REMOVAL OF TCE FROM SOIL BY BIOAUGMENTATION AND BIOSTIMULATION TECHNIQUES

Miss Kanthima Phummala

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 2006
Copyright of Chulalongkorn University

การกำจัดสารไตรคลอโรเอธิลีนจากดินโดยวิธีการเติมจุลินทรีย์และการกระตุ้นจุลินทรีย์

นางสาวกันทิมา พุ่มมาลา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

492148

Thesis Title	Removal of TCE from Soil by Bioaugmentation and Biostimulation Techniques
By	Miss Kanthima Phummala
Field of Study	Environmental Management
Thesis Advisor	Associate Professor Alissara Reungsang, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Manaskorn Rachakornkij, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Alissara Reungsang, Ph.D.)

..... Member
(Ekawan Luepromchai, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Jin Anotai, Ph.D.)

กันทิมา พุ่มมาลา: การกำจัดสารไตรคลอโรเอธิลีนจากดินโดยวิธีการเติมจุลินทรีย์และการกระตุ้นจุลินทรีย์ (REMOVAL OF TCE FROM SOIL BY BIOAUGMENTATION AND BIOSTIMULATION TECHNIQUES) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร.อลิศรา เรืองแสง, 93 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไตรคลอโรเอธิลีน (TCE) ในดินโดยใช้เทคนิคการเติมเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของจุลินทรีย์สายพันธุ์เดี่ยว *Rhodococccus* sp. P3 (P3) และกลุ่มจุลินทรีย์จากกากตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (acclimatized activated sludge) (AS) โดยทำการตรึงเซลล์แต่ละชนิดในซังข้าวโพดและกาบมะพร้าว ในการศึกษานี้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสาร TCE เท่ากับ 100 มก./กก. ผลการศึกษาพบว่า AS สามารถย่อยสลาย TCE ได้ดีกว่า P3 โดย เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย TCE ในดินที่เติมเซลล์อิสระของ AS เท่ากับ 88.15% ซึ่งสูงกว่าในดินที่เติม P3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 53.34% เซลล์ตรึงของ AS บนซังข้าวโพดมีความสามารถในการย่อยสลาย TCE สูงกว่าเซลล์อิสระโดยมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 94.31 % และ 88.15 % ตามลำดับ ในชุดการทดลองที่เติมเซลล์ตรึงของทั้ง P3 และ AS บนซังข้าวโพดมีจำนวนจุลินทรีย์สูงกว่าชุดการทดลองที่เติมเซลล์อิสระ แสดงให้เห็นว่าเทคนิคการตรึงเซลล์ช่วยเพิ่มการอยู่รอดของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปในดินได้ ผิวมะกรูดและโทลูอีนถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการเจริญและชักนำให้จุลินทรีย์ย่อยสลาย TCE ผลการศึกษา พบว่า ความเข้มข้นของผิวมะกรูดและโทลูอีนที่เหมาะสมในการชักนำจุลินทรีย์ประจำถิ่นในดินให้ย่อยสลาย TCE คือ 50 มก/กก และ 100 มก/กก ตามลำดับ แล้วใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นทั้งสองนี้ในการศึกษาผลของการกระตุ้นจุลินทรีย์โดยการเติมกากมันสำปะหลัง โดยในชุดการทดลองที่ใช้ผิวมะกรูดเป็นสารตั้งต้นในการเจริญพบว่า การย่อยสลาย TCE ในดินที่ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในเป็น 20:1 30:1 และ 40:1 มีการย่อยสลายไตรคลอโรเอธิลีนอยู่ในช่วง 18.87% ถึง 43.44% ซึ่งน้อยกว่าในดินที่ไม่มีการเติมกากมันสำปะหลัง (80.14%) แสดงให้เห็นว่าการเติมกากมันสัมปะหลังไม่สามารถกระตุ้นจุลินทรีย์ประจำถิ่นให้ย่อยสลาย TCE ได้ ในชุดการทดลองที่ใช้โทลูอีนเป็นสารตั้งต้นในการเจริญในทุกๆ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีการย่อยสลาย TCE อยู่ในช่วง 73.48% ถึง 95.63% ซึ่งสูงกว่าในดินที่ไม่มีการเติมกากมันสำปะหลัง (65.02%) แสดงให้เห็นว่ากากมันสำปะหลังสามารถกระตุ้นจุลินทรีย์ประจำถิ่นให้ย่อยสลายไตรคลอโรเอธิลีนได้เมื่อใช้โทลูอีนเป็นสารตั้งต้นในการเจริญ นอกจากนั้นเมื่อทดลองเติมเซลล์ตรึงของ AS ร่วมกับกากมันสำปะหลังในดินที่ใช้ผิวมะกรูดเป็นสารตั้งต้นในการเจริญ พบว่าไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย TCE ในดินได้

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4889404520: MAJOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT
KEY WORD: BIOAUGMENTATION/ BIOSTIMULATION/
TRICHLOROETHYLENE/ IMMOBILIZATION

KANTHIMA PHUMMALA: REMOVAL OF TCE FROM SOIL BY
BIOAUGMENTATION AND BIOSTIMULATION TECHNIQUES
THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. ALISSARA REUNGSANG, Ph.D., 93 pp.

This study aims to efficiently remove TCE from soil by using bioaugmentation and biostimulation techniques. TCE degradation abilities of free cell and immobilized cell of *Rhodococcus* sp. P3 (P3) in comparison to mixed cultures obtained from acclimatized activated sludge (AS) were investigated. Corncob and coir were used as supporting materials for immobilization. Initial concentration of TCE in soil microcosm was 100 mg/kg. Results showed that mixed cultures obtained from acclimatized AS could degrade TCE better than pure culture i.e., 88.15% and 53.34%, respectively. Immobilized acclimatized AS on corncob had a higher TCE degradation abilities, 94.31%, than free cell form (88.15%). Immobilization technique using corncob as support material improved survival of cells which indicated by higher cell numbers of TCE degraders in microcosms augmented with immobilized cell than with free cell. Kaffir lime peel and toluene could induce indigenous microorganisms in soil to degrade TCE. Optimal concentrations of kaffir lime peel and toluene to induce indigenous microorganisms were 50 and 100 mg/kg, respectively. These concentrations were further used in biostimulation experiment using cassava pulp as organic amendment. When kaffir lime peel at 50 mg/kg was used as a primary substrate, relative percentages of TCE removal by indigenous microorganisms in soil amended with cassava pulp at all ratios, C:N 20:1, 30:1 and 40:1 were in the range of 18.87% to 43.44% which was significantly lower than in unamended soil (80.14%) suggesting that the addition of cassava pulp did not stimulate indigenous microorganisms to degrade TCE. Superior result was obtained when toluene was used as primary substrate. Relative percentage of TCE removal by indigenous microorganisms in soil amended with cassava pulp at all C:N ratios were in the range of 73.48% to 95.63% which were higher than in unamended soil (65.02%) indicated that cassava pulp could stimulate indigenous microorganisms to degrade TCE in the presence of toluene. Combination of bioaugmentation plus biostimulation did not enhance TCE removal from soil.

Field of study Environmental Management Student's signature Kanthima Phummala

Academic year 2006 Advisor's signature .....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest and sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Alissara Reungsang for her kindness and to provide an opportunity to be her advisee. I am also grateful for her valuable supervision, valuable suggestions, supports, encouragement, guidance and criticism throughout the course of my study.

Sincere thanks and appreciation are also addressed to my graduate committee, Dr. Manaskorn Rachakornkij, Dr. Ekawan Luepromchai, and Associate Professor Dr. Jin Anotai for their helpful suggestions and criticisms.

I am also grateful to International Post Graduate Programs in Environmental Management, Chulalongkorn University for giving me all of knowledge and skills and Department of Biotechnology, KKU for facilitation of laboratory instruments and chemicals support and all Department of Biotechnology, KKU's members for the valuable suggestions.

This study cannot be finished without the supports of the National Research Center for Environmental and Hazardous Waste Management, Chulalongkorn University and the Research Centre for Environmental and Hazardous Substance Management-Khon Kaen University.

Appreciation is also expressed to all staff and members of the Department of Biotechnology and NRC-EHWM for their practical helps, providing the wonderful environment and friendship during the time of this study. I would like to thank P'Kan, P'Ion, P'Tor and P'Som-O for advising and special helps of doing thesis works and report, and also thank P'Nat, P'Aor, P'Kong (yai), P'Kong (noi), P' Janjao, Kluay, Toey, Milk, Wun, P'Tik, P'Shine, P'Oramas, N'Juk, N'Bausai, Koy, Poupae, Jacky, Kwan, Nichy, Namglan, Sairoong and all of my classmates at NRC-EHWM for their helps and friendship. My special additional thanks to "P'Pui", "Joy" and "Suwat" who always stand beside me and give me kindly encouragement.

Finally, I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my beloved parents, my lovely brother, my grandmother and all of my family for their love, motivation, inspiration and encouragement and support throughout of my life.

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT (IN THAI) iv
ABSTRACT (IN ENGLISH) v
ACKNOWLEDGEMENTS vi
TABLE OF CONTENTS vii
LIST OF TABLES ix
LIST OF FIGURES x
CHAPTER I INTRODUCTION 1
1.1 Introduction 1
1.2 Objectives 4
1.3 Hypotheses 4
1.4 Scope of the Study 4
CHAPTER II LITERATURE REVIEW 6
2.1 Trichloroethylene (TCE) 6
2.2 Biodegradation of Chlorinated Hydrocarbon 9
2.3 Bioremediation 12
2.4 Immobilization Technique 16
CHAPTER III RESEARCH METHODOLOGY 20
3.1 Materials 20
3.2 Methodology 22
3.3 Analytical Method 25
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION 27
4.1 Soil Characterization 27
4.2 Bioaugmentation of TCE 27
4.3 Effect of Kaffir Lime Peel as a Potential Primary Substrate on TCE Degradation 34
4.4 Effect of Cassava Pulp as Organic Amendment on TCE Degradation 38
4.5 Effects of Biostimulation plus Bioaugmentation on TCE Degradation 41

Page

CHAPTER V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATION 44
REFERENCES 46
APPENDICES 58
APPENDIX A 59
APPENDIX B 66
APPENDIX C 69
APPENDIX D 74
APPENDIX E 79
APPENDIX F 82
APPENDIX G 84
BIOGRAPHY 93

LIST OF TABLES

Page

Table 2.1 Physicochemical properties of TCE 7
Table 4.1 Characteristics of soil 27
Table 4.2 Relative percentage of TCE removal by free and immobilized cells forms of *Rhodococcus* sp. P3 and acclimatized activated sludge in soil microcosm at day 21 28
Table 4.3 Cell number of free cell and immobilized cell forms of *Rhodococcus* sp. P3 and acclimatized activated sludge in soil 30
Table 4.4 Cell number of immobilized cell forms of *Rhodococcus* sp. P3 and acclimatized activated sludge in soil in support materials 32
Table 4.5 Cell number of reused immobilized acclimatized activated sludge on corn cob in soil and support material 33
Table 4.6 Relative percentage of TCE removal in soil microcosm amended with various concentrations of kaffir lime peel after 14 days of incubation 35
Table 4.7 Effect of cassava pulp on stimulation of microorganisms 39
Table 4.8 Effect of combination between biostimulation and bioaugmentation on TCE degradation 42
Table B-1 Percent recovery of TCE in soil microcosm spiked with 100 mg/kg of TCE 68
Table D-1 Number of TCE degrader in soil microcosm induced with various concentration of kaffir lime peel and toluene 75
Table D-2 Number of TCE degrader in soil microcosm adjusted by cassava pulps at various C:N ratio 76
Table D-3 Number of bacteria in soil microcosm adjusted by cassava pulps at various C:N ratio 77
Table D-4 Number of fungi in soil microcosm adjusted by cassava pulps at various C:N ratio 78

LIST OF FIGURES

Page

Figure 2.1 Structure of TCE 6
Figure 2.2 Proposed scheme of TCE metabolism 10
Figure 2.3 Diagram of co-metabolism of TCE 11
Figure 2.4 Proposed pathway for a reductive dechlorination of PCE 12
Figure 2.5 Basic methods of cell immobilization 17
Figure 4.1 Degradation profiles of TCE in soil microcosms 30
Figure 4.2 Degradation profile of TCE in soil microcosm augmented with reused immobilized acclimatized activated sludge on corncob . 33
Figure A-1 Standard curves of TCE in soil 60
Figure A-2 Standard curves of TCE in soil containing corncob 60
Figure A-3 Standard curves of TCE in soil containing coir 61
Figure A-4 Standard curves of TCE in soil containing kaffir lime peel at concentration of 50 mg/kg 61
Figure A-5 Standard curves of TCE in soil containing kaffir lime peel at concentration of 100 mg/kg 62
Figure A-6 Standard curves of TCE in soil containing kaffir lime peel at concentration of 150 mg/kg 62
Figure A-7 Standard curves of TCE in soil containing kaffir lime peel at concentration of 250 mg/kg 63
Figure A-8 Standard curves of TCE in soil adjusted C:N to 20:1 by cassava pulp 63
Figure A-9 Standard curves of TCE in soil adjusted C:N to 30:1 by cassava pulp 64
Figure A-10 Standard curves of TCE in soil adjusted C:N to 30:1 by cassava pulp 64
Figure A-11 Standard curve of INTF in methanol 65
Figure C-1 Degradation profiles of TCE in soil microcosm added with various concentration of kaffir lime peel as primary substrate 70

Page

Figure C-2 Degradation profiles of TCE in soil microcosm added with various concentration of toluene as primary substrate 71
Figure C-3 Degradation profiles of TCE in soil microcosm adjusted by cassava pulp at various C:N ratios 72
Figure C-4 Degradation profiles of TCE in soil microcosm augmented with immobilized acclimatized activated sludge on corncob and adjusted by cassava pulp at various C:N ratios 73
Figure E-1 Microbial activity in soil microcosm adjusted by cassava pulp at variousC:N ratios 80
Figure E-2 Microbial activity in soil microcosm augmented with immobilized acclimatized activated sludge on corncob and adjusted by cassava pulp at various C:N ratios 81