

การกำจัดซัลเฟตและโลหะหนักในน้ำเสียโดยจุลินทรีย์ผสมภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจน



นางสาวนุชรา สิ้นบัวทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม (สหสาขา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2997-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SIMULTANEOUS REMOVAL OF SULFATE AND HEAVY METALS FROM
WASTEWATER BY MIXED MICROBIAL CULTURES UNDER
ANAEROBIC CONDITIONS

Miss Nusara Sinbuathong

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Environmental Management (Inter-Department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2005
ISBN 974-53-2997-5
Copyright of Chulalongkorn University

481668

Thesis Title Simultaneous Removal of Sulfate and Heavy Metals from
Wastewater by Mixed Microbial Cultures Under Anaerobic
Conditions


By Nusara Sinbuathong

Field of Study Environmental Management

Thesis Advisor Assistant Professor Sutha Khaodhiar, Ph.D


Thesis Co-Advisor Associate Professor Winai Liengcharernsit, D.Eng.
Professor Daniel J. Watts, Ph. D.


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


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


THESIS COMMITTEE

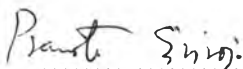
 Chairman
(Manaskorn Rachakornkij, Ph.D.)

 Thesis Advisor
(Assistant Professor Sutha Khaodhiar, Ph.D.)

 Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Winai Liengcharernsit, D.Eng.)

 Thesis Co-Advisor
(Professor Daniel J. Watts, Ph.D.)

 Member
(Associate Professor Wasant Pongsapich, Ph.D)

 Member
(Pramote Siroj, D. Agri. Sci.)

นุชรา สีนบัวทอง : การกำจัดซัลเฟตและโลหะหนักในน้ำเสียโดยจุลินทรีย์ผสมภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจน (SIMULTANEOUS REMOVAL OF SULFATE AND HEAVY METALS FROM WASTEWATER BY MIXED MICROBIAL CULTURES UNDER ANAEROBIC CONDITIONS) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.สุธา ขาวเขียว อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. วินัย เลียงเจริญฤทธิ์ และ ศ.ดร. แคนเนล เจ วัตต์ 283 หน้า ISBN 974-53-2997-5

การศึกษานี้เพื่อหาสัดส่วนของปริมาณซัลเฟต ซีโอติ และโลหะหนักที่ไม่สูงเกินไปที่สามารถมีได้ในระบบกำจัดน้ำเสียโดยจุลินทรีย์ผสมภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจน เพื่อให้เกิดการกำจัดซีโอติและซัลเฟตโดยกระบวนการตกตะกอนในรูปโลหะซัลไฟด์ และระบบยังคงผลิตก๊าซมีเทน โดยการเลือกใช้จุลินทรีย์ผสมที่มีศักยภาพสูง การวิจัยกระทำโดย 3 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการเปรียบเทียบศักยภาพของแบคทีเรียจาก 5 แหล่ง ได้แก่ บ่อเกรอะ ทะเล โรงงานผลิตเบียร์ ดินเปรี้ยว และน้ำชะขยะ ใช้ น้ำเสียสังเคราะห์จากสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 20,000 มก/ลิตร ควบคุมอัตราส่วนซีโอติต่อมวลแบคทีเรียเริ่มต้นให้เท่ากันทุกถังปฏิกรณ์ การเดินระบบทำแบบเดิมครั้งเดียว ใช้ถังปฏิกรณ์ความจุ 6 ลิตร จำนวน 5 ถัง โดยแต่ละถังต่อกับระบบเก็บก๊าซ การทดลองทำที่ภาวะอุณหภูมิห้องเฉลี่ย 31.5 องศาเซลเซียส เพื่อของการทดลองเริ่มต้นที่ 7 การทดลองอีกชุดหนึ่งทำเพื่อศึกษาการเกิดซัลเฟตรีดักชันและการกำจัดโลหะหนักโดยแบคทีเรียจากทั้ง 5 แหล่งดังกล่าว ใช้ถังปฏิกรณ์ขนาดเดียวกัน 10 ถัง เดิมซัลเฟตความเข้มข้น 2,100 มก/ลิตรลงไปทุกถัง เดิมโลหะหนักทองแดง 10 มก/ลิตร ลงไป 5 ถัง ผลการศึกษาปรากฏว่าแบคทีเรียผสมจากโรงงานผลิตเบียร์มีความสามารถเหมาะสมในด้านการผลิตก๊าซมีเทนและการเกิดปฏิกริยาซัลเฟตรีดักชัน การผลิตก๊าซมีเทนมีค่า 324 มล.(ที่ภาวะมาตรฐาน)ต่อกรัมซีโอติที่ถูกกำจัดในระบบ อัตราปฏิกริยาจำเพาะของการผลิตก๊าซมีเทนมีค่า 0.0072 มล.(ที่ภาวะมาตรฐาน) ต่อมก/ลิตรของมวลแบคทีเรียต่อชั่วโมง ไม่พบอัตราการตายในช่วงเวลาที่ทดลอง ทองแดงมีผลดีต่อปฏิกริยาซัลเฟตรีดักชัน เพราะเกิดการตกตะกอนกับซัลไฟด์ อัตราปฏิกริยาจำเพาะของการเกิดซัลเฟตรีดักชันมีค่า 9×10^{-7} ลิตร/มก.ของมวลแบคทีเรียต่อชั่วโมง แบคทีเรียกลุ่มนี้มีศักยภาพสูงสุดในการฟื้นฟูระบบที่รับน้ำเสียที่ปนเปื้อนด้วยโลหะหนักและซัลเฟต ปฏิกริยาการตกตะกอนเกิดเป็นโลหะซัลไฟด์ขึ้น จึงไปลดการยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียในระบบ การเปรียบเทียบศักยภาพของกลุ่มแบคทีเรียในการฟื้นฟูระบบนี้พิจารณาจากประสิทธิภาพการกำจัดซีโอติของระบบ กลุ่มแบคทีเรียจากโรงงานผลิตเบียร์จึงได้รับการเลือกเพื่อศึกษาต่อในขั้นตอนที่ 2 และ 3

ขั้นตอนที่ 2 เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการควบคุมระบบเพื่อกำจัดซัลเฟตและโลหะหนักออกจากน้ำเสีย ทดลองในขวดปฏิกริยาความจุ 100 มล. เดินระบบแบบเดิมครั้งเดียวที่ pH เริ่มต้นที่ 7 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส การทดลองใช้น้ำเสียสังเคราะห์จากสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 3,200 มก./ลิตร เดิมซัลเฟตเข้าระบบช่วง 0-2,600 มก/ลิตร เป็นผลให้อัตราส่วนซีโอติต่อซัลเฟอร์อยู่ในช่วง 13.7-3.7 พบว่าอัตราส่วนซีโอติต่อซัลเฟอร์ที่ค่า 9 ปฏิกริยาการกำจัดซีโอติและปฏิกริยาการเกิดก๊าซมีเทนเกิดสูงสุด ที่ภาวะนี้ค่ากิจกรรมจำเพาะของการผลิตก๊าซมีเทนมีค่าสูงสุดคือ 0.5815 กรัมมีเทนซีโอติต่อกรัมซีโอติที่ถูกกำจัดต่อกรัมแบคทีเรียก๊าซมีเทนที่เกิดมีปริมาตร 196 มล.(ที่ภาวะมาตรฐาน) และ ซัลเฟตที่ถูกกำจัดมีค่า 0.356 กรัม ต่อกรัมซีโอติที่ถูกกำจัด

ขั้นตอนที่ 3 เป็นการศึกษาความเป็นพิษของโลหะหนักแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ทำการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 2 โดยเลือกใช้อัตราส่วนซีโอติต่อซัลเฟอร์ที่ค่า 9 ในทุกขวดปฏิกริยา ผลการทดลองพบว่าโลหะหนักทุกชนิดมีผลเสียต่อกิจกรรมของแบคทีเรียแบบไม่ใช้ออกซิเจน ความเป็นพิษสัมพัทธ์ของโลหะหนักในด้านการกำจัดสารอินทรีย์คือทองแดง > แคดเมียม > สังกะสี การมีโลหะหนักหลายชนิดรวมกันในระบบจะทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรียอย่างเป็นทวีคูณ การยับยั้งชนิดนี้สามารถลดลงด้วยทองแดงที่มีอยู่ในระบบที่ความเข้มข้นไม่เกิน 1 มก/ลิตร แต่ถ้าระบบมีแคดเมียมรวมอยู่กับสังกะสี จะไม่สามารถลดการยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรียลงได้ การศึกษานี้ได้เสนอสูตรเพื่อเป็นเกณฑ์การตัดสินใจในการป้องกันแบคทีเรียในระบบถูกยับยั้งกิจกรรมอย่างเป็นทวีคูณคือ $K = (Zn/32.7 + Cd/56.2 + Cu/31.8)/W$ โดย $K \leq 15$ มิลลิอิกวาเลนซ์/กก. ของมวลแบคทีเรีย เมื่อ K คือค่าภาระบรรทุกโลหะหนักต่อมวลแบคทีเรีย และที่ค่าภาระบรรทุกดังกล่าวกิจกรรมการผลิตก๊าซมีเทนของแบคทีเรียจะลดลงเหลือประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับระบบควบคุม ค่า K หาได้จากอัตราส่วนของผลรวมของโลหะหนัก (ในหน่วยมิลลิอิกวาเลนซ์/ลิตร) ต่อปริมาณมวลแบคทีเรีย (ในหน่วยกก/ลิตร) Zn Cd และ Cu คือความเข้มข้นของสังกะสี แคดเมียม และทองแดง (ในหน่วย มก/ลิตร) ในน้ำเสีย การทดลองนี้ยังพบว่าเพื่อสุขภาพของน้ำเสียน้ำค่าสูงขึ้นไปไม่เกิน 8 ผลการทดลองต่างๆเหล่านี้มีส่วนเป็นการยืนยันศักยภาพของระบบ ในการลดความเป็นพิษของซัลไฟด์และการขยายระบบจากการมีโลหะหนักปนอยู่ในน้ำเสีย

สหสาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

#4489656020 : MAJOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT

KEY WORD: TOXICITY OF HEAVY METALS/ COMBINED METALS / ANAEROBIC PROCESS UNDER SULFATE REDUCING CONDITIONS/ SLUDGE FROM BREWERY WASTEWATER TREATMENT PLANT/ KINETIC RATE OF ANAEROBIC BACTERIA

NUSARA SINBUATHONG: SIMULTANEOUS REMOVAL OF SULFATE AND HEAVY METALS FROM WASTEWATER BY MIXED MICROBIAL CULTURES UNDER ANAEROBIC CONDITIONS. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. DR. SUTHA KHAODHIAR. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. DR. WINAI LIENGCHARERNSIT AND PROF. DR. DANIEL J. WATTS, 283 pp. ISBN 974-53-2997-5

This study focused on determining the optimum ratio of sulfate, COD, and heavy metals that facilitate, in anaerobic bioreactors, simultaneous lowering of COD and sulfate with precipitation of metal sulfides, with methane production using high performance mixed-microbial assemblages. Three phases of the research were performed. **Phase 1**, mixed-bacteria from five different sources, i.e., septic tank, a coastal area, a brewery wastewater treatment plant, acidic sulfate soil, and leachate from a landfill were compared. Glucose at 20,000 mg COD/l was used as synthetic waste. The initial loading factor of each reactor was controlled to be equal. Five reactors of 6-liter capacity, which were equipped with a gas collection system, were operated in a batch mode at room temperature of 31.5 °C and pH of 7. Another set of ten reactors were set to study sulfate reduction and heavy metal removal. Sulfate at 2,100 mg/l was added to all of these reactors and copper at 10 mg/l was added into the five reactors. Mixed-bacterial culture from a brewery wastewater treatment plant showed the optimum ability to promote methane production and sulfate reduction. The methane production yield coefficient was 324 ml at STP per gram of COD removal and the specific methane production rate was 0.0072 ml at STP/(mg MLVSS/l-hour) while the endogenous decay coefficient was not found during the experimental period. Copper showed a positive effect on sulfate reduction due to sulfide precipitation. The specific sulfate reduction rate was 9×10^{-7} (l/mg MLVSS-hour). This mixed-culture showed the highest performance in recovery of the system to higher levels of COD removal as a result of metal sulfide precipitation thereby avoiding system inhibition. This mixed-bacterial culture was selected to study in Phase 2 and 3. **Phase 2**, the experiments to find optimum reactor conditions for simultaneous control of sulfate and heavy metals in complex wastewater streams were carried out in reaction bottles with 100 ml working volume by a batch test at a pH of 7 and at 35 ± 1 °C. Glucose at 3,200 mg COD /l was used as synthetic waste. Sulfate was added in the range 0-2,600 mg/l giving rise to a COD:S ratio in the range of 13.7- 3.7. At a COD:S ratio of 9, the COD reduction reaction and methanogenesis were highly promoted. The highest specific methanogenic activity of 0.5815 (gCH₄ gas COD)/(g COD removal-g MLVSS) was shown at this condition. The methane produced was 196 ml (at STP) and the sulfate reduced was 0.356 gram, expressed per gram of COD removal. **Phase 3**, the toxicity of cadmium, copper, and zinc were studied in both single and combined metal forms. Experiments were conducted similarly to those of Phase 2. The optimum COD:S ratio of 9 was provided in all reactors. Heavy metals could negatively impact the activities of anaerobic bacteria. The relative toxicity of heavy metals in organic degradation was Cu > Cd > Zn. Combined heavy metals caused synergistic inhibition on the bacterial activity but the inhibition could be antagonized by Cu, when the concentration was not more than 1 mg/l. The antagonism was not observed when Cd combined with Zn. The criterion model for the prevention of the synergistic inhibition was proposed. The metal loading, K, of $(Zn/32.7 + Cd/56.2 + Cu/31.8)/W$ has to be less than 15 meq/kg MLVSS. At this metal loading, the relative methane production activity was not lower than 80%. Where K is the ratio of the sum of Zn, Cd, and Cu (in meq/l) divided by the MLVSS, W (in kg/l). Zn, Cd, and Cu are the concentration of the metal in solution (in mg/l). The final pH was elevated but did not exceed 8. These experimental results elucidated the performance of the reactor involved in sulfide detoxification and heavy metal remediation processes.

Inter-department Environmental Management
Field of study Environmental Management
Academic year 2005

Student's signature..... Nusara Sinbuathong
Advisor's signature..... S. L. A.
Co-advisor's signature..... Winai Liengcharernsith
Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

In my opinion, doing a PhD is a sacred task and this was definitely one of the best decisions of my life. This thesis is the result of four years of work; during which time, I have been accompanied and supported by many people. It is a pleasant position that I have now the opportunity to express my gratitude to all of them.

I am grateful to Assist. Prof. Dr. Sutha Khaodhiar, my thesis advisor, for his guidance, strict and extensive comments and our many discussions, which had an impact on the final form and the quality of this thesis. I would like to express my respectful gratitude to my thesis co-advisor, Assoc. Prof. Dr. Winai Liengcharernsit, who kept an eye on the progress of my work and always was available when I needed his advice; he provided me with strong encouragement, inspiration, and invaluable suggestions throughout this work. Without his kind advice this research dissertation would not have been possible. My thesis co-advisor Prof. Dr. Daniel J. Watts has provided helpful suggestion and shown unfailing interest throughout this research. On top of that, I am grateful to him for spending time on my English style and grammar. My appreciation also goes to Dr. Pramote Siroj for his supportive suggestions on the design and operation of bioreactors and for participating in my committee. I would also like to recognize Assoc. Prof. Dr. Wasant Pongsapich and Dr. Manaskorn Rachakornkij, a member and the chairman of my PhD committee, for their careful monitoring of my work and for the effort they put into reading and providing me with valuable comments on earlier versions of this thesis.

Prof. Peter O. Nelson's valuable comments on this work have truly made a difference, along with the many discussions on the topic of microbiology that I held with Dr. Pratoomporn Chim-Anage and Dr. Savitr Trakulnaleumsai.

I would like to thank the NRC-EHWM and the Graduated School of Chulalongkorn University for the financial support for this research. The facilities and equipment supported by Scientific Equipment Center, the KURDI and the KAPI institute (Kasetsart University) have been deeply appreciated.

The Program of my study has played a substantial role and provided me the opportunity to make many good friends (Jim, Pap, Effie, Gov, Oranuj, X, Supang, Joy, Tui, Aey, May, Nim, Ging, Renu, Viris, etc.). I thank you all for having shared many experiences and thoughts with me throughout the past four years.

I am deeply indebted to Prof. Dr. Thira Sutabutra, Assoc. Prof. Dr. Napavarn Noparatnaraporn, Prof. Dr. Rungsit Suwanketnikhom, Assist. Prof. Dr. Wichien Yongmanitchai, and Dr. Nanthana Chinoim, my bosses at Kasetsart University, who encouraged me to pursue this level of study.

My special gratitude is given to Boonsong Silapracharemkul for his great help in difficult times. My expressions of gratitude would be definitely incomplete if I forgot to thank my Thammasart University undergraduate students who were my helping hands in times of crisis.

Finally, I would like to express the deep sense of gratitude I feel for my late mother and father who formed part of my vision and taught me about the good things that really mattered in life. The happy memory of my father still provides a persistent inspiration for my journey in this life. I am grateful to my brother, Rawat, and three sisters, Narisa, Orapan, and Leena, for rendering me the sense and the value of brotherhood. I am glad to be one of them.

CONTENTS

	Page
Abstract (English)	iv
Abstract (Thai)	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	xii
List of Figures.....	xiii
Abbreviation and Symbols.....	xvii
CHAPTER I Introduction.....	1
1.1 Motivations.....	1
1.2 Objectives.....	2
1.3 Scope of Study.....	3
1.4 References.....	3
CHAPTER II Literature Reviews	6
2.1 Background.....	6
2.1.1 Anaerobic Wastewater Treatment and Process.....	6
2.1.1.1 Factors Controlling Anaerobic Process.....	7
2.1.1.1.1 Temperature.....	7
2.1.1.1.2 Alkalinity and pH.....	7
2.1.1.1.3 Toxicants.....	8
2.1.1.2 Process Microbiology.....	8
2.1.1.3 Biochemical Kinetics.....	9
2.1.2 Sulfate Reduction and Metal Ion Precipitation.....	12
2.1.3 Source of Heavy Metals.....	13
2.1.4 Basic Fundamentals in Biological and Toxicity Control.....	13
2.1.5 Inhibitory of Heavy Metals and Sulfide.....	14
2.1.5.1 Heavy Metals.....	14
2.1.5.2 Sulfides.....	16
2.1.6 Several Processes to Safeguard in Anaerobic Reactor.....	16

2.2 Literature Reviews.....	17
2.2.1 Studies on Various Anaerobic Bacteria and Heavy Metals....	17
2.2.2 Studies on Sulfate Reduction.....	18
2.2.3 Toxicity of Heavy Metals in Anaerobic Process.....	21
2.2.4 Sources of Mixed Microbial Assemblages.....	23
2.2.4.1 Mixed-Liquor in Septic Tanks.....	23
2.2.4.2 Coastal Area.....	24
2.2.4.3 Sludge from Alcohol Production Plant.....	24
2.2.4.4 Acidic Sulfate Soil.....	25
2.2.4.5 Leachate.....	25
2.3 References.....	27
 CHAPTER III Methodology.....	 32
3.1 Phase 1 Microbial Selection.....	32
3.1.1 Materials and Methods.....	34
3.1.2. Bioreactors.....	34
3.1.3 Feed Solution.....	34
3.1.4 Start Up.....	35
3.1.5 Operation.....	35
3.1.6 Isolation and Identification of Bacterial Culture.....	37
3.2 Phase 2 An Optimum Reactor Conditions for Simultaneous Control of Sulfate and Heavy Metals in Complex Wastewater Streams.....	41
3.3 Phase 3 Assessment of Inhibitory Effects of Heavy Metal(s) to Anaerobic Microorganisms.....	45
3.4 Analytical Methods.....	48
3.5 References.....	49

Chapter IV Comparison of the Potential Effectiveness of Selected Microbial Assemblages in Anaerobic Process of Wastewater Containing High Sulfate and Heavy Metal	50
4.1 Introduction.....	50
4.2 Purposes of this Chapter.....	50
4.3 Materials and Methods.....	51
4.4 Results and Discussion.....	51
4.4.1 Seed Characterization and Bacterial Morphology.....	52
4.4.2 Measurement of the Specific Rate of Waste Utilization, Biomass and Biogas Production and the Assessment of COD Removal Efficiencies.	52
4.4.2.1 Waste Utilization.....	56
4.4.2.2 Biomass Production.....	60
4.4.2.3 Biogas Production.....	64
4.4.2.4 VFA Degradation.....	70
4.4.3 Measurement of the Specific Rate of Sulfate Reduction Under Sulfate Reducing Condition and the Evaluation of the Effect of Sulfate Reduction and Heavy Metal in Bioreactors.....	73
4.4.4 Isolation and Identification of Bacteria.....	79
4.5 Conclusion.....	80
4.6 References.....	81
 Chapter V Optimum Reactor Conditions for Simultaneous Control of Sulfate and Heavy Metals in Complex Wastewater Streams	83
5.1 Introduction and Purposes of this Chapter.....	83
5.2 Materials and Methods.....	84
5.3 Results and Discussion.....	84

5.3.1 The Concentration of Sulfate and the COD:S Ratios for Controlling the Level and Mechanism of Sulfate Reduction.....	85
5.3.2 The Concentration of Sulfate and the COD:S Ratios to Promote Methanogenesis.....	87
5.3.3 COD Balance and Electron Flow to MPB and SRB.....	91
5.4 Conclusion.....	97
5.5 References.....	98

Chapter VI The Maximum Concentration of Heavy Metals in Wastewater that

will not Cause Synergistic Inhibition to Anaerobic Wastewater Treatment..100

6.1 Introduction.....	100
6.2 Purpose of this Chapter.....	101
6.3 Materials and Methods.....	101
6.4 Results and Discussion	103
6.4.1 Inhibition of Methane Production by Metal.....	104
6.4.1.1 Inhibition of Methane Production by a Single Metal.....	104
6.4.1.2 Inhibition of Methane Production by Combined Metals.....	106
6.4.2 Inhibition of the COD Removal by Metal.....	108
6.4.2.1 Inhibition of the COD Removal by a Single Metal.....	108
6.4.2.2 Inhibition of the COD Removal by Combined Metals.....	109
6.4.3 Criterion Model of Inhibition and Validation.....	111
6.4.3.1 A Criterion for Diagnosis of Inhibition.....	111
6.4.3.2 The Proposed Model.....	117
6.4.3.3 Results from the Experiment Set to Verify the Proposed Model.....	118

6.4.4	Assessment of Inhibitory Effects of Heavy Metals to Anaerobic Microorganisms via the VFA Monitoring.....	121
6.4.5	Assessment of Inhibitory Effects of Heavy Metals to Anaerobic Microorganisms via the Sulfate Monitoring.....	124
6.4.6	The Performance of Bioreactor.....	127
6.4.6.1	COD Removal.....	127
6.4.6.2	Sulfate Removal.....	128
6.4.6.3	Heavy Metal Removal.....	129
6.5	Conclusions.....	132
6.6	References.....	133
CHAPTER VII Conclusions and Recommendations.....		135
7.1	Conclusions.....	135
7.2	Contributions of this Work.....	137
7.3	Application for Industry.....	138
7.4	Recommendations for Further Work.....	139
References.....		140
Appendices.....		147
Biography.....		283

LIST OF TABLES

	Page
Table 2.1 Source of six common heavy metals found in influents of municipal wastewater treatment.....	15
Table 2.2 Elements normally thought of when discussing heavy metal toxicity in anaerobic reactor.....	15
Table 2.3 Soluble heavy metal concentrations inhibitory to the anaerobic process.....	15
Table 3.1 The variable and parameters for the studies in Phase 1	40
Table 3.2 Glucose synthetic wastewater composition.....	42
Table 3.3 The variables and parameters for the studies in Phase 2	44
Table 3.4 The variables and parameters for the studies in Phase 3	47
Table 3.5 The procedures utilized in this study.....	49
Table 4.1 Composition of the seed samples in form of soil, sediment and liquor.....	53
Table 4.2 The kinetic values, efficiencies, and the dominant morphology of acclimated seed sludge from different sources.....	77
Table 4.3 The results of bacterial identification.....	79
Table 5.1 Variables used, sulfate, COD:S and the percentage of COD and sulfate removal.....	85
Table 5.2 Recovery of COD and distribution of electrons to methanogenesis and sulfate reduction.....	93
Table 6.1 Compilation of data from reactors that contained a single heavy metal at various types and concentrations and the observed results in terms of methane production and COD removal activities.....	113
Table 6.2 Compilation of data from reactors that contained combined heavy metals at various types and concentrations and the observed results in terms of methane production and COD removal activities.....	114

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 3.1 Flow diagram of the overall experimental studies	33
Figure 3.2 Bioreactor for the studies of waste utilization, biomass and biogas production.....	36
Figure 3.3 Bioreactor for the studies of sulfate reduction and the effect of heavy metal.....	36
Figure 3.4 Flow diagram of the experimental study in Phase 1	38
Figure 3.5 Flow diagram of the experimental study in Phase 1 (under sulfate reducing condition).....	39
Figure 3.6 Experimental apparatus.....	41
Figure 3.7 Flow diagram of the experimental study in Phase 2	43
Figure 3.8 Flow diagram of the experimental study in Phase 3	46
Figure 4.1 The morphology of acclimated seed sludge.....	54
Figure 4.2 The time course of COD from the reactors that contained bacteria from various seed sources.....	55
Figure 4.3 The average percentage of COD removal from the reactors that contained bacteria from various seed sources.....	55
Figure 4.4 Evolution of biomass concentration in the anaerobic biodegradation of glucose from mixed-bacteria from a septic tank.....	56
Figure 4.5 Graphical determination of the specific waste utilization rate, K of mixed-bacteria from various sources.....	59
Figure 4.6 Graphical determination of the cellular yield coefficient, $Y_{X/S}$, of mixed-bacteria from various sources.....	62
Figure 4.7 The time course of total gas production at STP.....	65
Figure 4.8 The total gas production rate.....	65
Figure 4.9 The methane production profile.....	66
Figure 4.10 The time course of methane production.....	66
Figure 4.11 Graphical determination of the specific methane production rate, $Y_{P/S}$, of mixed-bacteria from various sources.....	68
Figure 4.12 Graphical determination of the methane production yield coefficient, $Y_{P/S}$, of mixed-bacteria from various sources.....	69

	Page
Figure 4.13 The time course of VFA degradation from reactors that contained mixed-bacteria from various sources.....	71
Figure 4.14 The time course of acetic acid in reactors that contained mixed-bacteria from various sources.....	72
Figure 4.15 The time course of sulfate reduction.....	73
Figure 4.16 Graphical determination of the sulfate reduction rate of mixed-bacteria from various sources.....	75
Figure 4.17 Effect of sulfate, and the combination of sulfate and Cu on COD removal in anaerobic process.....	78
Figure 5.1 Time course of sulfate presented in the effluent.....	86
Figure 5.2 Relationship between sulfate reduced and COD:S.....	86
Figure 5.3 Time course of methane production.....	88
Figure 5.4 Effects of sulfate on methane.....	88
Figure 5.5 Specific methanogenic activities (SMAs) from glucose.....	89
Figure 5.6 The percentage of COD removal and the COD:S ratio.....	90
Figure 5.7 The relationship between pH and the COD:S ratio.....	90
Figure 5.8 COD balance of methane, SO_4^{2-} and effluent at various ratios of the COD:S.....	92
Figure 5.9 Electron flow distribution to MPB and SRB as a function of COD:S.....	95
Figure 5.10 The acetic, propionic and butyric acid in the effluent of various reactors with various COD:S ratios.....	96
Figure 6.1 The percentage of methane profile when system contains a single metal	104
Figure 6.2 Relationship between methane production activities(AV) and a single metal dosed (A) Cd , (B) Cu, and (C) Zn.....	105
Figure 6.3 The percentage of methane profile when system contains combined metals	106
Figure 6.4 Effect of combined metals on the pattern of inhibition of methane production.....	107

Figure 6.5 Effect of combined metals on the pattern of inhibition of methane production.....	107
Figure 6.6 Effect of combined metals on the pattern of inhibition of methane production.....	107
Figure 6.7 Relationship between COD removal activities (AV) and a single metal dosed	108
Figure 6.8 Effect of combined metals on the pattern of inhibition of COD removal.	110
Figure 6.9 Effect of combined metals on the pattern of inhibition of COD removal.....	110
Figure 6.10 Effect of combined metals on the pattern of inhibition of COD removal.....	110
Figure 6.11 Effect of three combined metals on the pattern of inhibition of COD removal.....	111
Figure 6.12 The relationship between %AV in terms of methane production and the metal loadings of reactors in a single metal system	115
Figure 6.13 The relationship between %AV in terms of methane production and the metal loadings of reactors in a combined metal system	115
Figure 6.14 The relationship between %AV in terms of methane production and the <u>soluble</u> metal loadings of reactors in a combined metal system	115
Figure 6.15 The relationship between %AV in terms of COD removal and the metal loadings of reactors in a single metal system	116
Figure 6.16 The relationship between % AV in terms of COD removal and the metal loadings of reactors in a combined metal system	116

Figure 6.17 The relationship between % AV in terms of COD removal and the <u>soluble</u> metal loadings of reactors in a combined metal system	116
Figure 6.18 Effect of combined metals on methane production activity	118
Figure 6.19 Effect of <u>soluble</u> combined metals on methane production activity	119
Figure 6.20 Effect of combined metals on COD removal activity	119
Figure 6.21 Effect of <u>soluble</u> combined metals on COD removal activity	119
Figure 6.22 The time course of butyric, propionic and acetic acid when Cd in the range 0-20 mg/l was provided.....	122
Figure 6.23 The time course of butyric, propionic and acetic acid when Cu in the range 0-2 mg/l was provided.....	122
Figure 6.24 The time course of butyric, propionic and acetic acid when Zn in the range 0-30 mg/l was provided.....	122
Figure 6.25 The time course of butyric, propionic and acetic acid when metals were combined at various concentrations.....	123
Figure 6.26 The time course of sulfate when a single metal at various concentrations was provided	125
Figure 6.27 The time course of sulfate when combined metals of various types and concentrations were provided.....	126
Figure 6.28 Metal affecting sulfate reduction	127
Figure 6.29 The percentage of COD removal in reactors with single metal dosed ..	128
Figure 6.30 The influent and effluent pH in various reactors which contained a single metal in various types and concentrations at the metal loadings 0-80 meq/kg MLVSS.....	131
Figure 6.31 The Influent and effluent pH in various reactors which contained combined metals in various types and concentrations at the metal loadings 0-80 meq/kg MLVSS.....	131
Figure 6.32 The Influent and effluent pH in various reactors which contained combined metals in various types and concentrations at the metal loadings less than 30 meq/kg MLVSS.....	132

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

AAS	=	Atomic Absorption Spectrophotometry
A,C,G,T	=	Adenine, Cytosine, Guanine, Thymine
APHA	=	American Public Health Association
ATCC	=	American Type Culture Collection
AWWA	=	American Water Works Association
BLAST	=	Basic Local Alignment Search Tool
BOD	=	Biochemical Oxygen Demand
bp	=	Base pairs
Cd	=	Cadmium
CH ₄	=	Methane
Cl ⁻	=	Chloride
CO ₂	=	Carbon dioxide
COD	=	Chemical Oxygen Demand
COD:S	=	Chemical Oxygen Demand per Sulfur Ratio
Cr	=	Chromium
CSTR	=	Continuous Flow Stirred-Tank Reactor
Cu	=	Copper
DNA	=	Deoxyribo Nucleic Acid
dNTP	=	Deoxyribonucleotide Tri-Phosphate
<i>E. coli</i>	=	Escherichia Coil
EC ₅₀	=	Effective Collection
EDTA	=	Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid
EDX	=	Energy Dispersive X-ray spectrometry
Fe(SO ₄) (NH ₄) ₂ .6H ₂ O	=	Ferrous Ammonium Sulfate hexahydrate
FeS	=	Ferrous Sulfide
FID	=	Flame Ionization Detector
GC	=	Gas chromatography
H ₂	=	Hydrogen
H ₂ S	=	Hydrogen Sulfide
HAc	=	Acetic Acid
HBu	=	Butyric Acid

Hg	=	Mercury
HPr	=	Propionic Acid
HRT	=	Hydraulic Retention Time
K	=	Specific substrate utilization rate
K	=	Kelvin
K	=	Toxicant loading or heavy metal loading
k_d	=	Endogenous decay coefficient
K_p	=	Specific CH ₄ production rate
l/mg-h	=	Liter per milligram-hour
M^{2+}	=	Divalent metal ion
m	=	Meter
meq/l	=	Milli equivalent per liter
mg / kg DW	=	Milligram per kilogram dry weight
mg/l	=	Milligram per liter
mg/l as CaCO ₃	=	Milligram per liter as calcium carbonate
MLVSS	=	Mixed Liquor Volatile Suspended Solids
mM	=	Milli molar
Mn	=	Manganese
MPB	=	Methane Producing Bacteria
MSW	=	Municipal solid waste
mV	=	Milli volt
NA	=	Not analyzed
Na ₂ SO ₄	=	Sodium sulfate
NCBI	=	National Center for Biotechnology Information
ND	=	Not detectable
Ni	=	Nickel
NO ₃ ⁻	=	Nitrate ion
OM	=	Organic Matter
ORP	=	Oxidation Reduction Potential
Pb	=	Lead
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
pMol	=	Pico Mole
S	=	Substrate concentration

S^{2-}	=	Sulfide ion
SEM	=	Scanning Electron Microscope
SMA's	=	Specific Methanogenic Activities
S_0	=	Initial substrate concentration
SO_4^{2-}	=	Sulfate ion
SRB	=	Sulfate Reducing Bacteria
S_t	=	Substrate concentration at time t
STP	=	Standard Temperature and Pressure
t	=	Time or Hydraulic retention time
TCD	=	Thermal Conductivity Detector
TDS	=	Total Dissolved Solids
TOC	=	Total Organic Carbon
UASB	=	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
USEPA	=	United State Environmental Protection Agency
VFA's	=	Volatile Fatty Acids
W	=	Concentration of biomass (MLVSS), in the unit of kilogram/liter
$Y_{P/S}$	=	Methane production yield coefficient
$Y_{X/S}$	=	Cellular yield coefficient,
Zn	=	Zinc
θ	=	Hydraulic retention time
$\mu\text{g/g}$	=	Microgram per gram
$\mu\text{S/cm}$	=	Micro siemen per centimeter
\bar{X}	=	Average cell concentration, biomass
$^{\circ}\text{C}$	=	Degree Celsius
μ	=	Growth rate constant of biomass
μ_{max}	=	Maximum value of the growth rate constant, time a cell remains in the system
16S rRNA	=	16 Single-stranded ribosomal Ribonucleic Acid