**Name of Candidate**: Khadiga Ibrahim Mohammed **Degree:** Ph.D.
**Title of Thesis:** Biochemical and Microbiological Studies on Olive Industrial Liquid Wastes
**Supervisors**: Dr. Adel Sayed Afify
Dr. Mahmoud Abdel-Haleem Mahmoud
Dr. Hamdy Ali Emara
**Department:** Agricultural Biochemistry
**Approval: 16/11/2011**

## ABSTRACT

This study was conducted to test biological and chemical treatments applied to olive oil mill wastewater (OMW) to reduce its phenolic compounds, biological oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD) contents and its toxicity. The biological treatments were carried out using two fungal species (*Aspergillus wentii* and *Aspergillus niger*) isolated from OMW and compared with *Pleurotus ostreatus*. *A. wentii* was more efficient than *A. niger* in removing of BOD (74.3%) and phenolic compounds reduction (81.0%) from OMW after two weeks of incubation. On the other hand, the optimum OMW dilution used was 10%, in which the maximum BOD removal (62.0%) and maximum phenolic compounds reduction (81.0%) were seen by *A. wentii*.

Different chemical treatments applied used UV radiation alone or combined with different $H_2O_2$ concentrations, four Fenton system at three pH values (5, 7 and 9) and photo-catalysis by different amount of titanium dioxide at three pH values (5, 7 and 9). The degradation of tannic acid obtained was 47.85% at 0.05 M $H_2O_2$ and pH 5 under UV radiation. The maximum tannic acid degradation obtained by Fenton system was 95.33% at $2.4 \times 10^{-3}$ M $Fe^{2+}$ and 0.11 M $H_2O_2$ with UV radiation at pH 5. The maximum degradation obtained by photo-catalysis using titanium dioxide (50 mg/l) was 35.07% at pH 5. The maximum phenolic compounds degradation percentage in chemically treated OMW (2.00 M $H_2O_2$/UV, 150 min) reached 84.45%. The ethylacetate extracts of crude OMW, chemically treated (0.55 M $H_2O_2$/UV, 150 min) and biologically treated OMW were analyzed by GC/MS.

Finally, the effect of treated OMWs on growing tomato plants was tested with different NPK rates as fertilizer. The best result was achieved by chemically treated OMW + 100% NPK (349.5 g fruit/plant).

**Key words:** biological and chemical treatments, olive oil wastewater (OMW), phenolic compounds and chemical oxygen demand (COD)

**اسم الطالب:** خديجة ابراهيم محمد عبد الكريم **الدرجة:** دكتوراه الفلسفة
**عنوان الرسالة:** دراسة كيميائية حيوية و ميكروبيولوجية علي المخلفات السائلة لمصانع الزيتون
**المشرفون: دكتور:** عادل سيد عفيفي
**دكتور:** محمود عبد الحليم محمود
**دكتور:** حمدي علي عمارة
**قسم: كيمياء حيوية** **تاريخ منح الدرجة:** 2011/11/16

**المستخلص العربي**

الهدف الرئيسى فى هذه الدراسة هو تقليل الأضرار البيئية الناتجة من المخلف السائل الناتج من صناعة زيت الزيتون (OMW) عن طريق تطبيق بعض المعاملات الكيميائية والبيولوجية ثم إعادة استخدامه مرة اخري في الزراعة. في هذه الدراسة، المعاملات البيولوجية تضمنت توصيف الفطريات المعزولة من المخلف السائل الناتج من صناعة زيت الزيتون وتم إختيار سلالتان (*Aspergillus wentii* و *Aspergillus niger*) ومقارنتهما بسلالة فطرية مرجعية (*Pleurotus ostreatus*). أظهرت النتائج أن الفطرين *A. wentii* و *P. ostreatus* الأعلى في تكسير المركبات الفينولية في المخلف السائل وكذلك الأعلي تأثيراً في خفض الأكسيجين المستهلك حيويا في المخلف السائل وفطر *A. wentii* هو الأكثر كفاءة والأعلى فى إزالة للأكسجين الحيوى المستهلك (74.3٪) وتكسيراً للمركبات الفينولية (81٪). أفضل تركيز للمخلف السائل كان 10٪ حيث إنخفض الأكسيجين الحيوى المستهلك بنسبة 62٪ وتم تكسير المركبات الفينولية بنسبة 81٪ ، بينما أعلى إزالة للون المخلف السائل كان عند نفس التركيز (10٪) من بين الفطريات الثلاث. فى حالة المعاملات الكيميائية، عند تطبيق أفضل طريقة لتكسير المركبات الفينولية بواسطة فوق أكسيد الهيدروجين بتركيز 2.0 مولر وفي وجود الأشعة فوق البنفسجية وعلي درجة pH المثلي (5) ولأطول فترة تحضين (حتي 150 دقيقة) علي المخلف السائل الناتج من صناعة زيت الزيتون، أظهرت النتائج أن أعلي نسبة لتكسير المركبات الفينولية بلغت 84.45٪. ولدراسة تأثير بعض المعاملات الكيميائية والميكروبيولوجية علي المركبات الموجودة في المخلف السائل، تم أستخلاص تلك المركبات ثم تحليلها بواسطة GC/MS. تم التعرف على عدة مركبات في المخلف السائل الخام ولم تظهر في المخلف السائل المعامل كيميائياً، مثل مركب Benzaldhyde-3-amino-oxime الذي وجد في المخلف السائل الخام ولم يوجد في المخلف السائل المعامل كيميائياً. وعلى العكس من ذلك، تم التعرف على مركبات أخري في المخلف السائل المعامل كيميائياً فقط مثل Aminobenzenethiol. وهذا يعني أن نظام المعاملة بفوق أكسيد الهيدروجين مع التعرض للأشعة فوق البنفسجية له القدرة علي تكسير بعض المركبات دون الأخرى. تم إستخدام المخلف السائل الخام (غير المعامل) والمعامل في تجربتين زراعيتين، الأولي تضمنت دراسة تأثيرها علي إنبات بعض البذور والثانية تضمنت إستخدامها في ري بعض النباتات ودراسة تأثيرها علي بعض قيم النمو المختلفة. في تجربة الإنبات، تمت دراسة تأثيرها علي إنبات بذور الشعير والجرجير وصنفين من بذور الطماطم (Global و Castle rock). بلغت نسبة إنبات بذور الطماطم صنف Castle rock أعلي نسبة (96٪) للبذور المروية بالمخلف السائل بتركيز 20٪ ويليه المعامل بفطر *Aspergillus wentii* بتركيز10٪ (94٪) بينما إنبات بذور الطماطم صنف Global فبلغت النسبة 66٪ للبذور المروية بتركيز 5٪ من المخلف السائل المعامل كيميائيا بفوق أكسيد الهيدروجين (0.55 مولر) وفي وجود الأشعة فوق البنفسجية لمدة 150 دقيقة. أما إنبات بذور الشعير فقد بلغت نسبة الإنبات 35.3٪ للبذور المروية بالمخلف السائل المعامل بالطريقة الكيميائية والذي يبلغ تركيزه 5٪، ونسبة إنبات بذور الجرجير بلغت 55٪ للمروية بالمخلف السائل المعامل بالطريقة الكيميائية والذي يبلغ تركيزه 5٪. في تجربة ري النبات بالمخلف السائل المعامل، كانت هناك علاقة طردية بين معدل التسميد بـNPK والوزن الرطب او الجاف للمجموع الخضرى او الجذري بعد 45 و105 يوماً من الشتل. قد بلغت أعلي نسبة مع المخلف السائل المعامل حيوياً بالفطر *P. ostreatus* مع تسميد بنسبة 100٪ NPK ، ثم بالمخلف السائل المعامل بالطريقة الكيميائية مع نفس التسميد 100٪، ثم للمخلف السائل غير المعامل مع نفس التسميد، ثم الكنترول، بينما افضل محصول ثمار كان 349.5 جرام لكل نبات بعد 105 يوماً من الشتل وذلك عند الري بالمخلف السائل المعامل كيميائياً (0.55 مولر فوق أكسيد الهيدروجين فى وجود الأشعة فوق البنفسجية لمدة 150 دقيقة وعلي درجة pH 5) مع تسميد بنسبة 100٪ NPK.

**الكلمات الدالة:** المخلفات السائلة لمصانع الزيتون، الفينولات، المعالجة الحيوية والكميائية، الأكسجين المستهلك حيويا BOD وكيميائيا COD

# CONTENTS


| | Page |
|---|---|
| **INTRODUCTION** …….. | **1** |
| **REVIEW OF LITERATURE** …….. | **3** |
| 1. Extraction of olive oil ……... | **3** |
| 2. By-products resulted from olive oil extraction …… | **5** |
| 3. Chemical composition of OMW …….. | **5** |
| 4. Utilization of OMW ……. | **6** |
| 5. Remove of toxic substances from OMW ……. | **13** |
| **MATERIALS AND METHODS** …… | **23** |
| **MATERIALS** ……... | **23** |
| **METHODS** …….. | **26** |
| 1. Isolation of fungi from OMW ……. | **26** |
| 2. Treatments of OMW …… | **26** |
| a. Biological treatment …….. | **26** |
| b. Chemical treatment ……... | **26** |
| 3. Germination test ……... | **28** |
| 4. OMW as liquid fertilizer …….. | **29** |
| a. First pot experiment …….. | **30** |
| b. Second pot experiment …….. | **31** |
| 5. Chemical analyses …… | **31** |
| 6. Statistical analyses …… | **37** |
| **RESULTS AND DISCUSSION** …….. | **39** |
| 1. Chemical composition of OMW …….. | **39** |
| 2. Fungal isolation from OMW …… | **40** |
| 3. Biological treatment of OMW …….. | **41** |
| 4. Chemical treatments ……. | **53** |
| 5. GC/MS analysis of ethylacetate extracts of OMW …….. | **83** |
| 6. Evaluation of treated OMW on seeds germination……. | **89** |
| **SUMMARY** …….. | **104** |
| **REFERENCES** ……. | **107** |
| **ARABIC SUMMARY** | |