TREATMENT OF OILY WASTEWATER BY CHITOSAN IMMOBILIZED BACTERIA

Miss Nichakorn Khondee

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 2007
Copyright of Chulalongkorn University

การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันโดยใช้แบคทีเรียตรึงบนไคโตซาน

นางสาวณิชากร คอนดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

500545

Thesis Title	TREATMENT OF OILY WASTEWATER BY CHITOSAN IMMOBILIZED BACTERIA
By	Miss Nichakorn Khondee
Field of Study	Environmental Management
Thesis Principal Advisor	Ekawan Luepromchai, Ph.D.

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

Vice President

.....Acting Dean of the Graduate School

(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairperson

(Assistant Professor Manaskorn Rachakornkij, Ph.D.)

.....Thesis Principal Advisor

(Ekawan Luepromchai, Ph.D.)

.....External Member

(Assistant Professor Benjaphorn Prapagdee, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Onruthai Pinyakong, Ph.D.)

.....Member

(Tawan Limpiyakorn, Ph.D.)

ฉิชากร คอนดี : การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันโดยใช้แบคทีเรียตรึงบนไคโตซาน (TREATMENT OF OILY WASTEWATER BY CHITOSAN IMMOBILIZED BACTERIA) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย, 125 หน้า

ในการศึกษานี้ไคโตซานตรึงแบคทีเรียได้ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมัน ไคโตซานเป็นสารโพลิเมอร์ชีวภาพที่มีประจุบวก ซึ่งสามารถผลิตได้จากการตรึงหมู่อะซิทิลของไคตินออกไป สำหรับน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นน้ำเสียน้ำมันในน้ำอิมัลชัน 200 มิลลิกรัม/ลิตร ที่สังเคราะห์จากการผสมกันระหว่างน้ำมันหล่อลื่น น้ำกลั่นและสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ โดยในการศึกษาเบื้องต้นพบว่าไคโตซานชนิดผง ไคโตซานชนิดเกล็ดจากเปลือกกุ้ง และ ไคโตซานชนิดเกล็ดจากแกนปลาหมึก สามารถดูดซับน้ำมันในสารละลายบัพเฟอร์พีเอช 7 ได้ถึง 0.48 0.19 และ 0.24 กรัมน้ำมัน/กรัมไคโตซาน โดยในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันโดยไคโตซานพบว่า ปริมาณไคโตซาน 1.0 กรัม/ลิตร และระยะเวลาผสม 60 นาทีเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดน้ำมันและความขุ่นได้สูงถึง 80% และในการคัดแยกแบคทีเรียจาก 5 ดินตัวอย่างเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์พบว่ามีแบคทีเรีย 2 กลุ่ม (Ch2 และ Ch4) ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันได้มากที่สุด โดยแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มนั้นมีศักยภาพในการย่อยสลายสารกลุ่มอะโรมาติกได้มากกว่าสารกลุ่มอื่น หลังจากนั้นแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้จึงถูกนำไปย่อยสลายน้ำมันในน้ำอิมัลชัน 200 มิลลิกรัม/ลิตร และพบว่าแบคทีเรีย Ch2 สามารถย่อยสลายอิมัลชันได้ถึง 80 % ในขณะที่แบคทีเรีย Ch4 สามารถย่อยสลายอิมัลชันได้เพียง 65 % ดังนั้นแบคทีเรีย Ch2 จึงถูกเลือกเพื่อนำไปตรึงบนไคโตซานทั้ง 3 ชนิด และนำใช้ในการบำบัดนำมันในน้ำอิมัลชันที่มีความเข้มข้นสูง โดยจากผลการทดลองพบว่าการใช้แบคทีเรียตรึงบนไคโตซานแบบเกล็ดทั้ง 2 ชนิด สามารถบำบัดน้ำมันในน้ำอิมัลชันได้สูงสุด และในงานวิจัยนี้ได้ทำการประเมินและเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียอิมัลชันโดยใช้วิธีในการบำบัด 3 วิธีด้วยกันคือ การบำบัดโดยใช้เทคนิคการดูดซับโดยไคซาน การย่อยสลายโดยแบคทีเรีย และการดูดซับและการย่อยสลายโดยไคโตซานตรึงแบคทีเรีย จากการทดลองพบว่าในการบำบัดน้ำมันในน้ำอิมัลชันที่มีการเพิ่มความเข้มข้นทุกวันนั้น การบำบัดโดยใช้เทคนิคการดูดซับและการย่อยสลายโดยไคโตซานตรึงแบคทีเรียมีประสิทธิภาพสูงสุดถึง 91% และคงที่ตลอดการทดลอง ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการบำบัดน้ำมันในน้ำอิมัลชันโดยเทคนิคการดูดซับและการย่อยสลายโดยไคโตซานตรึงแบคทีเรีย เป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่สุดในการบำบัดน้ำมันในน้ำอิมัลชัน

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต.....ฉิชากร คอนดี.....

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

4989423520 : MAJOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT
KEYWORD : CHITOSAN / IMMOBILIZATION / OILY WASTEWATER / OIL-IN-WATER EMULSION / BIODEGRADATION

NICHAKORN KHONDEE : TREATMENT OF OILY WASTEWATER BY CHITOSAN IMMOBILIZED BACTERIA. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: EKAWAN LUEPROMCHAI, Ph.D., 125 pp.

Removal of oily wastewater by a natural sorbent integrated with biodegradation technique was explored in this laboratory-scale study. Chitosan is a cationic biopolymer produced by the extensive deacetylation of chitin obtained from shrimp shell wastes. To simulate wastewater from gas station, oil-in-water emulsion was prepared by mixing lubricating oil with distilled water and a nonionic emulsifier. The final concentration of oil was equivalent to 200 mg/L. From preliminary study, the maximum oil sorption capacity of powder chitosan, flake shrimp shell chitosan, and flake squid pen chitosan in a pH 7.0 buffer solution were 0.48, 0.19, and 0.24 g oil/g chitosan respectively. The amount of powder chitosan and mixing time were later varied to find the optimum conditions for maximum oil removal efficiency. At the optimum treatment conditions (dosage: 0.5 g/l and mixing time: 60 min), the oil and turbidity removal efficiency were around 80%. In the biodegradation experiment, oil-degrading bacteria were isolated from five soil samples. Two bacteria (Ch2 and Ch4) provided the highest lubricating oil degradation efficiency and specifically degraded the aromatic fraction of lubricant oil. Then, bacteria Ch2 and Ch4 were examined with oil-in-water emulsion 200 mg/L. Bacteria Ch2 obtained 80% of oil-in-water emulsion degradation; whereas, bacteria Ch4 could degrade only 65%. Hence, bacteria Ch2 was selected and immobilized on three chitosan forms for the treatment of high oil-in-water emulsion concentration. There was found that the treatment of oil-in-water emulsion by flake chitosan-immobilized cells achieved the highest oil removal efficiency. Finally, this research investigated and compared the effectiveness of three treatment types: sorption by chitosan, degradation by the isolated bacteria, and sorption and degradation by chitosan-immobilized bacteria treatment. The oil-in-water emulsion removal efficiency was determined from the remaining oil concentration in water. When the concentration of oil-in-water emulsion was increased, the oil-in-water emulsion removal efficiency of chitosan-immobilized cells was the highest (91%) and remained constant throughout the study. These result suggested that sorption and degradation by chitosan-immobilized bacteria was the most appropriate process to treat oily wastewater.

Field of Study: Environmental Management
Academic Year: 2007

Student's signature:....Nichakorn...K.....
Principal advisor's signature:.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincere gratitude, greatest appreciation to my advisor, Dr. Ekawan Luepromchai, for her helpful advices and guidance, enthusiastic support and encouragement throughout this research work. I also appreciated her for giving me and opportunity to get the great experience from oral presentation at 7th National Environmental Conference.

I am grateful to Dr. Sorawit Powtongsook for his flake shrimp shell and flake squid pen chitosan.

I would like to thank laboratory staffs and students in Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for their support, kindness, and friendship which give me a relax and familiar workplace surroundings.

I would like to thank staffs and students in National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management (NCE-EHWM), Graduate School, Chulalongkorn University for their support, kindness, and friendship.

Finally, I am very thankful to my family and my friends for support and encouragement. This work would not have been possible without their moral support.

CONTENTS

	Pages
ABSTRACT (THAI)	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF ABBREVIATIONS	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Statement of problem	1
1.2 Objectives	3
1.3 Hypothesis	3
1.4 Scopes of the study	3
CHAPTER II BACKGROUND AND LITERATURE REVIEWS	5
2.1 Introduction	5
2.2 Sources of car wash wastewater	5
2.3 Characteristics of oil-in-water emulsion	6
2.3.1 Mechanically emulsified oil	7
2.3.2 Chemically emulsified oil	7
2.4 Pollutants in car wash wastewater	7
2.4.1 Lubricating oils	10
2.4.2 Emulsifier	13
2.5 Oil-in-water emulsion treatment systems	13
2.5.1 Air flotation	14
2.5.2 Sequence Batch Biological Reactor (SBR) Process	15
2.5.3 Filtration	16
2.5.4 Adsorption	16
2.6 Oil sorbents and their applications	17
2.6.1 Commercial sorbents	17

Pages

CHAPTER II BACKGROUND AND LITERATURE REVIEWS (cont.)

2.6.2 Non-commercial sorbents 18

2.7 Lubricating oil biodegradation 20

2.7.1 Alkane degradation pathway 21

2.7.2 Aromatic degradation pathway 22

2.8 Biological treatment of oily wastewater 23

CHAPTER III METHODOLOGY 27

3.1 Research overview 27

3.2 Materials 28

3.2.1 Chemicals 28

3.2.2 Soil samples 29

3.2.3 Phosphate buffer solution 29

3.2.4 Culture media 30

3.2.5 Equipments 30

3.3 Procedure 30

3.3.1 Synthetic oil-in-water emulsion preparation 30

3.3.2 Oil and water sorbent performance of chitosan 31

3.3.3 Oil sorption by chitosan 31

3.3.4 Oil degradation by isolated bacteria 32

3.3.5 Oil-in-water emulsion treatment by chitosan-immobilized bacteria 33

3.4 Analytical methods 35

3.4.1 Quantitative analysis of oil-in-water emulsion 35

3.4.2 Quantitative analysis of oil adsorbed in chitosan 35

3.4.2 Turbidity of oil-in-water emulsion 36

3.4.3 Determination of the amount of lubricating oil-degrading bacteria and total bacteria 36

3.4.4 Determination of the number of attached viable bacteria 36

3.4.5 Standard curve of lubricating oil 37

3.4.6 Scanning electron microscope (SEM) 37

Pages

CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSIONS 38
4.1 Oil and water sorption by chitosan 38
4.2 Optimum oil-in-water emulsion treatment condition of chitosan 39
4.2.1 Effect of chitosan dosage 39
4.2.2 Effect of mixing time 41
4.3 Lubricating oil degradation by isolated bacteria 43
4.4 Oil-in-water emulsion treatment by bacteria immobilized on three forms of chitosan 47
4.4.1 Comparison of oil-in-water removal efficiency by bacteria immobilized on three types of chitosan 47
4.4.2 Number of bacteria survival in chitosan and emulsion 49
4.4.3 Scanning electron microscope (SEM) of chitosan-immobilized cells 52
4.5 Effectiveness of sorption and degradation approach by chitosan-immobilized cells 55

CHAPTER V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS 61
5.1 Conclusions 61
5.2 Recommendations for future work 62

REFERENCES 64
APPENDICES
APPENDIX A 72
APPENDIX B 74
APPENDIX C 115
BIOGRAPHY 125

LIST OF TABLES

Pages

2.1 Wastewater characteristic of car washing and other facilities in gas stations..... 8

2.2 Concentrations of organic pollutants in car wash effluents from automatic vehicle washing facilities in Göteborg, Sweden..... 9

2.3 Some of the main characteristics of the typical synthetic lubricants and mineral lubricants..... 12

2.4 Cationic and biological properties of chitosan..... 20

3.1 Physical and chemical properties of tween80..... 28

3.2 Specifications of sorbent materials..... 29

3.3 Sources of soil samples..... 29

4.1 Water and oil sorption capacities of chitosan..... 39

4.2 Percent degradation of saturate and aromatic fraction comparing to control (CFMM containing lubricating oil without bacteria) at 20^{th} day..... 45

LIST OF FIGURES

Pages

2.1 Process flow diagram of car wash process..... 6

2.2 Types of mineral oils: straight paraffin, branched paraffin, naphthene, and aromatic..... 11

2.3 Structure of chitin, chitosan and cellulose..... 19

2.4 Aerobic biodegradation pathways of alkanes..... 22

2.5 Aerobic biodegradation pathways of PAHs..... 23

3.1 Flow chart of the research..... 27

3.2 Brief procedure of oil-in-water emulsion removal by three treatment types.. 34

4.1 Percent oil removal after treatment vs. dosage of chitosan..... 39

4.2 Percent turbidity removal after treatment vs. dosage of chitosan..... 40

4.3 Percent oil removal after treatment vs. mixing time..... 42

4.4 Percent turbidity removal after treatment vs. mixing time..... 42

4.5 Photograph showing the oil-in-water emulsion before and after treated by powder chitosan with the optimum condition..... 43

4.6 Amount of total oil, saturate, and aromatic remained in CFMM after degrade by five isolated bacteria from soil samples..... 44

4.7 Percent oil removal by bacteria Ch2 and Ch4 and the number of bacteria Ch2 and Ch4 survival during the oil-in-water emulsion degradation experiment..... 46

4.8 Treatment of oil-in-water emulsion by bacteria immobilized on three forms of chitosan..... 48

4.9 Number of bacteria survival in chitosan during the experiment of oil-in-water emulsion treatment by bacteria immobilized on three forms of chitosan..... 50

4.10 Number of bacteria survival in emulsion during the experiment of oil-in-water emulsion treatment by bacteria immobilized on three forms of chitosan..... 51

4.11 SEM photograph of powder chitosan, flake shrimp shell chitosan, and flake squid pen chtisaon before immobilized bacteria..... 53

Pages

4.12 SEM photographs of (a) powder chitosan, (b) flake shrimp shell chitosan, and (c) flake squid pen chiton after used to immobilize bacteria Ch2..... 54
4.13 Amount of oil-in-water emulsion remaining after treated by three forms of treatment..... 56
4.14 Number of bacteria survival in emulsion during the experiment of oil-in-water emulsion treatment by lubricating oil-degrading bacteria..... 57
4.15 Amount of oil remaining in (a) chitosan-immobilized bacteria and (b) powder chitosan..... 58
4.16 Percent removal of saturate and aromatic fraction comparing to control after treated by three types of treatment..... 59

LIST OF ABBREVATIONS

CFMM	Carbon Free Mineral Medium
CFUs	Colony Forming Units
DCM	Dichloromethane
h	hour
M	Molar
min	minute
mg	Milligram
mL	Millilitre
MS	Mineral Salt
OD	Optical Density
TLC-FID	Thin Layer Chromatography with flame ionized detector