รายงานผลการวิจัย
เงินทุนบริษัทไทยวา จำกัด

เรื่อง

การสำรวจสรีรวิทยาเชิงนิเวศน์ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแก๊สชีวภาพในกากตะกอนน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมนม

571.638
293
ศ148ก

โดย

ดร. ศิริรัตน์ เร่งทิพย์
นางสาว ทัศตรา เขมาวุฒานนท์

2537

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย - เงินทุนบริษัทไทยวา จำกัด

รายงานผลการวิจัย

การสำรวจสรีรวิทยาเชิงนิเวศน์ของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแก๊สชีวภาพในกากตะกอนน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมนม

โดย

ดร. สิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์
นางสาว พัสตรา เขมาวุฒานนท์

กันวาคม 2537

I17482732 25 ธ.ค. 2541

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

541.638293
ต481ก

CHULALONGKORN UNIVERSITY - THAIWAH CO.,LTD

INVESTIGATION AND MICROBIAL ECOPHYSIOLOGY OF BIOMETHANATION IN SLUDGES OF DAIRY INDUSTRY

BY

DR.SIRIRAT RENGPIPAT
MISS PASTRA KEMAVUTHANON

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DECEMBER 1994

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย II

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ III

รายการตารางประกอบ IV

รายการภาพประกอบ VIII

สัญญลักษณ์และคำย่อ XI

บทที่

1. บทนำ 1

2. วารสารปริทัศน์ 9

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 21

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ 39

5. สรุปผลการทดลอง 81

เอกสารอ้างอิง 83

ภาคผนวก 89

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ 571.638293
ศ 481 ก
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี

บทคัดย่อ

ทำการแยกอะซิโตเจนซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่คัดเลือกโดยการเจริญบนอาหารที่มีกรดโพรพิโอนิคหรือกรดแลคติค และนำไปผสมกับเมธาโนเจนซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่คัดเลือกโดยการเจริญบนอาหารที่มีเมธานอลหรือ H_2:CO_2 (80:20) เพื่อศึกษาถึงการผลิตแก๊สมีเธนในระดับหลอดทดลอง พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สมีเธนของเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิค และเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลหรือ H_2:CO_2 (80:20) หลังจากบ่มเป็นเวลา 6 สัปดาห์ คือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นกรดแลคติค 5 mM มีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน และเติมตัวกระตุ้นกระบวนการเกิดแก๊สมีเธนคือ H_2:CO_2(80:20)ในสัปดาห์ที่ 2ของการเลี้ยงเชื้อโดยใช้อัตราส่วนของอะซิโตเจนต่อเมธาโนเจน 1:1 ที่ 37°C โดยได้ปริมาณแก๊สมีเธนเท่ากับ 2.00×10^5 nmole สิ่งที่น่าสนใจคือ เมื่อใช้เชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลหรือ H_2:CO_2(80:20) จะเกิดแก๊สมีเธนเท่ากับ 2.97×10^5 nmole เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นกรดแลคติค 10 mM มีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน และเติมตัวกระตุ้นกระบวนการเกิดแก๊สมีเธนคือ H_2:CO_2(80:20) ในสัปดาห์ที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยใช้อัตราส่วนของอะซิโตเจนต่อเมธาโนเจน 1:1 ที่ 37°C พบว่าในภาวะทั้ง 2 มีค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของน้ำเลี้ยงเชื้อ 6.65 และ 6.74 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมในช่วงการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มเมธาโนเจนและให้แก๊สมีเธนในปริมาณที่สูง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

Acetogens and methanogens were isolated from sludges of dairy industry by using propionic acid or lactic acid as a selective substrate for Acetogens and methanol or $H_2:CO_2$ (80:20) for Methanogens. Then, mixed cultures of the isolated Acetogens and Methanogens at a ratio of 1:1 was cultivated for methane production at 37°C. After 6 weeks of incubation, high quantity of methane of 2.00×10^5 nmole was obtained. This optimal production was from the mixed cultures of acetogens isolated by using propionic acid and methanogens by using methanol or $H_2:CO_2$ (80:20) as a selective substrate and being by cultivated in a medium containing 5 mM lactic acid with sand as a carrier matrix and subsequent addition of $H_2:CO_2$ (80:20) in the second week of cultivation. Interestingly, the highest quantity of methane production of 2.97×10^5 nmole was observed from 6 week-cultivation of the mixed cultures at a ratio of 1:1 of acetogens isolated by using lactic acid and methanogens by using methanol or $H_2:CO_2$ (80:20) as a selective substrate in a medium containing 10 mM lactic acid with sand as a carrier matrix and subsequent addition of $H_2:CO_2$ (80:20) in the second week of cultivation. It was observed that final pH of both conditions were 6.65 and 6.74, respectively, which was in the optimal pH range for methanogens growth.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ หน้า

1.1 ชีบสเทรตของแบคทีเรียกลุ่มเมธาโนเจนที่ใช้ในการสร้างแก๊สมีเธน 2

1.2 การจำแนกเมธาโนเจนเป็นorderโดยอาศัยสมบัติทางรูปร่างและการใช้ชีบสเทรต 5

2.1 ปริมาณพลังงานที่ใช้ในแต่ละปีโดยประชากรโลก 9

2.2 การนำแก๊สมีเธนไปใช้ในกิจกรรมชนิดต่างๆ 10

2.3 ประสิทธิภาพในการลดค่าบี.โอ.ดี.ของน้ำเสียที่เกิดจากการหมักโดยกระบวนการบำบัดแบบต่างๆ 11

2.4 เปรียบเทียบชนิดของแบคทีเรียในกากตะกอนและกากตะกอนที่ได้รับการปรับปรุงแล้ว 14

2.5 ค่าบี.โอ.ดี.ของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ 16

2.6 ของเหลือทิ้งประเภทเซลลูโลสที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตแก๊สมีเธน 17

2.7 เปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดอะมิโนในน้ำเสียและในกากตะกอนที่ผ่านกระบวนการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ 18

2.8 ค่าความร้อนของแก๊สเชื้อเพลิงต่างๆ 20

4.1 ปริมาณที่นับได้โดยเฉลี่ยของเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมชีบสเทรตชนิดต่างๆและบ่มไว้ที่37°C 44

4.2 ปริมาณแก๊สมีเธนที่ผลิตโดยเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมชีบสเทรตในน้ำเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้น20mMและบ่มไว้ที่37°C 48

4.3 แสดงชนิดและลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้จากการใช้ชีบสเทรตชนิดต่างๆ .. 55

4.4 แสดงค่าความเป็นกรดต่างสุดท้ายโดยเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่างๆ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา42วัน 60

ตารางที่

4.5 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายโดยเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิคให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่างๆและบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา42วัน 61

4.6 แสดงค่าความเป็นกรดด่างโดยเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคหรือกรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลโดยมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่อุณหภูมิ37°Cเป็นเวลา42วัน 64

4.7 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน 66

4.8 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mM และมีการเติมเมธานอลในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน .. 66

4.9 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติมH_2:CO_2(80:20)ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน 67

4.10 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน 69

ตารางที่

4.11 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติค และเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mM และมีการเติมเมธานอลในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน 69

4.12 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติค และเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mM และมีการเติมH_2:CO_2(80:20)ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน 70

4.13 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิค และเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน 72

4.14 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิค และเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติมเมธานอลในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน 72

4.15 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิค และเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติมH_2:CO_2(80:20)ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน 73

ตารางที่

4.16 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติค และเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน 75

4.17 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติค และเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mM และมีการเติมเมธานอลในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน 75

4.18 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติค และเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mM และมีการเติมH_2:CO_2(80:20)ในวันที่ 14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา 42วัน 76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่

1.1 วัฏจักรคาร์บอนในธรรมชาติ 4

1.2 การย่อยสลายสารเชิงซ้อนโดยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรีย3กลุ่ม 6

2.1 ระบบกำจัดน้ำกากส่าของโรงงานสุราแสงโสม จังหวัดนครปฐม 12

2.2 ประโยชน์ของผลพลอยได้ที่เกิดจากการใช้ระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ 19

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำหลอดเลี้ยงเชื้อแบบไร้อากาศ 23

3.2 ลักษณะภายในของท่อทองแดงสำหรับดูดแก๊สออกซิเจนซึ่งใช้ในกระบวนการทำหลอดเลี้ยงเชื้อแบบไร้อากาศ 24

3.3 ลักษณะภายนอกของท่อทองแดงสำหรับดูดแก๊สออกซิเจนซึ่งใช้ในกระบวนการทำหลอดเลี้ยงเชื้อแบบไร้อากาศ 24

3.4 เครื่องเคลือบวุ้นเข้ากับผิวด้านในหลอดทดลองของฮังเกต 25

3.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 26

3.6 ลักษณะกากตะกอนที่ได้รับจากโรงงานอุตสาหกรรมนม 29

3.7 แสดงการเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งโดยวิธีของฮังเกต 30

3.8 การเติมชั้นสเทรตไฮโดรเจนะคาร์บอนไดออกไซด์(80:20) 31

3.9 การเก็บตัวอย่างแก๊สมีเธนจากหลอดเลี้ยงเชื้อโดยใช้หลอดฉีดยาเก็บความดัน 32

3.10 การเก็บโคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 34

3.11 ขวดเก็บเชื้อบริสุทธิ์ 36

4.1 ลักษณะภายนอกของกากตะกอนเมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนกำลังขยาย 350 เท่า 40

4.2 ผิวของกากตะกอนเมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนกำลังขยาย 3,500 เท่า 41

4.3 ผิวของกากตะกอนเมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนกำลังขยาย 10,000 เท่า 41

รูปที่

4.4 ภาพตัดขวางของกากตะกอนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบผ่านตลอดกำลังขยาย 7,000 เท่า..... 43

4.5 ภาพตัดขวางของกากตะกอนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบผ่านตลอดกำลังขยาย 14,000 เท่า 43

4.6 เปรียบเทียบปริมาณที่นับได้ของเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆและบ่มไว้ที่ 37°C 45

4.7 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สมีเธนของเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆและบ่มไว้ที่ 37°C 49

4.8 ลักษณะโคโลนีของเชื้ออะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติค 56

4.9 ลักษณะโคโลนีของเชื้ออะซิโตเจนเมื่อสัมผัสอากาศ 56

4.10 ลักษณะโคโลนีของเชื้อเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลหรือ $H_2:CO_2$ (80:20) 57

4.11 ลักษณะการเรืองแสงของเชื้อเมธาโนเจนเมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดฟลูออเรสเซนต์กำลังขยาย1,000เท่า 57

4.12 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นกรดแลคติค5mMและแปรผันการเติมซับสเทรตชนิดอื่น 68

4.13 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นกรดแลคติค5mMและแปรผันการเติมซับสเทรตชนิดอื่น 71

4.14 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นกรดแลคติค10mMและแปรผันการเติมซับสเทรตชนิดอื่น 74

รูปที่

4.15 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมของละชิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นกรดแลคติค10mMและแปรผันการเติมซับสเทรตชนิดอื่น 77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	เปอร์เซนต์
$^{\circ}C$	=	องศาเซลเซียส
Kg	=	กิโลกรัม
mg	=	มิลลิกรัม
mM	=	มิลลิโมลาร์
KJ	=	กิโลจูล
MJ	=	เมกกะจูล
ft^3	=	ลูกบาศก์ฟุต
Hr	=	ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันวิกฤติการณ์ทางด้านพลังงานและภาวะมลพิษเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยโดยเฉพาะมลภาวะทางน้ำ กระบวนการบำบัดที่ได้รับความนิยมและสร้างแก๊สมีเธน ได้แก่ระบบการบำบัดที่ไม่ใช้อากาศ (Anaerobic Treatment) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ง่ายต่อการใช้งาน เครื่องมือไม่ซับซ้อน ให้แก๊สเชื้อเพลิงเป็นผลพลอยได้ และค่าใช้จ่ายต่ำเมื่อเทียบกับระบบบำบัดแบบที่ใช้อากาศ (Aerobic Treatment) (Sumaeth Chavadej, 1990)

ระบบบำบัดที่ไม่ใช้อากาศประกอบด้วยลำดับความซับซ้อน (Complex series) ของปฏิกิริยาการย่อยสลาย และปฏิกิริยาการหมัก (Fermentative Reaction) โดยแบคทีเรียหลายกลุ่มทำให้ได้มีเธนและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทสารระเหยง่าย (Volatile) ทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียลดลง เป็นการแสดงถึงประสิทธิภาพของการบำบัดในเทอมของค่าบี.โอ.ดีที่ลดลง

ด้วยเหตุที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม จึงมีของเหลือทิ้งประเภทเซลลูโลสที่สามารถนำมาผ่านระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศและเกิดแก๊สเชื้อเพลิงขึ้น ซึ่งจากการที่ระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศมีข้อดีดังกล่าว จึงมีผู้สนใจในการนำระบบนี้มาใช้มากขึ้น แต่ยังพบว่าข้อเสียของระบบนี้คือประสิทธิภาพในการบำบัดยังคงมีค่าต่ำ ค่าบี.โอ.ดี.ของน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วยังคงมีค่าสูง และผลิตแก๊สเชื้อเพลิงได้ปริมาณน้อยซึ่งเป็นผลจากความไม่เหมาะสมของแบคทีเรียในกากตะกอน จากรายงานของ Harada (1990) พบเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดทำงานร่วมกันในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ซึ่งจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญและมีบทบาทมากในระบบดังกล่าวคือแบคทีเรียกลุ่มที่เรียกว่า เมธาโนเจน

เมธาโนเจน เป็นแบคทีเรียในยุคเริ่มแรกของโลก (Archaebacteria) (Jain และคณะ, 1988) กล่าวคือ เกิดในช่วงที่บรรยากาศของโลกอยู่ในสภาพปราศจากออกซิเจน จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ต้องการอากาศในการดำรงชีวิต และสร้างมีเธน

ขึ้นจากซับสเทรตที่มีโครงสร้างง่ายๆ ดังแสดงในตารางที่ 1.1 (Jain และคณะ, 1988) และโดยสมบัติดังกล่าวนี้เองที่แยกเมธาโนเจนออกจากแบคทีเรียกลุ่มอื่น

ตารางที่ 1.1 ซับสเทรตของแบคทีเรียกลุ่มเมธาโนเจนที่ใช้ในการสร้างแก๊สมีเธน (Jain และคณะ, 1988)

Methanogenic species	Substrate
Methanobacterium formicicum	H_2-CO_2 , FORMATE
Methanosphaera stadtmaniae	METHANOL+H_2
Methanothermus fervidus	H_2-CO_2
Methanococcus vannielii	H_2-CO_2 , FORMATE
Methanomicrobium mobile	H_2-CO_2 , FORMATE
Methanospirillum hungatei	H_2-CO_2 , FORMATE
Methanosarcina barkeri	H_2-CO_2 , METHANOL , ACETATE
Methanolobus tindarius	METHANOL , METHYLAMINES
Methanothrix soehngenii	ACETATE

ตารางที่ 1.1 แสดงชนิดของซับสเทรตที่แบคทีเรียกลุ่มเมธาโนเจนสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน กระบวนการเกิดมีเธนในธรรมชาติส่วนใหญ่เริ่มจากการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มอื่น (Gottschalk, 1986) จนได้ซับสเทรตซึ่งเมธาโนเจนสามารถนำไปใช้ในการสร้างแก๊สมีเธนได้ ซึ่งการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียสองกลุ่มนี้เป็นแบบพึ่งพาอาศัยกัน (Syntrotroph) เพื่อรักษาสภาวะความดันบางส่วน (Partial Pressure) ของไฮโดรเจนให้ต่ำ (Yang และ Guo, 1991)

สามารถแบ่งชนิดซับสเทรตของเมธาโนเจนได้เป็น 3 กลุ่มคือ

1. ACETOCLASTIC SUBSTRATE ได้แก่ กรดอะซิติค

2. CO_2-TYPE SUBSTRATES ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ , ฟอร์เมท

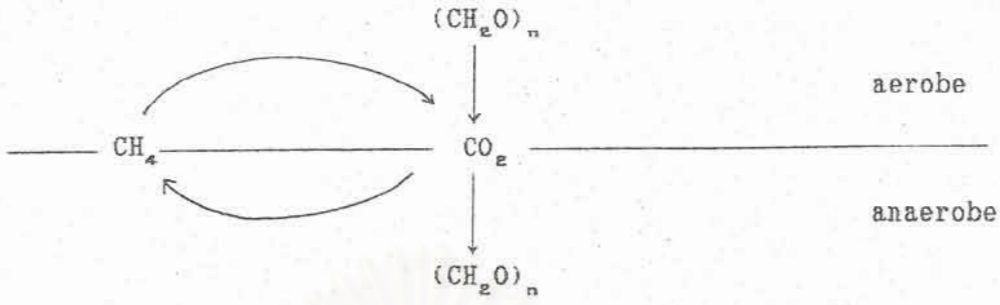
3. METHYL SUBSTRATES ได้แก่ เมธานอล , เมธิลลามีน

ถึงแม้ว่าเมธาโนเจนจะเจริญได้ในแหล่งอาหารง่ายๆเหล่านี้ แต่การเติมสารบางอย่าง เช่น สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) 0.05% ลงไปเล็กน้อยเป็นการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเมธาโนเจน (Jain และคณะ, 1988) และช่วยให้เกิดการสร้างมีเธนได้มากขึ้น

กระบวนการเกิดแก๊สมีเธน เป็นกระบวนการที่มีอยู่ทั่วไปทุกแห่งในสภาพแวดล้อมที่ไร้อากาศ เช่นในทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ในโคลน ในดินที่น้ำทะเลหรือน้ำจืดท่วมถึง ในเครื่องปฏิกรณ์ที่บำบัดน้ำเสียชนิดต่างๆ (Jain และคณะ, 1988) และบางครั้งมีการพบมีเธนเป็นองค์ประกอบของแก๊สติดไฟที่พบภายในลำต้นของต้นไม้บริเวณท่อลำเลียงน้ำและอาหารของพืชที่ตายแล้วและบริเวณเนื้อเยื่อของพืช (Zeikus, 1977) ซึ่งเป็นบริเวณที่เหมาะสมต่อการเจริญของเมธาโนเจน กล่าวคือสภาพไร้ออกซิเจน ความชื้นสูง และค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเมธาโนเจนจึงทำให้เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์และเกิดเป็นมีเธนภายใน แต่ถ้าในสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่มีออกซิเจนเมธาโนเจนจะเกิดการ Inactivated และถึงตายได้ในบางกลุ่ม

เมธาโนเจนเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ทำหน้าที่สุดท้ายในห่วงโซ่อาหารที่มีการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Gottschalk, 1986) กระบวนการดังกล่าวจะเกิดได้ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกลุ่มต่างๆที่อยู่ด้วยกัน กระบวนการนี้เกิดได้ดีเมื่อแบคทีเรียกลุ่มอื่นสามารถย่อยสลายและส่งซับสเทรตที่จำเป็นให้แก่เมธาโนเจน การทำงานร่วมกันนี้มีประโยชน์ในการผลักดันปฏิกิริยาบางชนิดที่เกิดยาก(พิจารณา Gibb s free energy) ให้เกิดได้ง่ายขึ้น กระบวนการดังกล่าวมีความสำคัญมากในวัฏจักรคาร์บอนในธรรมชาติ (รูปที่ 1.1) (Brock, 1991) เพราะเป็นสาเหตุของการย่อยสลายสารอินทรีย์ชีบซ้อนโดยไม่ใช้อากาศ เพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์แก๊สที่สะอาดและง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์คือแก๊สมีเธนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดยมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเพียงเล็กน้อย

รูปที่ 1.1 วัฏจักรคาร์บอนในธรรมชาติ (Brock, 1991)



เมธาโนเจนเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีรูปร่างแตกต่างกัน ไม่มีลักษณะจำเพาะ คือมีรูปแท่ง(ROD) รูปกลม (COCCUS) ซาร์ซินา (SARCINA) และสไปริลลัม (SPIRILLUM) แต่อย่างไรก็ตาม การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มนี้ก็ยังคงใช้รูปร่าง ลักษณะโคโลนี การย้อมติดสีแกรม และความสามารถในการใช้ซับสเทรตรวมถึงสารจำเป็นอื่นๆเป็นสมบัติเบื้องต้นในการจำแนก (Jain และคณะ, 1991)ดังตารางที่ 1.2 เมธาโนเจนยังมีลักษณะเฉพาะที่ให้จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่มพิเศษคือการมีโคเอ็นไซม์ที่ต่างจากแบคทีเรียทั่วไปคือโคเอ็นไซม์ M F_{420} F_{430} Methanofuran Methanopterin และจากสมบัติของ F_{420} นี้เองที่ให้เซลล์ของเมธาโนเจนเกิดการเรืองแสงเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

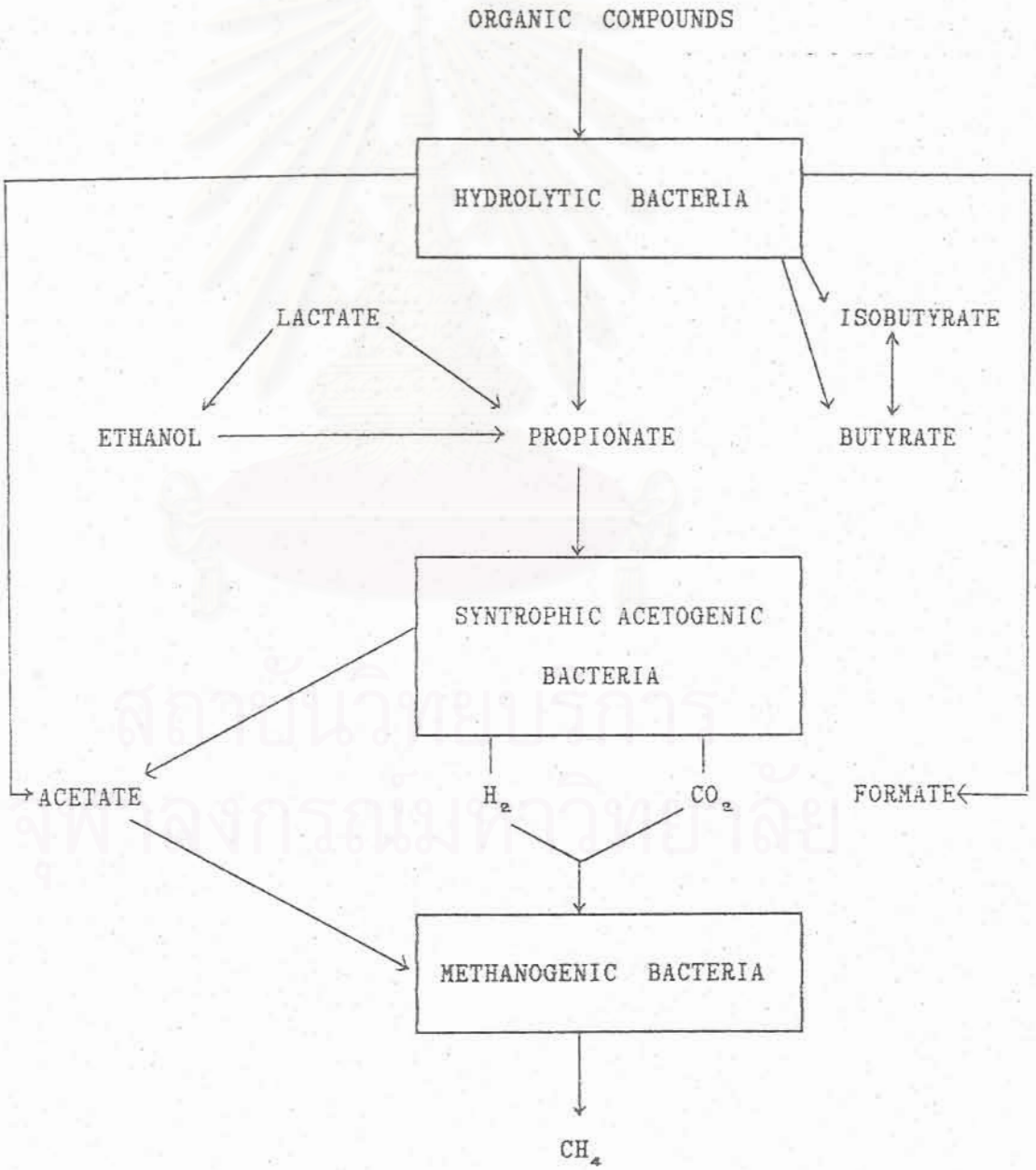
ตารางที่ 1.2 การจำแนกเมธาโนเจนเป็นorderโดยอาศัยสมบัติทางรูปร่างและการใช้ซับสเทรต (Jain และคณะ, 1991)

ORDER	ลักษณะทางรูปร่าง	ซับสเทรตที่ใช้
METHANOBACTERIALES	รูปแท่งหรือแลนเซท	H_2-CO_2 , FORMATE
METHANOCOCCALES	รูปกลม	H_2-CO_2 , FORMATE
METHANOMICROBIALES	ซาร์ซินาหรือรูปกลมหรือรูปแท่งที่มีเปลือกหุ้ม	METHANOL , METHYLAMINES H_2-CO_2 , FORMATE

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในกระบวนการผลิตแก๊สมีเธนจากน้ำทิ้งนั้น นอกจากต้องการเมธาโนเจนแล้ว ยังต้องการแบคทีเรียอีก2กลุ่มคือ ไฮโดรไลติคแบคทีเรีย และอะซิโตเจน ซึ่งทำงานร่วมกันในวัฏจักรห่วงโซ่อาหาร ดังรูปที่ 1.2 (Jain และคณะ, 1990) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนและเมธาโนเจนที่อยู่ด้วยกันแบบพึ่งพาอาศัย โดยการให้และรับสารบางตัวเพื่อสนับสนุนการเจริญของกันและกัน

รูปที่ 1.2 การย่อยสลายสารเชิงซ้อนโดยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรีย 3 กลุ่ม (Jain และคณะ, 1990)



จากรูป 1.2 จะเห็นว่าในการย่อยสลายสารอินทรีย์เริ่มต้นโดยการทำงานของไฮโดรไลติคแบคทีเรียเพื่อให้เกิดซับสเทรตสำหรับอะซิโตเจน เมื่ออะซิโตเจนนำไปใช้จะเกิดซับสเทรตสำหรับเมธาโนเจนที่จะนำไปใช้ในการสร้างแก๊สมีเธน ซึ่งลำดับของปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกันในการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ซับซ้อนเป็นมีเธน (ยกเว้นการHydrolysis) อธิบายได้ในเทอมของ Interdependent Hydrogen Transfer (IHT) คือการที่แบคทีเรียพึ่งพาอาศัยกันโดยการให้และรับ H_2 ซึ่งH_2ที่เกิดต้องถูกใช้ทันทีเพราะถ้าเกิดการสะสมจะเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาIHT ทำให้ปฏิกิริยาควบคู่บางปฏิกิริยาที่เกิดยากเกิดได้ง่ายขึ้น

$$2\ CH_3CH_2OH + 2\ H_2O \longrightarrow 4\ H_2 + 2\ CH_3COO^- + 2\ H^+$$

+19.2 KJ/Reaction (Zeikus และ Thiele, 1988)

พบว่าปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดไม่ได้โดยตัวเอง แต่หากไฮโดรเจนที่เกิดถูกดึงไปใช้โดยเมธาโนเจน ดังสมการ

$$4\ H_2 + HCO_3^- + H^+ \longrightarrow CH_4 + 3H_2O$$

-135.6 KJ/Reaction (Zeikus และ Thiele, 1988)

พบว่าปฏิกิริยาทั้งคู่จะเกิดได้ดีนั่นคือ IHT จัดเป็นกระบวนการที่เกิดระหว่างกลุ่มของแบคทีเรียและให้ประโยชน์ในการอยู่ร่วมกัน เพราะพบว่าถ้าเกิดกระบวนการ IHT ในระบบแล้ว จะมีความดันบางส่วนของแก๊สไฮโดรเจน (Hydrogen Partial Pressure) ต่ำมาก ซึ่งเป็นประโยชน์ในการผลักดันบางปฏิกิริยาที่เกิดยากจากการถูกยับยั้งโดย High Pressure of H_2 ให้เกิดได้ง่ายขึ้น โดยไฮโดรเจนที่เกิดจะถูกเมธาโนเจนดึงไปใช้อย่างรวดเร็ว จากแนวความคิดดังกล่าว ทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการศึกษาแบคทีเรียบางกลุ่มเช่น เมธาโนเจน อะซิโตเจนในกากตะกอน โดยใช้พื้นฐานความรู้ทางจุลชีววิทยาโดยการใช้ซับสเทรตเฉพาะชนิดต่างๆเพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับนำมาทำกากตะกอนที่มีส่วนประกอบของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆในปริมาณที่พอเหมาะ ในการนำไปใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียให้ได้ผลดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันปัญหาน้ำเสียเป็นปัญหาที่ถูกนำมาพิจารณาทั้งในภาครัฐและเอกชน ในปี 2534 ภาครัฐบาลได้ออกสำรวจเพื่อตรวจค่า BOD และCOD ของน้ำทิ้งจากโรงงานต่างๆ และวางโทษแก่หน่วยงานที่ไม่ปฏิบัติตามพ.ร.บ.ที่กำหนดอย่างเคร่งครัด ในขณะเดียวกัน

ภาคเอกชนได้เล็งเห็นความสำคัญ และลงทุนสร้างหน่วยบำบัดน้ำเสียจากโรงงานก่อนจะปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ ระบบบำบัดที่มักใช้ควบคู่กันได้แก่ระบบที่ใช้อากาศและระบบที่ไม่ใช้อากาศ

ในช่วง 10 ปีที่แล้ว การศึกษาระบบบำบัดที่ไม่ใช้อากาศได้รับความสนใจมากในการที่จะนำมาใช้บำบัดน้ำเสียที่ได้จากโรงงานต่างๆ เพราะระบบดังกล่าวนี้ไม่เพียงแต่จะสะดวกในการลดมลภาวะที่เกิดจากสารอินทรีย์ซับซ้อน แต่ยังให้แก๊สมีเธนซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อีก กระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้อากาศโดยกลุ่มก้อนของแบคทีเรียนั้นยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างชัดแจ้ง ทราบแต่เพียงว่าสามารถปฏิบัติโดยการถ่ายกากตะกอนจากบ่อพักเดิม ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของกลุ่มแบคทีเรียภายในกากตะกอนเกิดไม่สมบูรณ์ ในปัจจุบันได้มีการศึกษาโดยใช้ความรู้พื้นฐานทางจุลชีววิทยา โดยการสำรวจสรีรวิทยาเชิงนิเวศน์ของกากตะกอนจาก Anaerobic Digestor หลายแห่ง โดยมีการเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ เพื่อให้ได้กากตะกอนที่มีส่วนประกอบของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆอย่างเหมาะสม เพื่อนำไปใช้บำบัดน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพดีและมีการผลิตแก๊สมีเธนในปริมาณที่สูง

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาทางด้านนี้ในประเทศไทยอย่างจริงจังเพราะผู้ที่จะทำงานวิจัยในด้านนี้จะต้องได้รับการฝึกเทคนิคการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ใช้อากาศ โดยเฉพาะองค์ประกอบของแบคทีเรียในกากตะกอนซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Strictly Anaerobic Bacteria ที่มีความไวต่อออกซิเจนมาก จากประสบการณ์การปฏิบัติการด้านนี้โดยตรง จึงทำให้มีความสนใจที่จะสำรวจชนิด และปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆจากกากตะกอนที่ได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมนม เพื่อนำผลมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงกากตะกอนในระดับหลอดทดลอง เพื่อเป็นแนวทางในการขยายขนาดต่อไป

<u>แหล่งตัวอย่าง</u>

กากตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตภัณฑ์นม

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อสำรวจชนิดและปริมาณแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนและเมธาโนเจนจากกากตะกอนที่ได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมนม

2. เพื่อปรับปรุงคุณภาพของกากตะกอนที่จะนำไปใช้ในงานบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยจะเป็นระดับพื้นฐานเพื่อเข้าใจถึงสรีรวิทยาเชิงนิเวศน์ของแบคทีเรียในกากตะกอนบางตัว เพื่อนำไปปรับปรุงใช้ในระดับอุตสาหกรรมโดย

1. ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกากตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตภัณฑ์นมโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2. ศึกษาผลของซับสเทรตชนิดต่างๆทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็งที่มีผลต่อการเจริญเติบโต , ปริมาณที่นับได้ และการผลิตแก๊สมีเธน

3. คัดเลือกและแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซับสเทรตชนิดต่างๆ

4. ศึกษาและเปรียบเทียบอัตราส่วนต่างๆของกลุ่มเชื้อที่สามารถผลิตแก๊สมีเธนได้มากที่สุด

วิธีวิจัย

1. การเตรียมอุปกรณ์การทดลองแบบ Anaerobic System

ก. นำกากตะกอนไปเตรียมเพื่อทำ SEM และ TEM

ข. การหาปริมาณที่นับได้โดยวิธีของฮังเกต และแยกชนิดเชื้อตามความต้องการซับสเทรต เพื่อให้ได้แบคทีเรียบริสุทธิ์

ค. การวัดปริมาณแก๊สมีเธนจากหลอดทดลองที่เพาะด้วยกากตะกอนในสภาวะที่มีซับสเทรตของเมธาโนเจนชนิดต่างๆกัน

2. การศึกษาปัจจัยที่ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณแก๊สมีเธนในระดับหลอดทดลองดังนี้

ก. ผลของซับสเทรตชนิดต่างๆ

ข. ผลของอัตราส่วนของแบคทีเรียชนิดต่างๆที่นำมาเตรียมกากตะกอน

ค. ผลของเวลา อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่าง

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ในปัจจุบันการใช้พลังงานจากแหล่งต่างๆ มีปริมาณมาก จากรายงานของ Stafford และคณะ (1980) พบว่าปริมาณที่ใช้ในแต่ละปีโดยประชากรโลกมีค่าสูง ดังตารางที่ 2.1 และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นจึงจำเป็นต้องมีการหาแหล่งพลังงานใหม่ขึ้นมาชดเชย โดยเฉพาะควรเป็นแหล่งพลังงานที่สะอาดและก่อให้เกิดปัญหาทางด้านมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด

ตารางที่ 2.1 ปริมาณพลังงานที่ใช้ในแต่ละปีโดยประชากรโลก (Stafford และคณะ, 1980)

แหล่งพลังงาน	ชนิด	ปริมาณ($MJx10^{12}$)
Fossils Fuels	น้ำมัน	120.5
	แก๊สธรรมชาติ	47.7
	เชื้อเพลิงแข็ง	81.2
Renewable Fuels	พลังงานน้ำ	15.5
	พลังงานเชื้อเพลิง	12.0
	พลังงานนิวเคลียร์	4.2

แหล่งพลังงานหนึ่งที่น่าสนใจในขณะนี้ คือแก๊สมีเธนซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่ได้อย่างต่อเนื่องจากระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศขณะย่อยสลายสารอินทรีย์เชิงซ้อน แก๊สดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มาก ดังแสดงในตารางที่ 2.2 (Merrill และ Merrill, 1973)

ตารางที่ 2.2 การนำแก๊สมีเธนไปใช้ในกิจกรรมชนิดต่างๆ (Merrill และ Merrill, 1973)

การนำไปใช้	ลูกบาศ์กฟุต	อัตราใช้
ให้แสงสว่าง	2.5	PER MANTLE PER HOUR
ประกอบอาหาร	12-15	PER PERSON PER DAY
เครื่องบ่ม	0.5-0.7	$Ft^3/Hr/Ft^3$ Incubator
ให้ความเย็นในตู้เย็น	1.2	$Ft^3/Hr/Ft^3$ Refrigerator
ใช้แทนแก๊ส	135-160	PER GALLON
ใช้แทนน้ำมันดีเซล	150-188	PER GALLON

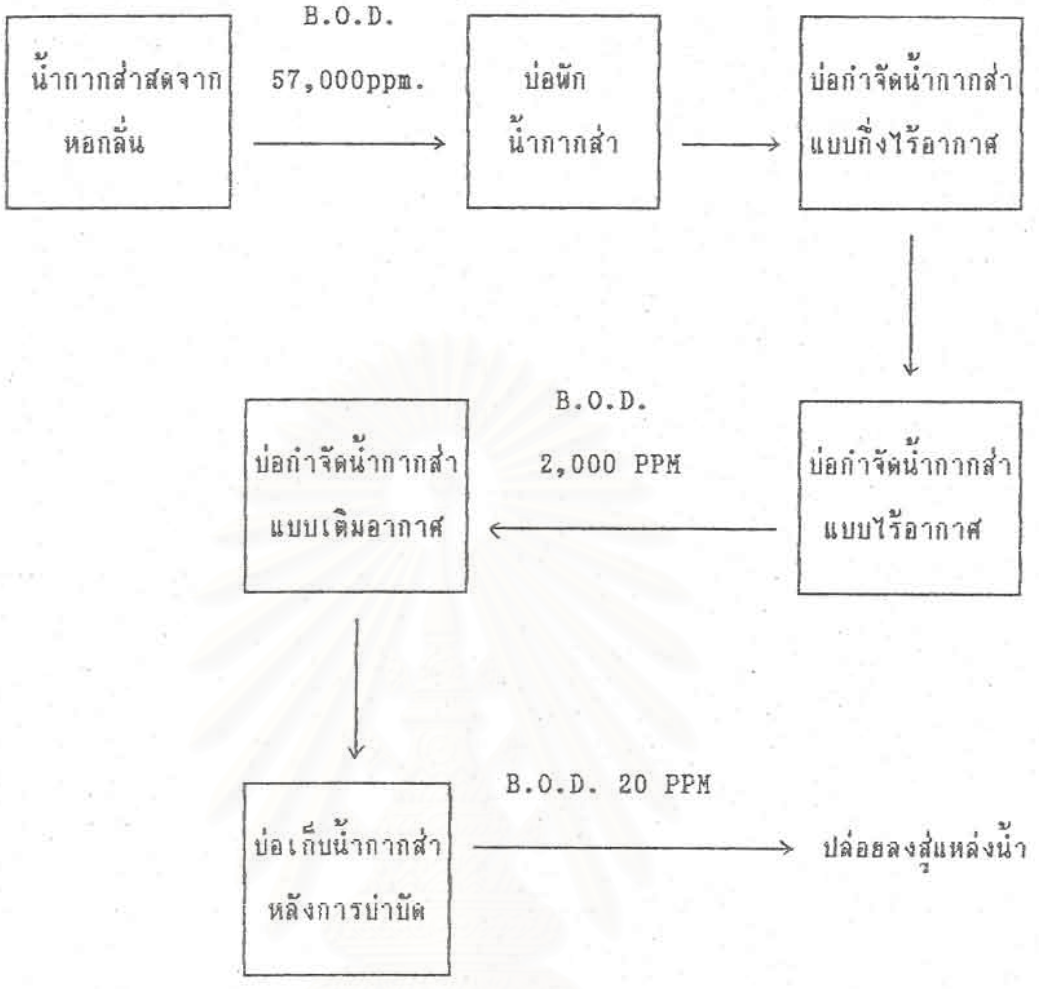
นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้แก๊สมีเธนกับเครื่องยนต์เป็นการยืดอายุการใช้งาน อันเนื่องมาจากการเผาไหม้ที่สะอาด จึงไม่มีเขม่าและไม่มีสิ่งสกปรกเหลือภายหลังการเผาไหม้ จึงเป็นผลดีอีกทางในการลดมลภาวะของสิ่งแวดล้อม นอกเหนือจากการพบว่าระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ สามารถลดค่าบี.โอ.ดี.ของน้ำเสียที่เกิดจากการหมัก (Fermentation Wastes) ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น (Stafford และคณะ, 1980) (ตารางที่ 2.3) และระบบนี้เป็นระบบที่ดีในการบำบัดน้ำเสียที่มีค่าบี.โอ.ดี.สูงมาก และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเหมาะกับประเทศไทย ซึ่งอุณหภูมิอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการทำงานของจุลินทรีย์

ตารางที่ 2.3 ประสิทธิภาพในการลดค่า บี.โอ.ดี.ของน้ำเสียที่เกิดจากการหมัก (Fermentation Wastes)โดยกระบวนการบำบัดแบบต่างๆ(Stafford และคณะ, 1980)

ชนิดของการบำบัด	%การลดของค่าบี.โอ.ดี.
กระบวนการบำบัดทางเคมี	10
อิเลคโตรไดอะไลซิส	28
กระบวนการกากตะกอนเร่ง	30
กระบวนการลานกรองจุลินทรีย์	72
กระบวนการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ	83

แต่อย่างไรก็ตาม ภายหลังระบบบำบัดนี้ น้ำเสียยังต้องผ่านเข้าสู่ระบบบำบัดแบบอื่นอีก ดังที่รายงานโดยสุจินต์ พนาปาวุฒิกุล (2527) ถึงการใช้ระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศที่ใช้เป็นการบำบัดแบบปฐมภูมิ (Primary Treatment) ในการบำบัดน้ำกากส่าที่โรงงานสุราไทยท้า จังหวัดนนทบุรี โดยสามารถลดค่าบี.โอ.ดี.ลงได้ 80% และเกิดแก๊สมีเธนประมาณ 15-20ลูกบาศ์กเมตร ก่อนที่จะเข้าสู่ระบบบำบัดแบบอื่น เพื่อให้ค่าบี.โอ.ดี.ของน้ำทิ้งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของกระทรวงอุตสาหกรรม คือ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์ (2528) รายงานถึงระบบกำจัดน้ำกากส่าของโรงงานสุราแสงโสม จังหวัดนครปฐม ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ซึ่งต้องผ่านกระบวนการบำบัดทั้งแบบที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศจึงสามารถปล่อยลงสู่แหล่งน้ำได้



รูปที่ 2.1 ระบบกำจัดน้ำกากส่าของโรงงานสุราแสงโสม จังหวัดนครปฐม
(สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2528)

ในปี 2526 จันทรา ทองคำเภา และวรรณี พฤฒิถาวร ได้รายงานถึงการบำบัดน้ำเสีย จากโรงงานเส้นหมี่ชอเฮง จังหวัดนครปฐม โดยระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ พบว่าค่าบี.โอ.ดี.ของน้ำเสียที่ออกจากโรงงานก่อนเข้าสู่ระบบบำบัดมีค่าสูงถึง 3,000 PPM ต่อเมื่อเข้าสู่ระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศแล้วจะลดค่าบี.โอ.ดี.ลงเหลือ 500 PPM และเหลือเพียง 20-30 PPM เมื่อเข้าสู่ระบบบำบัดแบบใช้อากาศ ซึ่งการที่ของเสียต้องผ่านระบบบำบัดแบบอื่นภายหลังระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ เพราะว่ากากตะกอนมีองค์ประกอบของจุลินทรีย์ไม่เหมาะสม เพราะฉะนั้นจึงต้องมีการศึกษาและทำความเข้าใจเกี่ยวกับแบคทีเรียแต่ละกลุ่มในกากตะกอนรวมถึงความสัมพันธ์ของมันเพราะถ้าเกิดการยับยั้งหรือกำจัดแบคทีเรียกลุ่มใด จะทำให้การผลิตแก๊สมีเธนน้อยลงหรือ

ไม่เกิดเลย

จากการศึกษาของ Conrad และคณะ (1985) พบว่าแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนซึ่งเป็นกลุ่มที่สร้างแก๊สไฮโดรเจน และเมธาโนเจนซึ่งเป็นกลุ่มที่ใช้แก๊สไฮโดรเจนอยู่ชิดกันมากในกากตะกอน เพื่อประโยชน์ในการถ่ายทอดสารสำคัญที่เป็นผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม ต่อมาในปี 1988 Thiele และคณะ ได้ทำการศึกษาและพบว่าการแลกเปลี่ยนแก๊สไฮโดรเจนระหว่างแบคทีเรียสองกลุ่มนั้นเกิดภายในกากตะกอน ดังนั้นการที่แบคทีเรียสองกลุ่มอยู่ชิดกันจะทำให้การเปลี่ยนสารอินทรีย์ซับซ้อนไปเป็นแก๊สมีเธนเกิดได้สูงสุด และเป็นการเลี่ยงการจำกัดการถ่ายทอดสารระหว่างกันด้วย

แบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนนั้น เป็นกลุ่มสำคัญในการเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้เป็นซับสเทรตของเมธาโนเจน แต่จะเจริญได้น้อยมากถ้าเลี้ยงในลักษณะเชื้อบริสุทธิ์ เพราะแก๊สไฮโดรเจนที่เกิดจากการย่อยสลายซับสเทรต จะเป็นตัวจำกัดการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ดังนั้นการนำเอาแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนไปเลี้ยงกับแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ไฮโดรเจน เช่นเมธาโนเจน จะทำให้อะซิโตเจนเจริญได้มากขณะเดียวกันก็ย่อยสลายซับสเทรตให้เมธาโนเจนได้มากด้วย นั่นคือความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียสองกลุ่มในแง่การพึ่งพาอาศัยกันนี้สำคัญมากในการควบคุมการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำทิ้ง และกระบวนการเกิดแก๊สมีเธนของระบบ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีการศึกษาเพื่อทำความเข้าใจถึงสรีรวิทยาเชิงนิเวศน์เบื้องต้นของเชื้อจุลินทรีย์จากกากตะกอนของโรงงานอุตสาหกรรมนม และนำข้อมูลที่ได้มาปรับปรุงกากตะกอนให้มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ และเกิดแก๊สมีเธนในปริมาณสูง โดยแปรผันอุณหภูมิ ชนิด และความเข้มข้นของซับสเทรต รวมถึงอัตราส่วนของอะซิโตเจนและเมธาโนเจนในปริมาณที่พอเหมาะ พบว่าสาเหตุที่กากตะกอนที่ปรับปรุงคุณภาพแล้วมีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ และเกิดแก๊สมีเธนสูงกว่าเป็นเพราะชนิดของแบคทีเรียต่างกัน บางชนิดหายไป บางชนิดเกิดขึ้นแทนที่ (Bhatnagar และคณะ, 1991) แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบชนิดของแบคทีเรียในกากตะกอนและกากตะกอนที่ได้รับการปรับปรุงแล้ว (Bhatnagar และคณะ, 1991) โดย +++ แสดงถึงการมีแบคทีเรียชนิดนั้นๆในปริมาณมาก + แสดงถึงการมีแบคทีเรียชนิดนั้นๆ และ - คือการไม่มีแบคทีเรียชนิดนั้นๆ

ชนิดของแบคทีเรีย	กากตะกอน	กากตะกอนที่ปรับปรุงคุณภาพ
1.Hydrolytic- fermentative	+++	+
2.Syntrophic Acetogens		
Butyrate degraders		
Syntrophomonas sp.	+	-
Sporeforming strain BH	-	+
Non-sporeforming strain IB	-	+
Propionate degraders		
Synthrophobacter sp.	+	-
Sporeforming strain PT	-	+
Non-sporeforming strain PW	-	+
3.Methanogens		
Acetotrophic		
Methanothrix soehngenii	+	-
Methanothrix-like	-	+
Methanosarcina barkeri	+	-
H_2-CO_2 utilizing		
Methanobrevibacter	+	-
Methanobacterium formicicum	-	+
Methanospirillum hungatei	+	+

เมื่อได้กากตะกอนที่เหมาะสมแล้ว อาจมีการศึกษาต่อไปโดยการเติมเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีสมบัติต่างๆ เช่นการย่อยสลายสารพิเศษบางตัว เพื่อให้การบำบัดน้ำเสียมีประสิทธิภาพดีเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในปัจจุบัน

ถึงแม้ว่าปริมาณมีเธนที่เกิดจากกระบวนการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศจะมีค่า 1-5% ของพลังงานที่ต้องการใช้ในประเทศที่พัฒนา (Stafford และคณะ, 1980) แต่ก็ยังมีการใช้เฉพาะในท้องถิ่นที่โรงงานตั้งอยู่เท่านั้น เพราะมีข้อจำกัดในเรื่องของการเก็บรักษาและการใช้ความดันอัดให้แก๊สกลายเป็นของเหลว ซึ่งทำให้ค่าใช้จ่ายในการลงทุนสูงมาก ทำให้มีผู้สนใจในการผลิตมีเธนจากกระบวนการดังกล่าวน้อยเมื่อยังมีแหล่งพลังงานอื่นให้เลือกในราคาที่ไม่สูงมาก แต่ในความเป็นจริงระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศจัดเป็นระบบที่มีประโยชน์มาก เพราะไม่ว่าจะเป็นระบบบำบัดไม่ใช้อากาศแบบใดก็ตาม ก็เป็นวิธีการที่ใช้ค่าใช้จ่ายต่ำกว่าระบบบำบัดแบบใช้อากาศในการกำจัดสารอินทรีย์จากน้ำเสีย (Sumaeth Chavadej, 1990) เนื่องมาจากเครื่องปฏิกรณ์มีราคาไม่สูงมาก และการทำงานของเครื่องไม่ต้องการพลังงานคุณภาพสูงเหมือนในระบบบำบัดที่ใช้อากาศ นอกจากนี้ในระบบของมันยังไม่ต้องการการกวนที่ใช้พลังงานจากภายนอกแต่ใช้ฟองแก๊สชีวภาพที่เกิดและเคลื่อนที่ขึ้นสู่ด้านบนเป็นตัวทำให้เกิดการผสมกันระหว่างน้ำเสียและกากตะกอนอย่างทั่วถึง การที่ใช้ฟองแก๊สในการกวนนี้ยังมีประโยชน์คือไม่ไปทำลายกระบวนการเกิดกากตะกอนที่เกิดขึ้นภายใน อันเป็นผลโดยตรงกับประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย

สำหรับประเทศไทยใช้ระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศกันมาก เพื่อบำบัดน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์สูงมากๆ กล่าวคือระบบของเสียที่มี ค่าบี.โอ.ดี.เกิน 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 2.5 (Sumaeth Chavadej, 1990) จะต้องผ่านกระบวนการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศก่อนที่จะผ่านเข้ากระบวนการบำบัดแบบอื่นต่อไป

ตารางที่ 2.5 ค่าบี.โอ.ดี.ของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ (Sumaeth Chavadej, 1990)

น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ	ค่าบี.โอ.ดี.(mg/lit)
โรงต้มกลั่น	35,000-40,000
การผลิตแอลกอฮอล์	35,000
น้ำตาล	200-3,800
น้ำมันปาล์ม	6,700-27,700
น้ำมันพืช	2,000-14,000
ยางธรรมชาติ	240-5,800
ผงชูรส	100,000
อาหารกระป๋อง	560-3,500
ไอสครีม	220-4,000
อาหารทะเลแช่แข็ง	430-2,100
โรงฆ่าสัตว์และเนื้อแช่แข็ง	450-900
ยีสต์	500-5,500
กระดาษและเยื่อกระดาษ	400-10,000

นอกจากนี้การที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม จึงมีของเสียเหลือทิ้งประเภทเซลลูโลส (Cellulosic Materials) เป็นจำนวนมากในแต่ละปี ดังตารางที่ 2.6 (Stafford และคณะ, 1980) ดังนั้นถ้าระบบการย่อยสลายของเสียเหล่านี้เกิดควบคู่ไปกับการเกิดผลิตแก๊สมีเธนก็จะเป็นประโยชน์ต่อประเทศเป็นอันมาก

ตารางที่ 2.6 ของเหลือทิ้งประเภทเซลลูโลสที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตแก๊สมีเธน (Stafford และคณะ, 1980)

วัสดุที่ใช้	$\%CH_4$	$\%H_2$	$\%CO_2$
กระดาษกรอง	81.9	14.5	3.5
กระดาษหนังสือพิมพ์	88.8	4.4	6.8
กระดาษจดหมาย	78.6	12.6	8.7
เปลือกกล้วย	80.6	3.1	7.4
ต้นกล้วย	87.0	5.4	7.5

Merrill และ Merrill (1973) ยังแสดงให้เห็นถึงการนำเอากากตะกอนที่ได้ภายหลังบำบัดไปใช้ประโยชน์ดังนี้

1. ใช้เป็นปุ๋ย เพราะกากตะกอนที่ผ่านการบำบัดแล้ว มีธาตุไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมเป็นส่วนมาก

2. ใช้ในการปรับปรุงสภาวะของดิน เพราะกากตะกอนจะช่วยให้ดินเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำ และปรับปรุงโครงสร้างของดิน

3. Sludge Hydroponics คือการปลูกพืชโดยตรงในสารละลายของอาหาร ซึ่งในที่นี้จะใช้ Digested Sludge และ Effluent ที่ออกจากเครื่องปฏิกรณ์

4. Sludge-Algae-Fish (Aquaculture) โดยการใส่กากตะกอนที่ผ่านการบำบัดแล้วลงบ่อ เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่ายซึ่งใช้เป็นอาหารของปลา

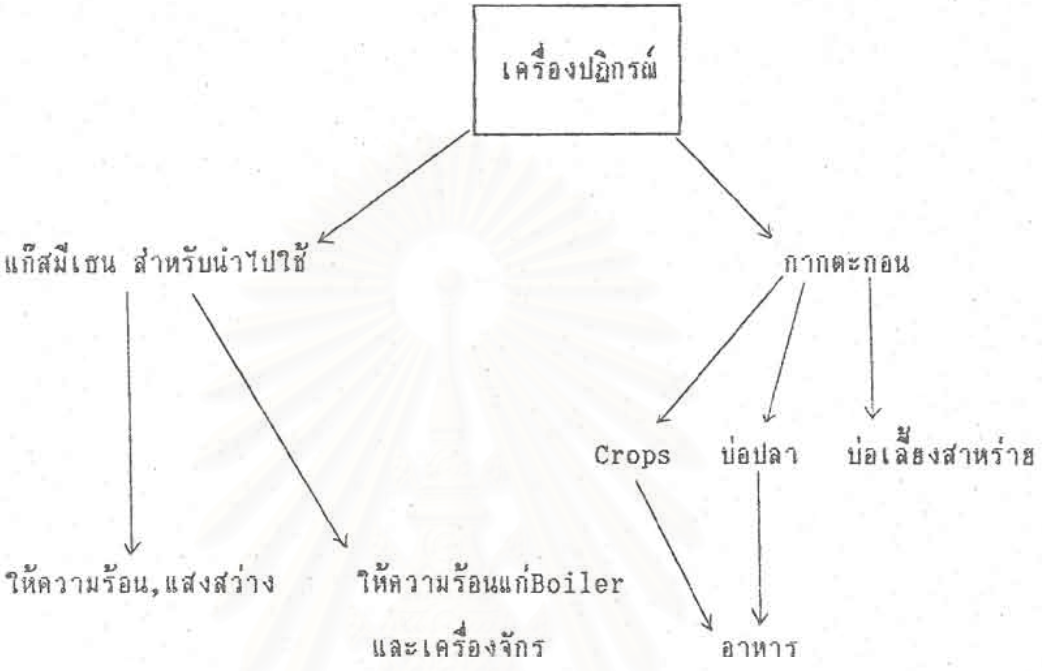
5. Sludge-Algae-Methane โดยการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวใน Diluted Sludge เมื่อเติบโตเต็มที่ก็เก็บเกี่ยว นำมาทำให้แห้ง และเข้าสู่เครื่องปฏิกรณ์เพื่อผลิตแก๊สมีเธน

นอกจากประโยชน์ดังกล่าว ยังสามารถนำกากตะกอนที่ผ่านการบำบัดแล้ว มาใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดในปริมาณสูง ดังตารางที่ 2.7 (Stafford และคณะ, 1980)

ตารางที่ 2.7 เปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดอะมิโน(มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)ในน้ำเสียและในกากตะกอนที่ผ่านกระบวนการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ (Stafford และคณะ, 1980)

ชนิดของกรดอะมิโน	Sewage effluent	Sewage sludge
Cystine	3.9	4.2
Lysine-Histidine	5.5	22.4
Arginine	6.7	14.6
Serine-Glycine-Aspartic	18.3	31.6
Threonine-Glutamic	9.5	40.1
Alanine	7.0	23.4
Tyrosine	3.5	10.8
Methionine-Valine	15.1	27.8
Phenylalanine	11.1	26.5
Leucine	10.7	29.9
Total	91.3	231.3

จึงเห็นได้ว่ากระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศทำให้เกิดพลังงานและการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า แสดงดังรูปที่ 2.2 (Merrill และ Merrill, 1973)



รูปที่ 2.2 ประโยชน์ของผลพลอยได้ที่เกิดจากการใช้ระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ (Merrill and Merrill, 1973)

เมื่อพิจารณาถึงสมบัติของแก๊สมีเธน เมื่อเปรียบเทียบกับแก๊สเชื้อเพลิงอื่นดังตารางที่2.8 (Merrill และ Merrill, 1973) แล้วพบว่ามีเธนมีค่าพลังงานที่สูงกว่าแก๊สที่เกิดจากถ่านหิน (Coal gas) และให้ค่าความร้อนที่สูงพอประมาณ อีกทั้งยังเป็นแหล่งพลังงานที่เป็นผลพลอยได้ จึงกล่าวได้ว่าระบบบำบัดที่ไม่ใช้อากาศนั้นเป็นระบบที่น่าสนใจในการนำมาใช้

ตารางที่ 2.8 ค่าความร้อนของแก๊สเชื้อเพลิงต่างๆ (Merrill and Merrill, 1973)

ชนิดของแก๊สเชื้อเพลิง	ค่าความร้อน (บี.ที.ยู./ลูกบาศก์ฟุต)
แก๊สจากถ่านหิน	450-500
แก๊สชีวภาพ	540-700
แก๊สมีเธน	896-1,069
แก๊สธรรมชาติ	1,050-2,200
แก๊สโพรเพน	2,200-2,600
แก๊สบิวเทน	2,900-3,400

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch&Lomb, USA

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น ϕ70 ของบริษัท Beckman, USA

เครื่องบ่ม อุณหภูมิ 37°C และ 55°C ของบริษัท Memmert, เยอรมันตะวันตก

Vortex Mixer

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี Hewlett Packard Series 2

กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงฟลูออเรสเซนต์ติด รุ่น Labophot 2 ของบริษัท NIKON ประเทศญี่ปุ่น

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจากกากตะกอน

หลอดฉีดยาขนาด 1มิลลิลิตร, 15มิลลิลิตร และ 20 มิลลิลิตร

เข็มเบอร์ 18 และ 23

หลอดฉีดยาเก็บความดันขนาด 1 มิลลิลิตร

ขวดทนความดันขนาด 60 มิลลิลิตร สำหรับเก็บเชื้อบริสุทธิ์

หลอดแก้วทนความดันขนาด 20 มิลลิลิตร สำหรับเลี้ยงเชื้อ

จุกยาง, ฝาอลูมิเนียม และที่ปิดฝาอลูมิเนียม แสดงดังรูปที่ 3.1

แก๊สไนโตรเจนที่ปราศจากออกซิเจน (OFN) ของบริษัท TIG

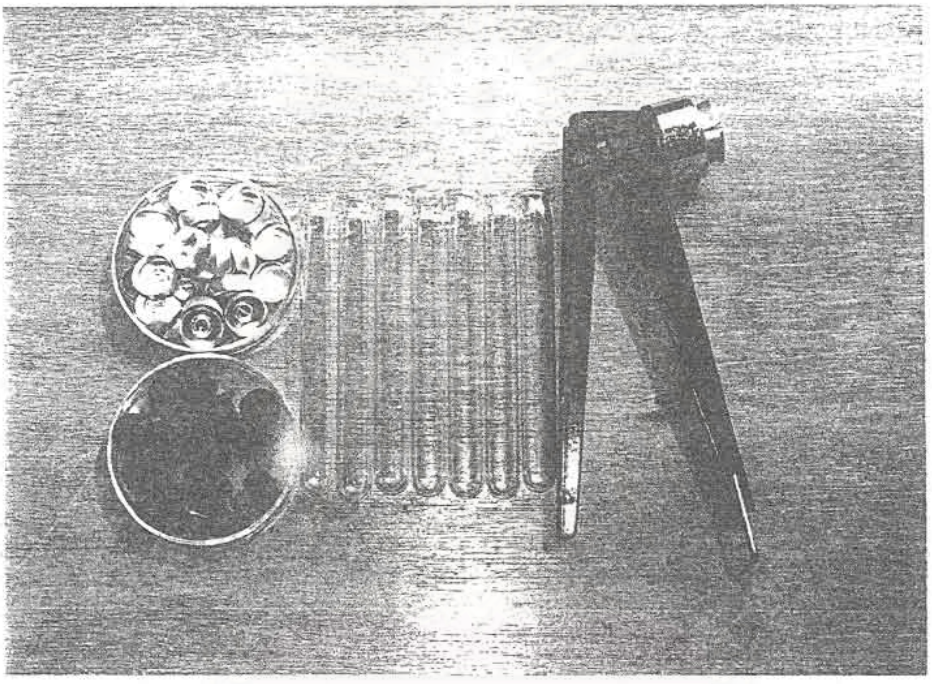
แก๊สไฮโดรเจนะคาร์บอนไดออกไซด์ในอัตราส่วน 80:20 ของบริษัท TIG

ท่อทองแดงสำหรับดูดแก๊สออกซิเจน แสดงดังรูป 3.2 และ 3.3 โดยมีวิธีเตรียมดังภาคผนวก ข หน้า 97

เครื่องเคลือบวุ้นโดยเทคนิคของฮังเกต (Hungate, 1969) แสดงดังรูป 3.4 (เครื่องนี้ช่วยในการเคลือบวุ้นเข้ากับผิวด้านในของหลอดทดลอง โดยความหนาของวุ้นสม่ำเสมอทั้งหลอด ใช้เลี้ยงเชื้อโดยหลักการเดียวกับการ Pour Plate)

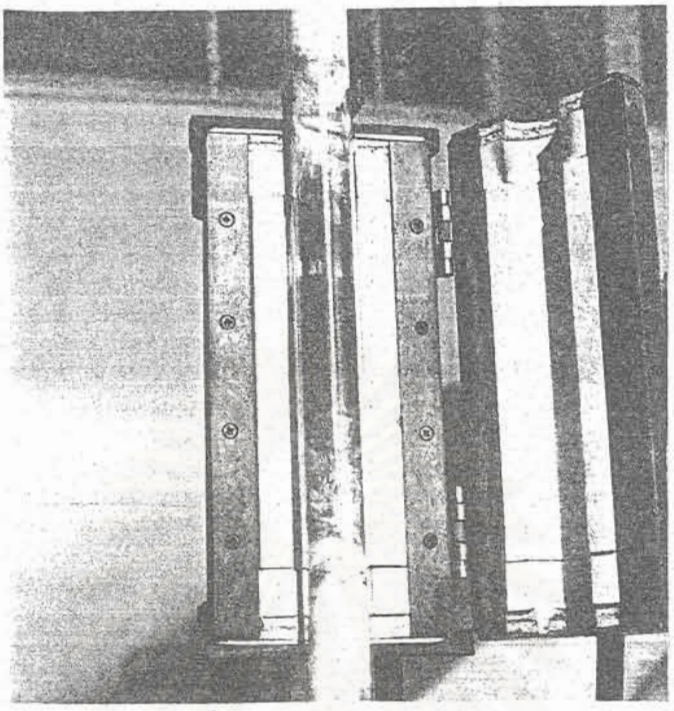
อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงดังรูปที่ 3.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

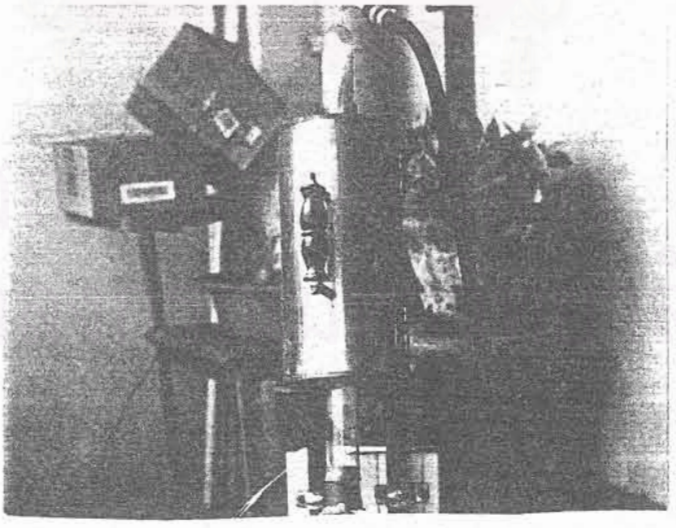


รูปที่ 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำหลอดเลี้ยงเชื้อแบบไร้อากาศ

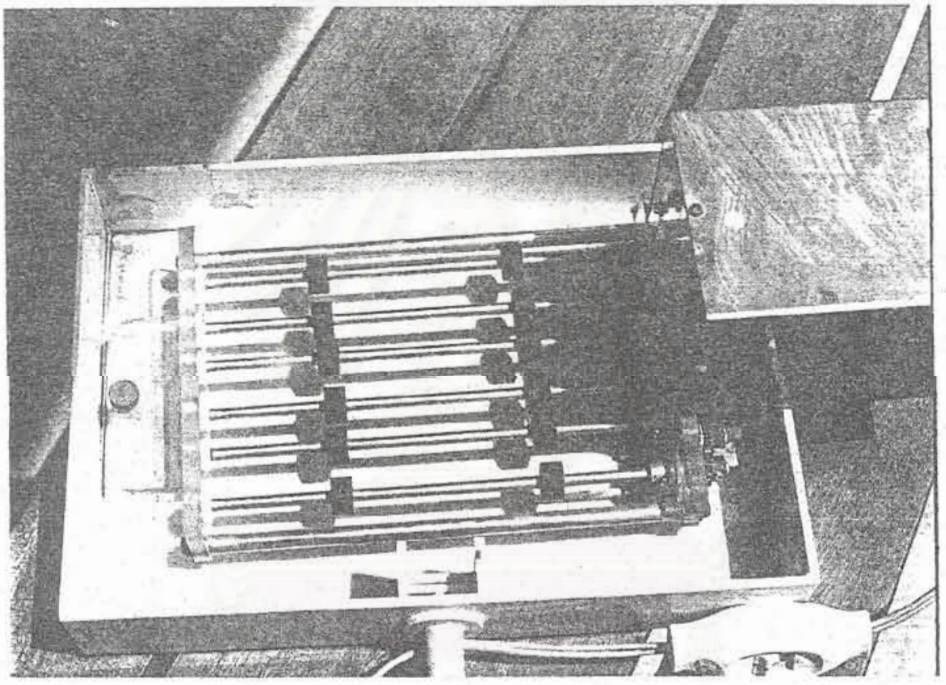
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



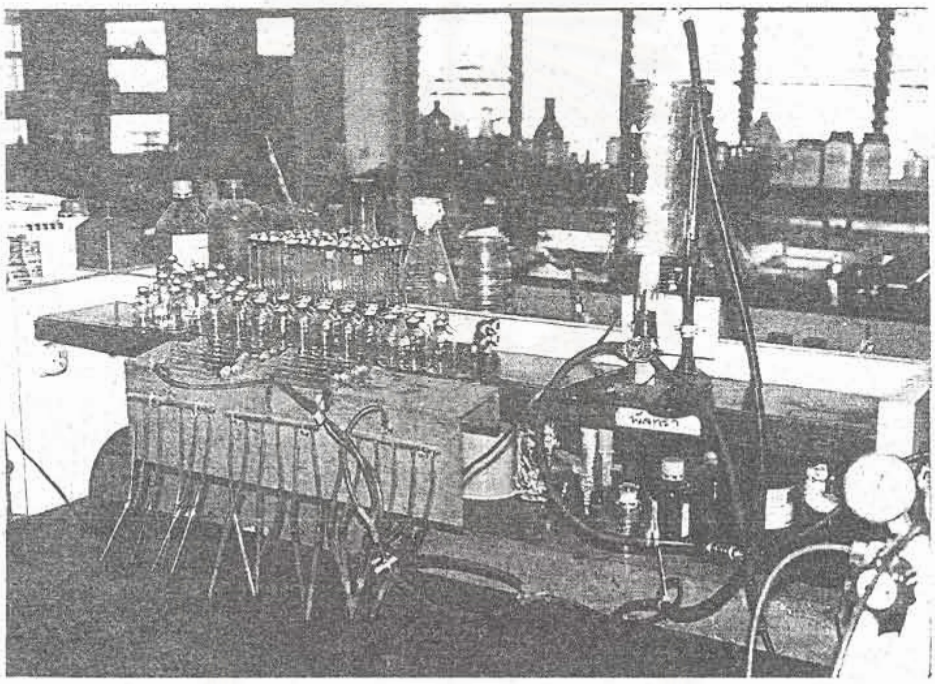
รูปที่ 3.2 ลักษณะภายในของท่อทองแดงสำหรับดูดออกซิเจนซึ่งใช้ในกระบวนการทำหลอดเลี้ยงเชื้อแบบไร้อากาศ



รูปที่ 3.3 ลักษณะภายนอกของท่อทองแดงสำหรับดูดออกซิเจนซึ่งใช้ในกระบวนการทำหลอดเลี้ยงเชื้อแบบไร้อากาศ



รูปที่ 3.4 เครื่องเคลือบวุ้นเข้ากับผิวด้านในของหลอดทดลองของฮังเกต



รูปที่ 3.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

นำตัวอย่างกากตะกอน ที่ได้จากเครื่องปฏิกรณ์ในการบำบัดน้ำเสียแบบ UASB (Upflow Anerobic Sludge Blanket) ของโรงงานอุตสาหกรรมนมในประเทศญี่ปุ่น ที่บรรจุในขวดทนความดันที่มีแก๊สไฮโดรเจนะคาร์บอนไดออกไซด์ (80:20) และมีการตรวจพบแก๊สมีเธนเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 15วัน ในสภาพที่มีการเติมสารละลายรีดิวซ์ 0.1-0.2 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ลักษณะเป็นเม็ดกลมสีขาวครีม (รูปที่ 3.6) ก่อนนำมาใช้ต้องไปเขย่าอย่างแรงบนวอร์เทกซ์มิกเซอร์ จนเปลือกสีขาวหลุดออก จะได้เชื้อภายในสีดำซึ่งเป็นเชื้อผสมของแบคทีเรียหลายกลุ่มและทำการเขย่าต่อจนกว่าเชื้อที่ได้จะกระจายอย่างสม่ำเสมอ

ใช้เข็มเบอร์ 18 ดูดสารละลายกากตะกอน มาถ่ายลงหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ก่อนนำมาใช้

3.4 การหาปริมาณที่นับได้ของแบคทีเรียในกากตะกอน(Hungate, 1969)

นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เตรียมไว้ ไปหลอมที่อุณหภูมิ 100° C เมื่อวุ้นละลาย นำมาเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.03 มิลลิลิตร, สารรีดิวซ์ 0.03 มิลลิลิตร, สารละลายวิตามิน 0.03 มิลลิลิตร และซับสเทรต ความเข้มข้น 1000 mM 0.06 มิลลิลิตร

จากนั้นนำมาเติมสารละลายกากตะกอน ปริมาตร 0.03 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่หลอม จะได้เชื้อที่มีความเจือจาง 10^{-2} แล้วนำไปวางบนเครื่องมือของฮังเกตซึ่งจะหมุนตลอดเวลาในขณะเดียวกับน้ำเย็นไหลผ่าน วุ้นจะแข็งตัวเคลือบผิวด้านในของหลอดอย่างสม่ำเสมอ ดังรูปที่ 3.7 นำไปบ่มที่ 37°C จากนั้นนำมานับจำนวนโคโลนีของเชื้อทุกสัปดาห์

ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะต้องมีการเติมซับสเทรตต่างๆ คือ เมธานอล กรดฟอร์มิค กรดแลคติค กรดอะซิติค กรดโพรพิโอนิค ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ ส่วนซับสเทรตไฮโดรเจนะคาร์บอนไดออกไซด์ เติมโดยต่อจากถังแก๊สโดยตรงผ่านเข็มฉีดยาเบอร์ 23 โดยใช้ความดัน 1 atm เป็นเวลา 5 นาทีโดยเทคนิคปลอดเชื้อ (รูปที่ 3.8)

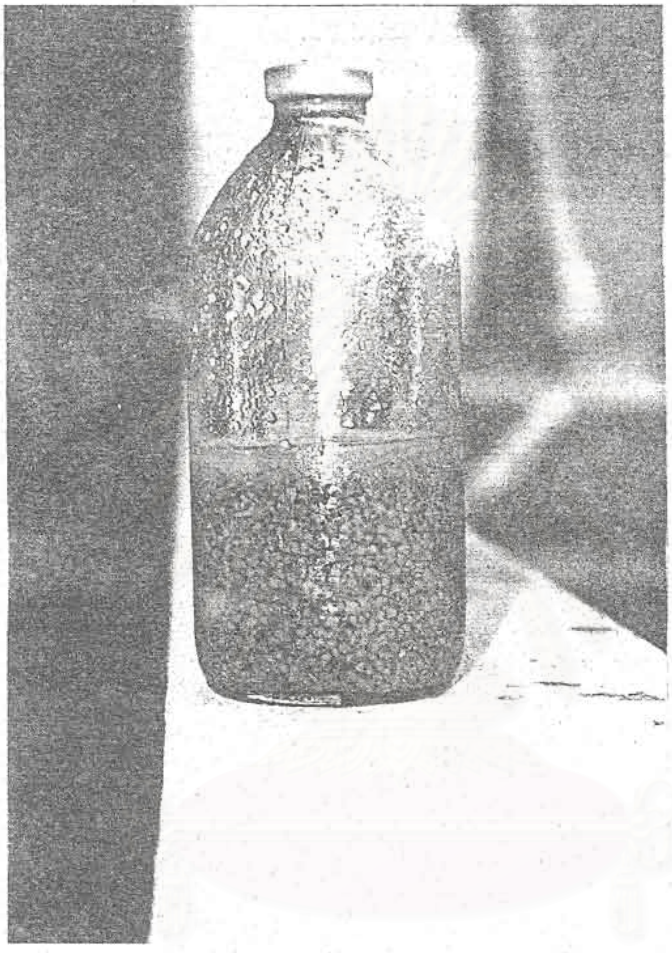
3.5 การวัดการเจริญของแบคทีเรียในกากตะกอนโดยการวัดค่าความขุ่น

ใช้ไซริงจ์ และเข็มฉีดยาเบอร์ 23 ดูดสารละลายกากตะกอน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆ จะได้เชื้อที่มีความเจือจาง 10^{-2} นำไปบ่มที่ 37°C แล้วนำมาทำการวัดค่าความขุ่นโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 nm ทุกสัปดาห์

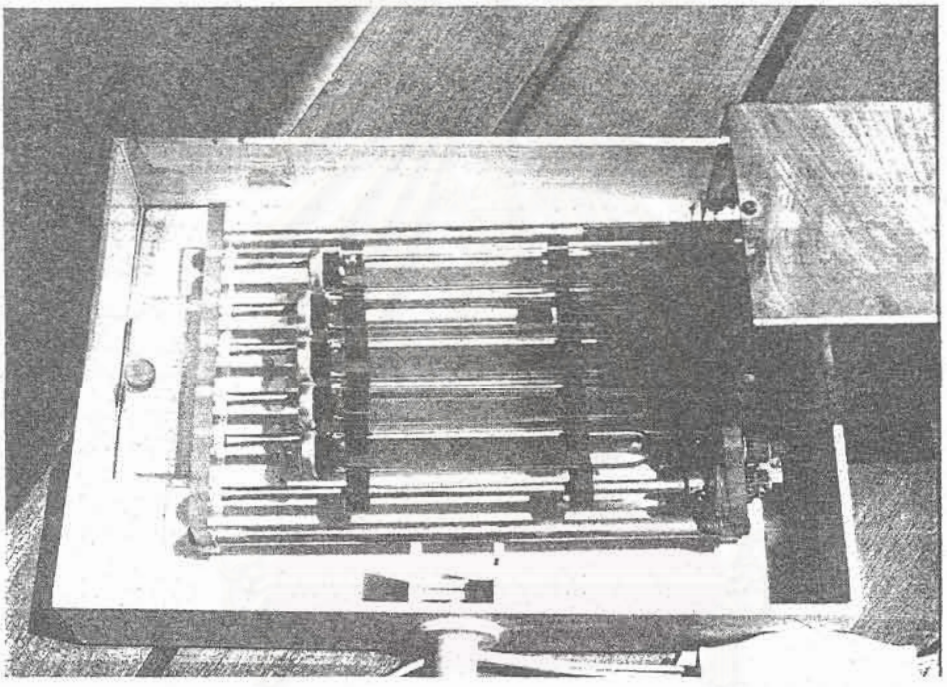
3.6 การหาปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากการทำงานร่วมกันของเชื้อผสมตามธรรมชาติ

ใช้หลอดฉีดยาและเข็มเบอร์ 23 ดูดสารละลายกากตะกอนปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆ จะได้เชื้อที่มีความเจือจาง 10^{-2} นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ทำการตรวจวัดแก๊สมีเธนที่เกิดจากการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียทุกสัปดาห์ โดยใช้หลอดฉีดยาเก็บความดันขนาด 1 มิลลิลิตรดูดแก๊สจาก Headspace ของหลอดเลี้ยงเชื้อ ดังภาพที่ 3.9 โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟีภาวะเดียวกับเมื่อทำกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค หน้า 99) แล้วจึงคำนวณเปอร์เซ็นต์ของแก๊สมีเธนในตัวอย่าง โดยอาศัยกราฟมาตรฐานของมีเธน

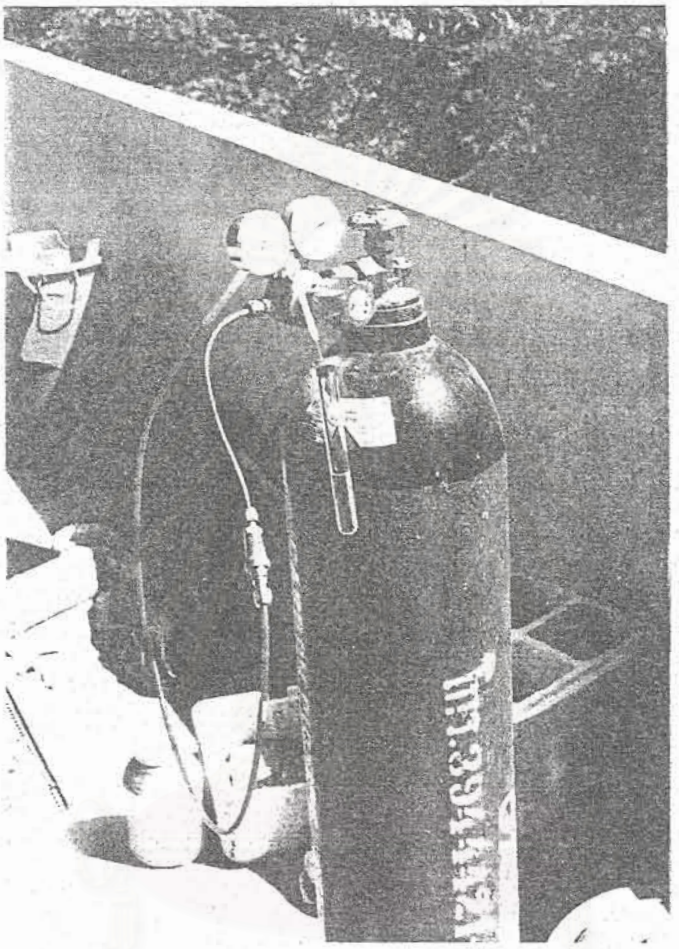
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



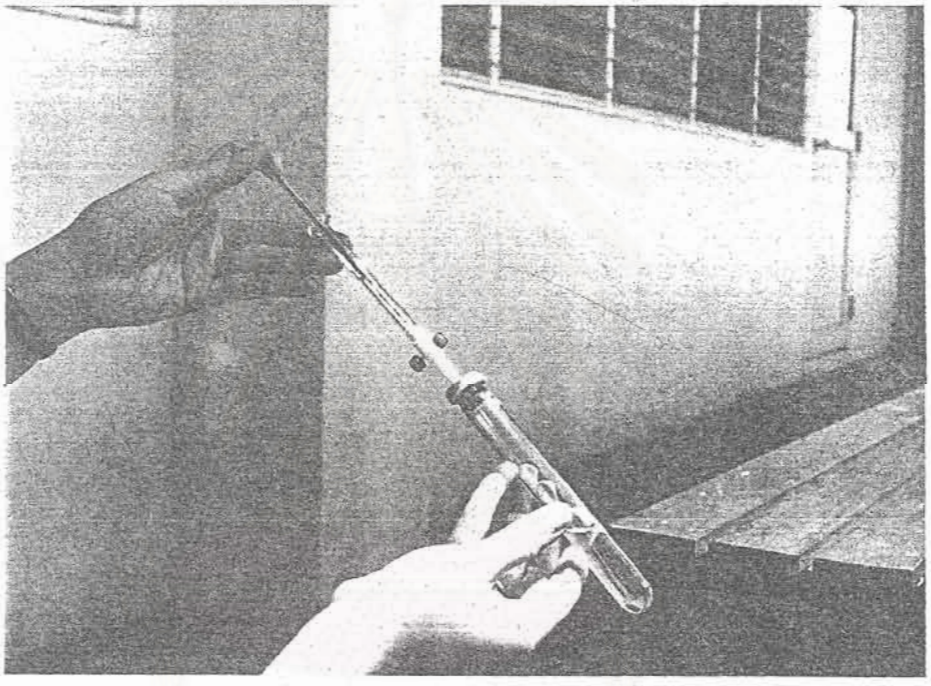
รูปที่ 3.6 ลักษณะกากตะกอนที่ได้รับจากโรงงานอุตสาหกรรมนม



รูปที่ 3.7 แสดงการเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งโดยวิธีของฮังเกต



รูปที่ 3.8 การเติมซับสเทรตไฮโดรเจนะคาร์บอนไดออกไซด์ (80:20)



รูปที่ 3.9 แสดงการเก็บตัวอย่างแก๊สมีเธนจากหลอดเลี้ยงเชื้อโดยใช้หลอดฉีดยาเก็บความดัน

3.7 การคัดกรอง(SCREENING)เชื้อแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนและเมธาโนเจน

3.7.1 การคัดเลือกเมธาโนเจนที่มีความสามารถในการใช้แก๊สไฮโดรเจนะแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นซับสเทรต

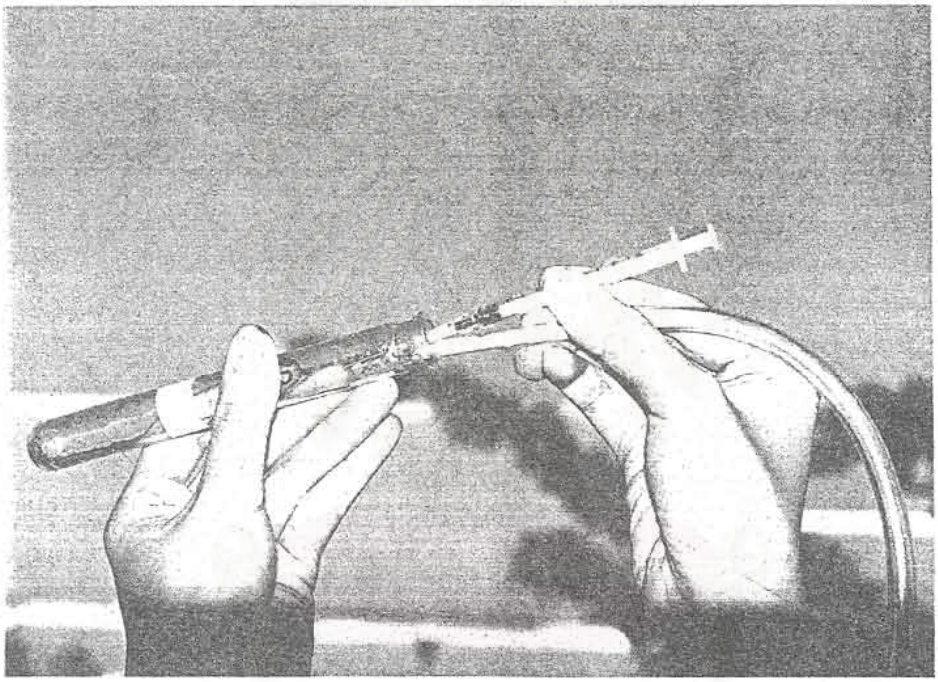
ก. ลงเชื้อจากกากตะกอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐานให้ได้ความเจือจางของเชื้อ 10^{-2} จากนั้นจึงเติมแก๊สไฮโดรเจนะแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (80:20) เพื่อใช้เป็นซับสเทรต โดยใช้ความดัน 1 atm เป็นเวลา 5 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° C

เมื่อครบ 14 วัน ดูดสารละลายเชื้อจากหลอดเริ่มต้น (โดยใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มเบอร์ 23) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีซับสเทรตชนิดเดิม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบ 14วัน ดูดสารละลายเชื้อจากหลอดดังกล่าวปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีซับสเทรตชนิดเดิม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบ 14 วันทำซ้ำเช่นเดิมจนครั้งสุดท้ายที่ปริมาตรของสารละลายเชื้อเป็น 0.1 มิลลิลิตร หลังจากบ่มครบ 14วันให้ดูดสารละลายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโดยวิธีของฮังเกต เพื่อตรวจดูความบริสุทธิ์ของเชื้อกลุ่มที่สามารถใช้ แก๊สไฮโดรเจนะแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นซับสเทรตได้

ข. หรืออีกวิธีหนึ่ง โดยการลงเชื้อจากกากตะกอนในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพื้นฐาน จากนั้นจึงเติมไฮโดรเจนะแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (80:20) เพื่อใช้เป็นซับสเทรตโดยใช้ความดัน 1 atm เป็นเวลา 5 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ37° C

เมื่อมีโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพื้นฐานแล้ว จึงเปิดฝาอลูมิเนียมและจุกยาง จากนั้นจึงใช้หลอดฉีดยา และเข็มเบอร์23 ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาณเล็กน้อย ฉีดไปบริเวณโคโลนีที่ต้องการจะแยก แล้วจึงดูดกลับมาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวใหม่ นำไปบ่มที่ 37°C ประมาณสองสัปดาห์ แล้วจึงนำสารละลายเชื้อนี้มาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ทำซ้ำขั้นตอน จนกว่าโคโลนีที่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะเป็นโคโลนีที่มีลักษณะเดียวกัน ซึ่งแสดงถึงความบริสุทธิ์ของเชื้อ

การใช้วิธีนี้ มีข้อดีตรงที่ สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้เร็วกว่าวิธีในข้อ ก แต่ก็มีข้อควรระวัง กล่าวคือ เมธาโนเจนเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความไวต่อการปนเปื้อนโดยแก๊สออกซิเจนมาก ดังนั้นทุกขั้นตอนภายหลังการเปิดจุกยางจะต้องทำอย่างรวดเร็วภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน (ภาพที่ 3.10)



รูปที่ 3.10 การเก็บโคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

3.7.2 การคัดเลือกเชื้อเมธาโนเจนที่มีความสามารถในการใช้เมธานอลเป็นซับสเทรต

ลงเชื้อจากกากตะกอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐาน ที่มีการเติมเมธานอลเป็นซับสเทรต โดยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20mM แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ ก หรือ ข จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

3.7.3 การคัดเลือกเชื้อเมธาโนเจนที่มีความสามารถในการใช้อะซิเตทเป็นซับสเทรต

ลงเชื้อจากกากตะกอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐาน ที่มีการเติมกรดอะซิติคเป็นซับสเทรต โดยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20mM แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ ก หรือ ข จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

3.7.4 การคัดเลือกเชื้อเมธาโนเจนที่มีความสามารถในการใช้กรดอินทรีย์เป็นซับสเทรต

ลงเชื้อจากกากตะกอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐาน ที่มีการเติมกรดฟอร์มิค หรือกรดโพรพิโอนิค หรือกรดแลคติคเป็นซับสเทรต โดยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20mM แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ ก หรือ ข จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

3.8 การทดสอบชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้

3.8.1 เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแล้ว ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปชะโคโลนีในหลอด แล้วจิ้งดูดกลับมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว บ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 1 เดือน แล้วจึงนำไปตรวจดูว่าเป็นอะซิโตเจนหรือเมธาโนเจน โดยการตรวจสอบแก๊สมีเธน โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี ถ้าเป็นอะซิโตเจนจะตรวจไม่พบแก๊สมีเธนและตรวจพบแก๊สมีเธนถ้าเป็นเมธาโนเจน

3.8.2 เพิ่มปริมาณของเชื้อแต่ละกลุ่ม โดยดูดสารละลายเชื้อจากหลอดที่มีเชื้อบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดเลี้ยงเชื้อที่ขนาดใหญ่ขึ้น เก็บไว้เป็นstock ของเชื้อต่อไป (ภาพที่ 3.11)

T 151023489

รูปที่ 3.11 ขวดเก็บเชื้อบริสุทธิ์ขนาด 60มิลลิลิตร

3.9 การทดสอบลีนยันแบคทีเรียกลุ่มเมธาโนเจน

นำเมธาโนเจนที่ได้ ไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ พบว่าเมธาโนเจนจะเกิดการเรืองแสงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรโดยคุณสมบัติของโคเอ็นไซม์F_{420} ซึ่งการวิเคราะห์นี้ต้องรีบทำเพราะ F_{420} จะสลายตัวอย่างเร็วเมื่อสัมผัสอากาศ

3.10 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สมีเธนของแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนและเมธาโนเจน

ทำการผสมเชื้อในกลุ่มอะซิโตเจน ที่แยกได้จากการเลี้ยงในกรดโพรพิโอนิค และกรดแลคติค กับเมธาโนเจนที่แยกได้จากการเลี้ยงในเมธานอล หรือแก๊สไฮโดรเจนะคาร์บอนไดออกไซด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐาน ในอัตราส่วน 3:1 (อะซิโตเจน 0.9 มิลลิลิตรและเมธาโนเจน 0.3 มิลลิลิตร) และ2: 1(อะซิโตเจน 0.8 มิลลิลิตรและเมธาโนเจน 0.4 มิลลิลิตร) และ 1:1 (อะซิโตเจน 0.6 มิลลิลิตร และ เมธาโนเจน 0.6 มิลลิลิตร) และ 1:2(อะซิโตเจน 0.4 มิลลิลิตรและเมธาโนเจน 0.8 มิลลิลิตร) และ 1:3 (อะซิโตเจน 0.3 มิลลิลิตรและเมธาโนเจน 0.9 มิลลิลิตร) และ1:11 (อะซิโตเจน 0.1 มิลลิลิตรและเมธาโนเจน 1.1 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปบ่มที่ภาวะต่างๆ

ก. ผลของอุณหภูมิ

นำเชื้อที่ผสมแล้ว ไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คืออุณหภูมิห้อง, 37°C และ 55°C เมื่อครบ 42 วัน นำไปตราจหาแก๊สมีเธนโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี และวัดค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อ

ข. ผลของความเข้มข้นซับสเทรต

แปรผันความเข้มข้นของซับสเทรต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อผสม คือ 5mM 10mM 20mM และ 30mM จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อครบ 42 วัน นำไปตรวจหาแก๊สมีเธนโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี และวัดค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อ

ค. ผลของชนิดซับสเทรต

แปรผันชนิดของซับสเทรตที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อผสม คือกรดแลคติค และกรดโพรพิโอนิค จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อครบ 42 วัน นำไปตรวจหาแก๊สมีเธนโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี และวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อ

ง. ผลของตัวค้ำจุน

ใส่ทราย (ที่ผ่านการทำความสะอาดโดยล้างด้วยน้ำกลั่น) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับ 0.2 มิลลิเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ประมาณ 0.01 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 10 มิลลิลิตร เพื่อเป็นตัวให้แบคทีเรียยึดเกาะเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ใส่ทราย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

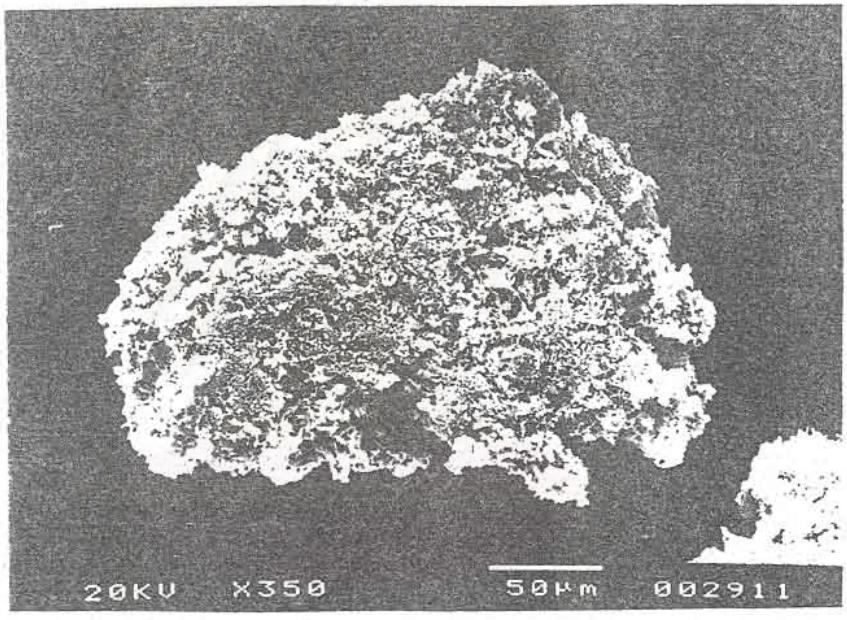
4.1 สมบัติทางกายภาพของกากตะกอน

กากตะกอนในการทำการวิจัยเป็นกากตะกอนที่ได้รับมาจากเครื่องปฏิกรณ์ในการบำบัดน้ำเสียแบบ Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) ของโรงงานอุตสาหกรรมนมในประเทศญี่ปุ่น มีลักษณะเป็นเม็ดกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3.5 มิลลิเมตร เปลือกภายนอกสีขาวครีม ภายในมีสีดำ

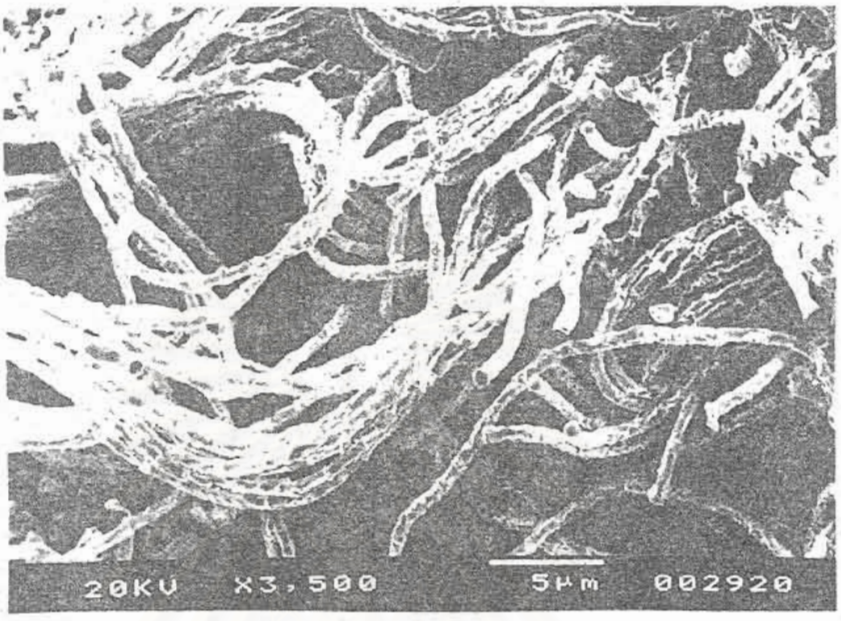
4.2 การตรวจลักษณะภายนอกของกากตะกอนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope)

นำกากตะกอนที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมนม ไปตรวจโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 กากตะกอนที่ได้มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (Self Immobilized) (Thiele และคณะ, 1990) ของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ

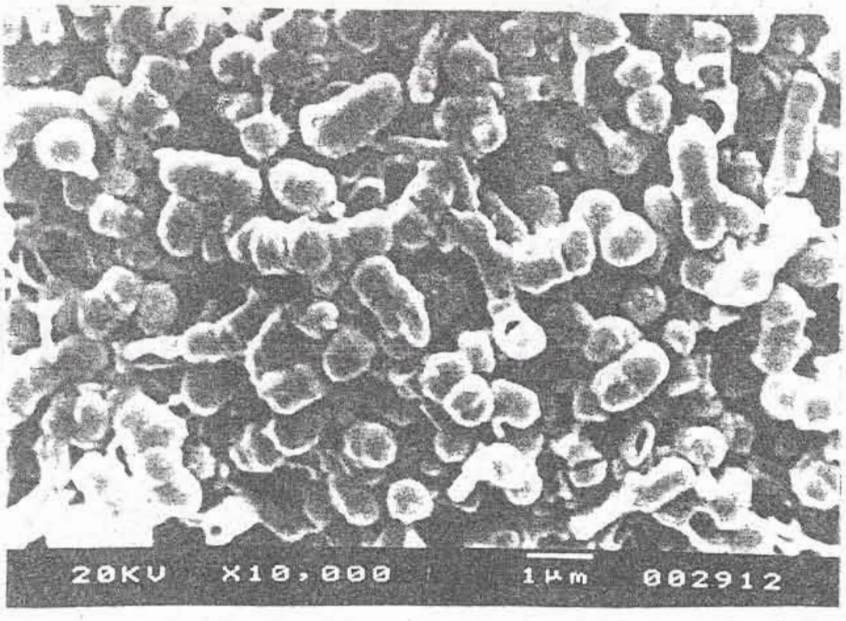
จากรูปยังสังเกตุพบว่ากากตะกอนมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนซึ่งยึดกันโดยสารพวกโพลีแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดปล่อยออกมาใช้ในการเชื่อมระหว่างเซลล์ เพื่อประโยชน์ในการส่งเสริมความแข็งแรงของโครงสร้างกากตะกอน (Harada, 1990) โดยที่ส่วนนอกของกากตะกอนเป็นไฮโดรไลติคแบคทีเรีย ส่วนภายในเป็นเมธาโนเจนหรืออะซิโตเจน และมีรูเล็กๆมากมายบนผิวของกากตะกอนสำหรับนำซับสเทรตในรูปที่สามารถละลายได้ (dissolved substrate) หรือซับสเทรตที่อยู่ในรูปแก๊ส (gaseous substrate) เข้าสู่ส่วนในของกากตะกอนเพื่อลดการจำกัดการถ่ายทอดมวล (mass transfer limitation) (Thiele และคณะ, 1988)



รูปที่ 4.1 ลักษณะภายนอกของกากตะกอนเมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน กำลังขยาย 350 เท่า



รูปที่ 4.2 แบคทีเรียลักษณะเป็นสายซึ่งคาดว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Methanothrix* ที่พบเมื่อศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนกำลังขยายเท่า 3,500 เท่า

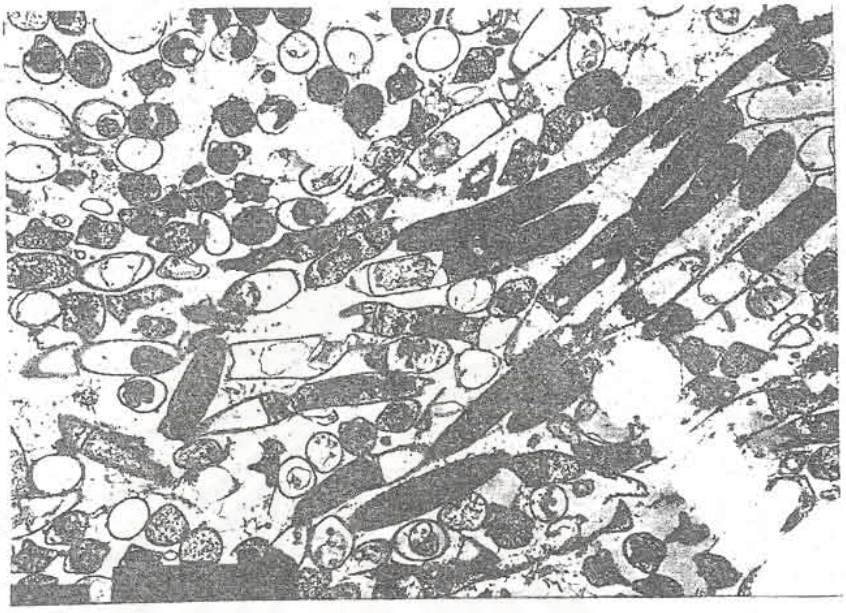


รูปที่ 4.3 แบคทีเรียที่ผิวของกากตะกอนเมื่อศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน กำลังขยาย 10,000 เท่า

4.3 การตรวจลักษณะภายในของกากตะกอนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบผ่านตลอด(Transmission Electron Microscope)

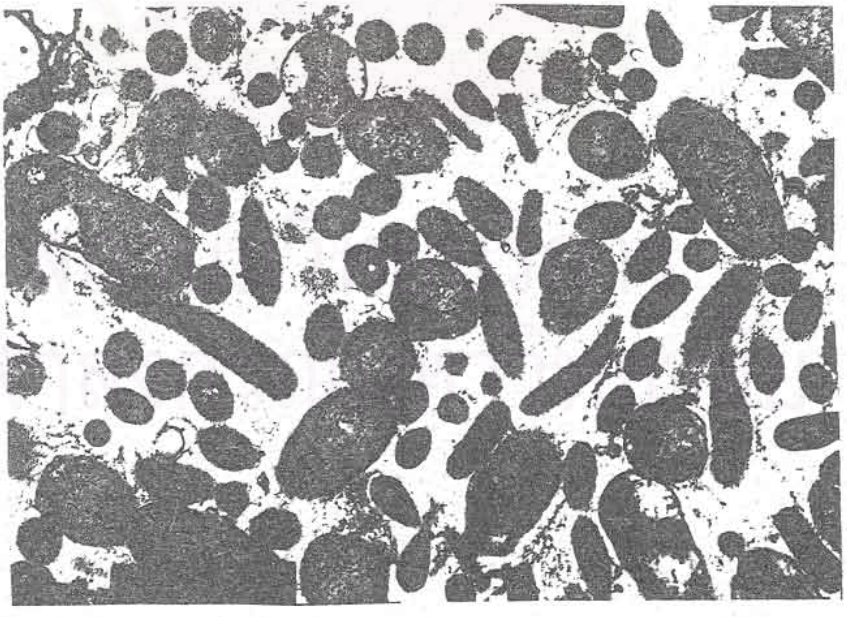
นำกากตะกอนที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมนมไปศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบผ่านตลอด ผลแสดงดังรูปที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าภายในกากตะกอนประกอบด้วยแบคทีเรียที่มีรูปร่างแตกต่างกัน บางส่วนอยู่อย่างหนาแน่นมากบางส่วนหนาแน่นน้อย ซึ่งในการทดลองขั้นต่อไปจะแยกแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนและเมธาโนเจนออกมาโดยใช้ซับสเทรตเป็นตัวคัดเลือก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



1μ

รูปที่ 4.4 ลักษณะของแบคทีเรียที่พบเมื่อศึกษากากตะกอนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบผ่านตลอดกำลังขยาย 7,000เท่า



1μ

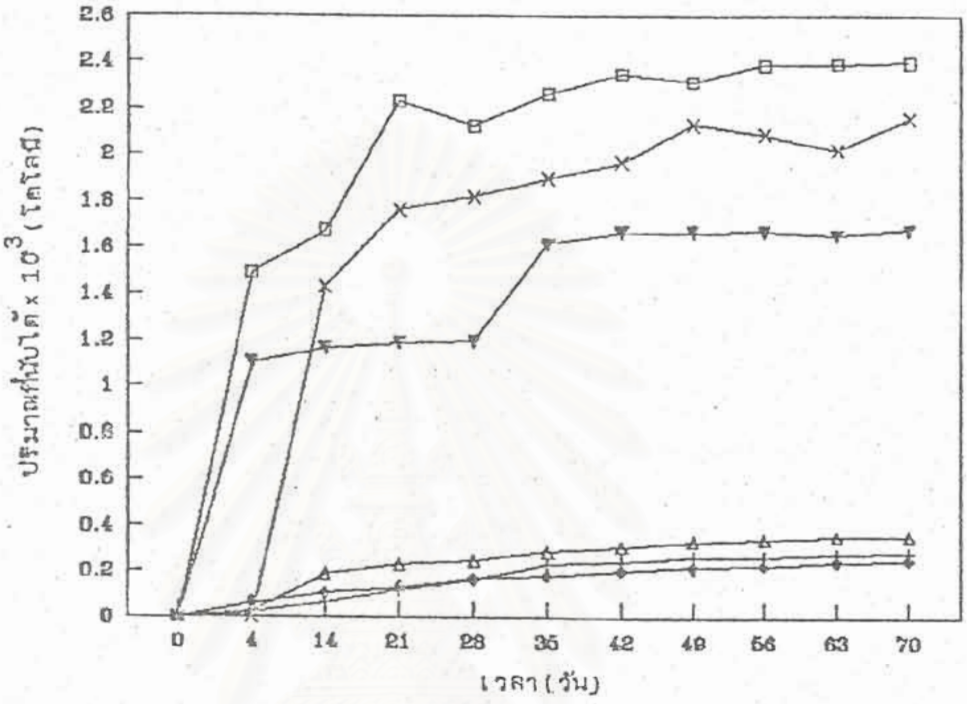
รูปที่ 4.5 ลักษณะของแบคทีเรียที่พบเมื่อศึกษากากตะกอนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบผ่านตลอดกำลังขยาย 14,000เท่า

4.4 การนับปริมาณแบคทีเรียที่นับได้(TOTAL BACTERIAL COUNT)ของเชื้อผสมตามธรรมชาติจากกากตะกอนในซับสเทรตชนิดต่างๆ

ผลจากการนำเชื้อจากกากตะกอนไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพื้นฐานที่ความเจือจาง 10^{-2} โดยใช้ซับสเทรตชนิดต่างๆ ดังกราฟรูปที่ 4.6 (ตารางที่ 4.1) ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบปริมาณที่นับได้ของเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆและบ่มไว้ที่ 37°C

ตารางที่ 4.1 ปริมาณที่นับได้โดยเฉลี่ยของเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆและบ่มไว้ที่ 37°C

เวลา (วัน)	ปริมาณที่นับได้ (โคโลนี)					
	กรดแลคติค 20mM	เมธานอล 20mM	กรดฟอร์มิค 20mM	กรดอะซิติค 20mM	$H_2:CO_2$ (80:20)	โพรพิโอนิค 20mM
0	0	0	0	0	0	0
4	1489	25	18	60	0	1100
14	1675	186	62	101	1434	1165
21	2233	228	117	128	1762	1187
28	2127	247	164	166	1821	1196
35	2263	286	233	180	1898	1617
42	2349	307	244	201	1967	1668
49	2313	330	266	217	2132	1668
56	2388	341	266	227	2089	1672
63	2392	353	276	243	2021	1655
70	2398	355	2835	249	2158	1676



รูปที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณที่นับได้ของเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆและบ่มไว้ที่ 37°C

- □ กรดแลคติค
- × ไฮโดรเจนะคาร์บอนไดออกไซด์ (80:20)
- ▼ กรดโพรพิโอนิค
- △ เมธานอล
- + กรดฟอร์มิค
- ♦ กรดอะซิติค

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณที่นับได้ของเชื้อแบคทีเรียจากกากตะกอน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐานที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆ เรียงจากมากไปหาน้อย คือ กรดแลคติค, H_2:CO_2(80:20), กรดโพรพิโอนิค, เมธานอล, กรดฟอร์มิค และกรดอะซิติค ตามลำดับ

พบว่าในช่วง 14 วันแรก มีโคโลนีเกิดจำนวนมากและเมื่อพิจารณาซับสเทรตของเมธาโนเจน 4 ชนิด คือ H_2:CO_2 (80:20), เมธานอล, กรดฟอร์มิค และกรดอะซิติค พบว่าในอาหาร H_2:CO_2 (80:20) มีจำนวนโคโลนีมากที่สุดเป็นเพราะเมธาโนเจนที่ใช้ไฮโดรเจน (Hydrogenotrophic Methanogen) นั้นใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling Time) สั้นที่สุด จึงทำให้สามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วและมีการพบเมธาโนเจนกลุ่มนี้มากในสภาพไร้อากาศ (Zeikus, 1977) นอกจากนี้ยังพบว่ามีเมธาโนเจนที่ใช้กรดฟอร์มิคและเมธานอลอยู่บ้าง สำหรับในซับสเทรตอะซิติคนั้นพบว่ามีจำนวนโคโลนีของเมธาโนเจนน้อยที่สุดเพราะเมธาโนเจนที่ใช้กรดอะซิติค (Acetrotrophic Methanogen) เป็นเมธาโนเจนที่เจริญได้ช้ามาก (Khan และ Trottier, 1978) ดังนั้นเวลาของการบ่มอาจเป็นตัวจำกัดจำนวนโคโลนี

สำหรับในอาหารที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิคและกรดแลคติคนั้น พบว่าจำนวนโคโลนีมาก คาดว่าโคโลนีที่เกิดเป็นผลรวมของแบคทีเรียสองกลุ่มคือ อะซิโตเจนและเมธาโนเจน และพบว่าจำนวนโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้จำนวนโคโลนีมากกว่าการเติมกรดโพรพิโอนิค ซึ่งเป็นเพราะความยากง่ายในการดึงซับสเทรตไปใช้ กล่าวคือในการเริ่มเกิดการย่อยสลายกรดโพรพิโอนิคในสภาวะมาตรฐานต้องการพลังงานถึง 76 KJ/mol ซึ่งนับเป็นพลังงานที่สูงมาก (Lun และ Cheng, 1992) แต่จากผลการทดลองพบว่าการใช้วิธีนี้ค่อนข้างเป็นวิธีสุ่ม กล่าวคือในที่นี้ทำการทดลอง 6 ซ้ำ สามารถดึงค่าที่ใกล้กันออกมาได้ 3 ค่า 3 ค่าที่เหลือไม่สูงมากก็ต่ำมาก เป็นไปได้ว่าในการดึงเชื้อมาจากตัวอย่างในแต่ละครั้งได้ปริมาณเชื้อมามากน้อยแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแนวโน้มของกราฟคือการที่จำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่ม ซึ่งการใช้วิธีเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งนี้น่าจะใช้เพื่อเป็นการดูลักษณะโคโลนีและทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ มากกว่าที่จะนำมาพิจารณาอย่างจริงจังถึงปริมาณของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆจากกากตะกอนหรือปริมาณของมีเธนที่เกิด ทั้งนี้เมื่อดูผลการวิจัยของ Labat และGarcia (1986) แสดงให้เห็นว่าปริมาณที่นับได้ของแบคทีเรียบน

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนั้นไม่สัมพันธ์กับปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้น

4.5 การวัดค่าความขุ่น (OPTICAL DENSITY) ของเชื้อผสมตามธรรมชาติจากกากตะกอนในซับสเทรตชนิดต่างๆ

จากการวัดค่าความขุ่นของเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆเพื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อผสม พบว่าค่าความขุ่นที่ได้ให้ผลไม่แน่นอนจึงไม่สามารถแสดงข้อมูลได้ ทั้งนี้เป็นเพราะ

4.5.1 จากการวัดในระบบปิด ทำให้ต้องใช้หลอดเลี้ยงเชื้อในการวัด ดังนั้นความผิดพลาดจึงมาจาก การที่เนื้อแก้วของหลอดมีความหนาบางไม่สม่ำเสมอเท่ากันในทุกหลอด จึงไม่สามารถนำผลมาใช้ในการอ้างอิงได้

4.5.2 การเจริญของเมธาโนเจน จะเกิดแก๊สมีเธนเป็นหลักโดยจะเกิดเป็นเซลล์เพียง 5% ของซับสเทรตที่เป็นสารประกอบคาร์บอน จึงเห็นได้ว่าค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำมาก ทำให้การวัดค่าความขุ่นที่เปลี่ยนแปลงเห็นได้ไม่ชัดเจน

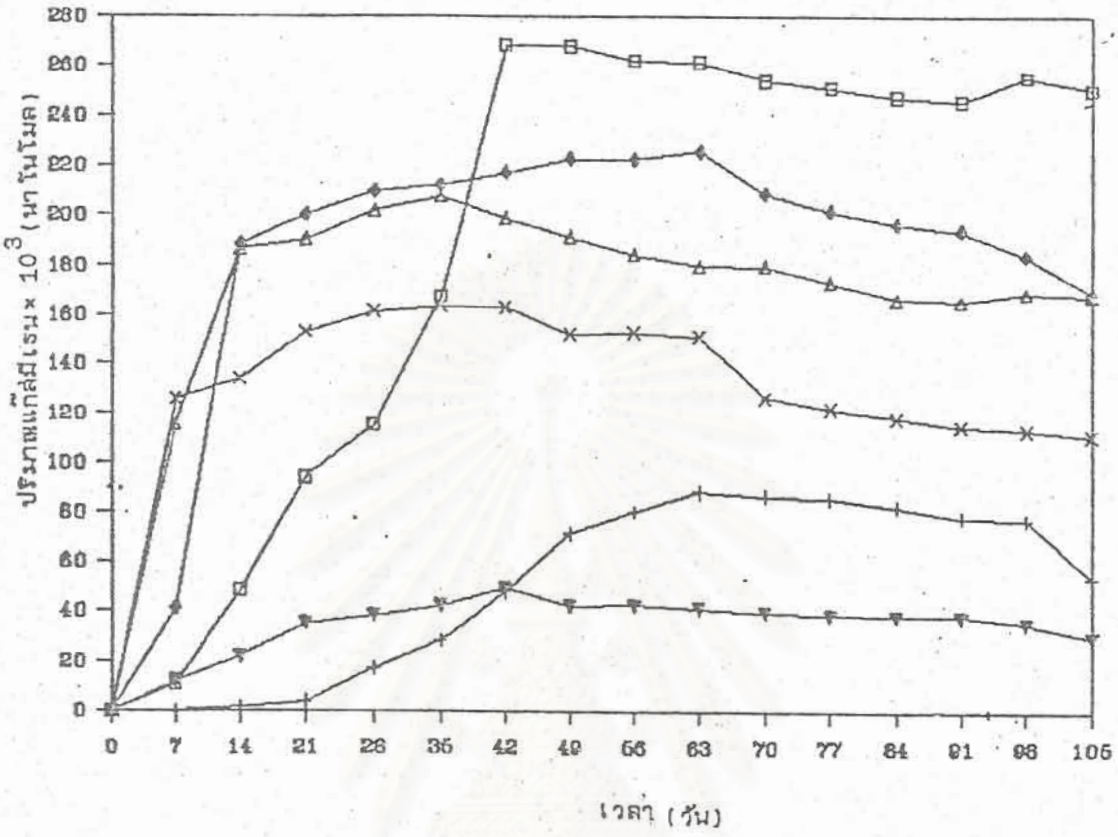
จากปัจจัยดังกล่าวเหล่านี้จึงไม่ควรนำการวัดความขุ่นของซับสเทรตมาใช้ในการอ้างอิงถึงการเจริญของเชื้อผสม

4.6 ผลของเชื้อผสมตามธรรมชาติจากกากตะกอนในการผลิตมีเธนจากซับสเทรตชนิดต่างๆ

ผลจากการหาปริมาณแก๊สมีเธนของเชื้อผสมตามธรรมชาติในซับสเทรตชนิดต่างๆดังกราฟรูปที่ 4.7 (ตารางที่ 4.2) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณมีเธนของเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตให้ได้ความเข้มข้น 20 มม. และบ่มไว้ที่ 37°C

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแก๊สมีเธนที่ผลิตโดยเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมซับสเทรตในน้ำเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้น20mM และบ่มไว้ที่ 37°C (pH_b, pH_a = ค่าความเป็นกรดด่างก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ)

เวลา (วัน)	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)					
	กรดแลคติค 20mM	เมธานอล 20mM	กรดฟอร์มิค 20mM	กรดอะซิติค 20mM	H_2:CO_2 80:20	โพรพิโอนิค 20mM
7	10.95	115.27	0	41.15	125.68	12.04
14	48.48	186.72	1.47	188.41	133.69	21.85
21	94.34	190.31	3.92	200.23	153.04	35.10
28	115.16	201.81	17.00	209.33	161.43	38.31
35	167.53	207.32	28.01	211.84	163.50	42.13
42	268.09	198.98	47.69	217.29	163.17	49.16
49	267.87	191.42	71.23	222.47	152.06	42.07
56	261.72	184.37	80.06	222.25	152.71	42.35
63	261.05	179.85	88.51	225.47	151.24	41.04
70	253.96	179.49	86.66	208.52	126.11	39.40
77	251.03	172.98	85.89	201.43	121.64	38.59
84	247.21	166.34	82.24	196.47	117.99	38.20
91	245.58	165.41	78.21	193.42	114.50	38.09
98	255.11	168.57	77.23	183.77	113.14	35.26
105	250.16	167.48	53.90	168.40	110.74	29.76
pH_b	6.82	7.20	6.94	6.97	7.40	6.58
pH_a	6.80	7.18	6.96	6.95	7.39	6.63



รูปที่ 4.7 ปริมาณมีเธนของเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตให้ได้ความเข้มข้น 20mM และบ่มไว้ที่ 37°C

กรดแลคติค

ไฮโดรเจนะคาร์บอนไดออกไซด์ (80:20)

กรดโพรพิโอนิค

เมธานอล

กรดฟอร์มิค

กรดอะซิติค

พบว่ากระบวนการเกิดแก๊สมีเธนจะเกิดร่วมกับการย่อยสลายสารอินทรีย์ ดังนั้นจึงใช้ปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิด เป็นตรรชนีแสดงความสัมพันธ์กับการเจริญของเมธาโนเจนในซับสเทรตชนิดต่างๆ (Zeikus, 1977) ในที่นี้จะแยกพิจารณาเป็น 2 ส่วนจากกราฟในรูปที่ 4.7

5.1 ความสามารถในการใช้ซับสเทรต

เชื้อมีความสามารถในการใช้ซับสเทรตได้เร็วเพียงใด สามารถพิจารณาได้จากความชันของกราฟ โดยพบว่าอัตราของการใช้ซับสเทรตเรียงจากมากไปหาน้อยคือ H_2:CO_2(80:20), เมธานอล, กรดอะซิติค, กรดแลคติค, กรดโพรพิโอนิค และกรดฟอร์มิคตามลำดับ ซึ่งการที่ใช้ H_2:CO_2 ได้เร็วที่สุดเนื่องมาจากว่าเมธาโนเจนทุกตัวสามารถใช้ซับสเทรตชนิดนี้ในการเกิดมีเธน และสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ได้ทันที (Zeikus, 1977) จึงเกิดมีเธนได้เร็วกว่าการใช้ซับสเทรตชนิดอื่น แต่เมื่อผ่านไประยะหนึ่งอัตราการเกิดแก๊สมีเธนจะน้อยมาก ซึ่งอาจเป็นเพราะการจำกัดซับสเทรต ถ้ามีการเติมซับสเทรตอาจทำให้ปริมาณแก๊สมีเธนสูงกว่าค่าที่ได้

ซับสเทรตชนิดต่อมาคือ เมธานอล เมธาโนเจนบางตัวสามารถใช้เมธานอลได้ทันที โดยเมธานอลบางโมเลกุลทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Electron Donor) บางตัวเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Electron acceptor) (Brock, 1991) แต่เมธาโนเจนบางตัวต้องเปลี่ยนเมธานอลให้เป็น H_2+CO_2 ก่อนจึงนำไปใช้ได้ (Banat และคณะ, 1983) ดังนั้นการใช้เมธานอลจึงช้ากว่า H_2:CO_2

ซับสเทรตชนิดต่อมาคือ กรดอะซิติค เป็นซับสเทรตโดยตรงของเมธาโนเจนเช่นเดียวกับ H_2:CO_2 และเมธานอล (Bryant, 1979) แต่พบว่าอัตราการเกิดแก๊สมีเธนจากกรดอะซิติคนั้นช้ากว่า H_2:CO_2 หรือเมธานอล ทั้งนี้เนื่องมาจากเมื่อพิจารณาค่า Gibb s free energy ของซับสเทรตทั้งหมดจะเห็นได้ชัดขึ้น ดังนี้

$$CH_3COO^- + H_2O \longrightarrow CH_4 + HCO_3^- \qquad -31\ KJ/mol$$

(Khan และ Trottier, 1978)

$$4H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O \qquad -135\ KJ/mol$$

(Karhadkar และคณะ, 1987)

$$4CH_3OH \longrightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O \qquad -112.5\ KJ/mol$$

(Brock, 1991)

สำหรับกรดแลคติค และกรดโพรพิโอนิคนั้น เมธาโนเจนไม่สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงต้องอาศัยแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนทำการย่อยสลายเพื่อให้ได้ซับสเทรตของเมธาโนเจน จึงต้องใช้เวลาในการย่อยสลายทำให้การเกิดมีเธนช้าด้วย แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างซับสเทรตทั้งสองชนิดนี้ พบว่าอัตราในการใช้กรดแลคติคสูงกว่ากรดโพรพิโอนิค ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า Gibb s free energy ของซับสเทรตทั้งสองชนิดนี้จะเห็นได้ชัดว่า การย่อยสลายกรดแลคติคจะให้พลังงานสูงกว่าการย่อยสลายกรดโพรพิโอนิค นั่นเป็นเพราะอะซิโตเจนกลุ่มที่เลี้ยงในกรดโพรพิโอนิคมีความสามารถในการย่อยสลายซับสเทรตต่ำมากและยังโตได้ช้าอีกด้วย (Lun และ Cheng, 1992)

$$CH_3CHOHCOOH + 2H_2O \longrightarrow CH_3COOH + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$$

-4.2 KJ/mol

(Mc.Inerney และ Bryant, 1979)

$$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \longrightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$$

+76 KJ/mol

(McCartney และ Oleszkiewicz, 1991)

สำหรับการใช้กรดฟอร์มิคเป็นซับสเทรต ตามทฤษฎีน่าจะเกิดมีเธนได้เร็วกว่ากรดแลคติคหรือกรดโพรพิโอนิค เพราะเป็นซับสเทรตโดยตรงตัวหนึ่งของเมธาโนเจน แต่จากผลการทดลองพบว่า เกิดได้ช้าที่สุดและเป็นซับสเทรตชนิดเดียวที่มี lag phase ซึ่งเป็นไปได้ว่าในสิ่งแวดล้อมเดิมของกากตะกอนไม่มีกรดฟอร์มิคเป็นองค์ประกอบ จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้กรดฟอร์มิคมีจำนวนน้อยมากและอยู่อย่าง inactive ต่อเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐานที่มีกรดฟอร์มิคเป็นองค์ประกอบ เชื้อจึงต้องปรับตัวอยู่ระยะหนึ่งก่อนที่จะสามารถดึงซับสเทรตไปใช้ได้และเมื่อผ่านช่วงปรับตัวแล้ว จะสามารถใช้กรดฟอร์มิคและผลิตแก๊สมีเธนได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดโพรพิโอนิคเป็นซับสเทรต

5.2 อัตราการผลิตแก๊สมีเธน

พบการเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ในซับสเทรตต่างๆ คือกรดแลคติค, กรดอะซิติค, เมธานอล, $H_2:CO_2$(80:20), กรดฟอร์มิค และกรดโพรพิโอนิค ตามลำดับ จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อใช้กรดแลคติคเป็นซับสเทรต จะเกิดมีเธนมากที่สุด ซึ่งจากรายงานของ Stafford และคณะ (1980) พบว่าความต้องการซับสเทรตของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับแหล่งที่คัดเลือกแบคทีเรียนั้นๆ ซึ่งในที่นี้กากตะกอนที่นำมาทำการทดลอง เป็นกากตะกอนที่ได้รับมาจากโรงงานอุตสาหกรรมนม จึงมีแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถย่อยสลายกรดแลคติคได้มาก จึงเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นซับสเทรตของเมธาโนเจนขึ้นมาก เช่น อะซิติค, ไฮโดรเจน จึงเกิดปริมาณมีเธนขึ้นมากที่สุดและยิ่งเมธาโนเจนดึงซับสเทรตที่เกิดไปใช้ได้มากเท่าไร ก็จะเกิดการย่อยสลายกรดแลคติคมากขึ้นเท่านั้น ดังปฏิกิริยาคบคู่ที่เกิดขึ้นดังนี้

$$CH_3CHOHCOOH + 2H_2O \longrightarrow CH_3COOH + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$$

$$CH_3COOH \longrightarrow CH_4 + CO_2$$

$$4H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O$$

สำหรับกรดอะซิติคนั้น เป็นซับสเทรตที่สำคัญของกระบวนการเกิดมีเธนในอุณหภูมิช่วง 20-40 °C เพราะในอุณหภูมิดังกล่าวสารอินทรีย์ต่างๆจะถูกย่อยเป็นกรดอะซิติค หรือ H_2+CO_2 (Zinder, 1988) ทำให้ปริมาณเมธาโนเจนที่ใช้กรดอะซิติค (Acetoclastic Methanogens) มีปริมาณมาก และเมื่อนำไปเลี้ยงในกรดอะซิติคจึงเกิดแก๊สมีเธนในปริมาณสูง และพบว่ากรดอะซิติคจำนวนมากเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นมีเธนและคาร์บอนไดออกไซด์ในขณะที่เมธาโนเจนโตได้ช้ามาก (Bryant, 1979) นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในกรดอะซิติคจะเกิดแก๊สมีเธนในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเลี้ยงใน $H_2:CO_2$ เป็นเพราะข้อจำกัดของความสามารถในการละลายของแก๊สผสม ซึ่งในงานทดลองเป็นการเติม $H_2:CO_2$ ลงไปบริเวณ Headspace ของหลอดเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้การดึงไปใช้ยากกว่าสภาพในธรรมชาติที่ถ่ายทอดโดยตรงจากอะซิโตเจนสู่เมธาโนเจน (Conrad และคณะ, 1985)

จากรายงานของ Chartrain, Bhatnagar และ Zeikus ในปี 1987 แสดงให้เห็นว่าการเติมแลคโทสลงในถังหมักน้ำเวย์แบบต่อเนื่องจะทำให้ความเข้มข้นในสถานะคงตัวของแบคทีเรียที่ย่อยสลายแลคโทส แลคเทต และอะซิเทตมากขึ้น

ซึ่งเมื่อในสภาวะเดิมของกากตะกอนในแหล่งที่เก็บมาได้รับแลคโทสอยู่ตลอดจากน้ำเสียของโรงงาน จึงทำให้สภาวะดังกล่าวของกากตะกอนเป็นสภาวะที่มีแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายกรดแลคติค และกรดอะซิติคมากด้วย

สำหรับเมธานอลและ $H_2:CO_2$ นั้น พบว่าในเมธานอลให้มีเธนมากกว่าใน $H_2:CO_2$ (80:20) ซึ่งอาจเป็นเพราะความสามารถในการละลายของแก๊สผสม $H_2:CO_2$ ที่ใช้เป็นซับสเทรตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวน้อยกว่าความสามารถในการละลายของเมธานอล ดังนั้นจึงมีซับสเทรตเมธานอลสำหรับการดึงไปใช้มากกว่าจึงเกิดมีเธนมากกว่า

สำหรับฟอร์มิคมีปริมาณมีเธนน้อยเนื่องจากข้อจำกัดของเวลา คือในเวลาที่เท่ากัน เมธาโนเจนที่ใช้กรดฟอร์มิคต้องการเวลาสำหรับปรับตัวให้เข้ากับซับสเทรตและต้องการเวลาสำหรับการเพิ่มจำนวน ดังเช่นที่พบจากน้ำเสียของโรงงานผลิตแอลกอฮอล์จากแป้งมันสำปะหลัง (Cassava alcohol slops) ว่าแอคติวิตีของกากตะกอนเพิ่มจาก 0.017 Kg CH_4-COD/Kg.VSS/Day ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำมากในช่วงเริ่มต้นเป็น 0.45 Kg CH_4-COD/Kg.VSS/Day ใน194 วัน (Dararatana และคณะ, 1990)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณมีเธนระหว่างการใช้กรดโพรพิโอนิค และกรดฟอร์มิคเป็นซับสเทรตแล้ว พบว่าเมื่อใช้กรดฟอร์มิคเป็นซับสเทรตจะเกิดมีเธนมากกว่าทั้งที่ความสามารถเริ่มต้นในการใช้ซับสเทรตต่ำกว่า นั่นเป็นเพราะเมื่อเชื้อสามารถปรับตัวในการนำกรดฟอร์มิคไปใช้ได้แล้วเชื้อก็จะสามารถดึงมาใช้ได้เร็ว จึงเกิดมีเธนในปริมาณสูง และเชื้อกลุ่มนี้สามารถโตได้เร็วกว่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้กรดโพรพิโอนิคซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่โตช้าที่สุด (Thiele และคณะ, 1990)

4.7 <u>ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนและเมธาโนเจนที่แยกได้จากกากตะกอนโดยใช้ซับสเตรทต่างๆเป็นตัวคัดเลือก</u>

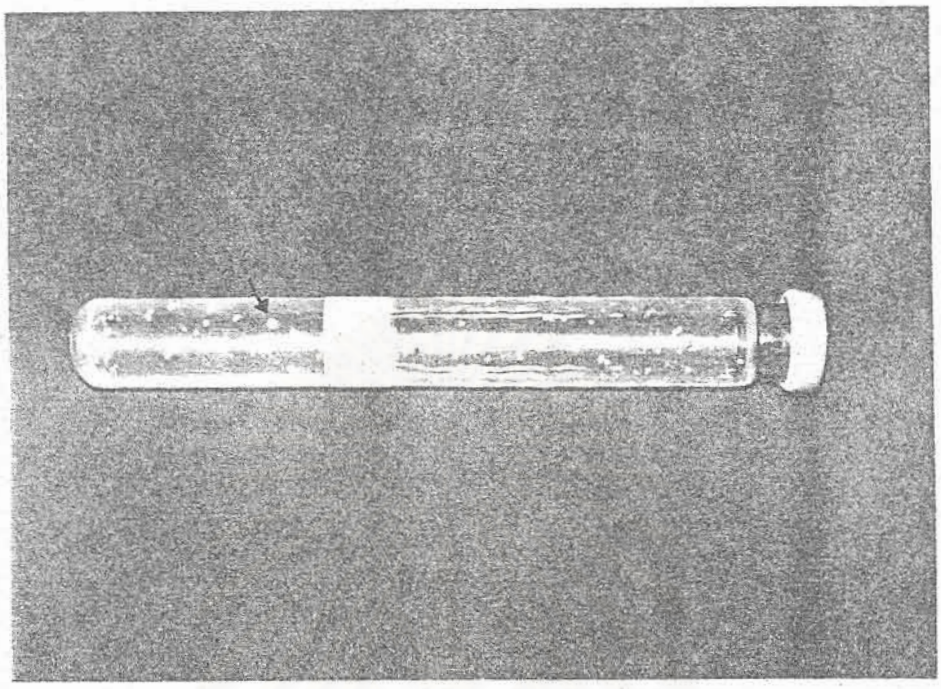
จากการใช้ซับสเทรตชนิดต่างๆ คือ กรดแลคติค, กรดโพรพิโอนิค, กรดอะซิติค, เมธานอล, $H_2:CO_2$(80:20) และ กรดฟอร์มิค เป็นตัวคัดเลือกจะทำให้ได้แบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนและเมธาโนเจนเป็นหลัก (Bhatnagar และคณะ, 1991) ซึ่งจะนำเชื้อสองกลุ่มนี้มาผสมกันเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสม พบว่าสามารถแยก

อะซิโตเจนได้สองกลุ่มจากการใช้ซับสเทรตสองชนิด คือกรดโพรพิโอนิค และกรดแลคติค และแยกเมธาโนเจนได้หนึ่งกลุ่มจากการใช้ซับสเทรตสองชนิดคือ เมธานอล หรือ H_2:CO_2 (80:20) ดังตาราง 4.3

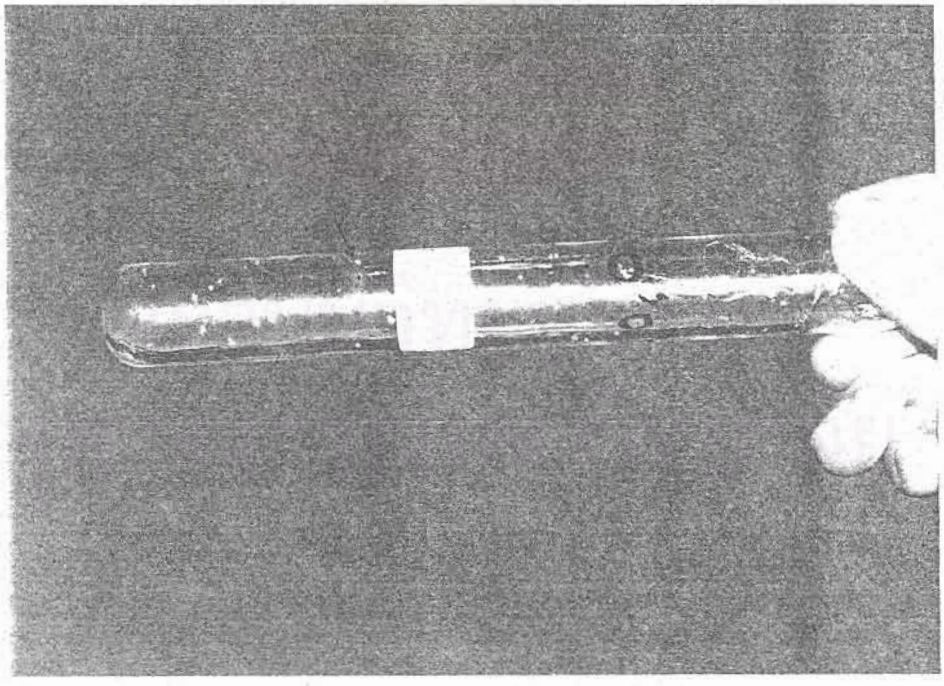
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 แสดงชนิดและลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้จากการใช้ซับสเทรตต่างๆ

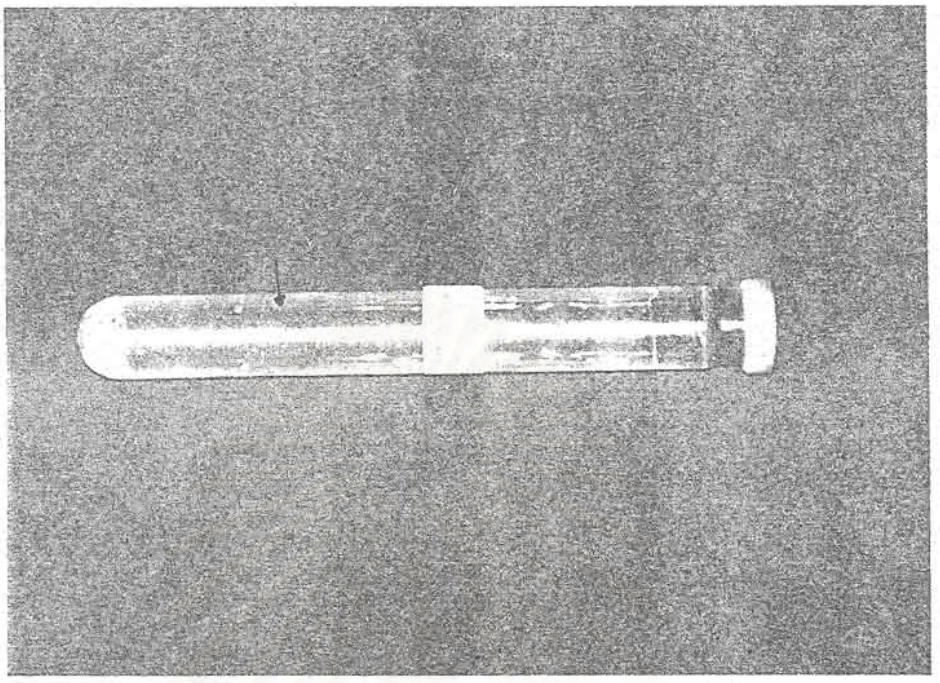
ซับสเทรต	ชนิดของแบคทีเรีย	ลักษณะของเชื้อ
1.กรดโพรพิโอนิค	อะซิโตเจน	โคโลนีขาวใส, ยาวรี, หัวแหลมท้ายแหลม ยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ แกรมลบ, รูปร่างกลม มีทั้งอยู่เป็นกลุ่มและอยู่เป็นสายสั้นๆ, ไม่มีสปอร์
2.กรดแลคติค	อะซิโตเจน	โคโลนีสีขาว ค่อนข้างใหญ่, ขอบไม่กลมไม่เรียบ, เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 4.8 และ 4.9 ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ แกรมลบ, รูปร่างกลม มีทั้งอยู่เป็นคู่และเป็นสายสั้นๆ, ไม่มีสปอร์
3.เมธานอล 4.H_2:CO_2	เมธาโนเจน	โคโลนีใส ขนาดเล็กเห็นเป็นจุดกลม ขอบเรียบ ดังรูปที่ 4.10 ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ แกรมลบ, รูปร่างกลม อยู่เป็นกลุ่ม ไม่มีสปอร์ มีการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.8 ลักษณะโคโลนีของเชื้ออะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคความเข้มข้น 20mM



รูปที่ 4.9 ลักษณะโคโลนีของเชื้ออะซิโตเจนเมื่อสัมผัสอากาศ



รูปที่ 4.10 ลักษณะโคโลนีของเชื้อเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลหรือ$H_2:CO_2$(80:20)

รูปที่ 4.11 ลักษณะการเรืองแสงของเชื้อเมธาโนเจนเมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงฟลูออเรสเซนต์ติดอยู่ กำลังขยาย 1000 เท่า

สำหรับในกรดฟอร์มิค และกรดอะซิติคนั้น ไม่พบโคโลนีใดๆ ซึ่งในกรณีของกรดฟอร์มิค เป็นเพราะในกากตะกอนมีเชื้อที่ใช้กรดฟอร์มิคอยู่น้อย และ inactive เมื่อ transfer หลายครั้งจึงหายไป หรืออาจเป็นเพราะเชื้อบางชนิดไม่สามารถขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Methanospirillum soehngenii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้โซเดียมฟอร์เมทเป็นซับสเทรต (Jain และคณะ, 1988) หรือในกรณีของกรดอะซิติคเป็นเพราะการเจริญของเมธาโนเจนที่ใช้กรดอะซิติคช้า ดังจะเห็นได้จากสมการ

$$CH_3COO^- + H_2O \longrightarrow CH_4 + HCO_3^- \qquad -31\ KJ/mol$$

ซึ่งเห็นได้ว่าพลังงานที่ปล่อยออกมาเมื่อเลี้ยงเมธาโนเจนในกรดอะซิติค มีค่าเกือบไม่พอในการเกิด 1 โมลของ ATP ดังนั้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงช้า (McInerney และ Bryant, 1979) ทำให้โตไม่ทันเพียงพอที่จะคงอยู่ในระบบ (Bryant, 1979) นอกจากโตช้าแล้วแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้กรดอะซิติคนี้ยังมีการเจริญที่เอาแน่นอนไม่ได้อีกด้วย (Zinder, 1988) ซึ่งในทั้งสองกรณี คือทั้งในกรดฟอร์มิคและกรดอะซิติค อาจเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียบางกลุ่มไม่สามารถเลี้ยงในลักษณะของเชื้อบริสุทธิ์ได้ เช่น *Methanococcus mazei, Methanosarcina methanica* (Zeikus, 1977)

การที่ไม่สามารถแยกจำนวนชนิดของเชื้อได้เท่ากับที่ดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบผ่านตลอดนั้น เป็นเพราะแบคทีเรียทุกกลุ่มไม่สามารถเลี้ยงได้ใน Artificial media (Zeikus, 1977) หรือเป็นเพราะการใช้ซับสเทรตเป็นตัวคัดเลือกทำให้เชื้อแบคทีเรียลดความหลากหลายลง ซึ่งในสภาวะเติมของกากตะกอนมีเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาก เพราะองค์ประกอบของเชื้อขึ้นกับองค์ประกอบของน้ำเสีย (Bhatnagarและคณะ, 1991)

4.8 ผลของเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนและเมธาโนเจนที่แยกจากกากตะกอนในการผลิตแก๊สมีเธนจากซับสเทรตชนิดต่างๆ

จากการที่สามารถแยกแบคทีเรียสองกลุ่มใหญ่ คืออะซิโตเจนสองกลุ่มจากกรดแลคติค และกรดโพรพิโอนิค และเมธาโนเจนหนึ่งกลุ่มจากเมธานอล และ $H_2:CO_2$ (80:20) ได้จากกากตะกอน ในการทดลองนี้จะนำมาผสมกันเพื่อทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการอยู่ร่วมกันและเกิดแก๊สมีเธนในปริมาณสูง ดังนั้นจึงทำการทดลองในซับสเทรตสองชนิดขนานกันไป คือเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารของอะซิโตเจน (กรดแลคติคและกรดโพรพิโอนิค) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนไม่สามารถใช้ซับสเทรตของเมธาโนเจน เมื่อจะเลี้ยงด้วยกันจึงต้องเลี้ยงในอาหารของอะซิโตเจน จากนั้นมันจะทำการย่อยสลายซับสเทรตนั้นและส่งอาหารที่จำเป็นให้เมธาโนเจนใช้ต่อไป นั่นคือ

4.8.1 เลี้ยงเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้แลคติคเป็นตัวคัดเลือกและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลเป็นตัวคัดเลือกในอัตราส่วนต่างๆ

4.8.2 เลี้ยงเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคเป็นตัวคัดเลือกและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลเป็นตัวคัดเลือกในอัตราส่วนต่างๆ

ซึ่งในการทดลองจะใช้เมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอล เพราะจากการพิจารณาลักษณะโคโลนี การย้อมติดสีแกรม และความสามารถในการผลิตแก๊สมีเธนแล้วพบว่าเป็นชนิดเดียวกับที่แยกโดยใช้ $H_2:CO_2$ (80:20) และการใช้เมธาโนเจนตัวดังกล่าวนี้พบว่ามีภาวะของการเพาะเลี้ยงที่สะดวกกว่า

สำหรับวันที่ควรนำไปวัดปริมาณมีเธนที่เกิดมากที่สุด ให้พิจารณาโดยอ้างอิงจากเชื้อผสมของกากตะกอนในธรรมชาติ (ตารางที่ 4.2) นั่นคือในอาหารเลี้ยงเชื้อกรดแลคติคและกรดโพรพิโอนิคจะให้มีเธนมากที่สุดในวันที่ 42 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อได้ซับสเทรต และวันทำการทดลองที่เหมาะสมแล้ว จึงผสมเชื้อทั้งสองกลุ่ม และบ่มไว้ในอุณหภูมิต่างกันคือ 37°C, 55°C และ ที่อุณหภูมิห้องเพื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิเพราะโดยทั่วไปแล้ว อุณหภูมิมีผลต่อแอคติวิตีและการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และบ่มไว้ในความเข้มข้นของซับสเทรตต่างกันคือ10mM, 20mM, และ 30mM พบว่าจากผลการทดลอง ทุกหลอด ทุกสภาวะเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิคเป็นซับสเทรตไม่พบแก๊สมีเธน และพบปริมาณน้อยมากเมื่อใช้กรดแลคติคเป็นซับสเทรตและ

เมื่อวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการเลี้ยงเชื้อแล้ว ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละอุณหภูมิที่ความเข้มข้นซับสเทรตเดียวกัน แต่จะพบความแตกต่างของค่าความเป็นกรดด่างอย่างเห็นได้ชัด ที่ความเข้มข้นของซับสเทรตต่างกัน กล่าวคือค่าความเป็นกรดด่างภายหลังการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของซับสเทรตเริ่มต้น 10mM มีค่าประมาณ 6.4 ค่าความเป็นกรดด่างที่ความเข้มข้นของซับสเทรต 20mM มีค่าประมาณ 5.8 และค่าความเป็นกรดด่างที่ความเข้มข้นของซับสเทรต 30mM มีค่าประมาณ 4.9 แสดงว่าในที่นี้ความแตกต่างของอุณหภูมิไม่มีผลมากนัก ผลแสดงดังตาราง 4.4 และ 4.5 (ข้อมูลดังตาราง 1-6 ภาคผนวก ง หน้า 104-106)

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายโดยเฉลี่ย(3ซ้ำ)ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงละชิโดเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆและบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา42วัน

ความเข้มข้นของซับสเทรต(mM)	ค่าความเป็นกรดด่างเฉลี่ยเมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ		
	37°C	55°C	อุณหภูมิห้อง
10	6.50	6.37	6.34
20	5.73	5.95	5.89
30	4.95	4.99	4.97

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายโดยเฉลี่ย(3ซ้ำ)ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมโพรพิโอนิคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆและบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 42วัน

ความเข้มข้นของซับสเทรต(mM)	ค่าความเป็นกรดด่างเฉลี่ยเมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ		
	37°C	55°C	อุณหภูมิห้อง
10	6.47	6.46	6.41
20	5.62	5.71	5.84
30	4.92	4.97	4.87

สาเหตุที่ไม่พบแก๊สมีเธนอาจเป็นดังต่อไปนี้

1. ความเข้มข้นซับสเทรตที่ใช้เป็นค่าความเข้มข้นที่มากเกินไป ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างมีค่าต่ำ โดยเฉพาะที่ 30 mM มีการพบว่าค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ต่ำกว่า 6 เกิดจากการเติมซับสเทรตที่ความเข้มข้นสูงและเร็วเกินไป (Merrill, 1973)

2. อัตราส่วนของอะซิโตเจนต่อเมธาโนเจนไม่เหมาะสม พบว่าค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อภายหลังการเลี้ยงเชื้อโดยส่วนมาก จะมีค่าต่ำกว่าค่าที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเมธาโนเจน คือ 6.5-7.8 แม้แต่ที่ 10 mM ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่าเมื่อใช้เลี้ยงเชื้อผสมจากธรรมชาติ (20mM) ก็ยังคงให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ต่ำ แสดงว่าค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำนี้ไม่ได้มาจากความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเทรตอย่างเดียว แต่เป็นเพราะผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายซับสเทรตของอะซิโตเจนด้วย จึงทำให้เกิดกรดที่มากเกินไปซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลง (Stafford และคณะ, 1980) จนถึงจุดที่บัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สามารถรักษาสภาวะให้เหมาะสมได้ (Archer, และคณะ, 1986)

จึงเกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเมธาโนเจน การสร้างแก๊สมีเธนหยุดลง (มรกต ตันติเจริญ และคณะ, 2527) เมื่อเมธาโนเจนตายลงจากภาวะไม่เหมาะสมดังกล่าว จึงไม่มีตัวที่ดึงไฮโดรเจนไปใช้ ดังนั้นไฮโดรเจนที่เกิดจึงเป็นอันตรายต่ออะซิโตเจนเองทำให้ระบบไม่สามารถทำงานได้ ทั้งนี้เกิดเนื่องจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมทาง Thermodynamics (Phelps และคณะ, 1985)

3. การที่เลี้ยงเชื้อทั้งสองกลุ่มในลักษณะของเชื้อบริสุทธิ์แล้ว จึงนำมาผสมกันจะทำให้ประสิทธิภาพของการอยู่ร่วมกันลดลง และมีผลต่อการถ่ายทอดแก๊สไฮโดรเจนระหว่างกัน (Thiele และคณะ , 1988) นั่นคือ แทนที่ไฮโดรเจนซึ่งอะซิโตเจนสร้างจะถ่ายทอดโดยตรงสู่เมธาโนเจน ก็ออกสู่ headspace มากขึ้นทำให้อัตราส่วนการถ่ายทอดแก๊สไฮโดรเจนระหว่างแบคทีเรียสองกลุ่ม (Interspecies Hydrogen Transfer Ratio) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงอัตรา ส่วนของแก๊สไฮโดรเจนที่ถ่ายทอดไปสู่เมธาโนเจน ต่อแก๊สไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นทั้งหมดมีค่าลดลง ทำให้การสร้างมีเธนลดลงจนอาจไม่เกิดขึ้นเลย เพราะจากรายงานของ Conrad และคณะในปี 1985 แสดงให้เห็นว่า การเกิดมีเธนขึ้นอยู่กับการถ่ายทอดไฮโดรเจนระหว่างอะซิโตเจนและเมธาโนเจนที่อยู่ชิดกันในกากตะกอนมากกว่าไฮโดรเจนที่อยู่ในบริเวณรอบนอกของกากตะกอน กล่าวคือ เพียง 5-6% ของแก๊สมีเธนจาก $H_2:CO_2$ มาจากบริเวณรอบนอกนั้น และ 94-95% มาจาก Interspecies Hydrogen Transfer ดังนั้นการถ่ายทอดไฮโดรเจนเป็นกระบวนการสำคัญที่เกิดระหว่างอะซิโตเจนและเมธาโนเจน เพราะฉะนั้นการที่แบคทีเรียสองกลุ่มดังกล่าวอยู่ชิดกันในกากตะกอน จะทำให้การเกิดแก๊สมีเธนเกิดได้สูงสุดและเป็นการหลีกเลี่ยง mass transfer limitation ระหว่างทั้งคู่ จากรายงานของ Thiele และคณะ (1988) แสดงให้เห็นถึงอัตราส่วนของไฮโดรเจนต่อมีเธนที่เกิดใน floc และ free flora ว่ามีค่าประมาณ 1.5 และ 10 ตามลำดับ แสดงว่าไฮโดรเจนที่เกิดใน floc เปลี่ยนเป็นมีเธนได้มากกว่าใน free flora ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่าการเกิดมีเธนโดย flora น้อยกว่าใน floc เพราะฉะนั้นจึงมีการเติมทรายเพื่อเป็นตัวค้ำจุน เพราะเมธาโนเจนมีคุณสมบัติพิเศษคือผลิตโพลีเมอร์ที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ (exopolymer) มาช่วยในการเกาะติดกับตัวค้ำจุนเฉพาะเมื่ออยู่ร่วมกับอะซิโตเจน (Bhatnagar และคณะ, 1991) ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการเริ่มและกระตุ้นให้เกิดการรวมกลุ่มของแบคทีเรีย และถ้าเกิดเร็วเท่าไรก็สามารถย่อยสลายซับสเทรต

ได้เร็ว และเกิดมีเธนมากขึ้นเท่านั้น (Zeikus และ Thiele, 1988)

4. กระบวนการเกิดมีเธนเกิดได้ไม่ดี เพราะมีการพบว่าค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำกว่าค่าเริ่มต้น แสดงว่ามีการทำงานของอะซิโตเจนเกิดการย่อยสลายซับสเทรตแล้วเกิดกรด แต่การที่ไม่พบมีเธนอาจเป็นเพราะกระบวนการเกิดมีเธนเกิดได้ไม่ดี จึงมีการเติม H_2:CO_2 หรือเมธานอลลงไปในหลอดเลี้ยงเชื้อในสัปดาห์ที่สองของการเลี้ยง เพราะพบว่าไฮโดรเจนสามารถช่วยในการกระตุ้นกระบวนการเกิดมีเธน (Zeikus, 1977) และเมธานอลก็เช่นกัน (Oremland และ Polcin, 1982)

5. การใช้ซับสเทรตโพรพิโอนิคนั้นให้มีเธนน้อย เพราะการย่อยสลายกรดโพรพิโอนิคให้เป็น H_2+CO_2 หรือกรดอะซิติค นั่นเป็นขั้นตอนที่เกิดได้ช้า (Brock,1991) ทำให้ประสิทธิภาพในการเกิดมีเธนต่ำ จึงเปลี่ยนมาใช้ซับสเทรตชนิดเดียวคือกรดแลคติค

เมื่อทดลองเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ในการทดลองครั้งต่อไปแล้ว คือ ลดความเข้มข้นของซับสเทรตที่ใช้ ลดอัตราส่วนของอะซิโตเจน ใช้ซับสเทรตแลคติค มีการเพิ่มทรายเป็นตัวค้ำจุน และใส่เมธานอลหรือ H_2:CO_2 ลงไปกระตุ้นกระบวนการเกิดมีเธนแล้ว พบว่าที่ความเข้มข้นซับสเทรต 20 mM ก็ยังคงให้แก๊สมีเธนน้อยมากจนไม่สามารถรายงานได้ และเมื่อวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายหลังการเลี้ยงเชื้อพบว่าเป็นค่าที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเมธาโนเจน คืออยู่ในช่วง 4.59-5.60 ดังตารางที่ 4.6 (ข้อมูลดังตาราง 7 และ 8 ภาคผนวก ง หน้า 107-108)

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าความเป็นกรดด่างโดยเฉลี่ย(3ซ้ำ)ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมชับสเทรตชนิดต่างๆเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคหรือกรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลโดยมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน

ชนิดของเชื้อผสม	ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเชื้อ20mMจากนั้นจึง		
	ไม่เติมตัวกระตุ้นในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ	เติมเมธานอลเป็นตัวกระตุ้นในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ	เติมH_2:CO_2เป็นตัวกระตุ้นในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ
-อะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอล	5.38	5.41	5.40
-อะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอล	5.17	5.29	5.49

สำหรับที่ความเข้มข้นกรดแลคติค 5mM และ 10mM ไม่ว่าจะในสภาวะใดก็ให้แก๊สมีเธนในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้น 20mM และมีการพบว่าเมื่อมีการใช้ $H_2:CO_2$ (80:20) เป็นตัวกระตุ้นกระบวนการเกิดมีเธน จะพบในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อใช้เมธานอลเป็นตัวกระตุ้นหรือเมื่อไม่มีการเติมตัวกระตุ้น ดังรูปที่ 4.12-4.15 (ตารางที่ 4.7-4.18)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3 (nmole)	pH
2:1	98.89	6.76
1:1	110.09	6.58
1:2	114.75	6.77
1:3	133.61	6.70
1:11	145.90	6.71

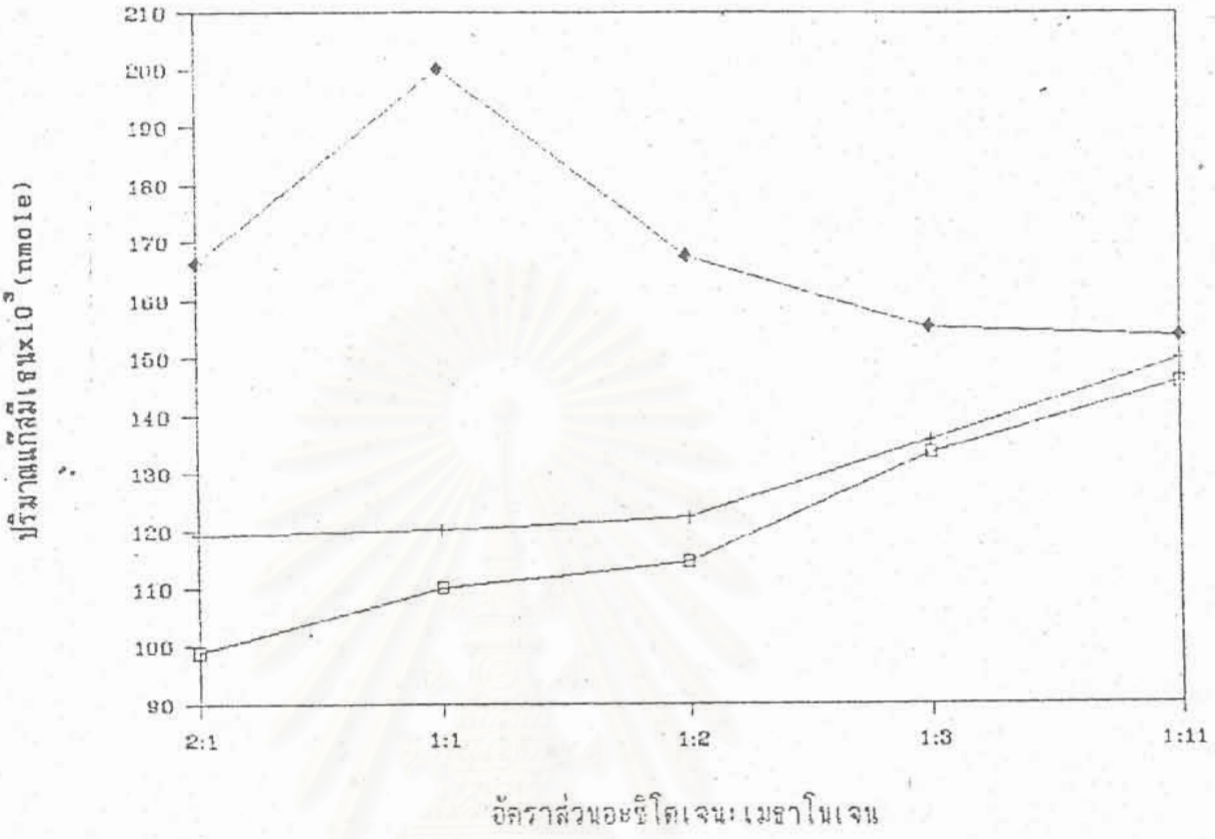
ตารางที่ 4.8 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติมเมธานอล5mMในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3 (nmole)	pH
2:1	119.34	6.68
1:1	120.23	6.56
1:2	122.35	6.71
1:3	135.74	6.71
1:11	149.81	6.71

ตารางที่ 4.9 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติม H_2:CO_2 (80:20)ในวันที่ 14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37 °Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	166.37	6.72
1:1	200.17	6.65
1:2	167.87	6.74
1:3	155.45	6.72
1:11	153.85	6.75

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆเมื่อบ่มเป็นเวลา 42วันโดยที่

- □ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน
- \+ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5mM และเติมเมธานอล 10 mM ในวันที่ 14ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน
- ♦ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5mM และเติม $H_2:CO_2$ (80:20)ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

ตารางที่ 4.10 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	102.19	6.52
1:1	123.41	6.65
1:2	151.55	6.51
1:3	148.82	6.62
1:11	148.10	6.66

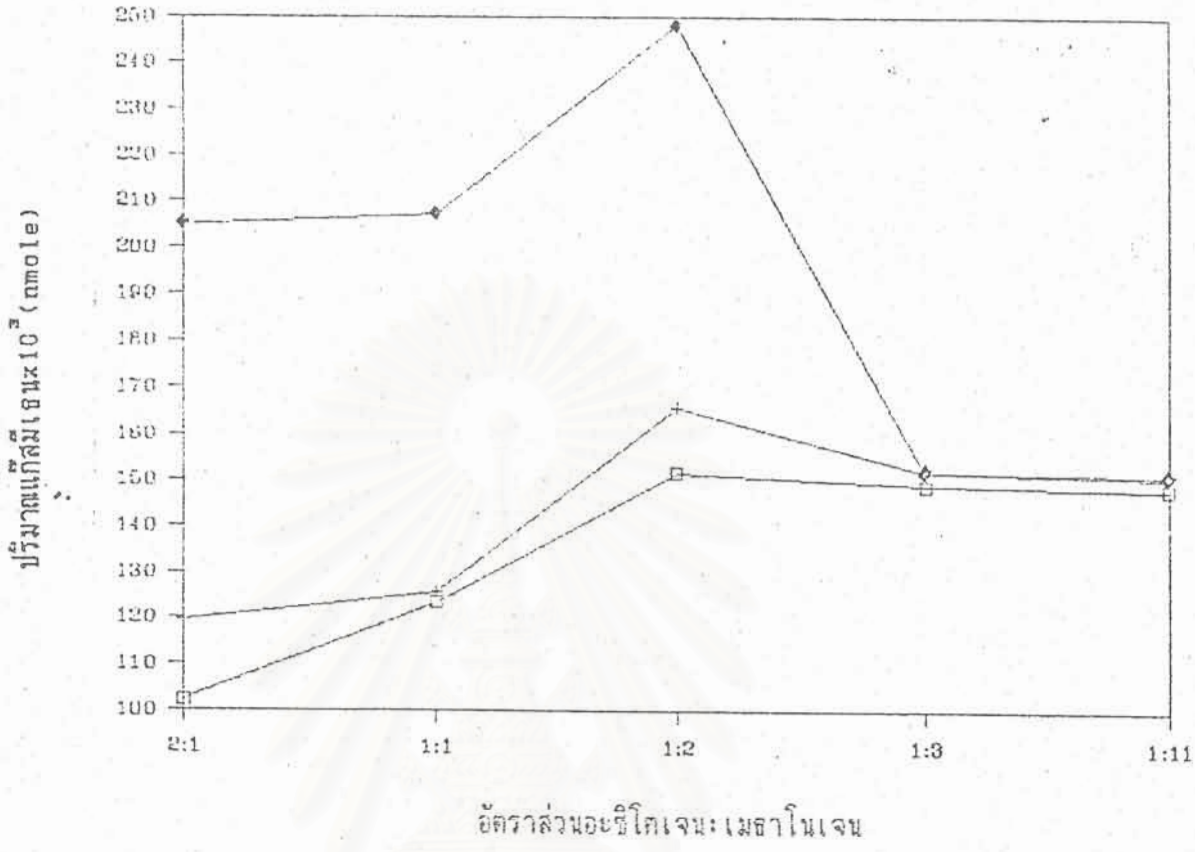
ตารางที่ 4.11 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติมเมธานอล 5mMในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	119.68	6.70
1:1	125.57	6.62
1:2	165.69	6.79
1:3	151.72	6.59
1:11	150.53	6.67

ตารางที่ 4.12 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติม$H_2:CO_2$ (80:20)ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	205.02	6.67
1:1	207.39	6.75
1:2	248.19	6.74
1:3	151.83	6.75
1:11	151.27	6.76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆเมื่อบ่มเป็นเวลา42วันโดยที่

- □ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน
- + มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5mM และเติมเมธานอล 5 mM ในวันที่ 14ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน
- ♦ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5mM และเติม H_2:CO_2 (80:20)ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

ตารางที่ 4.13 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	4.76	6.54
1:1	34.71	6.56
1:2	34.85	6.50
1:3	39.54	6.57
1:11	41.56	6.51

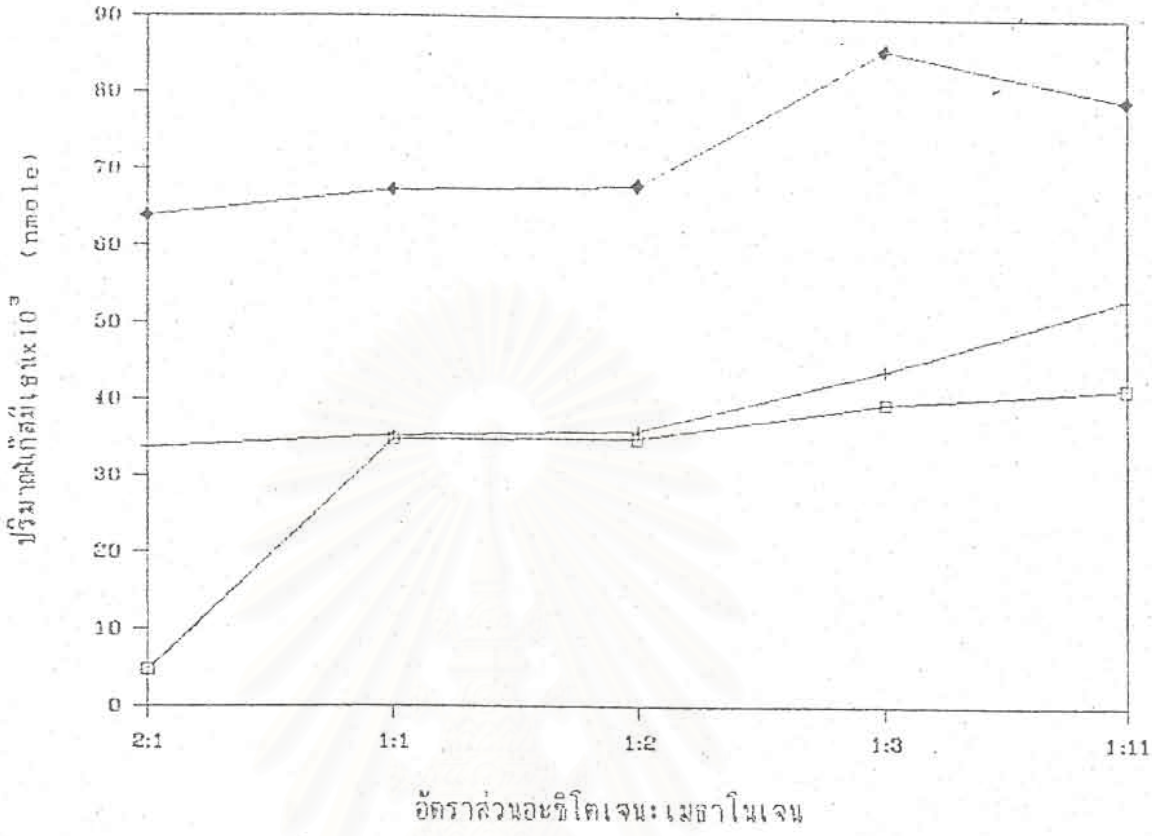
ตารางที่ 4.14 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติมเมธานอล10mMในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	33.68	6.51
1:1	35.19	6.52
1:2	35.84	6.56
1:3	43.95	6.59
1:11	53.30	6.55

ตารางที่ 4.15 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติมH_2:CO_2 (80:20)ในวันที่ 14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	63.85	6.52
1:1	67.30	6.52
1:2	67.89	6.60
1:3	85.82	6.50
1:11	79.22	6.53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.14 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆเมื่อบ่มเป็นเวลา42วันโดยที่

□ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10mMและมีการเติมกรายเป็นตัวค้ำจุน

\+ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10mM และเติมเมธานอล 10 mM ในวันที่ 14ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเติมกรายเป็นตัวค้ำจุน

♦ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10mM และเติม H_2:CO_2 (80:20)ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเติมกรายเป็นตัวค้ำจุน

ตารางที่ 4.16 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	103.14	6.54
1:1	124.98	6.55
1:2	157.51	6.62
1:3	150.11	6.66
1:11	150.47	6.55

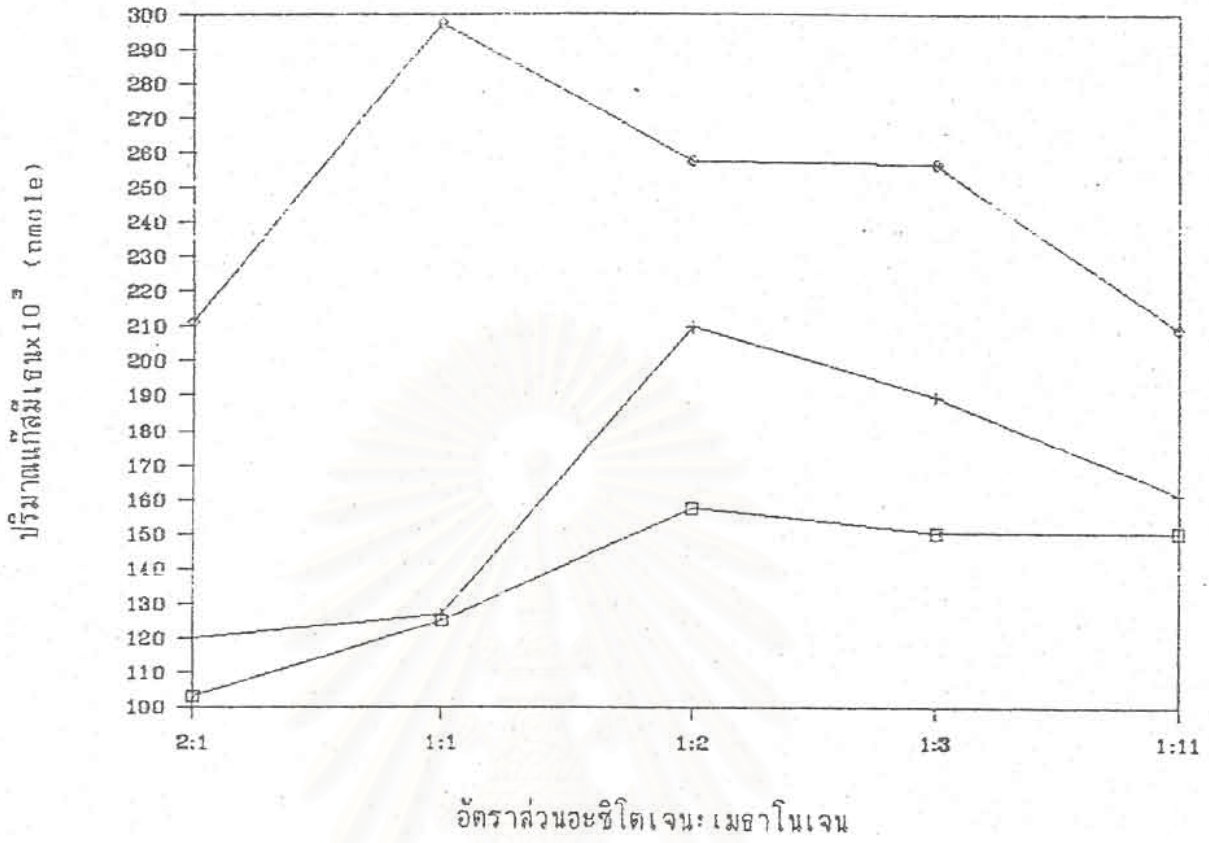
ตารางที่ 4.17 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติมเมธานอล5mMในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	120.01	6.66
1:1	126.78	6.52
1:2	209.68	6.61
1:3	189.28	6.73
1:11	161.23	6.57

ตารางที่ 4.18 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโดเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10มMและมีการเติมH_2:CO_2 (80:20)ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	211.19	6.54
1:1	297.46	6.74
1:2	257.40	6.57
1:3	256.38	6.59
1:11	208.65	6.66

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.15 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆเมื่อบ่มเป็นเวลา42วันโดยที่

□ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

\+ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10mM และเติมเมธานอล 5 mM ในวันที่ 14ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

♦ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10mM และเติม $H_2:CO_2$ (80:20)ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

ซึ่งเมื่อพิจารณาผลการทดลองในระดับหลอดทดลองแล้ว พบว่าปัจจัยสำคัญที่เป็นไปได้ในการทำให้เกิดมีเธนมากขึ้น คือการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของซับสเทรต การเติมเมธานอลหรือ $H_2:CO_2$ ลงไปกระตุ้นกระบวนการเกิดมีเธน และการเติมกรายเป็นตัวค้ำจุน

สำหรับอัตราส่วนของอะซิโตเจนต่อเมธาโนเจนนั้น เมื่อใช้อัตราส่วนเติม คือ 2:1, 1:1, 1:2 และ1:3 ก็ปรากฏว่ามีการผลิตแก๊สมีเธนโดยจะให้มีเธนมากที่สุดที่อัตราส่วนหนึ่งของอะซิโตเจนต่อเมธาโนเจน ซึ่งกรณีนี้อาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ต้องพิจารณาร่วมกับการมีตัวค้ำจุน เพื่อประโยชน์ในการส่งถ่ายสารอาหารที่จำเป็นให้แก่กัน

จากผลการทดลอง พบว่าไม่ว่าจะเป็น อะซิโตเจน จากกรดแลคติค หรือกรดโพรพิโอนิคก็ตาม เมื่อนำมาผสมกับเมธาโนเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการใช้ซับสเทรตแลคติค ใช้กรายเป็นตัวค้ำจุนและมีการเติม $H_2:CO_2$ (80:20) ลงในสัปดาห์ที่สองของการเลี้ยงเชื้อนั้น จะเกิดแก๊สมีเธนมากที่สุดเมื่อเทียบในสภาวะเดียวกัน นั้นเป็นเพราะว่าไฮโดรเจนเป็นตัวกระตุ้นกระบวนการเกิดมีเธนได้ดีกว่า และเมธาโนเจนสามารถดึง $H_2:CO_2$ ไปใช้ได้ดีกว่าเมธานอล

เมื่อพิจารณาความเป็นกรดด่างภายหลังการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นซับสเทรต 5mM พบว่าค่าอยู่ระหว่าง 6.51-6.79 (ตารางที่ 4.7-4.18) และสำหรับค่าความเป็นกรดด่างภายหลังการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นซับสเทรต 10mM นั้นอยู่ระหว่าง 6.50-6.74 ซึ่งทั้งสองสภาวะเป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเมธาโนเจน จึงทำให้กระบวนการเกิดมีเธนเกิดขึ้นได้ดี เพราะฉะนั้นถ้าสามารถควบคุมความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก็จะเป็นผลดีต่อระบบ (McFarland และ Jewell, 1989)

เมื่อเปรียบเทียบ ในสภาวะของความเข้มข้นที่ต่างกัน คือ 5mM และ 10mM พบว่าที่ความเข้มข้นซับสเทรต 5mM นั้น เมื่อใช้อะซิโตเจนจากกรดโพรพิโอนิคผสมกับเมธาโนเจนจะให้ปริมาณแก๊สมีเธนมากกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้น 10 mM และในทางกลับกันที่ความเข้มข้น 10 mM เมื่อใช้อะซิโตเจนจากกรดแลคติคผสมกับเมธาโนเจนจะให้ปริมาณแก๊สมีเธนมากกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้น 5 mM แสดงว่าความเข้มข้นของซับสเทรตที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของอะซิโตเจน ที่เป็นดังนี้เพราะว่า อะซิโตเจนที่ได้จาก

กรดโพรพิโอนิค มีความสามารถในการย่อยสลายกรดแลคติคได้น้อยกว่าอะซิโตเจนจากกรดแลคติค ทั้งนี้เนื่องจากอะซิโตเจนจากกรดโพรพิโอนิคต้องใช้เวลาในการปรับตัวให้เข้ากับซับสเทรต ดังนั้นเมื่อใช้ซับสเทรตความเข้มข้นสูงจึงเกิดภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของอะซิโตเจนที่แยกจากกรดโพรพิโอนิค ทำให้ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดมีค่าน้อยกว่า ส่วนอะซิโตเจนที่ได้จากกรดแลคติคมีความสามารถในการย่อยสลายกรดแลคติคได้มาก ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นซับสเทรตสูงกว่าก็สามารถเกิดซับสเทรตของเมธาโนเจนได้มากกว่า จึงเกิดมีเธนมากกว่า

เมื่อเปรียบเทียบในสภาวะของความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าเมื่อใช้อะซิโตเจนจากกรดแลคติคจะเกิดมีเธนมากกว่าเมื่อใช้อะซิโตเจนจากกรดโพรพิโอนิค ที่เป็นดังนี้เพราะอะซิโตเจนจากกรดแลคติคสามารถย่อยสลายกรดแลคติคได้ดีกว่า จึงเกิดซับสเทรตสำหรับเมธาโนเจนดีกว่าอะซิโตเจนจากกรดโพรพิโอนิค

จากผลการทดลองสามารถบอกได้ว่า ความเข้มข้นและชนิดของซับสเทรตที่ใช้การเติมตัวกระตุ้นกระบวนการเกิดแก๊สมีเธนในสัปดาห์ที่สองของการเลี้ยงเชื้อ และการใช้ตัวค้ำจุนนั้นมีผลต่อปริมาณแก๊สมีเธน

นอกจากนี้มีการพบว่า ตัวค้ำจุนที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมความสามารถในการรวมกลุ่มและเกาะติดของแบคทีเรียกับมัน ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ (Isa และคณะ, 1986) เพราะนอกจากประโยชน์ในการอยู่ชิดกันของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มในกากตะกอนแล้ว ยังมีประโยชน์ในการกำจัดซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรียซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยในสภาวะแวดล้อมเดียวกับเมธาโนเจน (Parkin และคณะ, 1991) และแย่งเมธาโนเจนในการใช้ซับสเทรตเดียวกัน เช่นการใช้แก๊สไฮโดรเจน (Banat และคณะ, 1983) การใช้เมธานอล (Nanninga และ Gottschal, 1987) และมักจะมีความสามารถในการใช้ซับสเทรตดีกว่าด้วย (Lovley และคณะ, 1982) นอกจากนี้ระบบที่มีซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรียอยู่ จะสร้างซัลไฟด์ซึ่งเป็นพิษต่อเมธาโนเจน (Pichon และคณะ 1988) เพราะฉนั้นถ้าตัวค้ำจุนดีเมธาโนเจนก็สามารถเกาะตัวค้ำจุนได้ดีกว่าซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรีย ทำให้สามารถเจริญเติบโตได้มากกว่าและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์และเกิดเป็นมีเธนได้ดี (Isa และคณะ, 1986)

เมื่อได้กากตะกอนหลักชั้งเกิดจากแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มแล้ว ก็สามารถเพิ่มประโยชน์ใช้งาน โดยการเพิ่มแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถย่อยสลายหรือลดความเป็นพิษของสารในน้ำเสียได้ เช่นเพิ่มแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้เพนตาคลอโรฟีนอลเข้าไปในกากตะกอน จะได้กากตะกอนเร่งชนิดใหม่ที่สามารถเกิด Anaerobic Dechlorination ของเพนตาคลอโรฟีนอล หรือเปอร์คลอโรเอทธิลีน (Bhatnagar และคณะ, 1991)

การที่สร้างกากตะกอนจากแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้ยังมีประโยชน์ เพราะการออกแบบในลักษณะดังกล่าวเป็นการแยกแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มออกจากไฮโดรไลติคแบคทีเรียซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 5-6 และก็ยังสามารถทำงานต่อไปได้จนค่าความเป็นกรดด่างลดลงถึง 4.5-5.0 ซึ่งเป็นค่าที่จำกัดการเจริญของเมธาโนเจน

เมื่อศึกษาจนได้อัตราส่วนของอะซิโตเจนและเมธาโนเจนที่เหมาะสมแล้วยังต้องศึกษาต่อถึงสมบัติในการทนต่อการแกว่ง (Fluctuation) ของอัตราการเติมซับสเทรต ความสามารถในการทนต่อออกซิเจน ความสามารถในการเกาะติดกับตัวค้ำจุนต่างๆ ทั้งนี้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการบำบัด (Chartrain และคณะ, 1987) และเมื่อนำไปใช้จริงในบ่อบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศ จะต้องมีการตักกากตะกอนจากบ่อเดิมทิ้ง เพราะในระบบดังกล่าวมักมีซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรียอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวจะมีความสามารถในการใช้ซับสเทรตดีกว่าเมธาโนเจน ทำให้กากตะกอนที่ปรับปรุงแล้ว (Design granule) ทำงานไม่ดี ดังจะเห็นจากรายงานของ Sorensen และคณะ ในปี 1981 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าถ้าไม่มีกระบวนการซัลเฟตรีดักชัน (Sulfate Reduction) ที่เกิดโดยการทำงานของซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรียแล้ว แอคติวิตีของกระบวนการเกิดมีเธนจะเพิ่มจาก 2 $nmolg^{-1}hr^{-1}$ เป็น 3 $nmolg^{-1}hr^{-1}$ แต่ถ้าพบการเจริญเติบโตของซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรีย จะทำให้ปริมาณมีเธนที่เกิดลดลง (Yadav และ Archer, 1989)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายซับสเทรตเพื่อให้เกิดมีเธนได้ดีที่สุดคือ

1. ชนิดของซับสเทรตที่ใช้ พบว่าการใช้กรดแลคติคเป็นซับสเทรตที่ดีกว่าการใช้กรดโพรพิโอนิค

2. ความเข้มข้นของซับสเทรตที่ใช้ต้องไม่สูงเกินไป ซึ่งในที่นี้ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 5 mM และ 10 mM ขึ้นอยู่กับชนิดของอะซิโตเจน

3. การเติมเมธานอลหรือ $H_2:CO_2$ ลงไปเป็นตัวกระตุ้นกระบวนการเกิดแก๊สมีเธนในสัปดาห์ที่สองของการเลี้ยงเชื้อจะทำให้เกิดมีเธนมากกว่าเมื่อไม่เติม และพบว่า $H_2:CO_2$ (80:20) จะทำให้ปริมาณมีเธนสูงกว่าเมื่อใช้เมธานอล

4. การมีตัวค้ำจุนให้แบคทีเรียยึดเกาะ เป็นการส่งเสริมการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนและเมธาโนเจน ดังนั้นปริมาณมีเธนที่ได้เมื่อใช้ตัวค้ำจุนจึงมีค่าสูง

5. อัตราส่วนของอะซิโตเจนต่อเมธาโนเจนที่ให้ปริมาณมีเธนสูงที่สุดในแต่ละสภาวะของการทดลอง ไม่สามารถนำไปใช้กับทุกกากตะกอน เนื่องมาจากกากตะกอนที่ได้รับจากแต่ละโรงงานอุตสาหกรรมมีเชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกัน

โดยสรุปพบว่าสภาวะที่ทำให้เกิดแก๊สมีเธนในปริมาณมากนั้น แบ่งเป็นสองสภาวะ คือ ถ้าใช้อะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติค ความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเทรตที่ดีนั้นคือ 10 mM โดยใช้กรดแลคติคเป็นซับสเทรต และมีการเติม $H_2:CO_2$ (80:20) ลงในสัปดาห์ที่สองของการเลี้ยงเชื้อ มีทรายเป็นตัวให้แบคทีเรียยึดเกาะ โดยมีอัตราส่วนอะซิโตเจนต่อเมธาโนเจนที่เหมาะสม คือ 1:1 และเกิดแก๊สมีเธน 2.97×10^5 mmole

และเมื่อใช้อะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิค ความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเทรตที่ดีนั้น คือ 5 mM โดยใช้กรดแลคติคเป็นซับสเทรต และมีการเติม $H_2:CO_2$

(80:20) ลงในสัปดาห์ที่สองของการเลี้ยงเชื้อ มีทรายเป็นตัวให้แบคทีเรียยึดเกาะ โดยมีอัตราส่วนอะซิโตเจนต่อเมธาโนเจนที่เหมาะสม คือ 1:1 และเกิดแก๊สมีเธน $2.00x10^5$ nmole

นอกจากนี้ได้มีการทำการทดลองเพิ่มเติม เพื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพของตัวค้ำจุนชนิดต่างๆอันได้แก่ ทราย อลูมินา และดิน พบว่าอลูมินามีแนวโน้มที่จะให้ปริมาณแก๊สมีเธนที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับทรายและดิน ดังนั้นในการนำไปใช้งานในภาคปฏิบัติควรได้มีการทำการทดลองซ้ำ เพื่อหาตัวค้ำจุนที่ดีอันจะให้ประโยชน์สูงสุดในการนำไปใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จันทรา ทองค่าเภา และ วรรณี พฤฒิถาวร. 2526. การกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม. จดหมายข่าวสภาวะแวดล้อม. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ปีที่ 2. เล่มที่ 3. หน้าที่ 1-16

มรกต ตันติเจริญ, ศักรินทร์ ภูมิรัตน์ และชเนศ อุทิศธรรม. 2527. การผลิตพลังงานจากของเสียของโรงงานสับปะรดกระป๋อง. จดหมายข่าวสภาวะแวดล้อม. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ปีที่ 3. เล่มที่ 4. หน้าที่ 7-15

สุจินต์ พนาปวุฒิกุล. 2528. การใช้น้ำกากส่าจากโรงงานสุราในการผลิตแก๊สชีวภาพและทำปุ๋ยอินทรีย์ชนบท. จดหมายข่าวสภาวะแวดล้อม. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ปีที่ 3. เล่มที่ 2. หน้าที่ 1-4 อ้างถึงในสันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2528. การคัดเลือกเชื้อราเพื่อใช้ในการฟอกสีน้ำกากส่า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2528.

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2528. การคัดเลือกเชื้อราเพื่อใช้ในการฟอกสีน้ำกากส่า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2528.

ภาษาอังกฤษ

Archer, D., B., Hilton, M., G., Adams, P., and Wiecko, H., 1986. Hydrogen as a Process Control Index in a Pilot Scale Anaerobic Digestion. Biotechnology Letters. 8(3):197-202

Banat, I., M., Nedwell, D., B., Balba, M., T., 1983. Stimulation of Methanogenesis by Slurries of Saltmarsh Sediment after the addition of Molybdate to inhibit Sulfate Reducing Bacteria. Journal of Microbiology. 129: 123-129.

Bhatnagar, L., Wu, W-M., Jain, M., K., and Zeikus, J., G., 1991. Design and Function of Biomethanation granules for Harzadous Waste Treatment. Proceedings International Symposium on Environmental Biotechnology. 1-10.

Brock, T., D., and Madigan, M., T., 1991. Biology of Microorganism. 16th.ed., Prentice Hall, New Jersey, USA.

Bryant, M.,P., 1979. Microbial Methane Production-Theoretical Aspects. Journal of Animal Science. 48(1).

Chartrain, M., Bhatnagar, L., and Zeikus, J., G., 1987. Microbial Ecophysiology of Whey Biomethanation: Comparison of Carbon Transformation Parameters, Species composition, and Starter Culture performance in Continuous Culture. Appl. and Env. Microbiol. 53(5): 1147-1156.

Chavadej, S., 1990. Application of Anaerobic Treatment for Agro-industrial Wastes in Thailand. Paper presented at regional Workshop on Anaerobic Treatment Technique of Wastewaters from Agro-industry., Thailand. 22-23 May, 1990.

Conrad, R., Phelps, T., J., and Zeikus, J., G., 1985. Gas Metabolism Evidence in support of the juxtaposition of Hydrogen-porducing and Methanogenic Bacteria in Sewage sludge and Lake sediments. Appl. and Env. Microbiol. 50(3): 595-601.

Dararatana, S., Ploypatarapinyo, P., and Klintsukont, C., 1990. Treatabilities Studies of Wastewater from Cassava Alcohol Production Plant By UASB. Paper presented at Regional Workshop on Anaerobic Treatment Techniques of Wastewaters from Agro-industry. 22-23 May, 1990

Gottschalk, G., 1986. Bacterial Metabolism. 2nd.ed. Springer-Verlag. New York Inc.

Harada, H., 1990. High Rate Performance of UASB Process for Treatment of High-strength Wastewaters. Paper presented at Regional Workshop on Anaerobic Treatment Techniques of Wastewaters from Agro-industry. 22-23 May, 1990

Hungate, R., E., 1969. Method in Microbiology. Academic Press Inc, New York.

Isa, Z., Grusenmeyer, S., and Verstraete, W., 1986. Sulfate Reduction Relative to Methane Production in High-Rate Anaerobic Digestion: Microbial Aspects. Appl. and Env. Microbiol. 51(3): 580-587.

Jain, M., K., Bhatnagar, L., and Zeikus, J., G., 1988. A Taxonomic Overview of Methanogens. Indian J. Microbiol. 28(3): 143-147.

————Bhatnagar, L., and Zeikus, J., G., 1990. Biochemical pathways for Methane Fermentation and use of Granulated Biomass for High-Rate Anaerobic Digestion. Report at the International Conference on Biogas, India.

————Bhatnagar, L., and Zeikus, J., G., 1991. Anaerobic Microbiology A Practical Approach. Oxford: JRL Press.

Khan, A., W., and Trottier, T., M., 1978. Effect of S-Containing compounds on Anaerobic Degradation of Cellulose to Methane by Mixed cultures obtain from Sewage Sludge, Appl. and Env. Microbiol. 35(6): 1027-1034

Karhadkar, P., P., Audic, J-M., Faup, G., M., and Khanna, P., 1987. Sulfide and Sulfate Inhibition of Methanogenesis. Wat. Res. 21(9): 1061-1066.

Labat, M., and Garcia, J., L., 1986. Study on the development of Methanogenic Microflora during Anaerobic Digestion of Sugar beet Pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 163-168.

Lovley, D., R., Dwyer, D., F., and Klug, M., J., 1982. Kinetic Analysis of Competition between Sulfate Reducers and Methanogens for Hydrogen in Sediments, Appl. and Env. Microbiol. 43(6): 1373-1379.

Lun, S-Y., and Chen, J., 1992. The Contribution of IHT to the Substrate Removal in Methanogenesis. Process Biochem. 27: 285-289

McCartney, D., M., and Oleszkiewicz, 1991. Sulfide Inhibition of Anaerobic Degradation of Lactate and Acetate. Wat. Res. 25(2): 203-209.

Mc.Inerney, M., J., and Bryant, M., P., 1979. Metabolic stages and Energetics of Microbial Anaerobic Digestion. Paper presented at The First Symposium of Anaerobic Digestion held at Cardiff University.

Mc.Farland, M., J., and Jewell, W., J., 1989. *In Situ* Control of Sulfide Emissions during the Thermophillic (55°C) Anaerobic Digestion Process. Wat. Res., 23(12):1571-1577

Merrill, R., and Merrill, Y., 1973. Methane Digestors for Fuel gas and Fertilizer. 12nd.ed., Santa Barbara.

Nanninga, H., J., and Gottschal, J., C., 1987. Properties of *Desulfovibrio carbinolicus* sp. NOV and other Sulfate Reducing Bacteria Isolated from an Anaerobic-Purification Plant. Appl. and Env. Microbiol. 53: 802-809

Oremland, R., S., and Polcin, S., 1982. Methanogenesis and Sulfate Reduction: Competitive and Non-competitive Substrates in Estuarine Sediments. Appl. and Env. Microbiol. 44(6): 1270-1276.

Parkin, G., F., Sneve, M., A., and Loos, H., 1991. Anaerobic Filter Treatment of Sulfate-Containing Wastewaters. Wat. Sci.Tech., 23:1283-1291.

Pichon, M., Rouger, J., and Junet, E., 1988. Anaertobic Treatment of Sulfur-Containing Effluent. Wat.Sci. Tech., 20(1): 133-141.

Phelps, T., J., Conrad, R., and Zeikus, J., G., 1985. Sulfate dependent IHT between *M. barkeri* and *D. vulgaris* during Coculture Metabolism af Acetate or Methanol. Appl. and Env. microbiol. 50(3): 589-594.

Sorensen, J., Christensen, D., and Jorgensen, B., B., 1981. Volatile Fatty Acids and Hydrogen as Substrates for Sulfate Reducing Bacteria in Anaerobic Marine Sediments. Appl. and Env. Microbiol. 42(1): 5-11.

Stafford, D., A, Hawkes, D., L., and Horton, R., 1980. Methane Production from Waste Organic Matter. np: CRC Press.

Thiele, J., H., Chartrain, M., and Zeikus, J., G., 1988. Control of Interspecies Electron flow during Anaerobic Digestion: Role of floc formation in Syntrophic Methanogenesis. Appl. and Env. Microbiol. 54(1), 10-19.

Thiele, J., H., Wu, W-M., and Jain, M., K., 1990. Ecoengineering High Rate Anaerobic Digestion Systems: Analysis of Improved Syntrophic Biomethanation Catalysts. Biotechology and Bioeengineering. 35: 990-999

Yadav, V., K., and Archer, D., B., 1989. Sodium Molybdate Inhibits Sulfate Reduction in the Anaerobic Treatment of High-Sulfate Molasses Wastewater. Appl. Microbiol. Biotechnol., 31: 103-106.

Yang, S-T., and Guo, M., 1991. A Kinetic Model for Methanogenesis from Whey Permeate in A Packed Bed Immobilized cell Bioreactor. Biotechnology and Bioengineering. 37: 375-382.

Zeikus, J., G., 1977. The Biology of Methanogenic Bacteria. Bacteriological Reviews. 41(2): 514-541.

Zeikus, J., G., and Thiele, J., H., 1988. Control of Interspecies Electron Flow during Anaerobic Digestion: Significance of Formate Transfer versus Hydrogen Transfer during Syntrophic Methanogenesis in Flocs. Appl. and Env. Microbiol. 54(1): 20-29.

Zinder, S., H., 1988. Conversion of Acetic acid to Methane by Thermophiles. 5th. International Symposium on Anaerobic Digestion.

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

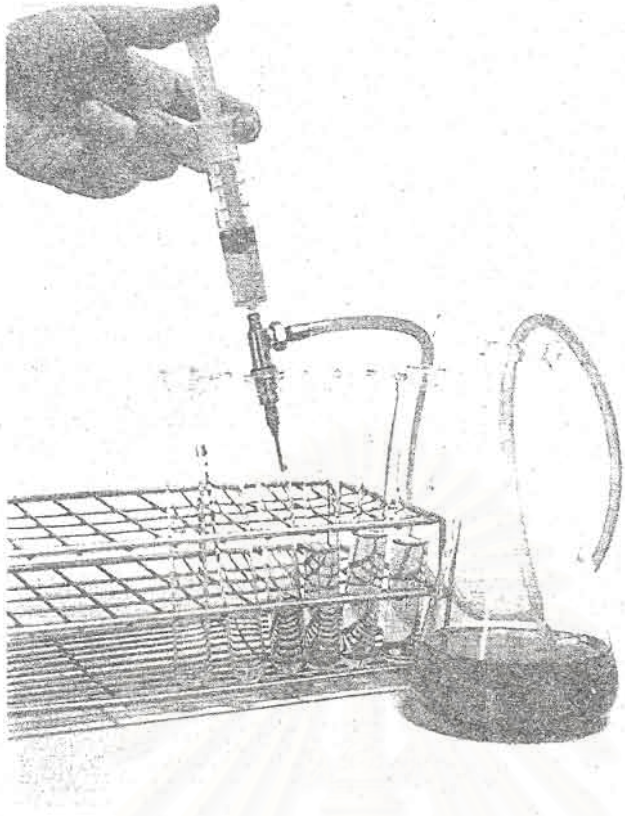
1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐาน (Liquid Phosphate-Buffered Basal Medium)

น้ำกลั่น	945	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์	0.9	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	1	กรัม
TRACE MINERAL	10	มิลลิลิตร
สารละลายรีซาซูลิน	1	มิลลิลิตร

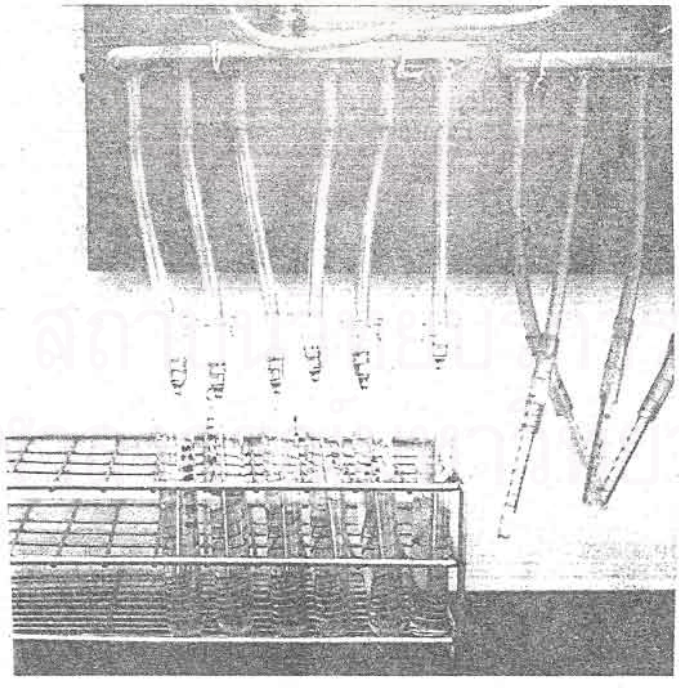
ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.4 ต้มภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน บรรจุลงหลอดทนความดัน หลอดละ 9.5 มิลลิลิตร (รูปที่ 1) ไล่อากาศโดยใช้แก๊สไนโตรเจน (OFN) (รูปที่ 2) ปิดด้วยจุกยาง (รูปที่ 3) และผนึกด้วยฝาอลูมิเนียม (รูปที่ 4) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที หลังจากนั้น นำมาเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 มิลลิลิตร, สารรีดิวซ์ 0.1 มิลลิลิตร, สารละลายวิตามิน 0.1 มิลลิลิตร และซับสเทรตต่างๆ ความเข้มข้น 1000 มิลลิโมลาร์ 0.2 มิลลิลิตร โดยการเติมสารทั้งหมดนี้ ใช้เข็มเบอร์ 23 โดยเทคนิคปลอดเชื้อ แสดงดังรูปที่ 5 และ 6 จะได้หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร (รูปที่ 7)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพื้นฐาน

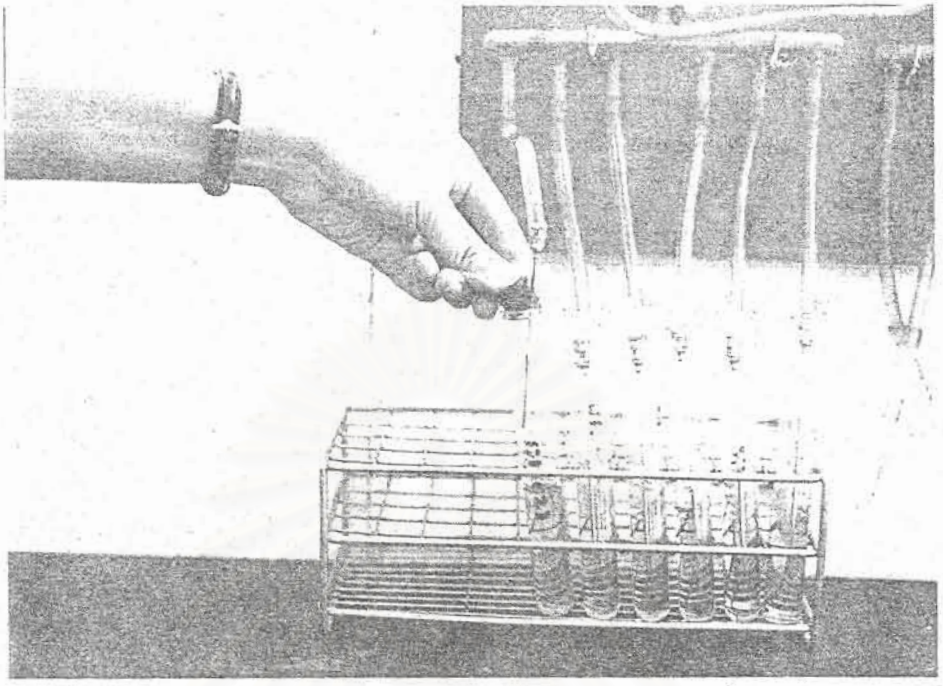
สูตรอาหารเหมือนข้อ 1 แต่มีการเติมวุ้น 1.5 % ในแต่ละหลอด โดยบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2.85 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีผงวุ้น จากนั้นผ่านกรรมวิธีเช่นเดียวกับข้อ 1 จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แสดงดังรูปที่ 8



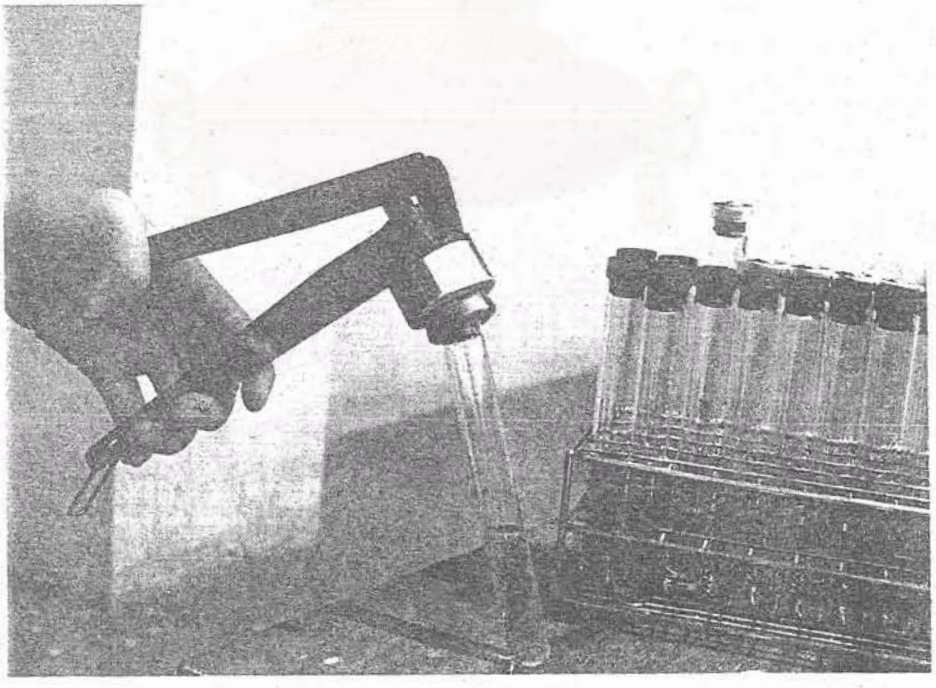
รูปที่ 1 การบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวลงหลอดทนความดัน



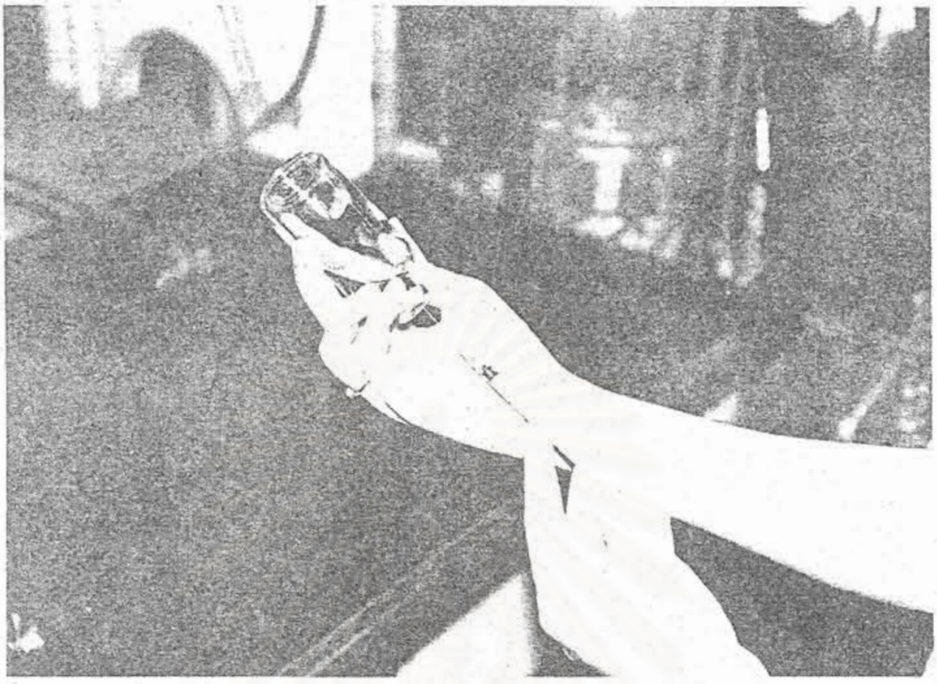
รูปที่ 2 การไล่อากาศจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยใช้แก๊สไนโตรเจน (OFN)



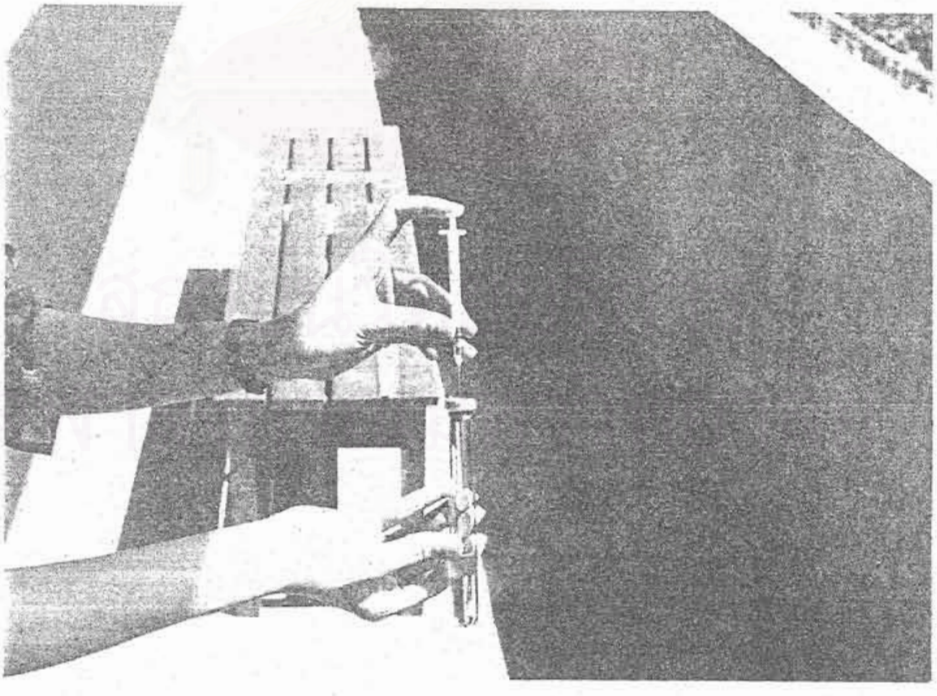
รูปที่ 3 การปิดหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยจุกยาง



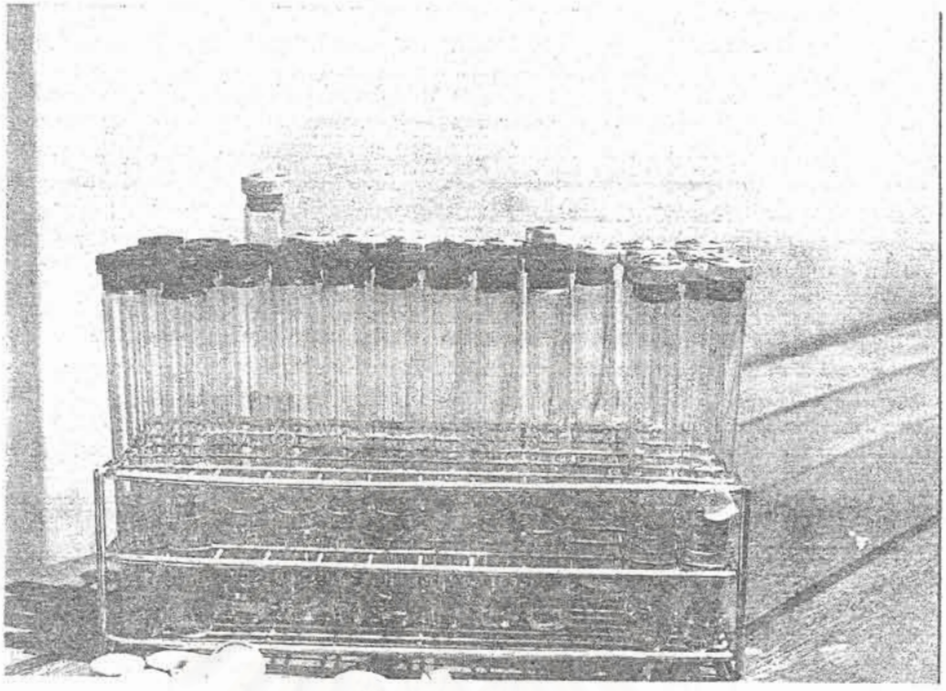
รูปที่ 4 การปิดหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยฝาอลูมิเนียม



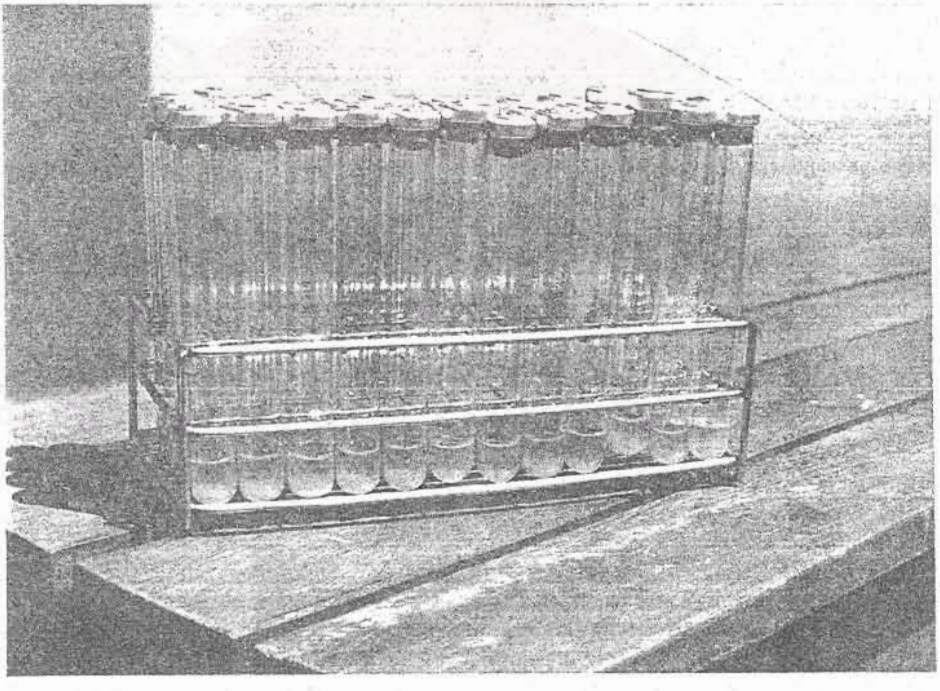
รูปที่ 5 วิธีการนำซับสเทรตออกจากขาด



รูปที่ 6 การเติมซับสเทรตลงหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 7 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว



รูปที่ 8 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	75	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	145	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ประมาณ 6.8-7.2 จากนั้นบรรจุลงขวดทนความดัน ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน ปิดด้วยจุกยาง และผนึกด้วยฝาอลูมิเนียม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที

2. สารละลายรีซาซูรินอินดิเคเตอร์

ละลายสีย้อมรีซาซูริน 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายรีดิวซ์ซิสเตอิน-ซัลไฟด์

ซิสเตอิน-ไฮโดรคลอไรด์	12.5	กรัม
โซเดียมซัลไฟด์	12.5	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์		
น้ำกลั่นที่ไล่แก๊สออก	1	ลิตร

ละลายซิสเตอิน-ไฮโดรคลอไรด์ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 9.5 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นเติมโซเดียมซัลไฟด์และเติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร บรรจุลงขวดทนความดัน ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน ปิดด้วยจุกยาง และผนึกด้วยฝาอลูมิเนียม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว 14 นาที

4. สารละลายเทรซมิเนอรัล

ไนไตรโลไตรอาซิติค	6.4	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต	0.05	กรัม
แมงกานิสคลอไรด์	0.05	กรัม

โคบอลท์คลอไรด์	0.085	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.05	กรัม
ซิงค์คลอไรด์	0.05	กรัม
คอปเปอร์คลอไรด์	0.01	กรัม
H_3BO_3	0.005	กรัม
โซเดียมโมลิบเดท	0.005	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5	กรัม
Na_2SeO_3	0.085	
นิกเกิลซัลเฟต	0.0013	กรัม
โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์		
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ละลายไนไตรโลไตรอาซิติคในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.5 โดยใช้โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ แล้วจึงเติมสารตัวอื่นๆ ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วบรรจุลงขวด ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

5. <u>สารละลายวิตามิน</u>

ไบโอติน	0.001	กรัม
กรดโฟลิค	0.001	กรัม
บี6(ไพริดอกซิน)ไฮโดรคลอไรด์	0.005	กรัม
บี1(ไทอามิน)ไฮโดรคลอไรด์	0.0025	กรัม
บี2(ไรโบฟลาวิน)	0.0025	กรัม
นิโคตินิค(ไนอาซิน)	0.0025	กรัม
แพนโทเทนิค	0.0025	กรัม
บี12(ไซยาโนโคบาลามิน)	0.00005	กรัม
พาราอมิโนเบนโซอิค	0.0025	กรัม
กรดลิโปอิค	0.0025	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายน้ำ และบรรจุลงขวด ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนนำมาใช้ต้องกรองผ่านเยื่อกรองที่มี Pore size ขนาด 0.2 ไมครอน

6. ซับสเทรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

6.1 กรดโพรพิโอนิค

6.2 กรดแลคติค

6.3 กรดอะซิติค

6.4 เมธานอล

6.5 กรดฟอร์มิค

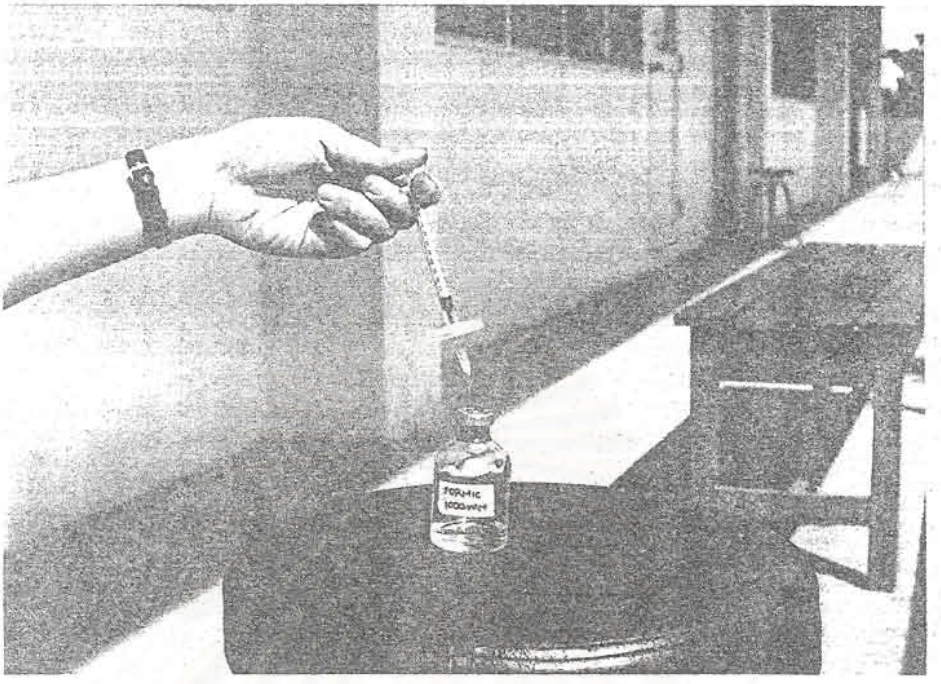
6.6 แก๊สไฮโดรเจน:คาร์บอนไดออกไซด์ (80:20)

ซับสเทรตในข้อ 6.1-6.5 บรรจุลงขวดปลอดเชื้อโดยผ่านเยื่อกรองที่มี Pore size ขนาด 0.2 ไมครอน แสดงดังรูปที่ 9 และ 10

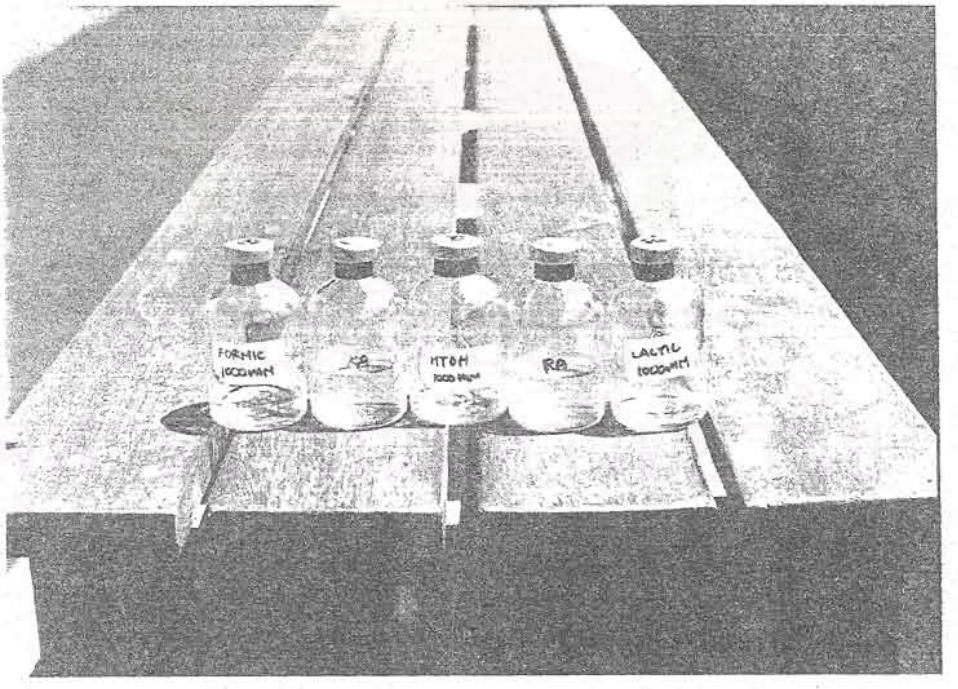
เวลาเติมซับสเทรตลงอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมโดยใช้เข็มเบอร์ 23 โดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยถ้าซับสเทรตเป็น (80:20)แก๊สไฮโดรเจน:คาร์บอนไดออกไซด์ ให้ใช้ความดัน 1 atm เป็นเวลา 5 นาที

7. คิวปริกออกไซด์ที่ใช้บรรจุในหลอดแก้วภายในท่อทองแดง

บรรจุใยแก้วลงหลอดแก้วพอประมาณ แล้วจึงเติม Cu_2O ลงไป กะระยะให้ตำแหน่งของ Cu_2O ภายในอยู่บริเวณท่อทองแดงเมื่อเปิดฝา จากนั้นจึงบรรจุใยแก้วด้านบนอีกครั้ง Cu_2O ตัวนี้จะเป็นตัวจับแก๊สออกซิเจนที่อาจมีปนอยู่ในแก๊สไนโตรเจนแล้วเปลี่ยนเป็น CuO เมื่อใช้สักระยะหนึ่งประสิทธิภาพของการจับออกซิเจนจะลดลง ให้นำไปทำการ Regenerate โดยการผ่านแก๊ส $H_2:CO_2$ (80:20) ไปในท่อแก้วที่บรรจุ CuO สักระยะ



รูปที่ 9 แสดงการบรรจุซีบสเทรตลงขวดปลอดเชื้อโดยผ่านเยื่อกรอง



รูปที่ 10 ขวดเก็บซีบสเทรต

1. การทำเส้นกราฟมาตรฐานของแก๊สมีเธน

1.1 วิธีเตรียมแก๊สมีเธนมาตรฐาน

ไล่อากาศออกจากขวดทนความดันขนาด 60 มิลลิลิตร โดยใช้แก๊สไนโตรเจน OFN จากนั้นจึงปิดจุกยาง และผนึกด้วยฝาอลูมิเนียม แล้วจึงบรรจุแก๊สไนโตรเจนลงขวด โดยผ่านเข็มเบอร์ 23 ขณะเดียวกับใช้เข็มเบอร์23 ปล่อยแก๊สภายในออก เป็นเวลา 10 นาที นำมาเตรียมแก๊สมีเธนที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 30, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 11)

1.2 วิธีเตรียมการวิเคราะห์

ใช้หลอดฉีดยาเก็บความดันขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดแก๊สมีเทนที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี ซึ่งมีสภาวะในการทำงานดังนี้

อุณหภูมิคอลัมน์	70°C
อุณหภูมิบริเวณฉีดตัวอย่างและเครื่องตรวจวัด	120°C
แก๊สฮีเลียมซึ่งใช้เป็นแก๊สพา มีอัตราการไหล	30 มิลลิลิตรต่อนาที
กระแสไฟฟ้า	80 มิลลิแอมแปร์

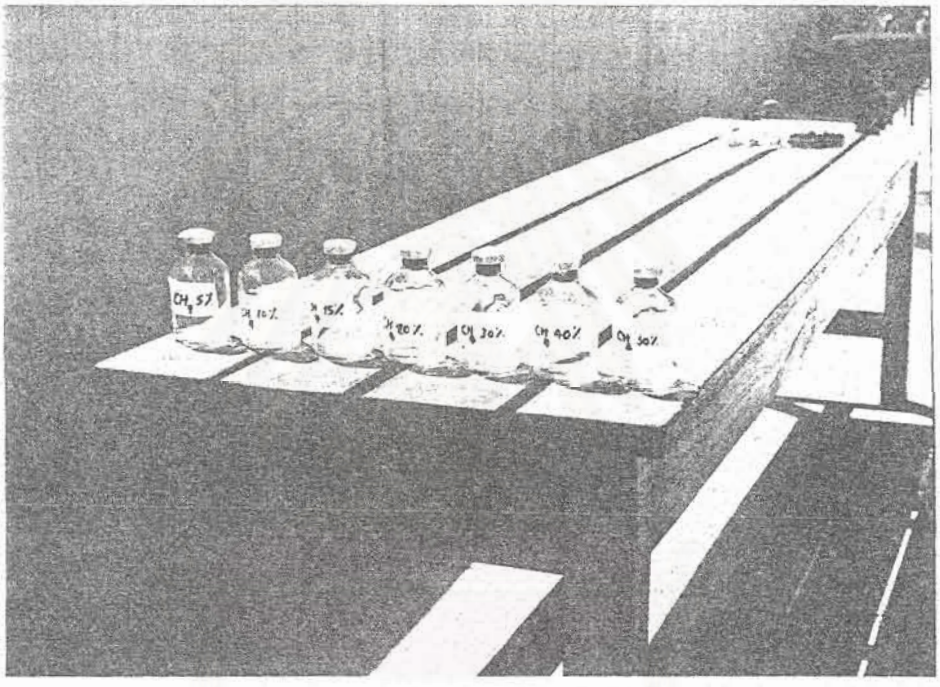
สารที่บรรจุในคอลัมน์ สำหรับเป็นเฟสที่หยุดนิ่ง : พอราพัค คิว

จากเวลาที่ได้ในการฉีดแก๊สมีเธนบริสุทธิ์ (ภาพที่ 12) ทำให้สามารถทราบความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของแก๊สมีเธน นำไปพลอตกราฟ กราฟที่ได้จะเป็นกราฟมาตรฐานของแก๊สมีเธนที่ใช้สำหรับหาความเข้มข้นของแก๊สมีเธนจากหลอดเลี้ยงเชื้อ แสดงดังภาพที่ 13

หมายเหตุ ปกติค่าความเข้มข้นเป็นเปอร์เซนต์ของมีเธน จะต้องนำไปคูณกับค่า Relationship Standard Gas (1% ของแก๊ส มีค่าเท่ากับ 163.5 นาโนโมล) และนำค่าดังกล่าวไปใช้ในการคำนวณ Linear Regression ของกราฟมาตรฐาน แต่ในที่นี้จะถอด Factor ดังกล่าวออก เพื่อให้ง่ายต่อการคำนวณ และให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ

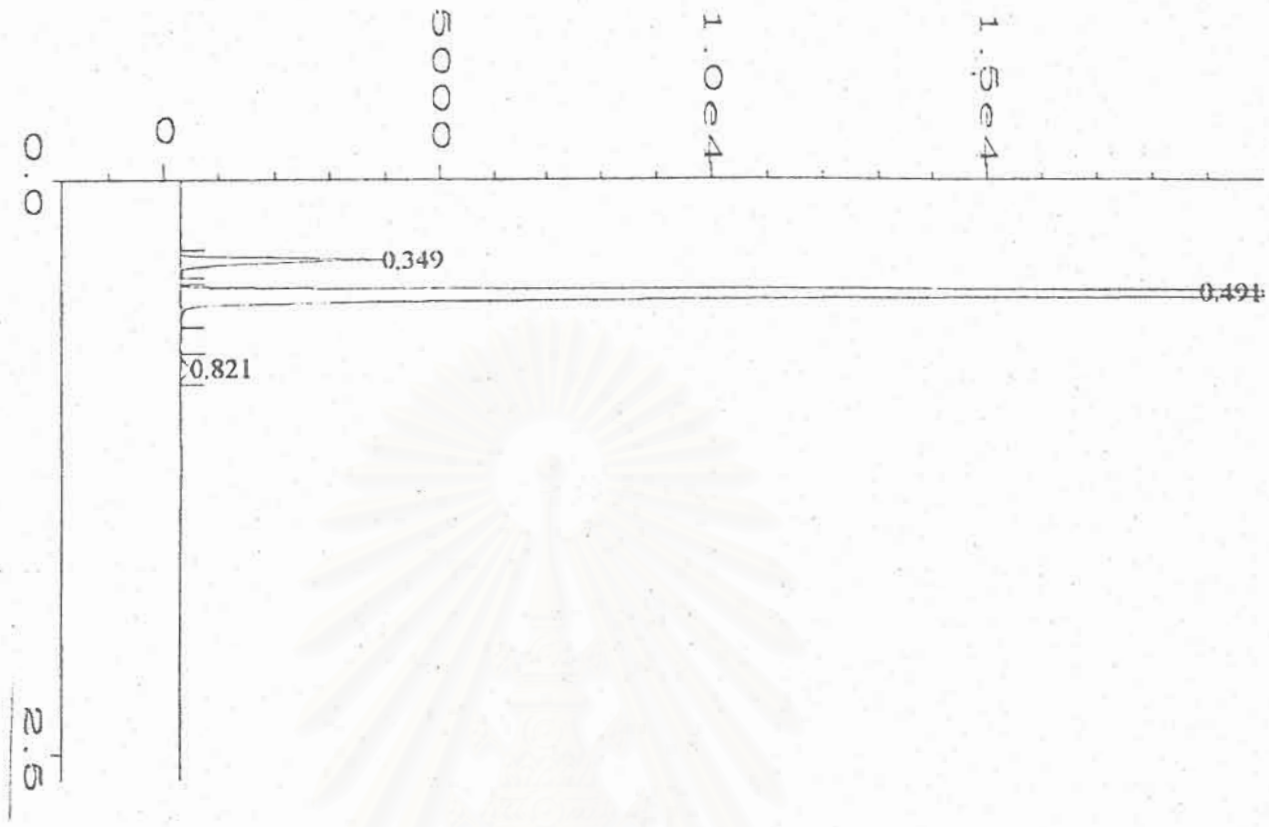
ดังนั้นค่าในแกนX ซึ่งเป็นค่าที่ต้องการทราบ จะต้องนำไปคูณกับ 163.5 ก่อน จึงได้ค่าที่ต้องการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 แก๊สมีเธนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

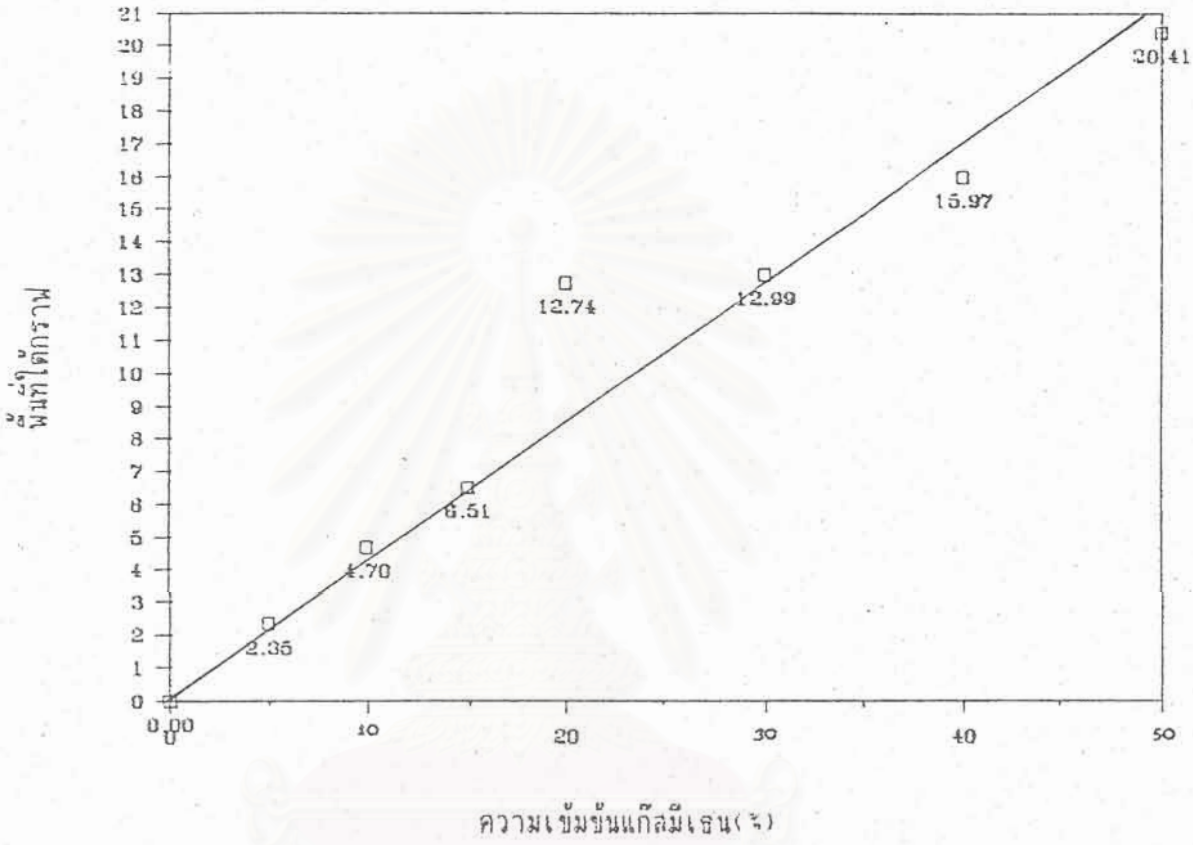


Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\STEROL\NV-F0133.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	0.349	5585	3731	BB	0.037	6.2770
2	0.491	82836	41900	BB	0.030	93.0936
3	0.821	560	177	BB	0.050	0.6294

Total area = 88981

รูปที่ 12 แสดงเวลาที่แก๊สมีเธนออกจากคอลัมน์ (0.491 นาที)



รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานของแก๊สมีเธนความเข้มข้นต่างๆ

ภาคผนวก ง

ข้อมูลตาราง

ตารางที่ 1 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่างๆ และบ่มไว้ที่37°C เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	pHที่ 10mM	pHที่ 20 mM	pHที่ 30 mM
3:1	6.44	5.44	4.85
2:1	6.47	5.57	4.93
1:1	6.50	5.81	4.94
1:2	6.57	5.98	4.93
1:3	6.53	5.86	5.09
pH เฉลี่ย	6.50	5.73	4.95

ตารางที่ 2 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่างๆ และบ่มไว้ที่55°C เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	pHที่ 10mM	pHที่ 20 mM	pHที่ 30 mM
3:1	6.27	5.89	4.96
2:1	6.50	6.05	4.94
1:1	6.37	6.06	4.96
1:2	6.33	5.97	5.11
1:3	6.36	5.79	5.00
pH เฉลี่ย	6.37	5.95	4.99

ตารางที่ 3 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่างๆ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	pHที่ 10mM	pHที่ 20 mM	pHที่ 30 mM
3:1	6.30	5.79	5.02
2:1	6.22	5.84	4.95
1:1	6.36	5.91	4.89
1:2	6.37	5.93	4.89
1:3	6.47	5.96	5.18
pH เฉลี่ย	6.34	5.89	4.97

ตารางที่ 4 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิคให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่างๆ และบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	pHที่ 10mM	pHที่ 20 mM	pHที่ 30 mM
3:1	6.41	5.71	4.88
2:1	6.50	5.73	4.94
1:1	6.49	5.58	4.88
1:2	6.43	5.55	4.94
1:3	6.52	5.56	4.94
pH เฉลี่ย	6.47	5.62	4.92

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิคให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ และบ่มไว้ที่ 55°C เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	pHที่ 10mM	pHที่ 20 mM	pHที่ 30 mM
3:1	6.44	5.44	4.98
2:1	6.47	5.60	4.98
1:1	6.43	5.76	4.95
1:2	6.42	5.88	4.92
1:3	6.54	5.86	5.01
pH เฉลี่ย	6.46	5.71	4.97

ตารางที่ 6 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิคให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	pHที่ 10mM	pHที่ 20 mM	pHที่ 30 mM
3:1	6.24	5.97	4.81
2:1	6.33	5.92	4.81
1:1	6.49	5.78	4.95
1:2	6.47	5.81	4.88
1:3	6.53	5.74	4.91
pH เฉลี่ย	6.41	5.84	4.87

ตารางที่ 7 แสดงค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลโดยมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมแลคติคให้ได้ความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเชื้อ 20 mM จากนั้นจึง		
	ไม่เติมซับสเทรตใดๆ ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ	เติมเมธานอล 5mM ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ	เติมH_2:CO_2(80:20) ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ
2:1	5.31	5.12	5.60
1:1	4.98	5.35	5.41
1:2	4.59	5.16	5.68
1:3	5.92	5.29	5.53
1:11	5.03	5.52	5.22
pH เฉลี่ย	5.17	5.29	5.49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลโดยมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมแลคติคให้ได้ความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเชื้อ 20 mM จากนั้นจึง		
	ไม่เติมซับสเทรตใดๆ ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ	เติมเมธานอล 5mM ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ	เติมH_2:CO_2(80:20) ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ
2:1	5.42	5.56	5.45
1:1	5.19	5.34	5.47
1:2	5.37	5.37	5.40
1:3	5.36	5.38	5.33
1:11	5.58	5.42	5.33
pH เฉลี่ย	5.38	5.41	5.40

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

1. <u>การศึกษาโครงสร้างภายในของกากตะกอนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่านตัวอย่าง (Transmission electron microscope)</u>

ทำการศึกษาโครงสร้างภายในของกากตะกอน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่านตัวอย่าง ดังนี้

เตรียมตัวอย่างกากตะกอน เพื่อศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่านตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างกากตะกอนมาทำการทดลอง ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1.1 นำกากตะกอนแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.3 เป็นเวลา 15 นาที และเปลี่ยนสารละลาย 2 ครั้ง

1.2 นำกากตะกอนแช่ใน 2.5% กลูตาราลดีไฮด์ ใน 0.1โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.2 เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C

1.3 เมื่อครบเวลา นำกากตะกอนไปล้างด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

1.4 นำกากตะกอนแช่ใน 1% ออสเมียมเททราออกไซด์ ใน 0.1โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.5 ล้างกากตะกอน ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.2

1.6 ทำตัวอย่างกากตะกอนให้แห้งโดยใช้ลำดับของเอทิลแอลกอฮอล์ ดังนี้ 35%, 70%, 95%, 100% และ 100% ครั้งละ 15 นาที

1.7 แช่กากตะกอนในโพรพิลีนออกไซด์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ซึ่งสารตัวนี้เป็นตัวกลางระหว่าง แอลกอฮอล์และเรซิน

1.8 แช่กากตะกอนในสารละลายโพรพิลีนออกไซด์:เรซิน (1:1) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.9 แช่กากตะกอนในเรซิน 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาทีโดยแต่ละครั้งใช้ Vacumm pump ดูดไอของโพรพิลีนออกไซด์ออกเพื่อให้เรซินเข้าเซลล์อย่างสมบูรณ์

1.10 หยดเรซินลงแม่พิมพ์ ประมาณครึ่งหนึ่งของความสูงแม่พิมพ์ แล้วแตะตัวอย่างลงไป เขี่ยให้ลงก้นหลุม จากนั้นจึงเติมเรซินจนเต็ม

1.11 อบที่ 60°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้ block แข็งตัว

1.12 นำพลาสติกที่ได้ไปเจียนโดยใช้มีดแก้ว ให้หน้าตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมูที่ด้านยาวที่สุดน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร หน้าตัดเรียบ

1.13 ตัดตัวอย่างให้บางเป็นพิเศษ ด้วยเครื่องตัดแบบบาง ultrotone, LKB ของประเทศสวีเดน โดยให้ได้ชิ้นตัวอย่างที่มีความหนาประมาณ 60-100 นาโนเมตร โดยสังเกตุจากชิ้นตัวอย่างที่ตัดจะมีสีเทาเงิน (ความหนาของตัวอย่างบอกโดยดูสีของ section ซึ่งลอยอยู่ในน้ำร่วมกับ การสะท้อนแสงที่ได้รับจากไฟนีออน ซึ่งติดกับเครื่องมือ

1.14 เมื่อได้ section ที่พอใจ แตะกลุ่มของ section ในแหล่งน้ำด้วยแผ่นตาข่าย (GRID) เพื่อนำมาทำการย้อมในสารละลายสำหรับย้อม โดยหยด 5% ยูเรนิลอาซิเตท ลงบนแผ่นพาราฟิล์ม จากนั้นนำ GRID ที่มี section มาลอยบนผิวของหยดยูเรนิลอาซิเตท โดยให้ด้านที่มี section คว่ำลง แล้วใช้ภาชนะกันแสงปิดบริเวณแผ่นพาราฟิล์มที่มีสารละลายยูเรนิลอาซิเตท และ GRID ลอยอยู่ ทิ้งไว้ 20 นาที

1.15 ใช้คีมนกแก้ว คีบ GRID จุ่มขึ้นลงในน้ำกลั่นที่ต้มและกรอง 10-15 จุ่ม แล้วจึงย้อม GRID ในหยดของเลดซิเตรท ซึ่งมีเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์วางใกล้ๆหยดของเลดซิเตรท เพื่อดูดคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศบริเวณนั้น ปิดบริเวณนั้นด้วยฝาของจานเลี้ยงเชื้อ 10 นาที

1.16 ล้าง GRID ด้วย 0.02 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลา 30 วินาที

1.17 ล้าง GRID ด้วยน้ำกลั่นที่ต้มและกรอง 2-3 ครั้ง ครั้งละ 10 จุ่ม ซับ GRID ให้แห้ง

1.18 นำตัวอย่างดังกล่าว ไปทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดผ่านตลอด แบบ JEM-100SX ของบริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น

2. การศึกษาลักษณะภายนอกของกากตะกอนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (Scanning electron microscope)

2.1 แช่กากตะกอนด้วย 2.5% กลูตาราลดีไฮด์ ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.2 นำกากตะกอน ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

2.3 แช่กากตะกอน ในสารละลายออสเมียมเททราออกไซด์ 1% ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปล้างน้ำ

2.4 ดึงน้ำออกจากตัวอย่างโดยใช้ เอทิลอัลกอฮอล์เข้มข้น 35%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100% และ 100% ครั้งละ 15 นาที

2.5 ทำให้ตัวอย่างแห้ง โดยใช้ Critical Point Dryer แบบ CPD 20 BALZERS UNION

2.6 Mount ตัวอย่างด้วย Carbon paint

2.7 เคลือบตัวอย่างด้วยผงทอง

2.8 นำตัวอย่างดังกล่าว ไปทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด SCAN ผ่านตัวอย่างแบบ JSM-T 220 A ของบริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย