

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E41076

**EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES ON NITRIFICATION  
BY ENTRAPPED CELLS**

**MISS CHUTIMA PLOYCHANKUL**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE PROGRAM IN ENVIRONMENTAL MANAGEMENT  
(INTERDISCIPLINARY PROGRAM)  
GRADUATE SCHOOL  
CHULALONGKORN UNIVERSITY  
ACADEMIC YEAR 2010  
COPYRIGHT OF CHULALONGKORN UNIVERSITY**

600255555

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES ON NITRIFICATION  
BY ENTRAPPED CELLS



Miss Chutima Ploychankul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Management  
(Interdisciplinary Program)  
Graduate School  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2010  
Copyright of Chulalongkorn University



ผลกระทบของซิลเวอร์นาโนต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันในเซลล์ดักติด

นางสาวชุติมา พลอยจันทร์กุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2553  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ชุดิมา พลอยจันทร์กุล : ผลกระทบของซิลเวอร์ขนาดนาโนต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันในเซลล์ดักติด. Effect of silver nanoparticle on nitrification by entrapped cells. อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ดร.สุมนา สิริพัฒนากุล อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.ตะวัน ลิ้มปิยากร, 95 หน้า.

## E<sub>1076</sub>

การศึกษาเป็นการศึกษาผลกระทบของซิลเวอร์อนุภาคนาโน (AgNP) ต่อกระบวนการไนตริฟิเคชันโดยใช้เซลล์ดักติด การศึกษาประกอบด้วยการศึกษาผลของ AgNP ต่อสมรรถนะการไนตริฟิเคชันและลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์ โดยศึกษาครอบคลุมอิทธิพลของความเข้มข้นแอมโมเนียและ AgNP เริ่มต้นต่อสมรรถนะการไนตริฟิเคชันของเซลล์ดักติดซึ่งใช้วิธีการเรสไพโรเมตริก การศึกษาเซลล์ดักติดจำแนกออกได้เป็นเซลล์ดักติดสองชนิด (แคลเซียมแอลจิเนต (CA) และพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA)) และสองขนาด (เล็กและใหญ่) การทดลองโดยใช้เซลล์อิสระได้กระทำควบคู่ไปกับเซลล์ดักติด เพื่อใช้เปรียบเทียบผลการศึกษา ส่วนการศึกษาผลต่อลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์และวัสดุดักติดศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนและแบบทรานสมิSSION ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้น (28 and 70 mg-N/L) ไม่ส่งผลกระทบต่อกิจกรรมการไนตริฟิเคชัน ในขณะที่ความเข้มข้นของ AgNP (0.05 to 5 mg/L) ส่งผลกระทบต่อการไนตริฟิเคชันอย่างชัดเจน (กิจกรรมไนตริฟิเคชันเท่ากับร้อยละ 2 ถึง 98 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มี AgNP) สำหรับเซลล์ดักติดทั้งสอง (CA และ PVA) สามารถช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ แต่พบว่าเซลล์ดักติดด้วย CA ซึ่งมีกิจกรรมไนตริฟิเคชันเท่ากับร้อยละ 64 ถึง 93 มีสมรรถนะการไนตริฟิเคชันดีกว่าเซลล์ดักติดด้วย PVA ซึ่งมีกิจกรรมไนตริฟิเคชันเท่ากับร้อยละ 4 ถึง 87 นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งเซลล์ดักติดด้วย CA และ PVA ขนาดใหญ่ซึ่งมีกิจกรรมไนตริฟิเคชันเท่ากับร้อยละ 44 ถึง 93 มีสมรรถนะดีกว่าขนาดเล็กซึ่งมีกิจกรรมไนตริฟิเคชันเท่ากับร้อยละ 4 ถึง 89 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสอดคล้องกับผลข้างต้น กล่าวคือ AgNP แทรกซึมเข้าไปภายในเซลล์และทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และไซโทพลาสซึมผลส่งให้กิจกรรมไนตริฟิเคชันลดลง รวมทั้งยังพบอีกว่าวัสดุดักติดสามารถลดทอนปัญหานี้ได้

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม .....ลายมือชื่อนิสิต.....ได้งาน.....ผลคะแนน.....  
ปีการศึกษา 2553 .....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

## 5187523820 : MAJOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT

KEYWORDS : CELL ENTRAPMENT NITRIFICATION NITRIFYING  
BACTERIA RESPIROMETER SILVER NANOPARTICLES

CHUTIMA PLOYCHANKUL : EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES  
ON NITRIFICATION BY ENTRAPPED CELLS

THESIS ADVISOR : SUMANA SIRIPATTANAKUL, Ph.D.

THESIS CO-ADVISOR : TAWAN LIMPIYAKORN, Ph.D., 95 pp.

**E41076**

Effect of silver nanoparticles (AgNP) on nitrification by entrapped cells was investigated. The study consisted of the AgNP effect on nitrification performance and microorganism physiology. The influences of initial ammonia and AgNP concentrations on the nitrification performance by the entrapped cells were conducted using respirometric method. Two types (calcium alginate (CA) and polyvinyl alcohol (PVA)) and two sizes (small and large) of the entrapped cells were chosen. The test using the free cells was also performed for comparative purpose. For physiological effect, scanning electron microscopic (SEM) and transmission electron microscopic (TEM) observations of the microbial cells and matrices were performed. The result showed that the initial ammonia concentrations (28 and 70 mg-N/L) did not play the important role on the nitrification activity while the AgNP concentrations (0.05 to 5 mg/L) obviously affected on the nitrification (activities of 2 to 98 % compared to the control (no AgNPs). Both PVA- and CA-entrapped cells could lessen the problem but nitrification performance by the CA-entrapped cells (activities of 64-93%) was better than that of the PVA-entrapped cells (activities of 4 to 87 %). For both PVA- and CA- entrapped cells, large entrapped cells (activities of 44 to 93 %) performed better than small entrapped cells (activities of 4 to 89 %). The microscopic observation supported the respirometric result. Silver nanoparticles penetrated and damaged microbial cell membrane and cytoplasm resulting in decreased nitrification activity. The entrapment matrices could minimize the problem.

Field of Study : Environmental Management

Academic Year : 2010

Student's Signature Chutima Ploychankul

Advisor's Signature [Signature]

Co-Advisor's Signature [Signature]

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my grateful appreciation and sincere gratitude to my advisor, Dr. Sumana Siripattanakul for her kindness and to provide an opportunity to her advisee during entire of my study. I owe my deepest gratitude for her valuable advices, encouragement, supports, and guidance throughout my research.

I would like to express my deepest and sincere gratitude to my co-advisor, Dr. Tawan Limpiyakorn, for his kindness, useful comments, and suggestions throughout my study. I am heartily thankful to my graduate committees, Assistant Professor Dr. Ekawan Luepromchai, Associate Professor Dr. Jin Anotai, and Dr. Sorawit Powtongsook.

Appreciation is also expressed to Associate Professor Sanong Ekgasit and Dr. Pattwat Maneewattanapinyo from Sensor Research Unit at Department of Chemistry, Chulalongkorn University, Thailand for supports on silver nanoparticles and its information. I am also grateful to Chaiwat Rongsayamanont for good advises on nitrification information and support in every method in the entire study. I would like to express my faithful heart to Narrerat Tongtavol for cheering up and inspiring me when I gave up and upset during the period.

This thesis would not have been possible if there are no financial supports from the National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management (NCE-EHWM), Graduate School, Chulalongkorn University. The thesis also partially supported by the Thailand Research Fund and Office of the Higher Education Commission via New Researcher Grant which granted for my advisor.

Last but definite not least, I owe my loving thanks to my dear family and friends for their love, pushing up, encouragement, and cheerfulness throughout my life.

# CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xii
LIST OF FIGURES.....	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 General introduction.....	1
1.2 Objectives.....	3
1.3 Scopes.....	3
1.4 Hypotheses.....	4
CHAPTER II THEORETICAL BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW.....	5
2.1 Silver nanoparticles.....	5
2.1.1 Properties of silver nanoparticles.....	5
2.1.2 Application of silver nanoparticles.....	5
2.1.3 Fate and transport of silver nanoparticles.....	7
2.1.4 Effect of silver nanoparticles in the environment.....	8
2.1.4.1 Human.....	8
2.1.4.2 Animal.....	8
2.1.4.3 Microorganisms.....	9
2.1.4.4 Wastewater treatment plant.....	10

	Page
2.2 Nitrification.....	10
2.2.1 Microbial nitrification.....	11
2.2.2 Influential factors for nitrification.....	15
2.2.2.1 Ammonia.....	15
2.2.2.2 Biochemical Oxygen Demand (BOD <sub>5</sub> ).....	15
2.2.2.3 Sludge Retention Time (SRT).....	15
2.2.2.4 Salinity.....	16
2.2.2.5 Temperature.....	16
2.2.2.6 pH and alkalinity .....	16
2.2.2.7 Dissolved oxygen concentration.....	17
2.2.2.8 Light.....	17
2.2.3 Nitrification process monitoring.....	17
2.2.3.1 Decrease in dissolved oxygen.....	17
2.2.3.2 Decrease in ammonia concentration.....	18
2.2.3.3 Real-time polymerase chain reaction.....	18
2.3 Cell entrapment.....	18
2.3.1 Principle of cell entrapment.....	19
2.3.2 Types of cell entrapment materials.....	19
2.3.2.1 Calcium alginate .....	20
2.3.2.2 Carragenan.....	21
2.3.2.3 Polyvinyl alcohol.....	21
2.3.2.4 Cellulose triacetate.....	22
2.3.3 Application of entrapped cells.....	22
2.3.3.1 Biomedical.....	22

	Page
2.3.3.2 Food and beverage.....	22
2.3.3.3 Wastewater treatment.....	23
CHAPTER III METHODOLOGY.....	24
3.1 Experimental framework.....	24
3.2 Chemicals and culture preparation.....	26
3.2.1 Chemicals.....	26
3.2.2 Nitrifying activated sludge and cultural condition.....	26
3.2.3 Nitrification ability verification of enriched NAS.....	27
3.2.3.1 Ammonia reduction test.....	28
3.2.3.2 Nitrate reduction test.....	28
3.3 Nitrification experiment.....	28
3.3.1 Respirometer setup and operation.....	28
3.3.2 Oxygen Uptake Rate and Specific Oxygen Uptake Rate Calculation.....	30
3.4 Cell entrapment procedure.....	31
3.4.1 Calcium alginate entrapment.....	31
3.4.2 Polyvinyl alcohol entrapment.....	31
3.5 Microscopic observation.....	33
3.5.1 Scanning electron microscopic (SEM) observation...	33
3.5.1.1 Scanning electron microscopic sample preparation.....	33
3.5.1.2 Scanning electron microscopic observation procedure.....	34

	Page
3.5.2 Transmission electron microscopic (TEM)	
observation.....	34
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION.....	36
4.1 Nitrification activated sludge acclimatization.....	36
4.2 Nitrification activities by the free cells.....	37
4.2.1 Effect of initial ammonia concentration.....	37
4.2.2 Effect of initial silver nanoparticles concentration.....	40
4.3 Nitrification activities by the entrapped cells.....	43
4.3.1 Polyvinyl alcohol-entrapped cells.....	43
4.3.1.1 Small PVA-entrapped cells.....	43
4.3.1.2 Large PVA-entrapped cells .....	44
4.3.2 Calcium alginate-entrapped cells.....	46
4.3.2.1 Small CA-entrapped cells.....	46
4.3.2.2 Large CA-entrapped cells.....	47
4.3.3 Comparison of nitrification activities of polyvinyl alcohol- and calcium alginate-entrapped cells.....	48
4.3.4 Comparison of nitrification activities of small and large entrapped cells.....	49

	Page
4.4 Comparison of nitrification process by free cells and entrapped cells.....	50
4.5 Scanning electron microscopic observation.....	51
4.5.1 Polyvinyl alcohol-entrapped cells.....	51
4.5.2 Calcium alginate-entrapped-cells.....	55
4.6 Transmission electron microscopic observation.....	57
CHAPTER V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.....	61
5.1 Conclusions.....	61
5.2 Recommendations.....	62
REFERENCES.....	63
APPENDICES.....	77
APPENDIX A.....	78
APPENDIX B.....	80
BIOGRAPHY.....	95

## LIST OF TABLES

		Page
Table 2.1	Properties of silver nanoparticles.....	6
Table 2.2	Characteristics of the genera of AOB.....	11
Table 2.3	Differentiation of the four genera of NOB.....	13
Table 2.4	Classification of the immobilized cell techniques.....	20
Table 3.1	Composition of growth medium.....	27
Table 3.2	Composition of inorganic salt.....	27
Table 3.3	Synthetic wastewater composition for the free cells systems.....	30
Table 3.4	Composition of synthetic wastewater in respirometer for the CA-entrapped cell systems.....	32
Table 3.5	Composition of the growth medium in respirometer for the PVA-entrapped cell systems.....	33
Table 4.1	Oxygen uptake rate and specific oxygen uptake rate.....	42
Table 4.2	Oxygen uptake rate from PVA-entrapped cells.....	45
Table 4.3	Oxygen uptake rate from CA-entrapped cells.....	48
Table 4.4	Comparison of oxygen uptake rate between PVA- and CA-entrapped cells.....	49
Table A.1	Dissolved oxygen concentration from respirometer setup test.....	79
Table B.1	Ammonia reduction and nitrate production tests.....	81

	Page
Table B.2 Dissolved oxygen concentration from free cells with ammonia concentration at 28 mg-N/L.....	84
Table B.3 Dissolved oxygen concentration from free cells with ammonia concentration at 70 mg-N/L.....	86
Table B.4 Dissolved oxygen concentration from the small PVA-entrapped cells.....	88
Table B.5 Dissolved oxygen concentration from the large PVA-entrapped cells.....	89
Table B.6 Dissolved oxygen concentration from the small CA-entrapped cells.....	91
Table B.7 Dissolved oxygen concentration from the large CA-entrapped cells.....	93

## LIST OF FIGURES

	Page
Figure 2.1	16S rDNA-based phylogenetic tree in class <i>Betaproteobacteria</i> .. 12
Figure 2.2	16S rRNA-based tree of NOB..... 14
Figure 3.1	Experimental framework..... 25
Figure 3.2	Respirometer setup..... 30
Figure 4.1	Ammonia concentrations during NAS acclimatization..... 36
Figure 4.2	Nitrate concentrations during NAS acclimatization..... 37
Figure 4.3	Dissolved oxygen concentration from the test at 28 and 70 mg-N/L with AgNp concentrations of 0 mg/L..... 38
Figure 4.4	Dissolved oxygen concentrations from the tests at 28 and 70 mg-N/L with AgNP concentrations of 0.05 mg/L..... 39
Figure 4.5	Dissolved oxygen concentrations from the tests at 28 and 70 mg-N/L with AgNP concentrations of 0.5 mg/L..... 39
Figure 4.6	Dissolved oxygen concentrations from the tests at 28 and 70 mg-N/L with AgNP concentrations of 5 mg/L..... 40
Figure 4.7	Dissolved oxygen concentrations from the tests at 28 mg-N/L with AgNP concentrations of 0, 0.05, 0.5, and 5 mg/L..... 41
Figure 4.8	Dissolved oxygen concentrations from the tests at 28 mg-N/L with AgNP concentrations of 0, 0.05, 0.5, 1, and 5 mg/L..... 42
Figure 4.9	Dissolved oxygen concentrations from small PVA-entrapped cells at the different concentrations of AgNPs..... 44

	Page
Figure 4.10 Dissolved oxygen concentrations from large PVA-entrapped cells at the different concentrations of AgNPs.....	45
Figure 4.11 Dissolved oxygen concentrations from small CA-entrapped cells at the different concentrations of AgNPs.....	46
Figure 4.12 Dissolved oxygen concentrations from large CA-entrapped cells at the different concentrations of AgNPs.....	47
Figure 4.13 Observed location of the entrapped cells.....	51
Figure 4.14 SEM images of the PVA-entrapped cells.....	52
Figure 4.15 SEM images of the PVA-entrapped cells.....	53
Figure 4.16 SEM images of the small PVA-entrapped cells.....	54
Figure 4.17 SEM images of the CA-entrapped cells.....	56
Figure 4.18 SEM images of the small CA-entrapped cells.....	57
Figure 4.19 TEM images of the spherical synthetic AgNPs.....	59
Figure 4.20 TEM images of free cells treated from the test with 5 mg/L of AgNPs .....	59
Figure 4.21 TEM images of separated cells from PVA entrapped cells treated from the test with 5 mg/L of AgNPs .....	60