Thesis Title	Treatment of ink factory wastewater by chemical precipitation coupled with *Cyperus alternifolius*
Thesis Credits	36
Candidate	Miss Rujira Dolphen
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Paitip Thiravetyan
Program	Doctor of Philosophy
Field of Study	Biotechnology
Department	Biotechnology
Faculty	School of Bioresources and Technology
Academic Year	2014

Abstract

Wastewater from ink production is complex, as it contains pigments, acrylic resin, monoethanolamine (MEA), NH_4OH. These chemicals have the effect of increasing chemical oxygen demand (COD), ammonium nitrogen (NH_4^+−N), suspended solids (SS), and especially dark color. Therefore, this study investigated the potential of wastewater treatment by chemical precipitation coupled with *Cyperus alternifolius*. From preliminary screening of plants, we found that *C. alternifolius* (Umbrella papyrus) had the highest efficiency to remove ink factory wastewater higher than *Echinodorus cordifolius* (Creeping Burrhead), *Thalia geniculata* (Alligator Flag), *Acorus calamus* (Sweet Flag), and *Dracaena sanderiana* (Lucky Bamboo). The results showed that original wastewater treated by *C. alternifolius* took a long time (about 45 days) to reduce COD from 32336 mg/L to 237 mg/L and total dissolved solids (TDS) from 12581 mg/L to 717 mg/L (under soil conditions). After the treatment, the plant was still in good health but the wastewater color was appeared. Firstly, chemical precipitation by H_2SO_4 was used to treat the original wastewater. The COD was reduced to 987 mg/L from an initial 12601 mg/L while SS was reduced to 30 from an initial 1176 mg/L. After that the phytoremediation with *C. alternifolius* was used as a secondary treatment. At day 7, COD and total kjedalh nitrogen (TKN) concentrations were reduced to 171 mg/L and 45 mg/L from an initial 987 mg/L and 156 mg/L, respectively. Notably, the color of the wastewater was disappeared.

The results of our study showed that plant absorption, soil adsorption, and microbial activities had an effect in treating wastewater and especially plant-microbe interaction. COD removal efficiency in the system was attributed as follows: 45% to *C. alternifolius* and microorganisms in plants, 26% to soil absorption, 19% to soil microorganisms, and 10% to wastewater microorganisms. In this study, using the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method, it was confirmed that the microbial community was made up of aerobic and facultative−anaerobic groups. Phylogenetic diversity analyses of eubacterial genes were carried out on wastewater, through which the 16S rRNA gene. It revealed that the major microorganism under plants grown in soil−containing wastewater conditions was Azospirillum. It was nitrogen fixing bacteria and it utilized nitrate as a respiratory electron acceptor, which was then reduced to molecular nitrogen. These results revealed that plant−microbe interactions are an efficient process for the treatment of wastewater containing high COD, TKN, and color. In addition, the data of microbial diversity can be useful for understanding plant-microbe interactions to improve system performance.

The potential of using sulfuric acid and magnesium and phosphate coupled with *C. alternifolius* for removal of ammonium nitrogen was also investigated. The results showed that when original wastewater was treated with H_2SO_4, the color was reduced from a dark color to an orange color while COD and SS decreased from 28827 mg/L to 1354 mg/L, and 2917 mg/L to 32 mg/L, respectively. NH_4^+−N also decreased from 458 mg/L to 295 mg/L. Precipitation with various types of MAPs such as (i) $MgCl_2.6H_2O$ + $Na_2HPO_4.12H_2O$, (ii) MgO + 85% H_3PO_4 and (iii) $MgSO_4.7H_2O$ + $Ca(H_2PO_4)_2$ and then phytoremediation by *C. alternifolius* were investigated. The results revealed that treatment with MgO + 85% H_3PO_4 and adjusting pH with $Ca(OH)_2$ was the best condition for *C. alternifolius* to grow effectively. This condition could change the orange color to colorless and decrease COD and NH_4^+−N to 329 mg/L and 13 mg/L, respectively, within 3 days. However, this method had a problem in the cost treatment. Therefore chemical precipitation by H_2SO_4 coupled with *C. alternifolius* was appropriated in treating of this wastewater.

In addition, research was also done on the degradation of ethanolamines such as monoethanolamine (MEA), diethanolamine (DEA), and triethanolamine (TEA) by *C. alternifolius*. We found that plants could degrade TEA into DEA, then into MEA, and then further into acetic acid. The accumulation of ethanolamines was found mainly in plant stems, which had the highest biomass. It demonstrated that the molecular size affected the removal rate through plant. A smaller molecular weight—MEA (MW=61.08 g/mol) was the fastest taken up, followed by DEA (MW=105.14 g/mol) and TEA (MW=149.19 g/mol), the highest molecular weight. The toxicity to the plant when exposed to ethanolamines elucidated that MEA had the highest toxicity, followed by DEA and TEA. Moreover, the application of *C. alternifolius* in ink factory wastewater revealed that the plant could completely uptake MEA at day 5 from an initial MEA concentration of 540 mg/L. The result indicated that *C. alternifolius* has a potential to remove ethanolamines and can be applied to ethanolamines-contaminated wastewater.

Keywords: Chemical precipitation / *Cyperus alternifolius* / Ethanolamine / Microorganism / Pigments / Phytoremediation

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การบำบัดน้ำเสียจากการผลิตหมึกโดยใช้วิธีการตกตะกอนทางเคมีร่วมกับต้นกกราชินี
หน่วยกิต	36
ผู้เขียน	นางสาวรุจิรา ดลเพ็ญ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.ไพทิพย์ ธีรเวชญาณ
หลักสูตร	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
คณะ	ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
ปีการศึกษา	2557

บทคัดย่อ

น้ำเสียจากโรงงานผลิตหมึกมีความซับซ้อน เนื่องจากประกอบด้วยเม็ดสี อะไครลิคเรซิน โมโนเอทธานอลเอมีน แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และอื่นๆ ซึ่งสารเคมีเหล่านี้ส่งผลต่อการเพิ่มความเข้มข้นของค่าซีโอดี แอมโมเนียมไนโตรเจน สารแขวนลอย โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่งผลทำให้น้ำเสียมีสีเข้ม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการบำบัดน้ำเสียโดยการตกตะกอนเคมีร่วมกับการประยุกต์ใช้พืช ซึ่งพืชที่ใช้ในการศึกษาคือ กกราชินี (*Cyperus alternifolius*) เนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าต้นกกราชินีมีความสามารถในการบำบัดน้ำเสียสูงที่สุด ซึ่งสูงกว่าต้นอเมซอน (*Echinodorus cordifolius*) ต้นคล้าน้ำ (*Thalia geniculata*) ต้นว่านน้ำ (*Acorus calamus*) และต้นกวนอิม (*Dracaena sanderiana*) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการบำบัดน้ำเสียตั้งต้นโดยใช้ต้นกกราชินีในระบบปลูกพืชแบบมีดินโดยตรงนั้นใช้ระยะเวลาในการบำบัดค่อนข้างนานประมาณ 45 วัน ในการลดค่าซีโอดีจาก 32336 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเท่ากับ 237 มิลลิกรัมต่อลิตร และลดปริมาณของแข็งที่ละลายเจือปนอยู่ในน้ำจาก 12581 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเท่ากับ 717 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการบำบัดน้ำเสียดังกล่าวพบว่าพืชยังคงแข็งแรงดีแต่สีของน้ำเสียยังคงหลงเหลืออยู่ในระบบ ดังนั้นจึงทำการศึกษาโดยใช้การตกตะกอนเคมีร่วมกับการประยุกต์ใช้พืชในการบำบัดน้ำเสียดังกล่าว การตกตะกอนทางเคมีด้วยกรดซัลฟูริกในขั้นตอนแรกสามารถลดค่าซีโอดีจาก 12601 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเท่ากับ 987 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่สารแขวนลอยลดลงจาก 1176 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำต้นกกราชินีมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียดังกล่าว พบว่าในวันที่ 7 ของการทดลอง สามารถลดค่าซีโอดีและค่าทีเคเอ็นจาก 987 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 156 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เหลือเท่ากับ 171 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 45 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเป็นที่น่าสังเกตว่าไม่พบสีของน้ำเสียหลงเหลืออยู่ในระบบ

ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่า การดูดซับโดยพืช ดินและกิจกรรมของจุลิทรีย์มีผลต่อการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีในระบบเกี่ยวข้องกับพืชและจุลินทรีย์จากพืช ร้อยละ 45 การดูดซับโดยดิน ร้อยละ 26 จุลินทรีย์ในดิน ร้อยละ 19 และจุลินทรีย์ในน้ำเสีย ร้อยละ 10 นอกจากนี้ยังได้นำการวิเคราะห์ด้วยวิธี denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) มายืนยันกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในระบบ ซึ่งพบกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีอากาศและกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศปริมาณมากที่สุด การวิเคราะห์การกระจายของจุลินทรีย์ในน้ำเสียโดยอาศัยความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการผ่านทางยีน 16S rRNA พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่โดดเด่นภายใต้สภาวะการปลูกพืชแบบมีดินคือ กลุ่ม Azospirillum ซึ่งเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและสามารถใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในการหายใจ ผลการทดลองเหล่านี้เปิดเผยว่าความสัมพันธ์ของพืชกับจุลินทรีย์เป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่มีสีปนเปื้อนและมีค่าซีโอดีและทีเคเอ็นสูง ซึ่งข้อมูลของความหลากหลายของจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเข้าใจความสัมพันธ์ของพืชกับจุลินทรีย์ในการปรับปรุงประสิทธิภาพของระบบ

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการกำจัดแอมโมเนียมไนโตรเจนในน้ำเสียโดยการใช้กรดซัลฟูริกและแมกนีเซียมและฟอสเฟต ร่วมกับการใช้ต้นกกราชินี ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อบำบัดน้ำเสียตั้งต้นด้วยกรดซัลฟูริกสามารถลดสีของน้ำเสียจากสีเข้มไปเป็นสีส้ม ขณะที่ค่าซีโอดีลดลงจาก 28827 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเท่ากับ 1354 มิลลิกรัมต่อลิตร สารแขวนลอยลดลงจาก 2917 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเท่ากับ 32 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนโตรเจนก็ลดลงจาก 458 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเท่ากับ 295 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเปรียบเทียบการตกตะกอนทางเคมีด้วยสาร 3 ชนิด ได้แก่ แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรตกับไดโซเดียมฟอสเฟต แมกนีเซียมออกไซด์กับกรดฟอสฟอริก และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตกับโมโนแคลเซียมฟอสเฟต ร่วมกับการบำบัดน้ำเสียโดยใช้ต้นกกราชินี ผลการทดลองเปิดเผยว่าการตกตะกอนด้วยแมกนีเซียมออกไซด์กับกรดฟอสฟอริก และปรับค่าพีเอชด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นสภาวะที่ดีที่สุดในการเจริญเติบโตของพืช และสภาวะนี้สามารถลดความเข้มข้นของค่าซีโอดีและแอมโมเนียมไนโตรเจนเท่ากับ 329 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 13 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสามารถกำจัดสีได้หมดภายใน 3 วัน อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียที่สูง ดังนั้นการตกตะกอนทางเคมีด้วยกรดซัลฟูริกร่วมกับต้นกกราชินีจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด

นอกจากนี้งานวิจัยได้ศึกษาการย่อยสลายของสารกลุ่มเอทธานอลเอมีน เช่น โมโนเอทธานอลเอมีน ไดเอทธานอลเอมีน และไตรเอทธานอลเอมีนโดยต้นกกราชินี พบว่าพืชสามารถย่อยสลายสารไตรเอทธานอลเอมีนเป็นไดเอทธานอลเอมีนแล้วเปลี่ยนเป็นโมโนเอทธานอลเอมีน จากนั้นถูกย่อยสลาย

ต่อเป็นกรดอะซิติก การสะสมของสารเอทธานอลเอมีนพบในส่วนของลำต้นพืชเป็นส่วนใหญ่ซึ่งมีปริมาณชีวมวลสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดของโมเลกุลมีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสารไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยพบว่าสารโมโนเอทธานอลเอมีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สุดจะถูกดูดขึ้นไปในพืชเร็วที่สุด (น้ำหนักโมเลกุล = 61.08 กรัมต่อโมล) ตามด้วยสารไดเอทธานอลเอมีน (น้ำหนักโมเลกุล = 105.14 กรัมต่อโมล) และสารไตรเอทธานอลเอมีน (น้ำหนักโมเลกุล = 149.19 กรัมต่อโมล) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลใหญ่ที่สุด เมื่อเทียบความเป็นพิษของสารเอทธานอลเอมีนต่อพืช พบว่าพิษของสารโมโนเอทธานอลเอมีนรุนแรงที่สุด รองลงมาคือสารไดเอทธานอลเอมีน และสารไตรเอทธานอลเอมีน นอกจากนี้การประยุกต์ใช้ต้นกกราชินีในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตหมึก พบว่าพืชสามารถดูดซับสารโมโนเอทธานอลเอมีนได้หมดภายใน 5 วัน จากความเข้มข้นสารโมโนเอทธานอลเอมีนเริ่มต้น 540 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำต้นกกราชินีไปประยุกต์ใช้ในน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนสารโมโนเอทธานอลเอมีน

คำสำคัญ: การตกตะกอนทางเคมี / การบำบัดสารมลพิษโดยใช้พืช / จุลินทรีย์ / ต้นกกราชินี / เม็ดสี / เอทธานอลเอมีน