present in the materials developed in the current study (Wang and Liu, 2018; Zuo et al., 2016).

3.2. Adsorption experiment

3.2.1. Adsorption kinetics

The results of manganese adsorption on BC and MC are shown in Fig. 2. The adsorption (at the initial concentration 3 mg L⁻¹) occurred rapidly in the initial periods of 120 and 240 min for BC and MC, respectively. Following the initial period, manganese adsorption slowed down and reached a steady state after 2.5 d. It is noted that the manganese adsorption at higher initial concentration (10 mg L⁻¹) was preliminarily tested to investigate the manganese adsorption capacity. The results showed that manganese adsorption by BC quickly reached a plateau after 60 min with an equilibrium adsorption capacity of 0.65 mg g⁻¹ at 303 K. Higher initial contaminant concentrations resulted in shorter time to equilibrium and higher equilibrium adsorption capacities (Gao et al., 2019). The manganese ion was bound on the biochar surface through bulk diffusion, leading to rapid adsorption in the initial period. After which, the metal ion diffused into inner micro-pores of sorbent (Wang et al., 2018).

The equilibrium adsorption capacities of BC and MC were: 0.30 and 0.54 mg g⁻¹ at 293 K, 0.46 and 0.72 mg g⁻¹ at 303 K, and 0.54, and 0.81 mg g⁻¹ at 313 K, respectively. Increasing the temperature increased adsorption thermodynamics and adsorption capacity. As expected, H₂O₂ could enhance the manganese adsorption capacity of biochar, since it had more oxygen-containing functional groups (Xue et al., 2012). These acidic functional groups could enhance the ion exchange properties leading to increasing of metal adsorption (Vasu, 2008). To date, no reports have been published on manganese adsorption using biochar from the wood vinegar industry derived from wood chips. For metal adsorption, the wood vinegar biochars had different capacities (0.34 to 13.10 mg g⁻¹) depending on metals, raw materials, and biochar production methods (Chen et al., 2011; Mohan et al., 2007). The metal adsorption capacities from biochars reported in this study (0.30 to 0.81 mg g⁻¹) were comparable to those previously reported. In groundwater, the manganese concentration of <1 mg L⁻¹ is typically reported. These biochars had sufficient adsorption capacities to remove manganese to allowable concentration for water supply (0.3 mg L⁻¹).

The manganese adsorption kinetics of BC and MC was modeled using the pseudo-first- and pseudo-second-order reactions. The kinetic parameters are presented in the supplementary material. The experimental data were confirmed by both models ($R^2 > 0.93$ for all tests). Overall, the pseudo-second-order model ($R^2 = 0.97$ – 0.98) fit manganese adsorption kinetics for both BC and MC better than that of the pseudo-first-order model. This result was similar to a previous study on lead (II) adsorption kinetics (Wang and Liu, 2018). It was reported that lead adsorption by H₂O₂-modified biochar (derived from yak manure) fit the pseudo-second-order model. The pseudo-second-order reaction implied chemisorption and multiple adsorption mechanisms by BC and MC. The mechanism of adsorption consisted of multiple steps: 1) external surface diffusion, 2) intra-particle diffusion, and 3) interaction between adsorbate and active site. In this study, the external surface diffusion might not be the rate-determining step, because the solution was shaken.

3.2.2. Adsorption isotherms

To describe adsorption behavior, a manganese adsorption isotherm experiment was conducted. The Langmuir and Freundlich adsorption models were applied to the experimental data (Fig. 2). The manganese adsorption by BC and MC fit both the Langmuir model ($R^2 = 0.91$ – 0.97) and the Freundlich model ($R^2 = 0.89$ – 0.98). The phenomenon could be from tested manganese concentration. This study aimed to investigate

Table 1
Elemental composition and pH of biochars (BC and MC).

	Elemental composition (% mass based)				Ash (%)	pH
	C	H	O	N		
BC	73.05	3.33	21.13	0.66	1.83	6.07
MC	70.40	2.95	23.79	0.64	2.22	5.95

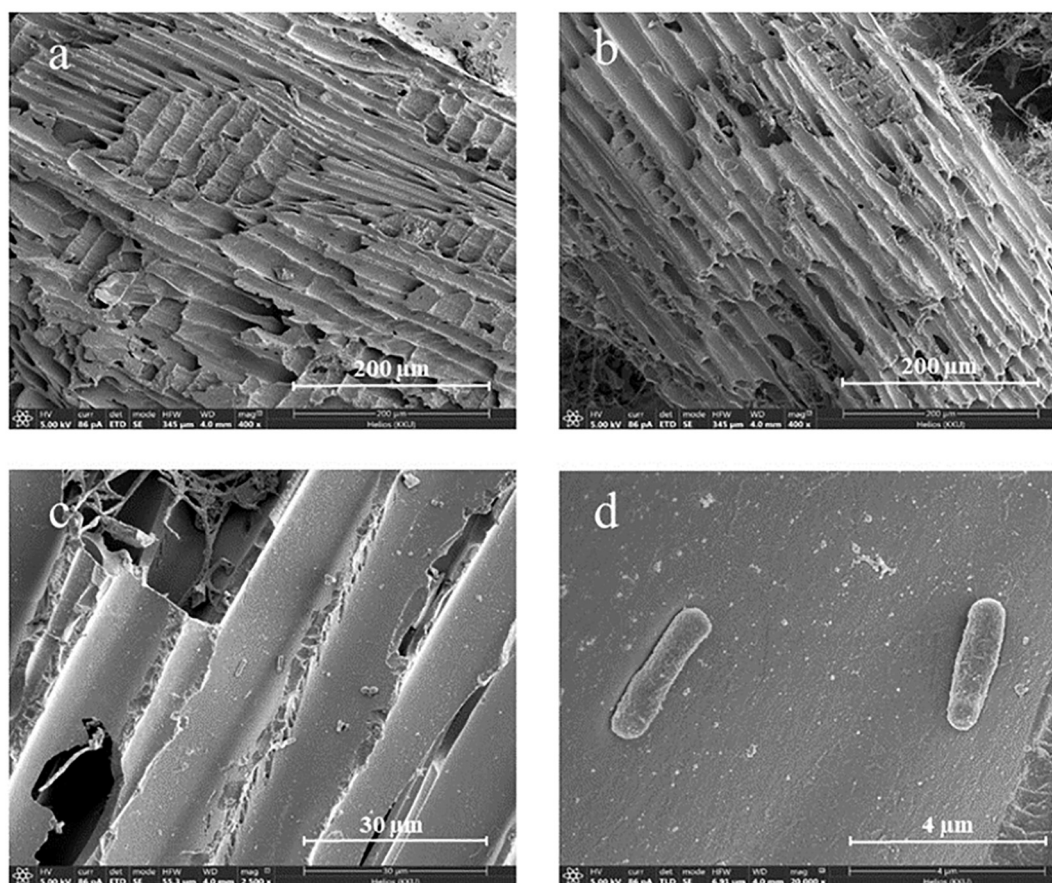


Fig. 1. FIB-FESEM images: (a) BC, (b) MC, and (c and d) SBP1 on biochar.

the potential of biochar for treating manganese in water treatment system. Low manganese concentration of 3 mg L^{-1} was selected to simulate the practical condition. This led to low C_e values for the entire experiment resulting in good fits for both models. Continued work under higher manganese concentrations should be performed for clearer modeling the manganese adsorption using the biochar for other applications. Based on the experimental Q_e ($Q_{e,\text{exp}}$) and the calculated Q_e from Langmuir and Freundlich models ($Q_{e,L}$ and $Q_{e,F}$), $Q_{e,\text{exp}}$ of the biochar better correlated to $Q_{e,L}$ than $Q_{e,F}$. Therefore, the manganese adsorption behavior was explained using Langmuir model. Results using Langmuir model indicated that manganese adsorption on BC and MC was by monolayer adsorption. All adsorption sites displayed equal manganese affinity. There is no interaction between adsorbate molecules (Foo and Hameed, 2010; Vijayaraghavan et al., 2006). Based on previous studies, inconsistencies in fitted adsorption models depended on sorbent, sorbate, and tested conditions (Gao et al., 2019; Wang et al., 2019).

For manganese adsorption capacity, the maximum adsorption capacities (Q_m) of BC and MC at 293, 303, and 313 K of Langmuir model were 0.38, 0.43, and 0.77 mg g^{-1} and 0.86, 1.04, and 1.15 mg g^{-1} , respectively. The result indicated that the maximum manganese adsorption capacities of MC were 1.5 to 2.4 times as much as those of BC because MC had different ratios of surface functional groups. According to the literature, the maximum manganese adsorption capacities by biochars varied based on raw materials, biochar production, and tested conditions (Emmanuel and Rao, 2008; Idrees et al., 2018). Biochars derived from dried fruit shell, poultry manure, and farmyard manure provided manganese adsorption capacities of 0.42, 2.84, and 6.65 mg g^{-1} , respectively. The manganese adsorption capacities by the waste biochar were comparable to previous studies and provide an efficient method for the utilization of wood vinegar waste. The manganese adsorption

capacity of the waste wood vinegar material demonstrates significant potential in water treatment applications. The modification of waste materials could be further refined to achieve greater adsorption capacities.

Overall, manganese removal of BC and MC was satisfactory. However, in practice, environmental factors, such as pH and co-existing toxic compounds and adsorbent reusability could influence manganese adsorption capability (Idrees et al., 2018; Shakya and Agarwal, 2019; Üçer et al., 2006). Previous studies suggested that higher pH led to better manganese adsorption performance because of lower competitive adsorption between H^+ and Mn^{2+} on negatively charged surface of adsorbent (Idrees et al., 2018). Presence of co-existing metals generated competitive adsorption resulting in lower manganese adsorption ability (Üçer et al., 2006). Further work is needed to investigate the effect of environmental factors and adsorbent reusability for practical manganese adsorption applications.

3.2.3. Thermodynamic study

The results of thermodynamic parameters for manganese adsorption on BC and MC at 293, 303, and 313 K are presented in Table 2. The Gibbs free energies for manganese adsorption by BC and MC at different temperatures were negative. This result suggested spontaneous manganese adsorption. The enthalpy values (ΔH°) for the adsorption by BC and MC were -17.38 and $20.27 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectively. The negative enthalpy value indicates that manganese adsorption on BC was exothermic, while the positive value specifies an endothermic process on MC. Moreover, ΔH° could refer to an attraction between manganese and the adsorbent. Theoretically, ΔH° values implied that van der Waals forces (4 to 10 kJ mol^{-1}), hydrogen bonding forces (2 to 40 kJ mol^{-1}), ligand exchange (40 kJ mol^{-1}), and chemical bonding forces (60 kJ mol^{-1}) were the main sorbate-sorbent attraction (Chaudhry

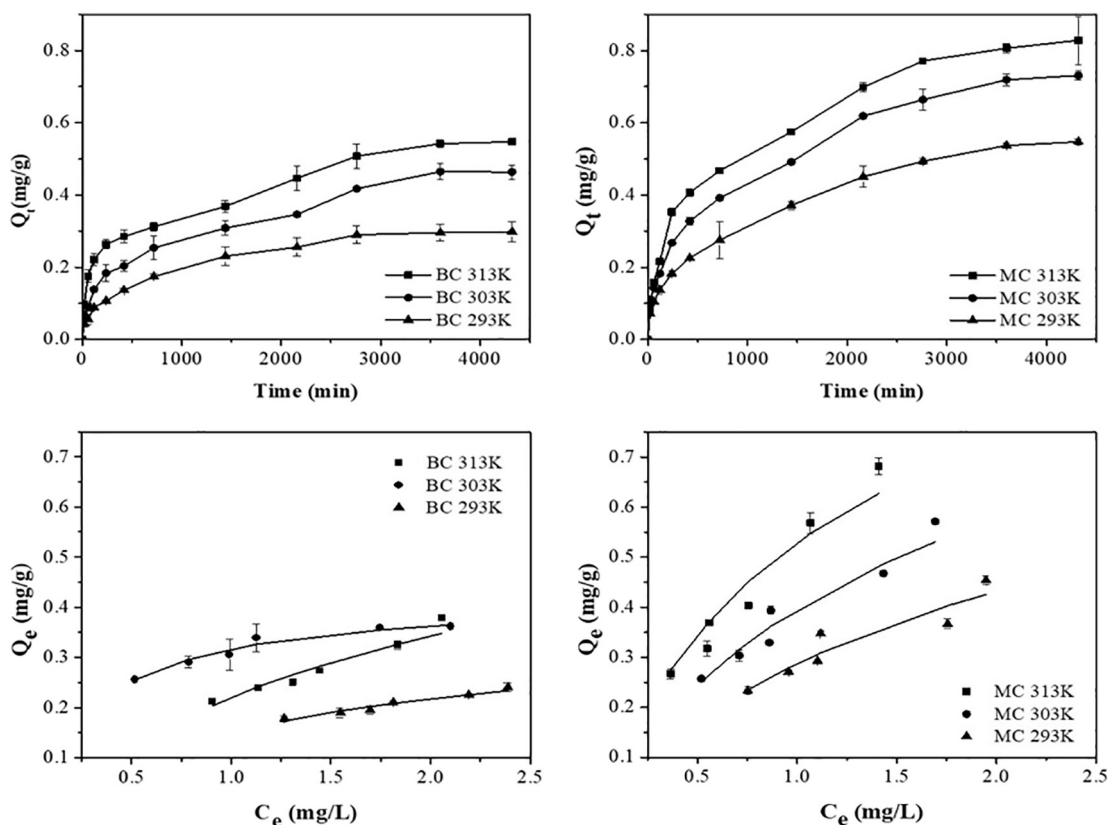


Fig. 2. Manganese adsorption kinetics and Langmuir adsorption isotherms by BC and MC.

et al., 2017). In this study, the manganese adsorption by BC and MC was governed by hydrogen bonding forces. This is similar to previous studies of metal (silver and arsenic) adsorption by biochars (Antunes et al., 2017; Vinh et al., 2015). The positive entropy values (ΔS°) implied the increasing of randomness at solid-solution interface on the active site of the biochar.

3.3. Manganese removal by biochar and cell-immobilized biochar

3.3.1. Cell immobilization period

For future application as a bio-filter, planktonic cells were colonized on the medium. One of the important factors affecting water treatment performance is the immobilized cell number (biofilm formation). The optimal cell immobilization period was investigated. BC (or MC) was mixed with bacterial medium containing SBP1 of 9×10^5 CFU mL⁻¹. The number of immobilized bacteria extracted from the biochars was shown in the supplementary material. Figs. 1c and d show the immobilized cells growing on both BC and MC surfaces.

Testing at 24 h showed that bacterial numbers from BC and MC were similar (2.8×10^5 CFU g⁻¹). Cell numbers became stable at 3 days. The immobilized cell number on MC (5.6×10^5 CFU g⁻¹ of biochar) on the

third day was twice as high as that on BC (2.8×10^5 CFU g⁻¹). The result was based on a combination of porosity, surface area, surface roughness, and surface charge, which is consistent with previous studies (Basu et al., 2016). The main role of the cell attachment on biochars should be further investigated. In a later experiment, the cell immobilization period of 3 days was selected to prepare CBC and CMC.

3.3.2. Manganese removal by the biochars and cell-immobilized biochars

Manganese removal experiments by the biochars and biochars with microbial cells (BC, MC, CBC, CMC, and FC) were performed. The manganese concentration decreased quickly in the initial period and reached a plateau after 3–5 days. Fig. 3 shows the manganese removal by BC and MC at different doses. Higher doses produced higher removal efficiencies. The free SBP1 cells removed manganese for 4.6–10.9%. Typically, manganese removal by free cells could be from biological oxidation and biosorption by the bacterial cells (Rosson and Neilson, 1982; Adams and Ghiorse, 1985; Burger et al., 2008). The result of the experiment with dead bacterial cells showed no significant manganese biosorption (data not shown).

Cell immobilization (CBC and CMC) exhibited a significant enhancement of manganese removal performance. The highest manganese removal was observed in these experiments by CMC (67.8–74.8%) (Fig. 3). The result showed that the modification can cause higher number of cells immobilized on modified biochar than biochar as shown in Fig. S2. Greater number of immobilized cells and manganese adsorption capacity could be why CMC provided highest manganese removal. These results were in contrast to a previous study by Wang et al. (2018) which reported a decrease in mercury removal performance by the cell-immobilized biochar because the microbial cell hindered the mercury sorption site. In the current study, manganese removal by the cell-immobilized biochars was higher than integrating SBP1 and the biochars. This suggests that the biochars provided a better environment or more nutrients for the microbial cells, resulting in synergized

Table 2
Thermodynamic parameters for manganese adsorption on BC and MC.

Adsorbent	T(K)	Thermodynamic parameter		
		ΔG° (kJ mol ⁻¹)	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹)
BC	293 K	-25.56	-17.38	32.55
	303 K	-30.15		
	313 K	-26.02		
MC	293 K	-24.89	20.27	153.94
	303 K	-26.25		
	313 K	-27.98		

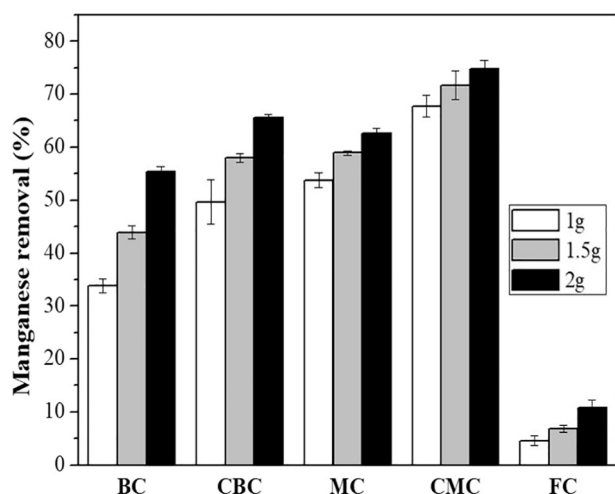


Fig. 3. Efficacies of manganese removal by the biochars (BC and MC), cell-immobilized biochars (CBC and CMC), and FC at different dosages.

manganese biotransformation. Immobilizing the microbial cells does not interfere with the sorption sites.

Practically, biochars with biofilm would extend the lifespans of biochars as filter media (Dianati-Tilaki and Mahmood, 2004). In typical water treatment systems, the natural biofilms at early stages of use are frequently lost during backwashing process. In this study, the microbial cells were attached on the biochars before the experiment. The cell immobilization (at the maturation stage) has been successfully applied on wastewater treatment and site remediation (Siripattanakul and Khan, 2010; Nzila et al., 2016). This is the first study to apply the cell immobilization technique for drinking water treatment and water supply production. The immobilized cells (compared to natural biofilm as BAC) could reduce cell loss in the initial period and increase the capability of the support materials.

Overall, the cell-immobilized biochar (as the immobilized cell-bi filter) is promising for removing manganese. The cell-immobilized biochar had high contaminant treatability, short-term biofilm formation, and low cell washout. In the future, the experiment with real manganese-contaminated water is required and application of this technology at water treatment plant to confirm the cell-immobilized biochar applicability should be demonstrated.

3.3.3. Manganese removal mechanism and distribution using advanced spectroscopic techniques

The FTIR spectra of the cell-immobilized biochars and the biochars before and after the manganese removal experiment were presented in the supplementary materials. After the manganese was removed, the intensity of FTIR bands decreased at 1428 cm^{-1} for BC and 1375 cm^{-1} for MC. These changes suggested that manganese ions were bound to the C—H bonds from aromatic species for BC and those of O—H for MC. After cell immobilization, the band intensities at 1428 cm^{-1} for BC and 1375 cm^{-1} for MC decreased. This suggests that manganese and microbial cell adsorption took place at the same binding sites. Otherwise, the FTIR spectra of CMC showed a higher intensity of band at 1428 cm^{-1} . This shows that the microbial cells could increase the sorption sites (Wang et al., 2018). After the manganese treatment using CBC and CMC, the FTIR bands at 1375 and 1429 cm^{-1} were lower. Even though the immobilized cells blocked active sites for manganese removal, another active site of MC (1428 cm^{-1}) increased, resulting in higher adsorption capacity from CMC. Also, higher manganese removal by CBC and CMC may be attributed to the role of biological manganese oxidation as described earlier.

The manganese distribution by μXRF of biochars and cell-immobilized biochars (MC and CMC) are presented in Fig. 4. The sectioning of all samples was prepared, as seen in Fig. 4a. Color scale bar

indicates the fluorescence counts of the particular element in analysis (blue color is for the lowest counts and red color is for the highest counts). Figs. 4b (MC and MC + Mn) and 4c (CMC and CMC + Mn) are presented the comparison of manganese distribution before and after treatment. Before experimentation, manganese was observed in CMC (Fig. 4c). This is because the bacteria (with slight manganese accumulation during cultivation) colonized on the surface of the biochar. After treatment, manganese was accumulated around the edge and pore of the biochars, while manganese accumulation increased significantly in the cell-immobilized biochars. This implies that the microbial cells penetrated into the biochar and accumulated manganese. So, the distribution of manganese in the CMC + Mn sample was observed at the highest level.

In μXRF analysis, manganese biosorption or transformation by the cells was inconclusive. A XANES analysis to determine manganese oxidation states was required. Normalized XANES spectra at manganese K-edge and derivative XANES spectra that were compared to manganese standards consisting of MnO and Mn_2O_3 (corresponding to Mn^{2+} and Mn^{3+}) are shown in the supplementary materials. Absorption edge energy of all samples (the biochars and cell-immobilized biochars before and after experiments) was between Mn^{2+} and Mn^{3+} . It is noted that manganese (mainly in Mn^{3+} form (>88%)) was detected as an elemental composition of biochars. After manganese adsorption, the edge energy was shifted to Mn^{2+} for both BC and MC (increasing Mn^{2+} 7–8%). This confirmed the soluble manganese (Mn^{2+}) adsorption on the biochars. After the experiment by CBC and CMC, the shift of edge energy to Mn^{2+} was lower than in the biochars without cells (increasing Mn^{2+} 2–6% compared to before treatment). The result suggests that some portion of manganese was oxidized to Mn^{3+} and that manganese removal by the cell-immobilized biochars was a combination of manganese adsorption by biochars and bio-oxidation by SBP1.

The proposed manganese removal mechanism is presented in Fig. 5. The waste biochar could physically adsorb manganese and attach microbial cells. Modification of biochar resulted in an increasing of manganese adsorption sites and cell attachment sites. The microbial cells transformed Mn^{2+} to Mn^{3+} through a biological oxidation process. It is known that Mn^{3+} further converts to Mn^{4+} (stable particulate). In practice, this particle manganese would be trapped on the filter medium and then cleaned out of the filter by backwashing the filter.

4. Conclusions

Wood vinegar waste successfully removed manganese. Manganese adsorption by BC and MC fit the pseudo-second-order and Langmuir models. The maximum adsorption capacities of MC (1.15 mg g^{-1}) were greater than those from BC (0.77 mg g^{-1}). CMC provided the highest maximum removal performance (74.8%). The μXRF and XANES results confirmed that the microbial cells dispersed and attached to deeper layers, leading to manganese bio-oxidation and adsorption. This research showed the feasibility of cell-immobilized biochar for use as a bio-filtration medium. Future investigations of the influence of operating conditions and actual water samples should be performed.

CRedit authorship contribution statement

Atcharaporn Youngwilai: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Visualization. **Pinit Kidkhunthod:** Formal analysis, Resources. **Nichada Jearanaikoon:** Formal analysis, Resources, Writing - review & editing, Visualization. **Jitrit Chaiprapa:** Formal analysis, Resources, Writing - review & editing. **Nontipa Supanchaiyamat:** Formal analysis, Resources, Writing - review & editing. **Andrew J. Hunt:** Writing - review & editing. **Yuvarat Ngernyen:** Resources. **Thunyalux Ratpukdi:** Writing - review & editing. **Eakalak Khan:** Writing - review & editing. **Sumana Siripattanakul-Ratpukdi:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Visualization, Writing - review & editing, Supervision.

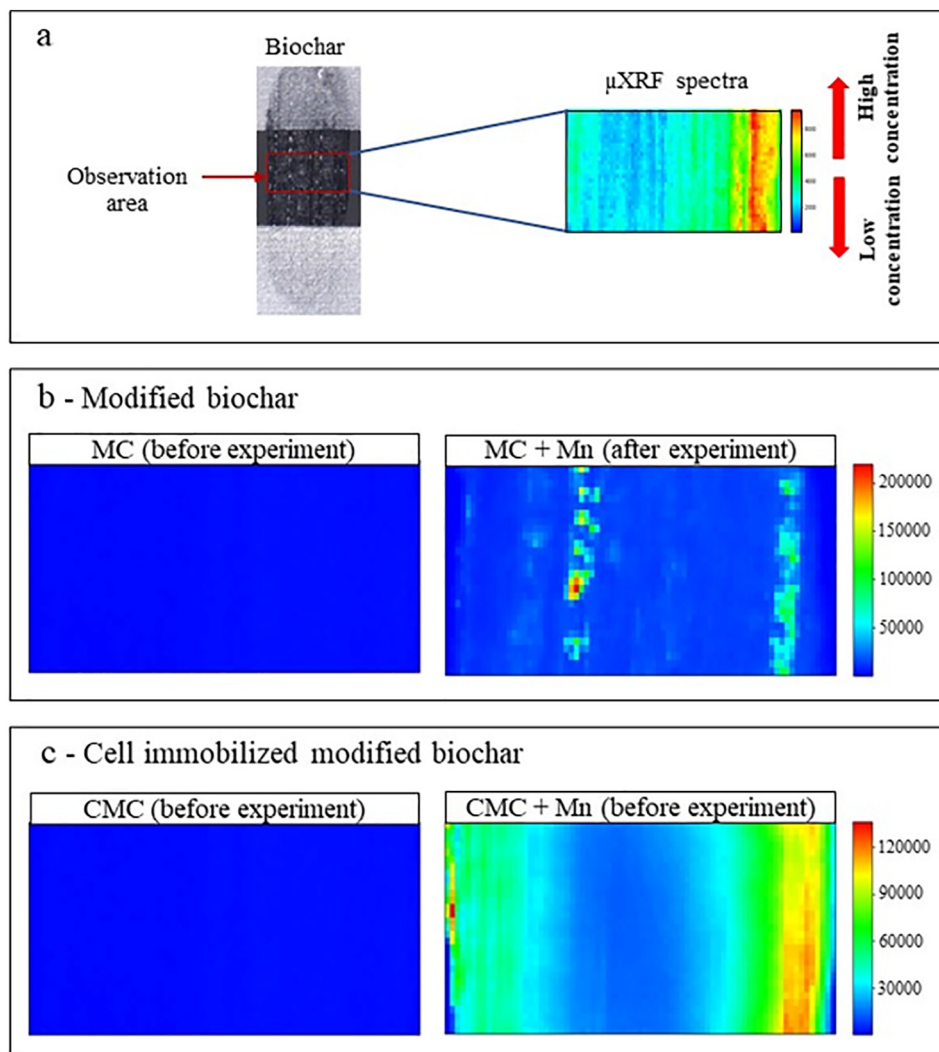


Fig. 4. μXRF images: (a) the longitudinal section of biochar sample, (b) manganese distribution map in the modified biochar (MC) and the modified biochar after treatment (MC + Mn), and (c) manganese distribution map in the cell-immobilized modified biochars (CMC) and the cell-immobilized modified biochars after treatment (CMC + Mn). The color scale of mappings was adjusted to the same scale for comparison.

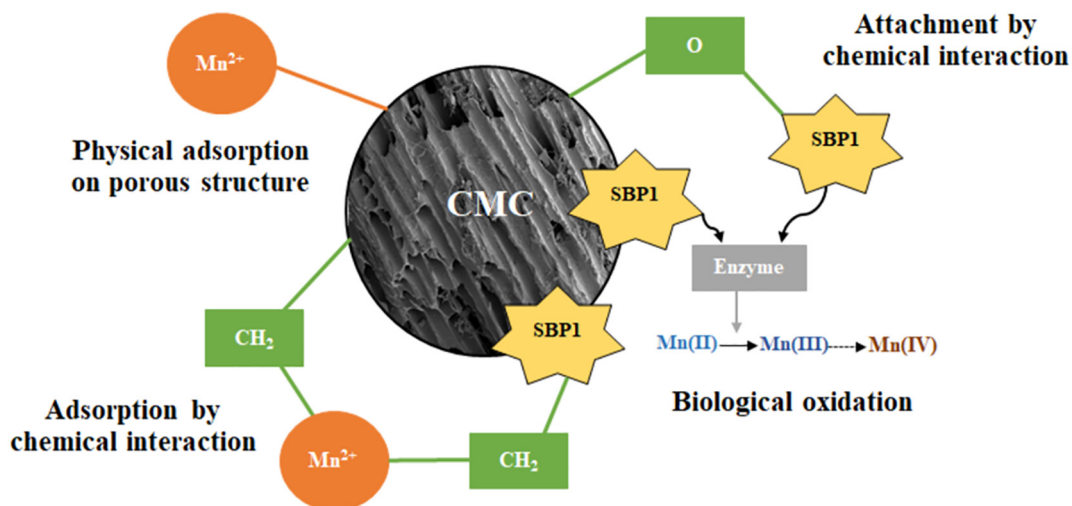


Fig. 5. Proposed manganese removal mechanism by the microbial cell-immobilized modified biochar derived from wood vinegar industrial waste.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This study was financially supported by the Research Career Development Grant (RSA6080054, The Thailand Research Fund (TRF), Thailand) and Royal Golden Jubilee Ph.D. (RGJ) program (Grant No. PHD/0151/2561, TRF, Thailand), Research Center for Environmental and Hazardous Substance Management (Khon Kaen University, Thailand), and Center of Excellence on Hazardous Substance Management (Thailand). The authors thank Department of Environmental Engineering (Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand) and Synchrotron Light Research Institute (Nakhon Ratchasima, Thailand) for equipment support. Any opinions, findings, and conclusions or recommendations expressed in this material are those of the authors and do not necessarily reflect the views of grant providers.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136708>.

References

- Abdel-Satar, A.M., Ali, M.H., Goher, M.E., 2017. Indices of water quality and metal pollution of Nile River, Egypt. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 43 (1), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2016.12.006>.
- Adams, L.F., Ghiorse, W.C., 1985. Influence of manganese on growth of a sheathless strain of *Leptothrix discophora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (3), 556–562.
- Antunes, E., Jacob, M.V., Brodie, G., Schneider, P.A., 2017. Silver removal from aqueous solution by biochar produced from biosolids via microwave pyrolysis. *J. Environ. Manag.* 203, 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.07.071>.
- APHA, et al. (Eds.), 2017. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, twenty third ed APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WEF (Water Environment Federation), Washington, DC.
- Babi, K.G., Koumenides, K.M., Nikolaou, A.D., Makri, C.A., Tzoumerkas, F.K., Lekkas, T.D., 2007. Pilot study of the removal of THMs, HAAs and DOC from drinking water by GAC adsorption. *Desalination* 210 (1–3), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.05.046>.
- Basu, O.D., Dhawan, S., Black, K., 2016. Applications of biofiltration in drinking water treatment – a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 585–595. <https://doi.org/10.1002/jctb.4860>.
- Burger, M.S., Mercer, S.S., Shupe, G.D., Gagnon, G.A., 2008. Manganese removal during bench-scale biofiltration. *Water Res.* 42 (19), 4733–4742. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.024>.
- Chaudhry, S.A., Khan, T.A., Ali, I., 2017. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies of Cr(VI) adsorption from aqueous solution onto manganese oxide coated sand grain (MOCSG). *J. Mol. Liq.* 236, 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.04.029>.
- Chen, X., Chen, G., Chen, L., Chen, Y., Lehmann, J., McBride, M.B., Hay, A.G., 2011. Adsorption of copper and zinc by biochars produced from pyrolysis of hardwood and corn straw in aqueous solution. *Bioresour. Technol.* 102, 8877–8884. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.078>.
- Cho, D.W., Kwon, G., Yoon, K., Tsang, Y.F., Ok, Y.S., Kwon, E.E., Song, H., 2017. Simultaneous production of syngas and magnetic biochar via pyrolysis of paper mill sludge using CO₂ as reaction medium. *Energy Convers. Manag.* 145, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.04.095>.
- Dianati-Tilaki, R.A., Mahmood, S., 2004. Study on removal of cadmium from water by adsorption on GAC, BAC and biofilter. *Pak. J. Biol. Sci.* 7, 865–869. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2004.865.869>.
- Emmanuel, K.A., Rao, A.V., 2008. Adsorption of Mn (II) from aqueous solutions using pithaceolobium dulce carbon. *Rasayan J. Chem* 1 (4), 840–852.
- Foo, K.Y., Hameed, B.H., 2010. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chem. Eng. J.* 156 (1), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.cje.2009.09.013>.
- Gai, X.J., Kim, H.S., 2008. The role of powdered activated carbon in enhancing the performance of membrane systems for water treatment. *Desalination* 225 (1–3), 288–300. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.07.009>.
- Gao, L.Y., Deng, J.H., Huang, G.F., Li, K., Cai, K.Z., Liu, Y., Huang, F., 2019. Relative distribution of Cd²⁺ adsorption mechanisms on biochars derived from rice straw and sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 272, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.138>.
- Greenstein, K.E., Lew, J., Dickenson, E.R.V., Wert, E.C., 2018. Investigation of biotransformation, sorption, and desorption of multiple chemical contaminants in pilot-scale drinking water biofilters. *Chemosphere* 200, 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.107>.
- Gutiérrez, R.L., Rubio-Arias, H., Quintana, R., Ortega, J.A., Gutierrez, M., 2008. Heavy metals in water of the San Pedro River in Chihuahua, Mexico and its potential health risk. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 5 (2), 91–98. <https://doi.org/10.3390/ijerph5020091>.
- Gwenzi, W., Chaukura, N., Mukome, F.N.D., Machado, S., Nyamasoka, B., 2015. Biochar production and applications in sub-Saharan Africa: opportunities, constraints, risks and uncertainties. *J. Environ. Manag.* 150, 250–261. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.11.027>.
- Hawash, S.I., Farah, J.Y., El-Diwani, G., 2017. Pyrolysis of agriculture wastes for bio-oil and char production. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 124, 369–372. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2016.12.021>.
- Hijnen, W.A.M., Suylen, G.M.H., Bahlman, J.A., Brouwer-Hanzens, A., Medema, G.J., 2010. GAC adsorption filters as barriers for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water treatment. *Water Res.* 44 (4), 1224–1234. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.10.011>.
- Hoslett, J., Massara, T.M., Malamis, S., Ahmad, D., van den Boogaert, I., Katsou, E., Ahmad, B., Ghazal, H., Simons, S., Wrobel, L., Jouhara, H., 2018. Surface water filtration using granular media and membranes: a review. *Sci. Total Environ.* 639, 1268–1282. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.247>.
- Idrees, M., Batool, S., Ullah, H., Hussain, Q., Al-wabel, M.I., Ahmad, M., Hussain, A., Riaz, M., Ok, Y.S., Kong, J., 2018. Adsorption and thermodynamic mechanisms of manganese removal from aqueous media by biowaste-derived biochars. *J. Mol. Liq.* 266, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.049>.
- Kavitha, B., Reddy, P.V.L., Kim, B., Lee, S.S., Pandey, S.K., Kim, K.H., 2018. Benefits and limitations of biochar amendment in agricultural soils: a review. *Journal of Environmental Management* 227, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.082>.
- Kidkhunthod, P., 2017. Structural studies of advanced functional materials by synchrotron-based x-ray absorption spectroscopy: BL5.2 at SLRI, Thailand. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 8 (3), 035007. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aa7240>.
- Klysubun, W., Kidkhunthod, P., Tarawarakarn, P., Sombunchoo, P., Kongmark, C., Limpijummong, S., Limpijummong, S., Rujiarawat, S., Yimnirun, R., Faungnawakij, K., 2017. SUT-NANOTEC-SLRI beamline for X-ray absorption spectroscopy. *J. Synchrotron Radiat.* 24 (3), 707–716. <https://doi.org/10.1107/S1600577517004830>.
- Kouzbour, S., El Azher, N., Gourich, B., Gros, F., Vial, C., Stiriba, Y., 2017. Removal of manganese (II) from drinking water by aeration process using an airlift reactor. *Journal of Water Process Engineering* 16, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.01.010>.
- Meyer, C.M.C., Rodríguez, J.M., Carpio, E.A., García, P.A., Stengel, C., Berg, M., 2017. Arsenic, manganese and aluminum contamination in groundwater resources of Western Amazonia (Peru). *J. Sci. Total Environ.* 607–608, 1437–1450. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.059>.
- Mohan, D., Pittman Jr., C.U., Bricka, M., Smith, F., Yancey, B., Mohammad, J., Steele, P.H., Alexandre-Franco, M.F., Gómez-Serrano, V., Gong, H., 2007. Sorption of arsenic, cadmium, and lead by chars produced from fast pyrolysis of wood and bark during bio-oil production. *J. Colloid Interface Sci.* 310, 57–73. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.01.020>.
- Mondal, P., Balomajumder, C., Mohanty, B., 2007. A laboratory study for the treatment of arsenic, iron, and manganese bearing ground water using Fe³⁺ impregnated activated carbon: effects of shaking time, pH and temperature. *J. Hazard. Mater.* 144 (1–2), 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.10.078>.
- Munda, S., Nayak, A.K., Mishra, P.N., Bhattacharyya, P., Mohanty, S., Kumar, A., Kumar, U., Baig, M.J., Tripathi, R., Shahid, M., Adak, T., Thilagam, V.K., 2016. Combined application of rice husk biochar and fly ash improved the yield of lowland rice. *Soil Research* 54 (4), 451–459. <https://doi.org/10.1071/SR15295>.
- Nzila, A., Razzak, S.A., Zhu, J., 2016. Bioaugmentation: an emerging strategy of industrial wastewater treatment for reuse and discharge. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 846. <https://doi.org/10.3390/ijerph13090846>.
- Patil, D.S., Chavan, S.M., Oubagaranadin, J.U.K., 2016. A review of technologies for manganese removal from wastewaters. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 4 (1), 468–487. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.11.028>.
- Rajapaksha, A.U., Alam, M.S., Chen, N., Alessi, D.S., Igalavithana, A.D., Tsang, D.C.W., Ok, Y.S., 2018. Removal of hexavalent chromium in aqueous solutions using biochar: chemical and spectroscopic investigations. *Sci. Total Environ.* 625, 1567–1573. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.195>.
- Rosson, R.A., Nealson, K.H., 1982. Manganese binding and oxidation by spores of a marine bacillus. *J. Bacteriol.* 151 (2), 1027–1034.
- Sangsuk, S., Suebsiri, S., Puakhom, P., 2018. The metal kiln with heat distribution pipes for high quality charcoal and wood vinegar production. *Energy for Sustainable Development* 47, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2018.10.002>.
- Shakya, A., Agarwal, T., 2019. Removal of Cr(VI) from water using pineapple peel derived biochars: adsorption potential and re-usability assessment. *J. Mol. Liq.* 293, 111497. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.11.1497>.
- Siripattanakul, S., Khan, E., 2010. Fundamentals and applications of entrapped cell bioaugmentation for contaminant removal. In: Shah, V. (Ed.), *Emerging Environmental Technologies*. Volume II. Springer, Dordrecht, pp. 147–169. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3352-9_7.
- Solé, V.A., Papillon, E., Cotte, M., Walter, P., Susini, J., 2007. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochim. Acta B At. Spectrosc.* 62 (1), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2006.12.002>.
- Srivastava, N.K., Majumder, C.B., 2008. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *J. Hazard. Mater.* 151 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.101>.
- Sun, Y., Yu, I.K.M., Tsang, D.C.W., Cao, X., Lin, D., Wang, L., Graham, N.J.D., Alessi, D.S., Komárek, M., Ok, Y.S., Feng, Y., Li, X.D., 2019. Multifunctional iron-biochar composites for the removal of potentially toxic elements, inherent cations, and hetero-chloride from hydraulic fracturing wastewater. *Environ. Int.* 124, 521–532. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.047>.

- Tekerlekopoulou, A.G., Vasiliadou, I.A., Vayenas, D.V., 2008. Biological manganese removal from potable water using trickling filters. *Biochem. Eng. J.* 38 (3), 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.07.016>.
- Tekerlekopoulou, A.G., Pavlou, S., Vayenas, D.V., 2013. Removal of ammonium, iron and manganese from potable water in biofiltration units: a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 751–773. <https://doi.org/10.1002/jctb.4031>.
- Therdkiattikul, N., Taweetanawanit, P., Ratpukdi-Siripattanakul, S., 2018. Screening of manganese-oxidizing bacteria from sand filter and soil, Khon Kaen, Thailand. *The International Water Association IWA World Water Congress & Exhibition 2018*. 2018. IWA Publishing, Tokyo, p. 109.
- Thompson, K.A., Shimabuku, K.K., Kearns, J.P., Knappe, D.R.U., Summers, R.S., Cook, S.M., 2016. Environmental comparison of biochar and activated carbon for tertiary wastewater treatment. *Environmental Science & Technology* 50 (20), 11253–11262. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03239>.
- Üçer, A., Uyanik, A., Aygün, Ş., 2006. Adsorption of Cu(II), Cd(II), Zn(II), Mn(II) and Fe(III) ions by tannic acid immobilised activated carbon. *Sep. Purif. Technol.* 47, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.06.012>.
- Vasu, A.E., 2008. Surface modification of activated carbon for enhancement of nickel(II) adsorption. *E-Journal of Chemistry* 5 (4), 814–819. <https://doi.org/10.1155/2008/610503>.
- Vijayaraghavan, K., Padmesh, T.V.N., Palanivelu, K., Velan, M., 2006. Biosorption of nickel (II) ions onto *Sargassum wightii*: application of two-parameter and three-parameter isotherm models. *J. Hazard. Mater.* 133 (1–3), 304–308. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.10.016>.
- Vikrant, K., Kim, K.H., Ok, Y.S., Tsang, D.C.W., Tsang, Y.F., Giri, B.S., Singh, R.S., 2018. Engineered/designer biochar for the removal of phosphate in water and wastewater. *Sci. Total Environ.* 616–617, 1242–1260. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.193>.
- Vinh, N.V., Zafar, M., Behera, S.K., Park, H.-S., 2015. Arsenic(III) removal from aqueous solution by raw and zinc-loaded pine cone biochar: equilibrium, kinetics, and thermodynamics studies. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 12 (4), 1283–1294. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0507-1>.
- Wang, Y., Liu, R., 2018. H₂O₂ treatment enhanced the heavy metals removal by manure biochar in aqueous solutions. *Sci. Total Environ.* 628–629, 1139–1148. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.137>.
- Wang, T., Sun, H., Ren, X., Li, B., Mao, H., 2018. Adsorption of heavy metals from aqueous solution by UV-mutant *Bacillus subtilis* loaded on biochars derived from different stock materials. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148 (May 2017), 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.039>.
- Wang, L., Wang, Y., Ma, F., Tankpa, V., Bai, S., Guo, X., Wang, X., 2019. Mechanisms and re-utilization of modified biochar used for removal of heavy metals from wastewater: a review. *Sci. Total Environ.* 668, 1298–1309. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.011>.
- Xu, X., Cao, X., Zhao, L., Wang, H., 2013. Removal of Cu, Zn, and Cd from aqueous solutions by the dairy manure-derived biochar. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 358–368. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0873-5>.
- Xue, Y., Gao, B., Yao, Y., Inyang, M., Zhang, M., Zimmerman, A.R., RO, K.S., 2012. Hydrogen peroxide modification enhances the ability of biochar (hydrochar) produced from hydrothermal carbonization of peanut hull to remove aqueous heavy metals: batch and column tests. *Chem. Eng. J.* 200–202, 673–680. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.06.116>.
- Zhu, I.X., Getting, T., Bruce, D., 2010. Review of biologically active filters in drinking water applications. *American Water Works Association Journal* 102, 67–77. <https://doi.org/10.2307/41314720>.
- Zuo, X., Liu, Z., Chen, M., 2016. Effect of H₂O₂ concentrations on copper removal using the modified hydrothermal biochar. *Bioresour. Technol.* 207, 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.032>.

Manganese-contaminated Groundwater Treatment by Novel Bacterial Isolates: Kinetic Study and Mechanism Analysis Using Synchrotron-based Techniques

Nakharin Therdkiatkul¹, Thunyalux Ratpukdi^{1,2}, Pinit Kidkhunthod³, Narong Chanlek³, Sumana Siripattanakul-Ratpukdi^{1,2*}

¹ Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering and Research Center for Environmental and Hazardous Substance Management, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Center of Excellence on Hazardous Substance Management (HSM), Bangkok 10330, Thailand

³ Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

* e-mail: sumana.r@kku.ac.th

ABSTRACT

Occurrence of manganese in groundwater causes colored water and pipe rusting in water treatment and distribution systems. Consumption of manganese-contaminated water promotes neurotoxicity in human and animals. Manganese-oxidizing bacteria were isolated for removing manganese in water. Bacteria were enriched from manganese-contaminated areas in Khon Kaen, Thailand. The selected bacterium was investigated for manganese removal kinetics and mechanism using synchrotron-based techniques. The result showed that among 21 isolates in microbial consortiums, *Streptomyces violaceus* strain SBP1 (SBP1) was the best manganese-oxidizing bacterium. At an initial manganese concentration of 1 mg L⁻¹, SBP1 achieved up to 46% removal. The isolate also successfully removed other metals, such as iron (81%) and arsenic (38%). The initial manganese concentration played a role in manganese removal efficiency and bacterial growth. The observed self-substrate inhibition best fit with Aiba model. Kinetic parameters estimated from the model, including a specific growth rate, half-velocity constant, and inhibitory constant were 0.095 h⁻¹, 0.453 mg L⁻¹, and 37.975 mg L⁻¹, respectively. Advanced spectroscopic techniques (X-ray photoelectron spectroscopy and X-ray Absorption near Edge Structure) indicated that SBP1 removed manganese via adsorption and oxidation. Manganese bio-oxidation was the main removal process. The selected isolate has potential for treating manganese-contaminated water in the future.

Introduction

Manganese is an abundant transition metal that disperses readily through soil and water. It can exist in many oxidation states (from Mn³⁺ to Mn⁷⁺). In aquatic environments, the main forms are dissolved manganese (Mn²⁺) and oxidized manganese (Mn³⁺ and Mn⁴⁺). The presence of manganese in groundwater is a common problem in many countries¹. In the USA, high manganese concentrations (up to 5.6 mg L⁻¹) have been reported in numerous

groundwater wells (68% of monitored wells)². In Vietnam and China, manganese concentrations of approximately 1.2 mg L⁻¹ were found in groundwater^{3,4}. The mentioned concentrations were much higher than the allowable concentrations for drinking water and water supplies in those countries. The United States Environmental Protection Agency sets the manganese standard at 0.05 mg L⁻¹ for drinking water, while the World Health Organization allows a manganese concentration of 0.1 mg L⁻¹ in a water supply^{2,5}. In a water treatment system, the presence of manganese (0.1 mg L⁻¹ or greater) can cause aesthetic problem and pipe rusting⁶. In addition, a high manganese concentration (0.2 mg L⁻¹ or greater) can cause neurotoxicity in humans and animals including Parkinson's symptoms, emotional capability, and hallucination⁷⁻¹⁰. Traditional manganese removal is performed in water treatment facilities by transforming soluble manganese to an insoluble form through oxidation, then separating the insoluble manganese via sedimentation and/or filtration processes. However, in many cases, chemical oxidation processes for manganese removal to drinking water standard were not achievable.

Biological oxidation by microorganisms has been considered as an alternative for manganese removal from water¹¹. The advantages of biological manganese removal for water treatment include high manganese oxidation performance, easy installation in the treatment system, low cost, and minimal or no chemical utilization¹². To accelerate biological process, contaminant-removing microorganisms were isolated and augmented in the contaminated environment. Previously, manganese-oxidizing bacteria, such as strains in the genera *Bacillus*, *Leptothrix*, *Pseudomonas*, *Roseobacter*, and *Acinetobacter* have been reported¹³⁻¹⁷. The manganese-oxidizing bacteria were isolated from soil, water pipes, and sediment in groundwater wells in many countries. Among the isolates, *Leptothrix* spp., *Bacillus* spp., and *Acinetobacter* sp. strain LB1 were applied for manganese removal in contaminated water¹⁷⁻¹⁹. The manganese oxidation performance reported in the previous works were different based on the bacterium growth, manganese removal capability, and tested environmental conditions. In addition, the proposed manganese removal mechanism to support the manganese removal system, whether by adsorption and/or oxidation by bacterial cells, was based on indirect measurement²⁰⁻²².

To treat manganese contaminated in water, manganese-oxidizing bacteria could be inoculated to accelerate the treatment efficiency. For practice, the previously isolated cultures may not survive well or perform effectively in a different environment. Therefore, using an indigenous culture isolated for the contaminated site could be more promising for manganese oxidation for water treatment. The isolated culture should be investigated for removal performance and mechanism for better understanding. Thus far, there was no published work report bacterial isolation and its removal kinetics for manganese treatment.

This work aimed to isolate manganese-oxidizing bacteria from a manganese-contaminated area in Thailand. The bacterial species were identified, and their manganese removal performances assessed. Monod and self-substrate inhibition kinetic models were determined for the manganese-oxidizing bacterium selected based on performance. Removal of manganese and other metals (iron and arsenic) by the novel isolated culture was demonstrated. Also, the manganese removal from real groundwater was demonstrated. The micro-structure and potential manganese removal mechanism were characterised using microscopic and advanced spectroscopic techniques, including scanning electron microscopy coupled with energy-dispersive x-ray spectroscopy (SEM-EDS), X-ray

photoelectron spectroscopy (XPS), and X-ray absorption spectroscopy (XAS)^{23–25}. The results of this study represent the first published report on the fundamental manganese removal mechanism of the isolated bacterium using synchrotron-based techniques. The bacterial isolate could be used for water treatment practices. Also, the fundamental information obtained through this work is useful for further applications.

Results

Manganese-oxidizing bacterial enrichment and isolation

Eight and nine bacterial colonies, respectively, were enriched from the soil (named SBP) and groundwater filter medium (designated FBP) samples taken from Ban Phai district (Khon Kaen, Thailand). Another soil source (named SKN) from Kranuan district (Khon Kaen, Thailand) yielded four isolates. The colony morphology of the 21 isolates is shown in Table 1. Based on the formulation of the bacterial medium, with a manganese concentration of 100 mg L⁻¹, the isolates were manganese-tolerant bacteria and had potential for manganese oxidation.

The manganese oxidation potential of the enriched cultures was investigated via the LBB method, as presented in Table 1 followed Akob *et al.*²⁶. Manganese oxidation was positive (five replicates) for six (SBP1, SBP2, SBP3, SBP7, FBP3, and SKN3) of the twenty-one enriched cultures. The cultures enriched from different environmental media and sources were promising for manganese oxidation. Those six bacterial isolates were further tested for manganese removal efficiency. During the 7-d experiment (at an initial manganese concentration of 5 mg L⁻¹), the isolates removed between 5.72 and 28.08% of the initial manganese. Three of the six isolates, SBP1 (24.30 ± 2.05%), SBP3 (28.08 ± 1.98%), and SBP7 (10.48 ± 2.93%) (average ± standard deviation), exhibited the highest performances and were chosen for later experimentation.

Manganese-oxidizing bacterial selection

Neighbor-joining phylogenetic analysis of the isolated cultures (SBP1, SBP3, and SBP7) was performed using the 16S rRNA gene nucleotide sequences (Fig. 1). SBP1, SBP3, and SBP7 had the highest similarity to *Streptomyces violarius* (98%), *Streptomyces violarius* (98%), and *Chryseobacterium cucumeris* (99%), respectively. The GenBank accession numbers of the three strains are MK212369, MK212370, and MK212371, respectively. Bacteria belonging to these genera are commonly distributed in soils around the world, including China, India, the USA, and Europe^{27–30}. Previously, manganese-oxidizing cultures have been identified as species of *Leptothrix*, *Crenothrix*, *Streptomyces*, and *Hyphomicrobium*^{11,12}. This is the first report of manganese removal by *Streptomyces violarius* and *Chryseobacterium cucumeris*.

Streptomyces violarius strain SBP1 (SBP1), *Streptomyces violarius* strain SBP3 (SBP3), and *Chryseobacterium cucumeris* strain SBP7 (SBP7) were investigated for manganese removal efficiency and bacterial growth (as MLSS) in synthetic groundwater. After 36 h of the experiment (at an initial manganese concentration of 5 mg L⁻¹ and MLSS of 10.61–23.31 mg L⁻¹), SBP1 provided the highest manganese removal (45.05 ± 2.11%)

and bacterial growth (as MLSS) ($163.33 \pm 6.70 \text{ mg L}^{-1}$) while SBP3 and SBP7 gave manganese removal efficiencies of 41.70 ± 1.02 and $9.23 \pm 0.60\%$, respectively.

Bacterial growth and metal removal by the selected isolate

The bacterial growth kinetics of the selected isolate, *Streptomyces violarius* strain SBP1 (SBP1), was estimated following the Monod model. Manganese removal efficiencies and bacterial growth under initial manganese concentrations of 1 to 100 mg L^{-1} are presented in the supplementary material (Fig. S1). For the manganese concentrations of 1, 5, 10, 15, and 20 mg L^{-1} , the kinetic coefficients were fit using a Lineweaver-Burk plot with $R^2 = 0.969$ (Fig. 2A); μ_{\max} of 0.069 h^{-1} and K_s of 0.057 mg L^{-1} were estimated. Previously, two consortia enriched from biofilters were observed to remove manganese with μ_{\max} 0.017 and 0.050 h^{-1} and K_s 0.030 and 0.313 mg L^{-1} , respectively^{31,32}. This indicates that the selected isolate from this study grew well in the manganese-contaminated environment, resulting in high μ_{\max} .

During the experiments with higher manganese concentrations ($30\text{--}100 \text{ mg L}^{-1}$), self-substrate inhibition took place. This result is consistent with prior works about manganese toxicity^{7,10}. The estimations of the self-substrate inhibition kinetic models, including the Haldane, Andrews, Edwards, Aiba, and Yano models, are presented in the supplementary material (Tables S1 and S2 and Fig. S2). Among the models, the Aiba model gave the best fit with μ_{\max} , K_s , and inhibitory constant (K_i) of 0.095 h^{-1} , 0.453 mg L^{-1} , and 37.975 mg L^{-1} , respectively (Fig. 2B).

Metal removal in synthetic and natural groundwater by SBP1 was demonstrated. For synthetic groundwater, SBP1 provided manganese, iron, arsenic removal efficiencies of 45.93, 81.21, and 38.11%, respectively (metal removal efficiencies are shown in supplementary material, Table S5). For the natural groundwater treatment, SBP1 could remove manganese in the natural groundwater (up to 23.10%) (manganese removal efficiencies are shown in supplementary material, Table S6). Even though the selected natural groundwater with high hardness (790 mg L^{-1} as CaCO_3) and low dissolved organic carbon contents (0.43 mg L^{-1}), SBP1 achieved manganese removal. The result demonstrated that SBP1 could survive and remove manganese in the real environment.

Manganese removal mechanism by the selected isolate

SEM-EDS analysis

The bacterium SBP1 was characterised by SEM-EDS. SBP1 is rod-shaped and approximately $0.1 \mu\text{m}$ in width and $0.4 \mu\text{m}$ in length (Fig. 3). After the 2-d manganese removal experiment, SBP1 morphology did not change. The bacterial sample was observed using EDS with the aim of detecting manganese attached to the bacterial cells. No manganese was detected (Fig. 3). This result contrasts with previous work that identified manganese adsorption (60%) based on EDS observation of *Serratia marcescens* in an initial manganese concentration of 40 mg L^{-1} ²⁵. In this study, however, a lower manganese concentration (5 mg L^{-1}) was applied to simulate contamination conditions in the field. Based on EDS, it is inconclusive whether manganese adsorption on the cell surface took place. Advanced measurement was required for determination of the manganese removal mechanism.

XPS and XAS techniques

The XPS technique was performed to detect manganese and determine its oxidation state on the surface of the cell sample after the manganese removal experiment. The XPS survey spectrum is presented in Fig. 4A. Oxygen, nitrogen, phosphorus, and carbon was found in the sample. The high resolution of the XPS spectrum of Mn2p peaks in Fig. 4B includes two major distinct peaks at binding energies of 641.8 and 653.8 eV, which correspond to Mn2p_{3/2} and Mn2p_{1/2}, respectively. Along with the Mn2p_{3/2}, the shake-up satellite peak at 646.6 eV was also observed. The observed satellite feature at 646.6 eV is only present for MnO, representing Mn²⁺.

SBP1 was characterised after the manganese removal experiment by X-ray Absorption Near Edge Structure (XANES) and Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS) to investigate manganese valence state and local structure. Fig. 5A shows the normalized XANES spectra at manganese K-edge of the SBP1 sample compared with manganese standards, including MnO, Mn₂O₃, and MnO₂, referred to as Mn²⁺, Mn³⁺, and Mn⁴⁺, respectively. Fig. 5A reveals different positions of absorption edge energy for the references and sample. To compare absorption edge energy among the sample and references, the derivative XANES spectra was performed (Fig. 5B). The absorption edge energy of the SBP1 sample was between those of MnO and Mn₂O₃. This indicates that the oxidation state of SBP1 comprises Mn²⁺ and Mn³⁺. The local structure around manganese atoms in the SBP1 sample was investigated by EXAFS as shown in the supplementary material (Fig. S3 and Table S7). A peak position of the main peak between 1 and 2 Å is consistent with the binding of manganese to oxygen³³. In this study, the peak position (1.5 Å) of the main peak corresponds to Mn-O bonding. EXAFS fitting revealed that manganese is surrounded by four oxygen atoms at interatomic distances of 2.14 Å.

Discussion

The result from this study found numerous manganese-tolerant bacteria in the environment. Typically, manganese is a required element as a co-factor for bacterial cells. Manganese is involved in transcriptional regulation, developmental and metabolic processes, and protection of the bacterial cell against oxidative stress. Previous studies have isolated manganese-oxidizing bacteria from soil and water treatment systems, including filters, water pipes, and sediment in groundwater wells in the USA, China, and South Africa^{17–19}. Bacterial cultures including *Pseudomonas putida* strain MnB1, *Leptothrix* spp., *Bacillus* spp., and *Acinetobacter* sp. strain LB1 were reported based on these studies as effective manganese-oxidizing microbes. SBP1 well removed manganese compared to previously reported cultures (Table 2). In addition, this is the first report on enrichment of manganese-tolerant bacteria in Thailand. The cultures isolated here can withstand a typically toxic environment (manganese concentration of 100 mg L⁻¹).

The manganese removal performance by the selected isolate (SBP1) presented in this study was comparable to those previously reported for manganese-oxidizing cultures. Adams and Ghiorse¹⁴ reported manganese removal by *Leptothrix discophora* of approximately 90 % in 24 h (initial manganese concentration of 3 mg L⁻¹). Recently, Zhao *et al.*³⁶ found manganese removal efficiencies by *Brevibacillus brevis* MO1 and

Brevibacillus parabrevis MO2 of approximately 40-65% during 10-d experiments with an initial manganese concentration of 5.5 mg L⁻¹.

This bacterium, SBP1, was previously investigated manganese removal in synthetic groundwater with low organic carbon supplement³⁷. The previous report found lower biological manganese removal performance (the efficiency of up to 11%). Main removal process reported earlier was adsorption by biochar. The result well correlated to the result by natural groundwater (low organic carbon). This indicated that the organic carbon content play an important role for manganese removal by SBP1. Moreover, SBP1 could remove iron and arsenic. The result well correlated to prior works^{11,38}. Manganese-oxidizing bacteria including strains in genera *Leptothrix*, *Crenothrix*, and *Metallogenium* successfully removed iron and manganese. This is because the bacteria contained enzymes related to metal oxidation. In addition, it was reported arsenic removal along with manganese and iron bio-oxidation³⁹. The result presented in this study stated that SBP1 effectively removed manganese, iron, and arsenic. Further work on metal removal mechanism by SBP1 should be performed.

For manganese removal kinetics by SBP1, previous studies have also reported that self-substrate inhibition kinetics followed the Aiba model, such as studies of alcohol fermentation, ammonia oxidation, and benzene degradation⁴⁰⁻⁴². This study is the first report on manganese biotransformation. It could be stated that the Aiba model fits well for a wide range of substrates and microbial cultures.

Manganese removal mechanism could be described by the synchrotron-based analysis. The XPS result (Fig. 4A) represent the typical composition of microbial cells²⁴. Manganese was also observed on the surface of the sample after the manganese removal experiment. The observed satellite peak at 646.6 eV (Fig. 4B) indicated the presence of manganese (Mn²⁺) on the cell surface²³. The bacterial adsorption mechanism is consistent with previous findings where living and dead cells were tested for manganese bio-sorption²⁴.

The XANES result confirmed that the manganese removal by SBP1 occurred via adsorption and biotransformation, resulting in the observation of Mn²⁺ and Mn³⁺. In addition, the ratio of Mn²⁺ and Mn³⁺ was calculated based on absorption edge energy. SBP1 comprised Mn²⁺ and Mn³⁺ at 20% and 80%, respectively. Normally, microorganisms are known to be a natural sorbent in the environment²⁴. In this work, the proportions of Mn²⁺ and Mn³⁺ based on the XANES result identified manganese biotransformation by SBP1 as a major manganese removal mechanism. Mn³⁺ is not stable in the environment and may convert to Mn²⁺ or Mn⁴⁺³². During the experiment, Mn²⁺ accumulation was not noticed; Mn³⁺ would be further oxidized to be Mn⁴⁺ later on.

Overall, the advanced spectroscopic techniques clearly indicated that SBP1 successfully removed manganese from contaminated water via adsorption and oxidation processes. Fig. 6 shows proposed manganese removal mechanism by SBP1. Manganese adsorption occurred all over the bacterial cells, whereas oxidation was not present at the cell surface. Even though oxidation was the main process, complete oxidation (formation of Mn⁴⁺) did not take place. The adjustment of environmental conditions to facilitate complete oxidation should be further studied.

Conclusions

Twenty-one pure bacteria were isolated from manganese-contaminated sites. Isolate SBP1 provided the highest manganese removal (46%). The isolate well removed iron and arsenic. During manganese removal experiments under initial concentrations of greater than 30 mg L⁻¹, growth of SBP1 was inhibited. Self-substrate inhibition kinetics followed the Aiba model. Based on synchrotron techniques, Mn²⁺ was observed on the cell surface. The XANES result showed a mixture of Mn²⁺ and Mn³⁺, which indicates a combination of manganese adsorption and bio-oxidation by SBP1. SBP1 shows promise for future application as an augmented microbial culture for biological manganese removal.

Methods

Bacterial medium and synthetic groundwater

For preliminary screening, a bacterial medium was modified from Cerrato *et al.*¹⁹. The medium (pH of 6.8) contained 0.308 g L⁻¹ (or 0.0154 g L⁻¹ for long-term cultivation) of MnSO₄·H₂O, 0.001 g L⁻¹ of FeSO₄·7H₂O, 2.383 g L⁻¹ of HEPES buffer, 1 g L⁻¹ of peptone, and 0.25 g L⁻¹ of yeast extract. The medium for bacterial isolation and long-term cultivation provided 100 and 5 mg-manganese L⁻¹, respectively. For a solid medium, agar (1.5% w/v) was added.

The synthetic groundwater contained 0.0001 g L⁻¹ of K₂HPO₄, 0.01 g L⁻¹ of Na₂SO₄, 0.008 g L⁻¹ of NaHCO₃, 0.0154 g L⁻¹ of MnSO₄·H₂O, 0.00005 g L⁻¹ of FeSO₄·7H₂O, 0.00067 g L⁻¹ of CaCl₂·2H₂O, 0.02 g L⁻¹ of MgSO₄·7H₂O, 0.002 g L⁻¹ of NH₄Cl, 1 g L⁻¹ of peptone, and 0.25 g L⁻¹ of yeast extract. For demonstration of other metal removal experiments, synthetic groundwater contained similar compositions with iron (or arsenic) of 1 and 5 mg L⁻¹ (more information shown in supplementary material). All chemicals were purchased from RCI labscan (Thailand), Hi-media (India), Ajax finechem (Australia), QReC (New Zealand), and Sigma-Aldrich (Singapore) via local chemical suppliers.

Manganese-oxidizing bacterial enrichment and isolation

Samples of soil and filter medium that had experienced manganese contamination were collected from Ban Phai district (16°4'42"N, 102°38'40"E) and Kranuan district (16°4'42"N, 102°38'40"E), Khon Kaen, Thailand. The soil and filter medium samples were air-dried at room temperature overnight. Then, 10 g of each air-dried sample was inoculated in 100 mL of bacterial medium. The samples were incubated at room temperature on an orbital shaker at 150 rpm for 1 week. The samples were sub-cultured into fresh medium 6 times to obtain stable mixed cultures. Bacterial cultures were isolated using spread and streak plate techniques.

The isolated bacteria were evaluated for 1) manganese oxidation potential using the leucobercobelin blue (LBB) method and 2) manganese removal efficiency. It is noted that the LBB assay was performed in the solid medium while manganese removal efficiency was carried out in the liquid medium. The LBB method was applied to distinguish dissolved manganese and oxidized manganese (Mn³⁺ and Mn⁴⁺)⁴³. The LBB reagent (0.04% (w/v) in 10 mM acetic acid) was prepared and dropped on isolated colonies in agar medium. Then, the isolated colonies were incubated in the dark at room temperature for 1 h. The agar

medium turned from colorless to blue in the presence of oxidized manganese (positive). Five replicates were performed to confirm manganese oxidation²⁶. The isolates with positive results from the LBB method were selected for the subsequent experiments.

Triplicate manganese removal experiments were performed by the selected. The isolates of 10 mL were inoculated in the bacterial medium with an initial manganese concentration of 5 mg L⁻¹. The isolates were shaken at 150 rpm and maintained at room temperature for 168 h. The manganese concentration in the water samples was analysed. The manganese removal efficiency was calculated by equation shown below.

$$\text{Manganese removal efficiency (\%)} = \frac{Mn_i - Mn_r}{Mn_i} \times 100 \quad (1)$$

where Mn_i and Mn_r are the initial and remaining manganese concentrations (mg L⁻¹), respectively. The isolates with the three highest efficiencies were selected for further experiments.

Manganese-oxidizing bacteria selection

Three bacterial isolates from the previous section were identified by the 16S rRNA genes. The isolates were cultivated in the bacterial medium agar for 2 days. The samples were sent for 16S rRNA gene identification (MacroGen, Korea). The full-length 16S rRNA gene sequences were amplified using polymerase chain reaction amplification with two universal primers (27f: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG and 1492r: 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) and aligned using BioEdit 7.2.6 and compared to sequences from the NCBI BLAST GenBank nucleotide sequence database. A phylogenetic tree of the three isolates compared to other related sequences was constructed. The Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model was applied using MEGA7⁴⁴. The tree with the highest log likelihood (-9324.80) was applied. There were a total of 1,217 positions in the final dataset.

The three isolates were investigated for their manganese removal performance and growth in synthetic groundwater. For the manganese removal performance test (triplicate experiments), the isolates were inoculated in the synthetic groundwater (10% inoculation) with an initial manganese concentration of 5 mg L⁻¹. Initial cell numbers of approximately 10⁴ CFU/mL (equal to MLSS of 100-200 mg L⁻¹) were applied. The isolates were shaken at 150 rpm at room temperature for 48 h. The manganese concentration in the water samples was analysed. The manganese removal efficiency was calculated following equation provided in earlier sub-section. The isolate with the highest removal efficiency was selected for the kinetic growth experiment.

Bacterial growth and metal removal

Triplicate experiments for bacterial growth and metal removal investigation were performed. The selected bacterium (10 mL) was inoculated in 100-mL aliquots of synthetic groundwater with manganese concentrations of 1, 5, 10, 15, 20, 30, 50, and 100 mg L⁻¹. The bacterium was shaken at 150 rpm at room temperature for 48 h. Water samples were collected at 0, 12, 24, 36, and 48 h. Bacterial cells were measured as mixed liquor suspended solids (MLSS). Specific growth rates were calculated based on bacterial cell

data. The bacterial growth kinetics (μ) were then estimated following the Monod model. The kinetic parameters were replotted and calculated using a Lineweaver-Burk plot. The specific growth rate, Monod model, and Lineweaver-Burk plot equations were as follows.

$$\frac{dX}{X} = \mu dt \quad (2)$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (3)$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{\mu_{\max}} \quad (4)$$

X is bacterial cell concentration (mg-MLSS L⁻¹); t is time (h), μ is specific growth rate (h⁻¹), μ_{\max} is maximum specific growth rate (h⁻¹); S is manganese concentration (mg L⁻¹); and K_S is half-velocity constant (mg L⁻¹). Alternatively, the self-substrate inhibition kinetics were estimated following the Haldane, Andrews, Edwards, Aiba, and Yano models (based on the microbial growth rates under different initial manganese concentrations)⁴⁵.

To confirm the metal removal performance by the selected isolate, metal removal experiments were demonstrated. The manganese, iron, and arsenic removal at the initial metal concentrations of 1 and 5 mg L⁻¹ and the selected isolate of 100 mg-MLSS L⁻¹ were tested in the synthetic groundwater (synthetic groundwater formulation shown in supplementary material, Table S3). For manganese removal from natural groundwater by the selected isolate, natural groundwaters with different characteristics (2 locations) were obtained. The groundwater characteristics and information are shown in supplementary material, Table S4. The selected isolates of 200 or 500 mg-MLSS L⁻¹ were inoculated. The batch reactors were shaken at 150 rpm and room temperature for 48 h. The metal removal efficiency percentage was calculated.

Microscopic and synchrotron-based spectroscopic techniques

Microscopic and synchrotron-based spectroscopic techniques including SEM-EDS, XPS, and XAS were used to characterise the bacterial cells to elucidate the mechanism of manganese removal. Bacterial samples were collected before and after the manganese removal experiment with a manganese concentration of 5 mg L⁻¹. SEM-EDS was used to investigate microbial cell morphology and elemental composition in the samples. The samples were also observed using a field emission scanning electron microscope coupled with a focused gallium ion beam (FIB-FESEM) (Thermo Fisher, USA). The bacterial cell samples were dehydrated followed [Taweetanawanit *et al.*⁴⁶](#).

The XPS technique was used to study the chemical composition and confirm the oxidation state of elements on the bacterial surface. The XPS measurement was carried out using a PHI5000 Versa Probe II (ULVAC-PHI, Japan) at the SUT-NANOTEC-SLRI Joint Research Facility (SLRI, Thailand). For investigating the oxidation state of elements and species of neighbor atoms for the entire bacterial cells, XAS techniques were selected: XANES and EXAFS, respectively. Manganese K-edge XANES and EXAFS were detected on BL5.2: SUT-NANOTEC-SLRI XAS Beamline SLRI, Thailand^{47,48}. The bacterium

sample for XPS and XAS was taken at 2 d, then filtered on cellulose acetate membrane (0.45 µm, Filtrex, USA) and dried in an oven at 70°C for 1.5 h.

Analytical procedures

Manganese analysis using nitric acid digestion was performed following standard method 3030E⁴⁹. After filtering a 25 mL water sample using a nylon filter (0.22 µm, Agela Technologies, USA), the sample was digested on a hot plate in a fume hood until reaching a sample volume of 5 mL. The digested sample was mixed with 10 mL nitric acid (conc.) (RCI labscan, Thailand). Then, the mixture was boiled until reaching a sample volume of 5 mL. The final 5-mL sample was adjusted to 25 mL by adding deionized water. The digested sample was analysed using an Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) (AAnalyst™ 800, Perkin Elmer, Singapore).

The bacterial cells (as MLSS) were measured using the gravimetric method following standard method 2540D⁴⁹. Water samples of 100 mL were filtered through a GF/C glass microfiber filter (1.2 µm, Whatman, UK). The filtered sample was dried in an oven at 105°C for 1.5 h.

References

1. Patil, D. S., Chavan, S. M. & Oubagaranadin, J. U. K. A review of technologies for manganese removal from wastewaters. *J. Environ. Chem. Eng.* **4**, 468–487, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.11.028> (2016).
2. United States Environmental Protection Agency (USEPA). *Drinking water health advisory for manganese* (USEPA, 2004).
3. Li, C. *et al.* Immobilization of iron- and manganese-oxidizing bacteria with a biofilm-forming bacterium for the effective removal of iron and manganese from groundwater. *Bioresour. Technol.* **220**, 76–84, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.020> (2016).
4. Nitzsche, K. S., Weigold, P., Lösekann-Behrens, T., Kappler, A. & Behrens, S. Microbial community composition of a household sand filter used for arsenic, iron, and manganese removal from groundwater in Vietnam. *Chemosphere* **138**, 47–59, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.032> (2015).
5. World Health Organization (WHO). *Guidelines for drinking water quality* (WHO Press, 2011).
6. Brandhuber, P., Clark, S., Knocke, W. & Tobiasson, J. *Guidance for the treatment of manganese* (Water Research Foundation, 2013).
7. Kostial, K. *et al.* Effect of a metal mixture in diet on the toxicokinetics and toxicity of cadmium, mercury and manganese in rats. *Toxicol. Ind. Health* **5**, 685–698, <https://doi.org/10.1177/074823378900500509> (1989).
8. Frisbie, S. H., Mitchell, E. J., Dustin, H., Maynard, D. M. & Sarkar, B. World health organization discontinues its drinking-water guideline for manganese. *Environ. Health Perspect.* **120**, 775–778, <https://doi.org/10.1289/ehp.1104693> (2012).
9. Bacquart, T. *et al.* Multiple inorganic toxic substances contaminating the

- groundwater of Myingyan Township, Myanmar: Arsenic, manganese, fluoride, iron, and uranium. *Sci. Total Environ.* **517**, 232–245, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.038> (2015).
10. Bjørklund, G., Chartrand, M. S. & Aaseth, J. Manganese exposure and neurotoxic effects in children. *Environ. Res.* **155**, 380–384, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.003> (2017).
 11. Katsoyiannis, I. A. & Zouboulis, A. I. Biological treatment of Mn(II) and Fe(II) containing groundwater: Kinetic considerations and product characterization. *Water Res.* **38**, 1922–1932, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.014> (2004).
 12. Mouchet, P. From conventional to biological removal of iron and manganese in France. *J. Am. Water Work. Assoc.* **84**, 158–167, <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1992.tb07342.x> (1992).
 13. Rosson, R. A. & Nealson, K. H. Manganese binding and oxidation by spores of a marine bacillus. *J. Bacteriol.* **151**, 1027–1034, <https://doi.org/10.1128/JB.151.2.1027-1034.1982> (1982).
 14. Adams, L. F. & Ghiorse, W. C. Influence of manganese on growth of a sheathless strain of *Leptothrix discophora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 556–562, <https://doi.org/10.1128/aem.49.3.556-562.1985> (1985).
 15. Caspi, R., Tebo, B. M. & Haygood, M. G. c-type cytochromes and manganese oxidation in *Pseudomonas putida* MnB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3549–3555, <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3549-3555.1998> (1998).
 16. Hansel, C. M. & Francis, C. A. Coupled photochemical and enzymatic Mn(II) oxidation pathways of a planktonic *Roseobacter*-like bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3543–3549, <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3543-3549.2006> (2006).
 17. Beukes, L. S. & Schmidt, S. Isolation and characterization of a manganese-oxidizing bacterium from a biofiltration system for the treatment of borehole water in KwaZulu-Natal (South Africa). *Eng. Life Sci.* **12**, 544–552, <https://doi.org/10.1002/elsc.201100153> (2012).
 18. Qin, S., Ma, F., Huang, P. & Yang, J. Fe (II) and Mn (II) removal from drilled well water: A case study from a biological treatment unit in Harbin. *Desalination* **245**, 183–193, <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.04.048> (2009).
 19. Cerrato, J. M. *et al.* Manganese-oxidizing and -reducing microorganisms isolated from biofilms in chlorinated drinking water systems. *Water Res.* **44**, 3935–3945, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.04.037> (2010).
 20. van Waasbergen, L. G., Hildebrand, M. & Tebo, B. M. Identification and characterization of a gene cluster involved in manganese oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *J. Bacteriol.* **178**, 3517–3530, <https://doi.org/10.1128/jb.178.12.3517-3530.1996> (1996).
 21. Zhang, J., Lion, L. W., Nelson, Y. M., Shuler, M. L. & Ghiorse, W. C. Kinetics of Mn(II) oxidation by *Leptothrix discophora* SS1. *Geochim. Cosmochim. Acta* **66**, 773–781, [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(01\)00808-0](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00808-0) (2002).
 22. Su, J. *et al.* Catalytic oxidation of manganese(II) by multicopper oxidase CueO and characterization of the biogenic Mn oxide. *Water Res.* **56**, 304–313, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.013> (2014).

23. Biesinger, M. C., Lau, L. W. M., Gerson, A. R. & Smart, R. S. C. Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn. *Appl. Surf. Sci.* **257**, 887–898, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.10.051> (2010).
24. Chubar, N., Visser, T., Avramut, C. & de Waard, H. Sorption and precipitation of Mn^{2+} by viable and autoclaved *Shewanella putrefaciens*: Effect of contact time. *Geochim. Cosmochim. Acta* **100**, 232–250, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.09.051> (2013).
25. Queiroz, P. S., Barboza, N. R., Cordeiro, M. M., Leão, V. A. & Guerra-Sá, R. Rich growth medium promotes an increased on Mn(II) removal and manganese oxide production by *Serratia marcescens* strains isolates from wastewater. *Biochem. Eng. J.* **140**, 148–156, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.09.018> (2018).
26. Akob, D. M. *et al.* Identification of Mn(II)-oxidizing bacteria from a Low-pH contaminated former uranium mine. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 5086–5097, <https://doi.org/10.1128/AEM.01296-14> (2014).
27. Gudeta, D. D. *et al.* Erratum: The soil microbiota harbors a diversity of Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamases of potential clinical relevance (Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 151–160, <https://doi.org/10.1128/AAC.01424-15> (2016).
28. Wang, F. *et al.* Kitamycin C, a new antimycin-type antibiotic from *Streptomyces antibioticus* strain 200-09. *Nat. Prod. Res.* **31**, 1819–1824, <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1295240> (2017).
29. Arora, N. *et al.* A strain of *Streptomyces* sp. isolated from rhizospheric soil of *Crataegus oxycantha* producing nalidixic acid, a synthetic antibiotic. *J. Appl. Microbiol.* **124**, 1393–1400, <https://doi.org/10.1111/jam.13736> (2018).
30. Zheng, B. X. *et al.* Responses to soil pH gradients of inorganic phosphate solubilizing bacteria community. *Sci. Rep.* **9**, 1–8, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37003-w> (2019).
31. Abu Hasan, H., Sheikh Abdullah, S. R., Kamarudin, S. K., Tan Kofli, N. & Anuar, N. Kinetic evaluation of simultaneous COD, ammonia and manganese removal from drinking water using a biological aerated filter system. *Sep. Purif. Technol.* **130**, 56–64, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.04.016> (2014).
32. Tekerlekopoulou, A. G., Vasiliadou, I. A. & Vayenas, D. V. Biological manganese removal from potable water using trickling filters. *Biochem. Eng. J.* **38**, 292–301, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.07.016> (2008).
33. Fernando, D. R. *et al.* Foliar manganese accumulation by *Maytenus founieri* (Celastraceae) in its native New Caledonian habitats: populational variation and localization by X-ray microanalysis. *New Phytol.* **177**, 178–185, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02253.x> (2008).
34. Ehrlich, H. L. Bacteriology of manganese nodules II. manganese oxidation by cell-free Extract from a manganese nodule bacterium. *Appl. Microbiol.* **16**, 197–202 (1968).
35. Douka, C. E. Kinetics of manganese oxidation by cell-free extracts of bacteria isolated from manganese concretions from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 74–80 (1980).

36. Zhao, X., Wang, X., Liu, B., Xie, G. & Xing, D. Characterization of manganese oxidation by *Brevibacillus* at different ecological conditions. *Chemosphere* **205**, 553–558, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.130> (2018).
37. Pacini, V. A., Ingallinella, A. M. & Sanguinetti, G. Removal of iron and manganese using biological roughing up flow filtration technology. *Water Res.* **39**, 4463–4475, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.08.027> (2005).
38. Katsoyiannis, I. A., Zikoudi, A. & Hug, S. J. Arsenic removal from groundwaters containing iron, ammonium, manganese and phosphate: A case study from a treatment unit in northern Greece. *Desalination* **224**, 330–339, <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.06.014> (2008).
39. Aiba, S., Shoda, M. & Nagalani, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 845–864, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000320\)67:6<671::AID-BIT6>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000320)67:6<671::AID-BIT6>3.0.CO;2-W) (1998).
40. Carrera, J., Jubany, I., Carvallo, L., Chamy, R. & Lafuente, J. Kinetic models for nitrification inhibition by ammonium and nitrite in a suspended and an immobilised biomass systems. *Process Biochem.* **39**, 1159–1165, [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00214-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00214-0) (2004).
41. Kim, D. J., Choi, J. W., Choi, N. C., Mahendran, B. & Lee, C. E. Modeling of growth kinetics for *Pseudomonas* spp. during benzene degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 456–462, <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1997-z> (2005).
42. Youngwilai, A. *et al.* Simultaneous manganese adsorption and biotransformation by *Streptomyces violaceus* strain SBP1 cell-immobilized biochar. *Sci. Total Environ.* **713**, 136708, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136708> (2020).
43. Gabelich, C. J., Gerringer, F. W., Lee, C. C. & Knocke, W. R. Sequential manganese desorption-adsorption in anthracite coal and silica sand filter media. *J. Am. Water. Works. Assn.* **98**, 116–127, <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2006.tb07665.x> (2005).
44. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874, <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054> (2016).
45. Sahoo, N. K. & Panigrahy, N. Biodegradation and kinetic study of 4-Chlorophenol in bioreactor packed with stabilized bacteria entrapped in calcium alginate beads system. *Environ. Process.* **5**, 287–302, <https://doi.org/10.1007/s40710-018-0294-7> (2018).
46. Taweeetanawanit, P., Ratpukdi, T. & Siripattanakul-Ratpukdi, S. Performance and kinetics of triclocarban removal by entrapped *Pseudomonas fluorescens* strain MC46. *Bioresour. Technol.* **274**, 113–119, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.085> (2019).
47. Kidkhunthod, P. Structural studies of advanced functional materials by synchrotron-based x-ray absorption spectroscopy: BL5.2 at SLRI, Thailand. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **8**, 035007, <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aa7240> (2017).
48. Klysubun, W. *et al.* SUT-NANOTEC-SLRI beamline for X-ray absorption spectroscopy. *J. Synchrotron Radiat.* **24**, 707–716, <https://doi.org/10.1107/S1600577517004830> (2017).
49. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association

(AWWA), Water Environment Federation (WEF). Standard methods for the examination of water and wastewater (APHA, 2017).

Acknowledgements

This study was granted by Research Career Development Grant (RSA6080054, The Thailand Research Fund (TRF), Thailand), Research Fund for Supporting Lecturer to Admit High Potential Student to Study and Research on His Expert Program Year 2016 (GS 591JT212, Khon Kaen University, Thailand), Research Center for Environmental and Hazardous Substance Management (Khon Kaen University, Thailand), and Center of Excellence on Hazardous Substance Management (Thailand). Authors thanks Department of Environmental Engineering (Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand) and Synchrotron Light Research Institute (Nakhon Ratchasima, Thailand) for equipment support. Any opinions, findings, and conclusions or recommendations expressed in this material are those of the author and do not necessarily reflect the views of grant providers.

Author contributions

All authors have reviewed and agreed to all of the manuscript contents. **Nakharin Therdkiatkul**: Formal analysis and investigation, Writing - original draft preparation. **Thunyalux Ratpukdi**: Conceptualization, Methodology, Writing - review and editing. **Pinit Kidkhunthod**: Writing - review and editing, Formal analysis and investigation, Resources. **Narong Chanlek**: Writing - review and editing, Formal analysis and investigation, Resources. **Sumana Siripattanakul-Ratpukdi**: Conceptualization, Methodology, Writing - review and editing, Funding acquisition, Resources, Supervision.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at

Correspondence and requests for materials should be addressed to S. S.-R.

List of figures

Figure 1. Neighbor-joining phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences

Figure 2. Bacterial growth kinetic experiments: (A) predicted Monod model (B) predicted Aiba model

Figure 3. SEM-EDS images: (left) morphology of SBP1 and (right) EDS spectra observed on SBP1

Figure 4. XPS spectra of SBP1 (after manganese oxidation experiment): (A) survey scan and (B) high resolution spectrum of Mn2p peak

Figure 5. Manganese K-edge XANES data of SBP1 (after manganese oxidation experiment), MnO, Mn₂O₃, and MnO₂: (A) normalized and (B) derivative spectra

Figure 6. Proposed manganese removal mechanism by SBP1

List of tables

Table 1. LBB spot test and colony morphology of enriched bacterial cells

Table 2. Biological manganese removal by isolated cultures

Table 1.

Name	LBB spot test					Size (mm)	Colony morphology at 48 h				Environmental medium	Location
	1	2	3	4	5		Form	Colour	Elevation	Margin		
SBP1	+	+	+	+	+	1	Circular	White	Umbonate	Entire	Soil	Ban Phai
SBP2	+	+	+	+	+	1	Circular	White	Umbonate	Entire	Soil	Ban Phai
SBP3	+	+	+	+	+	1	Circular	White	Umbonate	Entire	Soil	Ban Phai
SBP4	-	-	-	+	-	1	Irregular	Yellow	Flat	Undulate	Soil	Ban Phai
SBP5	-	-	-	-	-	1	Circular	Yellow	Convex	Entire	Soil	Ban Phai
SBP6	-	-	-	-	-	1.5	Circular	Yellow	Convex	Entire	Soil	Ban Phai
SBP7	+	+	+	+	+	1	Circular	Yellow	Convex	Entire	Soil	Ban Phai
SBP8	-	-	-	-	-	0.3	Circular	Yellow	Convex	Entire	Soil	Ban Phai
FBP1	-	-	-	-	-	0.5	Circular	Orange	Convex	Entire	Sand filter	Ban Phai
FBP2	-	-	-	-	-	1.5	Circular	Yellow	Convex	Entire	Sand filter	Ban Phai
FBP3	+	+	+	+	+	1	Circular	White	Convex	Entire	Sand filter	Ban Phai
FBP4	-	-	+	-	-	1.5	Circular	Yellow	Convex	Entire	Sand filter	Ban Phai
FBP5	-	-	-	-	-	0.5	Circular	Yellow	Convex	Entire	Sand filter	Ban Phai
FBP6	-	-	-	-	-	1	Circular	Yellow	Convex	Entire	Sand filter	Ban Phai
FBP7	-	-	+	+	-	1	Circular	Brown	Pulvinate	Entire	Sand filter	Ban Phai
FBP8	-	-	-	-	-	0.5	Irregular	Yellow	Flat	Undulate	Sand filter	Ban Phai
FBP9	-	+	-	+	-	1	Circular	Brown	Pulvinate	Entire	Sand filter	Ban Phai
SKN1	-	-	-	-	+	0.5	Circular	Yellow	Convex	Entire	Soil	Kranuan
SKN2	-	-	-	-	-	0.5	Circular	White	Convex	Entire	Soil	Kranuan
SKN3	+	+	+	+	+	1	Circular	White	Convex	Entire	Soil	Kranuan
SKN4	-	-	-	-	-	0.5	Irregular	Yellow	Flat	Undulate	Soil	Kranuan

Table 2.

Strain	Source	Country	Manganese concentration during isolation (mg L ⁻¹)	Removal efficiency	Reference
<i>Arthrobacter</i> sp.	Manganese nodule	New York, USA	-	60% at initial manganese 0.15 mg L ⁻¹	34
<i>Citrobacter freundii</i>	Manganese concretion	Peloponnese, Greece	-	50 % at initial manganese 0.4 mg L ⁻¹	35
<i>Brevibacillus brevis</i> strain MO1 and	Activated sludge	Harbin, China	30	65 % at initial manganese 5.5 mg L ⁻¹	36
<i>Brevibacillus parabrevis</i> strain MO2	Activated sludge	Harbin, China	30	66 % at initial manganese 5.5 mg L ⁻¹	36
<i>Bacillus</i> SG-1	Marine sediment	California, USA	50	65 % at initial manganese 55 mg L ⁻¹	13
<i>Leptothrix discophora</i> SS-1	Metallic surface film	New York, USA	100	90 % at initial manganese 3 mg L ⁻¹	14
<i>Streptomyces violarius</i> strain SBP1	Soil	Khon Kaen, Thailand	100	45 % at initial managanese 5 mg L ⁻¹	This study
<i>Streptomyces violarius</i> strain SBP2	Soil	Khon Kaen, Thailand	100	41 % at initial managanese 5 mg L ⁻¹	This study
<i>Chryseobacterium cucumeris</i> strain SBP7	Soil	Khon Kaen, Thailand	100	9 % at initial managanese 5 mg L ⁻¹	This study