

การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง

ปริญญานิพนธ์
ของ
จรรยารัตน์ จงจิตวิมล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
พฤษภาคม 2545
ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๑๑๕.๗๗๖

๔/๑๑/๖๖

๕๕

การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง

บทคัดย่อ

ของ

จรรยารัตน์ จงจิตวิมล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา

พฤษภาคม ๒๕๔๕

๔๐ ๒๒๔ ๒๕๔

23 ก.ย. 2545

จรรยารัตน์ จงจิตวิมล. (2545) การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซ

ชีวภาพที่อุณหภูมิสูง. ปรินูญานีพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม : ดร.ยุวดี นาคะผดุงรัตน์,
ศาสตราจารย์ ดร.มรกต ดันติเจริญ , ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์.

จุดประสงค์ของปรินูญานีพนธ์เพื่อศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส CMC
แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส)
โดยวิธี Most Probable Number (MPN) การนับจำนวนจุลินทรีย์ในถังหมักเมื่อป้อนด้วย
เปลือกสับปะรด พบจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน
เป็น 2.4×10^5 4.3×10^4 93 0-10 และ 4.3×10^4 MPN/ml ตามลำดับ เมื่อ
ป้อนกลูโคส หรือไชโลส หรือแอลฟา-เซลลูโลส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid
พบจุลินทรีย์เด่นคือจุลินทรีย์ที่ใช้ไชโลส จุลินทรีย์รองคือจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสและจุลินทรีย์ที่ใช้
ไซแลน เมื่อป้อน CMC หรือไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 พบจุลินทรีย์เด่นคือ
จุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส จุลินทรีย์รองคือจุลินทรีย์ที่ใช้ไชโลส และ จุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลน ส่วน
จุลินทรีย์ย่อยสลาย CMC และแอลฟา-เซลลูโลส พบว่ามีจำนวนน้อยและไม่ได้เป็นทั้ง
จุลินทรีย์กลุ่มหลักหรือกลุ่มรองของระบบ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มนี้มีการเจริญ
ช้าและอาจถูกชะล้างออกไปจากระบบ เมื่อป้อนกลูโคสเพิ่มขึ้น เป็นร้อยละ 0.1 พบว่า จำนวน
จุลินทรีย์ลดลงทุกกลุ่มจุลินทรีย์เด่นคือจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลน จุลินทรีย์รองคือจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส
และจุลินทรีย์ที่ใช้ไชโลส จำนวนจุลินทรีย์รวมลดลงมากแสดงว่ากลูโคสความเข้มข้นสูงอาจจะ
เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ในถังหมัก

จุลินทรีย์จากถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง สามารถย่อยสลายไซแลนได้เร็ว และ
ให้ผลชัดเจนกว่าโดยสามารถวิเคราะห์ผลได้ง่ายกว่าทุกสับสเตรท ไม่ว่าจะเป็นองค์ประกอบ
ของก๊าซ ค่า pH และปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่แสดงว่าจุลินทรีย์ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่
อุณหภูมิสูง อาจจะย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่าเซลลูโลส การใช้เปลือกสับปะรดเป็นอาหาร
สำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ทำให้สามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ได้มากกว่าเมื่อใช้สับสเตรทบริสุทธิ์อื่น
ที่ไม่ใช่กลูโคสในการเลี้ยงจุลินทรีย์ เนื่องจากในเปลือกสับปะรดมีความหลากหลายของน้ำตาล
ชนิดต่างๆ ที่มีความเหมาะสมต่อจุลินทรีย์ในถังหมัก ซึ่งส่วนใหญ่ดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันและ
มีความสัมพันธ์กันในลักษณะของ symbiosis ที่ซับซ้อน ขณะที่เลี้ยงจุลินทรีย์ในกลูโคสที่
ความเข้มข้นเหมาะสมทำให้จำนวนจุลินทรีย์ สูงสุด เพราะกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่
สามารถย่อยสลายด้วย anaerobe ผ่านวิถี metabolism หลายวิถี

STUDY ON THE POPULATION OF CARBOHYDRATE-UTILIZING BACTERIA IN THE
THERMOPHILIC BIOGAS REACTORS

AN ABSTRACT
BY
JAROONRAT JONGJITWIMOL

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in Biology
at Srinakharinwirot University
May 2002

Jaroonrat Jongjitwimol. (2002) *Study on the Population of Carbohydrate-Utilizing*

Bacteria in the Thermophilic Biogas Reactors. Master thesis, M.Ed.(Biology).

Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee :

Dr. Yuvadee Nakapadungrat, Prof. Dr. Morakot Tanticharoen, Assist. Prof.

Pornpan Lerstaveesin.

This thesis was to study on the population of carbohydrate-utilizing bacteria in the thermophilic biogas reactors (55^oC) by Most Probable Number (MPN) technique. When feeding with pineapple peel, the population of glucose-, xylose-, CMC-, α -cellulose-, and xylan-utilizing bacteria were 2.4×10^5 , 4.3×10^4 , 93, 0-10, and 4.3×10^4 MPN/ml, respectively. When feeding the reactors with 0.02% glucose, 0.02% xylose, or 0.02% α -cellulose in digestion fluid, the predominant group was xylose-utilizing bacteria and the minors were glucose- and xylan-utilizing bacteria. When feeding the reactors with 0.02% CMC or 0.02% xylan in digestion fluid, the predominant group was glucose-utilizing bacteria and the minors were xylose- and xylan-utilizing bacteria. CMC- and α -cellulose-utilizing bacteria had been neither predominant nor minor group. It was indicated that the growth of CMC- and α -cellulose-utilizing bacteria might be very slow and washed out from the system. When the reactor was fed with 0.1% glucose, the predominant group was xylan-utilizing bacteria and the minors were glucose- and xylose-utilizing bacteria. It was found that all population of carbohydrate-utilizing bacteria decreased in the 0.1% glucose feeding. The higher concentration of glucose might be toxic to the thermophilic bacteria in the reactor leading to decrease in the total numbers of bacteria.

The bacteria from the thermophilic reactors utilized xylan very fast and the growth of bacteria could be clearly analyzed in terms of gas composition, pH and sugar residue. In the respect of growth measuring parameters, hemicellulose was likely better degraded than cellulose. When feeding with pineapple peel, it was found that the number of carbohydrate-utilizing bacterial population was higher than that of feeding with other substrates except glucose. This was due to the pineapple peel containing various substrates which were suitable for bacterial growth in the reactor. The consortium of bacteria might be a complex symbiotic relationship. However, the proper concentration of glucose feeding gave rise to the highest total numbers of bacterial

population comparing to other substrates in the experiment. Being a monosaccharide, glucose was utilized by different metabolic pathways of the anaerobes.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง

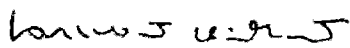
ของ

นางสาวจรรยารัตน์ จงจิตวิมล

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

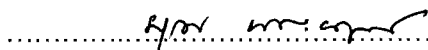


.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

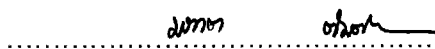
(รองศาสตราจารย์ ดร. นภาพร หะวานนท์)

วันที่ 10 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2545

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน

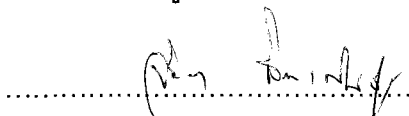
(อาจารย์ ดร. ยุวดี นาคะผดุงรัตน์)

.....กรรมการ

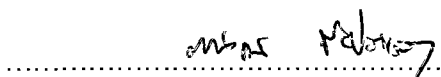
(ศาสตราจารย์ ดร. มรกต ตันติเจริญ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(รองศาสตราจารย์ จิรยา สินเต็มสุข)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาวิณี ชัยประเสริฐ)

ประกาศคุณูปการ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ยวดี นาคะผดุงรัตน์ ศ.ดร. มรกต ตันติเจริญ ผศ. พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดและแนวทางในการทำงานวิจัยรวมทั้งตรวจแก้ไขปัญญานิพนธ์ ผศ. ดร. ภาวิณี ชัยประเสริฐ ที่กรุณาตรวจแก้ไขปัญญานิพนธ์ และให้คำแนะนำ ตลอดระยะเวลาที่ปฏิบัติงาน ณ ห้องปฏิบัติการ Waste Utilization and Management มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี รศ. จรียา สิ้นเดิมสุข ที่กรุณาสละเวลาเพื่อเป็นกรรมการสอบ ซึ่งทำให้งานวิจัยและปัญญานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบคุณอาจารย์ เจ้าหน้าที่ นักวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี คุณพรพรรณ พาณิชนำสิน คุณจงกล พูนทวี ดร.อรรรณพ นพรัตน์ คุณวิลาวัลย์ สินธุประภา และคุณเสาวณีย์ มนัสสิริเกียรติ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับงานวิจัย รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงาน ทำให้งานวิจัยสามารถดำเนินไปได้อย่างราบรื่น

ขอขอบคุณ คุณวัชร ชัยพฤกษ์ คุณทิพวรรณ นารถนอม พี่ เพื่อน และน้องทุกคน ที่ห่วงใยและเป็นกำลังใจให้เสมอ

ขอขอบคุณสมาชิกครอบครัว “จงจิตวิมล” ที่ส่งเสริมและสนับสนุนการเรียนในระดับนี้

จรรยารัตน์ จงจิตวิมล

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
หลักการและเหตุผล.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ก๊าซชีวภาพ.....	4
การเกิดก๊าซชีวภาพ.....	4
กลุ่มจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ.....	7
ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ.....	11
ความสามารถของ Rumen bacteria ในการย่อยสลายสับสเตรท...	14
การศึกษาจุลินทรีย์ในถังหมัก.....	18
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	24
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	25
วัตถุดิบในการผลิตก๊าซชีวภาพ	25
ถังหมักก๊าซชีวภาพ.....	25
วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
การนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี MPN.....	27
การตรวจวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์.....	28
วิธีวิเคราะห์.....	30

บทที่		หน้า
4	ผลการทดลอง.....	31
	ผลการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนกลูโคส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid	32
	ผลการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนไซโลส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid	33
	ผลการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อน CMC ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid	35
	ผลการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อน แอลฟา-เซลลูโลส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid.....	36
	ผลการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อน ไซแลน ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid	38
	ผลการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อน กลูโคสร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid และ Synthetic medium	39
	ผลการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อน กลูโคส ร้อยละ 0.1 ใน Synthetic medium.....	41
	การเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมัก ก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงเมื่อป้อนด้วยสับสเตรตต่างๆ.....	43
	ศึกษากิจกรรมการใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5.....	45
5	สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	49
	สรุป อภิปรายผล.....	49
	ข้อเสนอแนะ.....	57
	บรรณานุกรม.....	58
	ภาคผนวก.....	63
	ภาคผนวก ก.....	64
	ภาคผนวก ข.....	73
	ประวัติย่อผู้วิจัย.....	84

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	สับสเตรทชนิดต่าง ๆ สำหรับการผลิตมีเทน.....	11
2	จุลินทรีย์ใน Rumen กับความสามารถในการ Hydrolysis และ Fermentation สับสเตรท	15
3	การจัดจำแนกคุณลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์เด่น ในกระเพาะอาหารของสัตว์ เคี้ยวเอื้อง(Rumen).....	17
4	จำนวนและสัดส่วนจุลินทรีย์ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิปานกลาง ก่อนและหลัง เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ.....	22
5	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนกลูโคส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid.....	32
6	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนไซโลส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid.....	34
7	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนCMC ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid.....	35
8	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนแอลฟา-เซลลูโลส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid	37
9	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนไซแลน ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid ..	38
10	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนกลูโคส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid และ Synthetic medium.....	40
11	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนกลูโคส ร้อยละ 0.02 และ 0.1 ใน Synthetic medium.....	42
12	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนด้วยสับสเตรทต่าง ๆ.....	44

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1	กระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศโดยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายกลุ่มเพื่อเปลี่ยนสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ไปเป็นก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์.....	5
2	การหมักพอลิแซ็กคาไรด์ ภายใต้ความดันย่อยของไฮโดรเจนต่ำหรือสูง.....	9
3	การย่อย Complex polysaccharides ภายใต้สภาวะไร้อากาศ.....	13
4	Biochemical pathways ของการหมักใน Rumen.....	16
5	ชุดถังหมักก๊าซชีวภาพ.....	26
6	การนับจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้วิธี MPN.....	28
7	การตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์.....	29
8	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนกลูโคสร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid.....	33
9	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนไซโลสร้อยละ 0.02 . ใน Digestion fluid....	34
10	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนCMCร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid.....	36
11	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนเซลลูโลสร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid...	37
12	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนไซแลนร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid.....	39
13	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนกลูโคสร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid และ Synthetic medium.....	41
14	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนกลูโคสร้อยละ 0.02 และ 0.1 ใน Synthetic medium.....	43
15	จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง.....	45
16	การใช้น้ำตาลกลูโคส(ร้อยละ) ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5.....	46
17	การใช้น้ำตาลไซโลส(ร้อยละ) ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5.....	46
18	ปริมาณCO ₂ (ร้อยละ)เมื่อใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5.....	47
19	ปริมาณCO ₂ (ร้อยละ)เมื่อใช้ไซโลสที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5.....	48

บทที่ 1

บทนำ

หลักการและเหตุผล

ของเสียและวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร หากไม่ได้รับการบำบัดอย่างเหมาะสม อาจมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้เนื่องจากเกิดการเน่าเสียส่งกลิ่นเหม็น เทคโนโลยีที่เหมาะสมในการบำบัดของเสียและวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรเหล่านี้ เช่น กระบวนการหมักแบบไร้อากาศ ซึ่งนอกจากจะสามารถกำจัดวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวแล้วยังมีผลพลอยได้เป็นพลังงานในรูปของก๊าซชีวภาพอีกด้วย กระบวนการหมักแบบไร้อากาศเป็นการทำงานของจุลินทรีย์หลายชนิด และมีปฏิกิริยาชีวเคมีที่เกี่ยวข้องอยู่หลายขั้นตอนโดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องทำงานสัมพันธ์กันเพื่อให้ระบบสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ ประกอบด้วย 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 เป็นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายมหโมเลกุลต่างๆ ไปเป็นกรดอินทรีย์ (Acidogenic bacteria หรือ Hydrolytic หรือ Fermentative bacteria) จุลินทรีย์กลุ่มนี้ย่อยสลายสารอินทรีย์พวกเซลลูโลส ไขมัน และโปรตีน ให้เป็นสารอินทรีย์โมเลกุลเล็กลงและจะย่อยสลายต่อไปเป็นเป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก กรดแลคติก และเอทานอล กรดเหล่านี้เป็นสารตั้งต้นในขั้นตอนการเกิดก๊าซมีเทนต่อไป กลุ่มที่ 2 เป็นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตก๊าซมีเทน (Methanogenic bacteria) จุลินทรีย์กลุ่มนี้จำแนกเป็นกลุ่มตามความสามารถในการใช้สารสำหรับการเจริญและผลิตก๊าซมีเทน ได้แก่ กลุ่มที่ 1 พวกที่ใช้คาร์บอนไดออกไซด์/ไฮโดรเจน กลุ่มที่ 2 พวกที่ใช้คาร์บอนไดออกไซด์/ไฮโดรเจน ฟอร์เมท กลุ่มที่ 3 พวกที่ใช้คาร์บอนไดออกไซด์/ไฮโดรเจน เมทานอล เมทาโนลามีน อะซิเตท และคาร์บอนมอนอกไซด์ Acidogenic bacteria นอกจากย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กและเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆแล้ว ยังมีความสำคัญในการช่วยปรับสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมต่อ Methanogenic bacteria โดย Acidogenic bacteria เป็นตัวช่วยลดปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในระบบที่เกิดขึ้น ในระหว่างที่มีการผลิตกรดอินทรีย์จากสารประกอบที่มีโมเลกุลเล็ก การดึงออกซิเจนที่มีอยู่ในระบบไปใช้ทำให้ระบบมีสภาวะไร้อากาศมากขึ้น ซึ่งเหมาะสมต่อการทำงานของ Methanogenic bacteria สำหรับ Methanogenic bacteria จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะย่อยสลายกรดอินทรีย์ให้เป็นก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และนำไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นในช่วง Acid fermentation ไปใช้ในการผลิตก๊าซมีเทนด้วย เนื่องจากไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นมีผลยับยั้งการทำงานของ Acid forming bacteria โดยกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆอาจถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกก่อนจะเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทน และพบว่า

ก๊าซมีเทนส่วนใหญ่จะได้มาจากการดอะซิติค ประมาณร้อยละ 70 ของก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นในถังหมัก (นพพร เจตนาชัย. 2529 ; หัตยา ทิพย์วัฒน์. 2531) จะเห็นว่ากรดอะซิติคเป็นสารตัวกลางสำคัญ สำหรับการเกิดก๊าซมีเทน (ชินพงศ์ วังโน. 2539 ; Bruce, et al. 1987 ; Winter, et al. 1999) วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหาร เช่นอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋องพบว่าเปลือกสับปะรดมีองค์ประกอบเป็นเฮมิเซลลูโลส ร้อยละ 2.31-2.88 และเซลลูโลส ร้อยละ 1.67-2.07 ของน้ำหนักเปียก ซูโครส ฟรุคโตส กลูโคส และเฮกโซส (ธนศ อุทิศธรรม. 2526) จากผลงานวิจัยพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ การย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่เกิดได้ดีที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) ส่วนก๊าซชีวภาพเกิดได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) (ธนศ อุทิศธรรม. 2526) สารโมเลกุลใหญ่ที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น แป้งมันสำปะหลัง เซลลูโลส ไชแลน มักถูกย่อยสลายที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่าที่อุณหภูมิปานกลาง (นพพร เจตนาชัย. 2529) ซึ่งเป็นผลมาจากความเหมาะสมของสภาวะต่อการทำงานของเอนไซม์ คือแม้ปริมาณจุลินทรีย์ในถังหมักที่อุณหภูมิสูงจะน้อยกว่าที่อุณหภูมิปานกลาง แต่สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไชลานเนสที่อุณหภูมิสูงได้มากกว่าที่อุณหภูมิปานกลาง และจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิปานกลางมีหลายกลุ่ม ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสอย่างเดียว จุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสและไซโลส จุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลสและไชแลน และจุลินทรีย์ที่ใช้ได้ทั้งกลูโคส ไซโลสและไชแลน แสดงว่าจุลินทรีย์สามารถใช้สับสเตรทได้หลายชนิด (สุวิมล ฤทธิ์เดช. 2543)

จากงานวิจัยเหล่านี้ จึงทำให้มีความสนใจในการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง เมื่อป้อนด้วยเปลือกสับปะรดหรือสับสเตรทอื่นๆ เช่น กลูโคส ไซโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไชแลนจะทำให้รู้ว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่พบในถังหมักมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร เพื่อให้เข้าใจถึงเรื่องของจุลินทรีย์ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง และอาจจะใช้ความรู้นี้เป็นแนวทางในการพัฒนาระบบอย่างเหมาะสมสำหรับการบำบัดของเสียที่มีเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพ จากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส)
2. ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพ ที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนด้วยกลูโคส ไซโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไชแลน

ความสำคัญของการวิจัย

ทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจเบื้องต้น เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง เมื่อป้อนด้วยสับสเตรตต่างๆ เพื่อจะนำองค์ความรู้นี้ไปใช้ประโยชน์และเป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาระบบบำบัดของเสียที่มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ก่อนจะนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพ จากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) โดยใช้วิธี Most Probable Number (MPN)
2. ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนด้วยกลูโคส หรือไซโลส หรือ CMC หรือแอลฟา-เซลลูโลส หรือไซแลนร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid
3. ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพ ที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนด้วยกลูโคสร้อยละ 0.02 และ 0.1 ใน Synthetic medium
4. ศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ในการใช้กลูโคสและไซโลส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5

นิยามศัพท์เฉพาะ

ระยะเวลาเก็บกัก (Hydraulic Retention Time ; HRT) คือระยะเวลาในการหมัก ซึ่งเป็นตัวแปรหลักในการออกแบบการกำจัดของเสีย ระยะเวลาเก็บกักเป็นระยะเวลาที่ของเสียอยู่ในถังหมัก หาได้โดยการหารปริมาตรของถังหมักด้วยปริมาตรของของเสียที่ไหลผ่านถังหมักต่อหน่วยเวลา ถ้าของเสียที่เติมในถังหมักเป็นของแข็ง เรียกว่าระยะเวลาเก็บกักกาก (Solid Retention Time ; SRT)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ก๊าซชีวภาพ

ก๊าซชีวภาพ หมายถึงก๊าซที่ได้จากการย่อยสลายอินทรีย์สารที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิต ทั้งที่เป็นพืชและสัตว์ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยมีจุลินทรีย์หลายชนิดทำหน้าที่ย่อยสลาย สารอินทรีย์ ก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นเป็นก๊าซผสม ระหว่างก๊าซมีเทน (CH_4) และก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้อาจมีก๊าซไนโตรเจน ก๊าซออกซิเจน ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ปนอยู่บ้างเล็กน้อย ก๊าซที่เกิดจากกระบวนการหมัก จะมีปริมาณที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้และสภาวะของกระบวนการหมักโดยทั่วไป ก๊าซชีวภาพประกอบด้วย

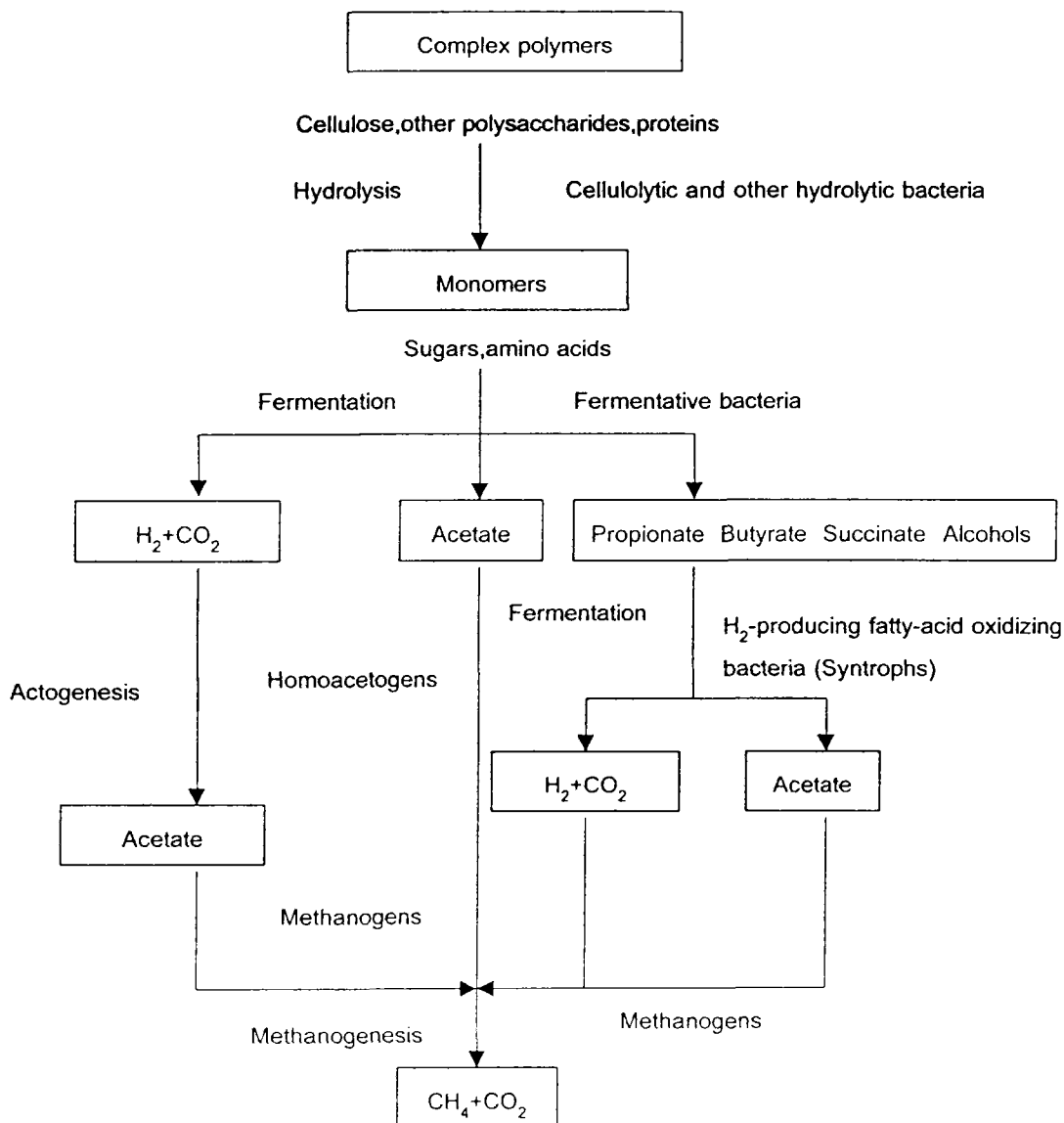
ก๊าซมีเทนร้อยละ	55-56
ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ	35-45
ก๊าซไนโตรเจนร้อยละ	0-8
ก๊าซออกซิเจนร้อยละ	0-1
ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ร้อยละ	0-1

ก๊าซชีวภาพที่สามารถใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงได้ ต้องมีก๊าซมีเทนเป็นองค์ประกอบ ไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 (Updated guidebook on biogas development. 1984)

การเกิดก๊าซชีวภาพ

ก๊าซชีวภาพ เกิดจากปฏิกิริยาทางชีวเคมีของการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดย จุลินทรีย์หลายจำพวกในสภาวะไร้อากาศ สารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลาย และให้ ก๊าซชีวภาพนั้นมาจากทั้งพืชและสัตว์ โดยสารอินทรีย์ส่วนใหญ่ประกอบไปด้วย คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน นอกจากนี้อาจมีพวกลิกนิน แทนนินและไคตินรวมอยู่ด้วย สารประกอบ ดังกล่าวเป็นสารโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจึงต้องผ่านกระบวนการทางชีวเคมีหลายขั้นตอน โดยจุลินทรีย์หลายกลุ่ม (นพพร เจตนาชัย. 2529)

ปฏิกิริยาชีวเคมีของกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรีย ในสภาวะไร้อากาศ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน (นพพร.เจตนชัย. 2529 ; Stronach and Lester. 1986) ตามภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 กระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศโดยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายกลุ่มเพื่อเปลี่ยนสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ไปเป็นก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Madigan, et al. 2000)

ขั้นตอนในการทำงานของจุลินทรีย์ร่วมกันหลายกลุ่ม เพื่อเปลี่ยนสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ไปเป็นก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เกิดขึ้นดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนไฮโดรไลซิส

ในขั้นตอนนี้สารอินทรีย์เชิงซ้อน (Complex organic compound) ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ไม่สามารถละลายน้ำได้ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ (Extracellular enzyme) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนนี้เป็นพวก Hydrolytic bacteria และ Fermentative bacteria ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายในขั้นตอนนี้จะเป็นอะไรขึ้นอยู่กัชนิดสารตั้งต้น เช่น ถ้าสารตั้งต้นเป็นคาร์โบไฮเดรต จะย่อยสลายได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Simple sugar) โปรตีนเปลี่ยนไปเป็นเปปไทด์ หรือ กรดอะมิโน ไขมันจะเปลี่ยนเป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอล นอกเหนือจากการย่อยสลายที่เกิดจาก Hydrolytic bacteria แล้วยังมีปฏิกิริยาที่เกิดจากพวก Fermentative bacteria รวมอยู่ด้วยซึ่งให้ผลผลิตเป็นพวกสารประกอบแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ขั้นตอนไฮโดรไลซิสนี้เป็น Rate-limiting step ของกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศของเหลือทิ้งทางการเกษตร เนื่องจากการย่อยสลายเกิดได้ช้า และมีข้อจำกัดในการย่อยสลายของเหลือทิ้งบางประเภท เช่น พวกที่มีเซลลูโลส (Cellulolytic waste) ลิกนินหรือไคตินเป็นองค์ประกอบ (Stronach and Lester. 1986 ; Bitton. 1999)

ขั้นตอนที่ 2 การผลิตกรดอินทรีย์

ขั้นตอนนี้เป็นการย่อยสลายผลผลิตที่ได้จากขั้นตอนไฮโดรไลซิส เพื่อนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ใหม่และใช้ในการสร้างพลังงาน โดยที่สารอินทรีย์โมเลกุลเล็กจะถูกแบคทีเรียพวก Facultative anaerobic bacteria ซึ่งเป็นพวกที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ดีทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน และ Obligate anaerobic bacteria ซึ่งเป็นพวกที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น สารอินทรีย์ในขั้นตอนไฮโดรไลซิสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile fatty acid) เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทีริก กรดแวนีริก และสารอื่นๆ เช่น ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยจุลินทรีย์พวก Acidogenic bacteria เนื่องจากสารอินทรีย์ที่ได้มาจากการย่อยสลายในขั้นตอนไฮโดรไลซิสมีหลายชนิด Acetogenic bacteria สามารถใช้กรดโพรพิโอนิกและกรดอินทรีย์อื่นๆ แล้วเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญมากที่สุดในการเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทน (นพพร เจตนชัย. 2529)

ขั้นตอนที่ 3 การผลิตก๊าซมีเทน

เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ซึ่งเป็นการย่อยสลายขั้นสุดท้าย จากขั้นตอนการผลิตกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะซิติก ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยจุลินทรีย์พวก Methane producing bacteria ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารอาหารอย่างมาก แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ Acetoclastic methane bacteria (Acetophilic bacteria) และ methane bacteria (Hydrogenophilic bacteria) (Henze and Harremoës, 1983) ภายหลังจากแบคทีเรียดังกล่าวย่อยสลายสารอาหารเสร็จสิ้นลง ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือก๊าซชีวภาพ และน้ำ ก๊าซชีวภาพที่ได้มักประกอบด้วย มีเทน คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน สำหรับบางกรณีอาจมีไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นส่วนประกอบ (ชินพงศ์ วังโน, 2538)

กลุ่มจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ

ในการศึกษากระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่สภาวะไร้อากาศแบบขั้นตอนเดียว พบว่ามีจุลินทรีย์หลายกลุ่ม เช่น แบคทีเรีย ฟังไจ และโปรโตซัว อยู่ร่วมกัน ซึ่งมีความสัมพันธ์กันในลักษณะ Symbiosis ที่ซับซ้อน โดยแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญที่สุดในระบบ (ชินพงศ์ วังโน, 2538 ; วราวุฒิ ครุสง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532 ; Bitton, 1999) แบ่งแบคทีเรียเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1. แบคทีเรียที่ไม่ผลิตก๊าซมีเทน (Non-methanogenic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็น Facultative anaerobic bacteria เจริญได้ดีในช่วง pH 4.0 - 6.5 ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม มีอัตราการเจริญสูง แบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าได้ภายใน 24 ชั่วโมง แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 Hydrolytic / Fermentative bacteria (Fermentative acidogenic bacteria หรือ Acidogenic bacteria หรือ Acidforming bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้ย่อยสลายสารอินทรีย์โดยไม่ใช้อากาศ โดยผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme เช่น เซลลูเลส โปรตีเอส ลิเปส) เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ (เช่น เซลลูโลส ลิกนิน โปรตีน ไขมัน) ไปเป็นสารโมเลกุลเดี่ยวที่ละลายน้ำได้ (เช่น กลูโคส กรดอะมิโน กรดไขมัน กลีเซอรอล) เพื่อจุลินทรีย์สามารถนำเข้าสู่เซลล์ แล้วเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ของสารตัวกลาง พวกกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (เช่น อะซิติก โพรพิโอนิก บิวทิริก แลคติก บิวทิริก หรือซักซินิก) แอลกอฮอล์และคีโตน (เช่น เอทานอล เมทานอล กลีเซอรอล อะซีโตน) อะซิเตท

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน โดยมีอะซิเตท เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต แบคทีเรียกลุ่มนี้แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

1.1.1 Cellulose-splitting bacteria ย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และถูกใช้ต่อไปโดย Methanogens ได้แก่ *Clostridium omelianskii* *Cl. thermocellum* *Cl. dissolvens*

กลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น Thermophilic cellulolytic bacterium พวก *Clostridium thermocellum* ย่อยสลายเซลลูโลสได้เอทานอล กรดอะซิติก จุลินทรีย์กลุ่มนี้ใช้น้ำตาลได้ จุลินทรีย์บางชนิดผลิต Endo-glucanase หรือ β -glucosidase สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ เช่น Carboxymethylcellulose

1.1.2 Semicellulose-splitting bacteria ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสเป็นไซโลส (Xylose) อะราบินโนส (Arabinose) กาแลคโตส (Galactose) และแมนโนส (Mannose) ได้แก่ *Bacteroides ruminicola*

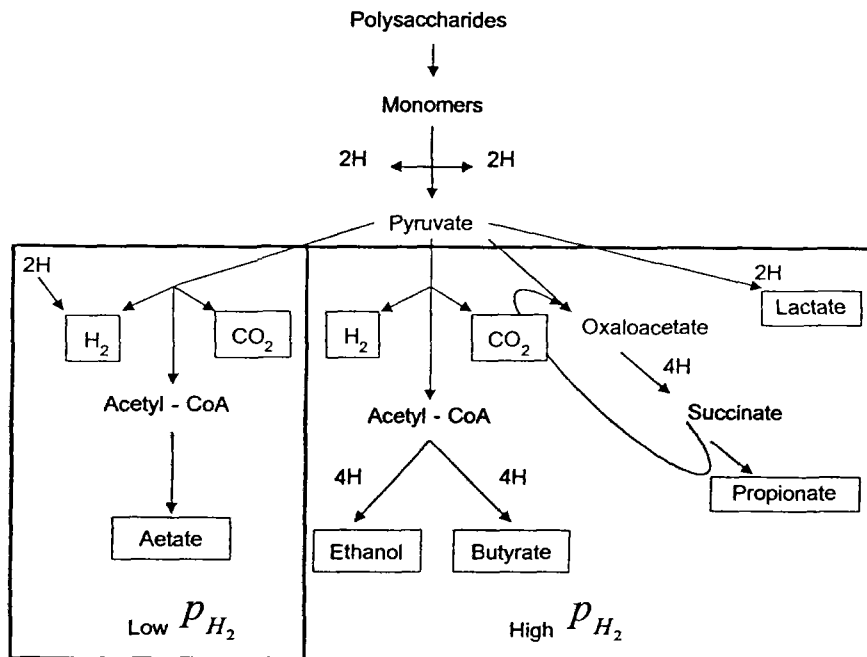
1.1.3 Starch-splitting bacteria ย่อยสลายแป้งเป็นกลูโคส ได้แก่ Gram' s positive cocci และ *Bacterium butyricum* ส่วนใน Sludge พบ *Cl. acetobutylicum* ซึ่งเปลี่ยนแป้งเป็น Acetobutanol กรดบิวทีริก กรดอะซิติก และไฮโดรเจน

1.1.4 Protein-splitting bacteria ย่อยสลายโปรตีนเป็นกรดอะมิโน ได้แก่ Gram' s positive bacteria เช่น *Clostridium* sp.

1.1.5 Fat-splitting bacteria ย่อยสลายไขมันเป็นกรดไขมันสายสั้นๆ ได้แก่ *Vibrio* sp. *Bacillus* sp.

1.2 Acetogenic bacteria

แบคทีเรียกลุ่มนี้ย่อยสลายสารตัวกลางชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในขั้นตอน Hydrolysis ให้เป็นกรดอะซิติก แบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการไฮโดรเจนต่ำ(ต่ำกว่า 10^4 atmosphere) ถ้าความดันย่อยของไฮโดรเจนสูง (สูงกว่า 10^4 atm) ทำให้อะซิเตทที่สร้างขึ้นถูกรีดิวส์เป็นผลให้อะซิเตทลดลง สับสเตรทจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดโพรพิโอนิก กรดบิวทีริก และเอทานอลมากกว่าก๊าซมีเทน ทำให้ระบบมีกรดอินทรีย์สะสมมากขึ้น ค่า pH ลดลง ความสัมพันธ์ของ Acetogenic bacteria และ Methanogens เป็นแบบ Symbiosis โดย Methanogens จะนำไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นไปใช้ ทำให้ค่าความดันย่อยของไฮโดรเจนต่ำลงและเหมาะสมต่อการทำงานของ Acetogenic bacteria ส่วน Acetogenic bacteria นำออกซิเจนที่เกิดขึ้นในระบบไปใช้ ทำให้ถึงหมักมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ Methanogens ตามภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 การหมักพอลิแซ็กคาไรด์ ภายใต้ความดันย่อยของไฮโดรเจนต่ำหรือสูง
(Winter, et al. 1999)

Acetogenic bacteria แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1.2.1 Hydrogen producing acetogenic bacteria / Proton-reducing

acetogenic bacteria / H_2 -producing fatty acid oxidizing bacteria

แบคทีเรียกลุ่มนี้จะเปลี่ยนกรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอนหลายอะตอม (เช่น โพรพิโอนิก บิวทีริก) และแอลกอฮอล์ไปเป็น อะซิเตท ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะถูกใช้ต่อไปโดย Methanogens

1.2.2 Homoacetogenic bacteria / H_2 -oxidizing acetogens

แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นทั้ง Autotroph และ Heterotroph ขึ้นกับการใช้สารอาหาร ถ้าเป็น Autotroph แบคทีเรียจะใช้สารประกอบที่มีคาร์บอน (Unicarbon compound) 1 อะตอม (H_2/CO_2) ในการเจริญ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นอะซิเตท ส่วน Heterotroph แบคทีเรียจะใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนหลายอะตอม เช่น น้ำตาลกลูโคส กรดแลคติก และไพรูเวตในการเจริญ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นบิวทีเรตและอะซิเตท แบคทีเรียกลุ่มนี้จะเร่ง "Back reaction" เช่น การผลิตอะซิเตทจาก H_2 และ CO_2 ดังสมการ



2. แบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทน (Methanogenic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็น Archaeobacteria มีลักษณะแตกต่างจาก Eubacteria และ Eucaryote อย่างชัดเจน คือ ผนังเซลล์ไม่มี Murein เป็นองค์ประกอบ เจริญได้โดยไม่ใช้อากาศ เจริญได้ดีในช่วง pH 7.0-7.8 ทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้น้อย เจริญช้ากว่าแบคทีเรียไม่ผลิตก๊าซมีเทน ช่วงเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า ใช้เวลาดังแต่ 3 วัน (ที่ 35 องศาเซลเซียส) ถึง 50 วัน (ที่ 10 องศาเซลเซียส) เยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วย Ether-linked isoprenoids มากกว่า Ether-linked phospholipid มี Coenzyme M, F₄₂₀, F₄₃₀, Methanopterin และ Methanofuran แบ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

2.1 Hydrogenotrophic methanogens หรือ Hydrogen-using methanogens (Chemolithotrophs)

แบคทีเรียกลุ่มนี้เปลี่ยนไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ไปเป็นก๊าซมีเทน ซึ่งมีความสำคัญคือช่วยรักษาระดับความดันย่อยของไฮโดรเจนให้ต่ำ เนื่องจากจำเป็นสำหรับการเปลี่ยนกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์ไปเป็นอะซิเตท ดังสมการ



2.2 Acetotrophic methanogens / Acetoclastic bacteria / Acetate splitting bacteria / Aceticlastic methanogens

แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญช้ามาก ประกอบด้วย 2 Genus สำคัญ คือ *Methanosarcina* sp. และ *Methanothrix* sp. สามารถเปลี่ยนอะซิเตท ไปเป็นมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการ



สารประกอบที่ Methanogens สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ มีจำกัดเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ตามตาราง 1

ตาราง 1 สับสเตรทชนิดต่างๆสำหรับการผลิตก๊าซมีเทน (Mackie, White and Bryant. 1992)

สับสเตรท	สารที่เข้าทำปฏิกิริยา	ผลิตภัณฑ์
ไฮโดรเจน	$4\text{H}_2 + \text{CO}_2$	$\text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$
ฟอร์มเมท	$4\text{HCOO}^- + 4\text{H}^+$	$\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
คาร์บอนมอนอกไซด์	$4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2$
เมทานอล	$4\text{CH}_3\text{OH}$	$3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
อะซิเตท	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$	$\text{CH}_4 + \text{CO}_2$
โมโนเมทิลลามีน	$4\text{CH}_3\text{NH}_3^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	$3\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_4^+$
ไดเมทิลลามีน	$2(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	$3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{NH}_4^+$
ไตรเมทิลลามีน	$4(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+ + 6\text{H}_2\text{O}$	$9\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_4^+$

ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ

จุลินทรีย์ในถังหมักเปลี่ยนสับสเตรทที่ใช้ในการทดลองเป็นจุลินทรีย์ผสม ซึ่งการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายชนิด ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆที่จะทำให้การทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ในกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ สามารถดำเนินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ (คณาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. 2538 ; ชินพงศ์ วังใน. 2539 ; นพพร เจตนาชัย. 2529 ; ธงชัย พรรณสวัสดิ์ และ วิบูลย์ลักษณ์ วิสุมิศักดิ์. 2540 ; Stronach and Lester. 1986) ประกอบด้วย

1. อุณหภูมิ มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของจุลินทรีย์ระบบบำบัดแบบไร้อากาศในสองช่วง คือช่วงอุณหภูมิปานกลาง เป็นช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส และช่วงอุณหภูมิสูง เป็นช่วงอุณหภูมิระหว่าง 47-55 องศาเซลเซียส

2. pH pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ Methanogenic bacteria อยู่ระหว่าง 6.5-7.5 ที่ pH ต่ำกว่า 5 หรือสูงกว่า 8 จะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซมีเทนจะลดลงอย่างรวดเร็ว และถ้าค่า pH ลดต่ำลงจนถึง 5.0 จะเป็นอันตรายอย่างรุนแรงต่อแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทน การป้อนสารอินทรีย์เข้าสู่ระบบมากเกินไป ทำให้แบคทีเรียที่ไม่สร้างมีเทนย่อยสลายสารอินทรีย์เป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่ายในปริมาณมาก จนแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทนใช้ไม่ทัน เกิดการสะสมของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายในระบบ ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อแบคทีเรียสร้างมีเทน และทำให้ค่า pH ของระบบลดลงอย่างรวดเร็ว

3. ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) เป็นค่าแสดงความสามารถของน้ำในการรับอนุภาคโปรตอน มีหน่วยเป็น มก/ล ของ CaCO_3 เป็นตัวบ่งชี้เสถียรภาพของระบบ ถ้าค่าความเป็นด่างของระบบมีค่าสูง แสดงว่าระบบมีความสามารถในการต้านทานการเปลี่ยนแปลง pH สูง โดยระบบสามารถรักษาค่า pH ให้คงตัวได้นาน แม้ในระบบจะมีปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายเพิ่มขึ้น ค่า pH ของระบบจะคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงง่าย สำหรับการบำบัดน้ำเสียมีค่าความเป็นด่างที่เหมาะสม อยู่ในช่วง 1,000-3,000 มก/ล ของ CaCO_3

4. กรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile fatty acid) เป็นผลิตภัณฑ์สารตัวกลางที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ โดยปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายมีความสัมพันธ์กับค่าความเป็นด่างและ pH ของระบบ ถ้าในระบบมีปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายสะสมอยู่มากเกินไป ในระยะแรกจะมีผลทำให้ค่าความเป็นด่างของระบบลดลง และถ้ายังไม่ได้แก้ไขให้ปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายลดลง จะมีผลทำให้ค่า pH ของระบบลดลงด้วย ซึ่งถ้ายังไม่ได้รับการแก้ไขต่อไปอีกอาจส่งผลให้ระบบล้มเหลวได้ในที่สุด

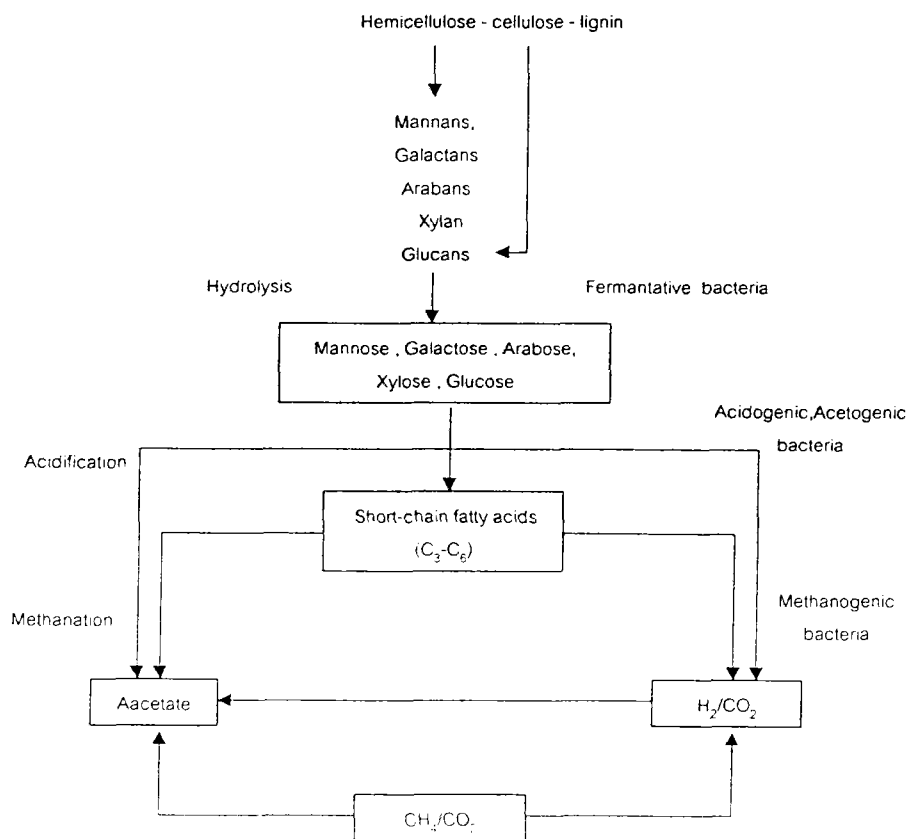
5. อัตราการป้อนสารอินทรีย์ (Organic loading rate) เป็นปัจจัยที่กำหนดความสามารถในการบำบัดของเสีย รวมถึงองค์ประกอบของน้ำเสียที่ป้อนเข้าสู่ระบบ (Carbon source) ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในระบบ เพราะจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารดังกล่าวเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนสำหรับเซลล์

6. อาหารเสริม (Nutrients) ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และเหล็ก จุลินทรีย์ต้องการเพื่อใช้สำหรับการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ และการสร้างกรดนิวคลีอิก นอกจากนี้ยังต้องการสารอินทรีย์อื่นๆ รวมทั้งแร่ธาตุเพื่อใช้ควบคุมระบบภายในเซลล์ เช่น แร่ดิน ออสโมติก Co-factor และเอนไซม์

7. ระยะเวลาเก็บกัก (Hydraulic Retention Time ; HRT) คือระยะเวลาในการหมัก เป็นระยะเวลาที่ของเสียอยู่ในถังหมักและมีกระบวนการต่างๆเกิดขึ้น โดยอัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเก็บกักจนถึงค่าสูงสุด ค่าหนึ่งต่อจากนั้นจะลดลง ซึ่งถ้ามีระยะเวลาเก็บกักน้อยเกินไปจะทำให้สารที่ย่อยสลายได้ยากถูกย่อยสลายได้ไม่ถึงขั้นสุดท้าย หรือมีผลทำให้ตะกอนแบคทีเรียออกจากระบบได้มาก จนแบคทีเรียถูกชะล้างออกจากระบบในอัตราที่เร็วกว่าที่แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวน และเป็นสาเหตุทำให้ระบบล้มเหลว

8. สารพิษ (Toxic substances) แบ่งเป็นสองพวกคือ แบบพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) ซึ่งจุลินทรีย์จะตายหมดภายในไม่กี่ชั่วโมง ได้แก่ ไซยาไนด์ อาร์เซนิก เป็นต้น แบบพิษออกฤทธิ์ช้า (Chronic toxicity) ได้แก่ ทองแดงและโลหะหนักต่างๆ จุลินทรีย์จะสะสมไว้ในเซลล์จนเกิดพิษและตายในที่สุด หรือแอมโมเนียที่มีความเข้มข้นเกิน 500 มก/ล

เฮนรี และ คริสโตเฟอร์ (Henry and Christopher. 1985) ศึกษาการย่อยเซลลูโลส โดยกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ พบว่ากระบวนการย่อยสลายพอลิเมอร์ ประกอบด้วย ขั้นตอน Hydrolysis acidification methanation ขั้นแรกเฮมิเซลลูโลสถูก Hydrolysis ด้วย เอนไซม์ให้กลายเป็น Polysaccharides และถูกย่อยสลายต่อไปเป็น Oligosaccharides ที่ละลายน้ำได้ (2,4-sugar polymer) และสุดท้ายได้ Monomers ของน้ำตาล C_5 หรือ C_6 น้ำตาล Monomers เหล่านี้จะถูกเปลี่ยนเป็น C_2 และกรดไขมันสายยาว คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน ขั้นตอน Hydrolysis และ Acidification เกิดโดยจุลินทรีย์กลุ่ม Acidogenic (Acid-forming) ส่วนกรดไขมันสายยาวถูกย่อยเป็นอะซิเตท โดยกลุ่มของ Acetogenic bacteria อะซิเตท เป็นอาหารสำหรับ Methanogenic bacteria เพื่อให้ได้ก๊าซมีเทน และ คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ถูกสร้างขึ้นระหว่างการสร้างกรดไขมัน และเปลี่ยนไปเป็นก๊าซมีเทนโดย Methane formers ตามภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 การย่อย Complex polysaccharides ภายใต้สภาวะไร้อากาศ
(ดัดแปลงมาจาก Henry and Christopher. 1985)

ความสามารถของ Rumen bacteria ในการย่อยสลายสับสเตรท

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในกระเพาะอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Rumen) สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โดยผ่าน (Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP ; Glycolysis) pathway กลูโคสเป็นสับสเตรทที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีความสำคัญ ส่วนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอื่นๆ มักถูกย่อยสลายผ่าน EMP และ Pentose phosphate pathway กลูโคสจะถูก Metabolized ไปเป็นไพรูเวทผ่าน EMP pathway จุลินทรีย์ใน Rumen เหมือนกับการหมักในสภาวะไร้อากาศอื่นๆ ประกอบด้วย Incomplete Krebs cycle (Tricarboxylic acid cycle ; TCA) และไม่สามารถออกซิไดซ์ไพรูเวทไปเป็น CO_2 ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ใน Rumen สามารถเกิด Heterofermentative metabolism ได้ (Lederberg, 1992) ตามตาราง 2

ตาราง 2 จุลินทรีย์ใน Rumen กับความสามารถในการ Hydrolysis และ Fermentation
 สับสเตรท^a (ดัดแปลงมาจาก Lederberg. 1992)

genera	Cel	Hcl	Sta	Pec	Pro	Ceb	Mal	Glu	Xyl	Ara
<i>Ruminococcus</i>	+	+	-	+		+	-	d	d	d
<i>Fibrobacter</i>	+	+	d	d		+	d	+	-	-
<i>Butyrivibrio</i>	+	+	d	+	+	d	d	+	d	+
<i>Lachnospira</i>	-	-	d	+	+	+	d	+	d	-
<i>Succinivibrio</i>	-	-	-	+		d	+	+	+	d
<i>Treponema</i>	-		-	+		+	+	+	+	+
<i>Prevotella</i>	-	d	d	d	+	+	d	+	d	d
<i>Succinimonas</i>	-	-	+			-	+	+	-	-
<i>Streptococcus</i>	-	-	+	d	+	+	+	+	d	d
<i>Ruminobacter</i>	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Selenomonas</i>	-	-	d		+	+	+	+	+	+
<i>Epidinium</i>	d	d	-	d	+	+	d	+	d	d
<i>Diplodinium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Entodinium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Ophryoscolex</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Entodinium</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	-	
<i>Isotricha</i>	-	-	+	+	+	+	-	+		
<i>Dasytricha</i>	-	-	-	+	+	+	+	+		
<i>Neocallimastix</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
<i>Caecomyces</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	

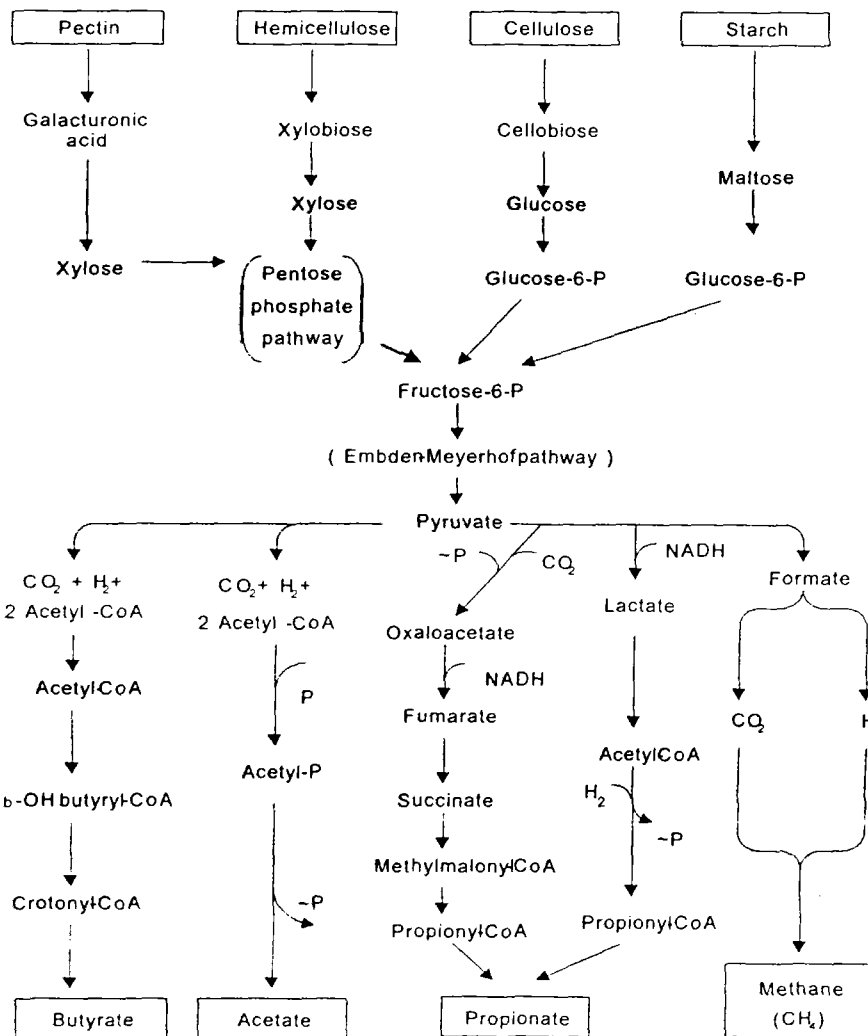
^a There can be significant variation among strains and growth conditions.

Cel,cellulose;Hcl,hemicellulose;Sta,starch;Pec,pectin;Pro,protein;Ceb,cellobiose;

Mal,maltose;Glu,glucose;Xyl,xylose;Ara,arabinose;+,most strains;

-,do not metabolize;d,depends upon strain.

จุลินทรีย์ใน Rumen สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบหลักในพืช โดยผ่านวิถีทางชีวเคมีที่มีความเฉพาะหลายวิถี ตามภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 Biochemical pathways ของการหมักใน Rumen
(Prescott,Harley and Klein. 1992)

รัสเซล (Russell. 2000) ได้บันทึกเกี่ยวกับ Rumen bacteria ประมาณ 20 ชนิด

ตามตาราง 3

ตาราง 3 การจัดจำแนกคุณลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์เด่นใน Rumen (ดัดแปลง
มาจาก Russell. 2000)

การจัดจำแนก		ผลิตภัณฑ์	บทบาท
Circa 1966	ปัจจุบัน	จากการหมัก ^a	อันดับแรก
bacteria			
<i>Bacteroids succinogenes</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	S, F, A	Cellulose
<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Ruminococcus albus</i>	A, F, E	Cellulose
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	S, F, A, H ₂ , E	Cellulose
<i>Butyrivibrio fabrisolvens</i>	<i>Butyrivibrio fabrisolvens</i>	B, F, L, A, H ₂	Cellulose, hemicellulose, starch pectin, sugars
<i>Bacteroids amylophilus</i>	<i>Ruminobacter amylophilus</i>	S, F, A, L, E	Starch
<i>Selenomonas ruminantium</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>	L, A, P, B, H ₂ , F	Sugars, starch, lactate
<i>Bacteroides ruminicola</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>	S, A, F, P	Starch, hemicellulose, pectin, beta-glucans, proteins
	<i>Prevotella albensis</i>	S, A, F	Starch, hemicellulose, pectin, beta-glucans, proteins
	<i>Prevotella brevis</i>	S, A, F	Starch, hemicellulose, pectin, beta-glucans, proteins
	<i>Prevotella bryantii</i>	S, A, F	Starch, hemicellulose, pectin, beta-glucans, proteins
<i>Succinimonas amyolytica</i>	<i>Succinimas amyolytica</i>	S, A, P	Starch
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	S, A, F, L	Maltodextrins
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	L, A, F, E	Starch, sugars
<i>Eubacterium ruminantium</i>	<i>Eubacterium ruminantium</i>	A, F, B, L	Maltodextrins, sugars
<i>Peptostreptococcus elsdenii</i>	<i>Megasphaera elsdenii</i>	P, A, B, Br	Lactate, maltodextrins, amino acids
<i>Lachnospira multipara</i>	<i>Lachnospira multipara</i>	L, A, F, E, H ₂	Pectin, sugars
	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	Br, A	Peptides, amino acids
	<i>Clostridium aminophilum</i>	A, B	Amino acids, peptides
	<i>Clostridium sticklandii</i>	A, Br, B, P	Peptides, amino acids
<i>Vibrio succinogenes</i>	<i>Wolinella succinogenes</i>	S	Malate, fumarate
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	A, S, P	Glycerol, lactate
<i>Methanobacterium ruminantium</i>	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	CH ₄	H ₂ , CO ₂ , formate

^a A, acetate; P, propionate; B, butyrate; F, formate; L, lactate; E, ethanol; Br, branched-chain VFA.

การศึกษาจุลินทรีย์ในถังหมัก

วิธี MPN เป็นวิธีที่ใช้นับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีปริมาณต่ำ (<100/g) โดยเฉพาะในนมและน้ำ หรือสำหรับอาหารที่อาจเกิดความยุ่งยาก ในการนับจำนวนโคโลนีให้ถูกต้อง วิธี MPN นี้ เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและเป็นการนับจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะที่มีชีวิตเท่านั้น (Pilot Plant Development and Training Institute. 2001) วิธี MPN นี้จะทำเจือจางเชื้อตัวอย่างที่หลายระดับและใส่เชื้อตัวอย่างลงในอาหารเหลว จากนั้นนำไปป่มและตรวจวัดการเจริญของเชื้อทำให้ทราบจำนวนของเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างที่ศึกษาได้ โดยถือว่าความเจือจางที่อยู่ถัดขึ้นไปจากความเจือจางที่ไม่มีการเจริญของเชื้ออยู่นี้ จะมีเชื้ออยู่อย่างน้อย 1 ตัว วิธีการนี้นำมาประยุกต์ใช้กับการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ในถังหมักผลิตก๊าซชีวภาพ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อผสม (นพพร เจตนาชัย. 2529) สำหรับการศึกษาจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่ม ดัดแปลงจากความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้อาหารคัดเลือกที่แตกต่างกัน (Jay. 1981)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้อาหารต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานแตกต่างกันไป วิธี MPN เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากการหาจำนวนจุลินทรีย์ในน้ำ ปัจจุบันมีการดัดแปลงสูตรอาหาร ทำให้สามารถใช้นับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้สารอาหารต่างๆ ได้หลายกลุ่ม เช่น Homoacetogen acetogen Sulfate-reducing bacteria และ Hydrolytic bacteria ที่ใช้สารอาหารต่างกัน รวมทั้งมีการดัดแปลงเพื่อใช้นับจำนวนเชื้อรา (สุวิมล ฤทธิ์เดช. 2543) หลักการสำคัญของวิธีการนี้มี 2 ปัจจัย คือ 1. ขั้นตอนในการเจือจางตัวอย่างเชื้อเพื่อให้ครอบคลุมจุลินทรีย์ทุกช่วงความเจือจางที่ต้องการศึกษา ดังนั้นผู้ศึกษาต้องมีความรอบคอบและแม่นยำ เนื่องจากการตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น ค่า pH ความขุ่น การใช้น้ำตาล และอื่นๆ จะตรวจวัดได้ต่อเมื่อทำการทดลองเสร็จสิ้นและได้มีการบ่มเชื้อไประยะหนึ่ง 2. อาหารและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีที่สุด (Pilot Plant Development and Training Institute. 2001)

การนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธีนี้ เกิดขึ้นได้มีการพัฒนามาเป็นลำดับโดย แมกคาร์ดี (McCready. 1915) ฮาวอร์สัน และ ซิกเลอร์ (Halvorson and Ziegler. 1933) อิเซนฮาร์ท และ วิลสัน (Eisenhart and Wilson. 1943) โคราน (Cochran. 1950) วูดวาร์ด (Woodward. 1957) ดีแมน (De Man. 1983) (Pilot Plant Development and Training Institute. 2001) วิธี MPN เป็นวิธีที่ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้เทคนิคความชำนาญมากนัก สามารถรักษาสภาวะไร้อากาศได้สะดวก ประหยัดเวลา ตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายวิธี เช่น การวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น / ตรวจสอบองค์ประกอบของก๊าซ ความขุ่น ค่า pH ปริมาณการใช้

สับสเตรทที่ลดลง เช่น Reducing sugar Total sugar และวิธีอื่นๆ เช่น NO_3 reduction Strach hydrolysis H_2S production เป็นต้น รวมทั้งสามารถตรวจวัดปริมาณก๊าซและผลิตภัณฑ์ต่างๆที่เกิดขึ้น ตามระยะเวลาที่กำหนดในระหว่างการบ่มได้ (สุวิมล ฤทธิ์เดช. 2543)

ทาบาสซัม และ ราโจกา (Tabassum and Rajoka. 2000) รายงานว่าจากการศึกษา Methanogenesis ของคาร์โบไฮเดรตพวก Cellulose Cellulobiose และกลูโคสซึ่งเป็นองค์ประกอบของ Cellulosic biomass โดย Syntrophic methane producing bacteria ที่แยกจากตะกอนน้ำจืด นับจำนวน Methanogen โดยวิธี MPN ซึ่งวัดการเจริญจากค่า pH ความขุ่น การผลิตก๊าซมีเทน และการย่อยสลายสับสเตรท ใช้เวลาบ่มเชื้อ 12-14 วัน พบว่า Methanogen มีจำนวน 2×10^6 และ 4×10^6 MPN/ml เมื่อเลี้ยงใน Methanol และ Dimethylamine ตามลำดับ ส่วน Acidogen และ Acetogen มีจำนวนสูงสุดเป็น 2.02×10^4 2.2×10^5 และ 4.4×10^6 MPN/ml เมื่อเลี้ยงในกลูโคส เซลโลไบโอส และ แอลฟา-เซลลูโลส ตามลำดับ ซึ่งผลิตภัณฑ์หลักจากการย่อยสลาย กลูโคส เซลโลไบโอส และ แอลฟา-เซลลูโลส คืออะซิเตท โพรพิอเนตและบิวทีเรต

เชน (Chen. 1983) ศึกษาการปรับตัวของประชากรใน Anaerobe sewage fermentor ที่อุณหภูมิปานกลางไปเป็นอุณหภูมิสูง โดยใช้จุลินทรีย์จากถังหมักที่ 35 องศาเซลเซียส ไปเลี้ยงที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส นับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี MPN แบบ 5 หลอด เป็นเวลา 10 สัปดาห์ วิเคราะห์ผลโดยให้เครื่องหมาย + ในขวดที่เกิดความขุ่น ปริมาณก๊าซมีเทน การย่อยกระดาษกรอง พบว่าที่อุณหภูมิสูงมีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่าที่อุณหภูมิปานกลางโดยนับจำนวน Mesophilic และ Thermophilic bacteria ที่ใช้อาหารเฉพาะในถังหมักที่อุณหภูมิปานกลาง พบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสที่อุณหภูมิ 35 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็น 3.5×10^7 1.05×10^7 3.5×10^6 MPN/ml ตามลำดับ จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้เซลลูโลสเป็น 1.8×10^6 4×10^4 และ $< 1 \times 10^3$ MPN/ml ตามลำดับ

นพพร เจตนาชัย (2529) ศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในถังหมักเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) โดยศึกษาจากความสามารถของจุลินทรีย์เหล่านี้ในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ในการหมักทั้ง 2 อุณหภูมิ ส่วนใหญ่มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันได้แตกต่างกัน โดยเฉพาะการใช้กรดอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิสูงไม่สามารถใช้กรดอินทรีย์ระเหยง่ายเหล่านี้ผลิตก๊าซชีวภาพได้ จากรายงานต่างๆพบว่ากรดอินทรีย์เป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการเกิดก๊าซชีวภาพ และระดับความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ทำให้คาดว่าในการศึกษาอาจใช้สารอาหารเหล่านี้ในระดับความเข้มข้นสูงเกินไป นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม มีผลต่อการย่อยสลายสารอาหาร

แต่ละชนิด สารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น แป้งมันสำปะหลัง เซลลูโลส ไชเลน มักถูกย่อยสลายที่อุณหภูมิสูง ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิปานกลาง สำหรับ Methanogenic bacteria ที่ย่อยสลายกรดอินทรีย์ระเหยง่ายและแอลกอฮอล์ พบได้ทั้งกลุ่ม Mesophile และ Thermophile ซึ่งกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวมีกิจกรรมได้ดีในช่วงอุณหภูมิปานกลาง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 37-40 องศาเซลเซียส

หัตยา ทิพย์วัฒน์ (2531) ศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ จากถังหมักเปลือกสับปะรด ที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) ในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่าจุลินทรีย์จากถังหมักทั้ง 2 อุณหภูมิ มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้ใกล้เคียงกันยกเว้นกรดไพรูวอิกและไพรูวานอล ที่จุลินทรีย์จากถังหมักอุณหภูมิสูงไม่สามารถใช้ได้ นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้ทดสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ ยังมีผลต่อความสามารถของจุลินทรีย์ ในการใช้สารเหล่านั้นและผลิตผลที่ได้ เช่น เมื่อเติม เซลลูโลส หรือกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งคาร์บอน จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตผลเท่านั้น แม้ว่าในถังหมักจะมีทั้ง Non-methanogenic bacteria และ Methanogenic bacteria อยู่ แต่เมื่อเติมเซลลูโลส หรือกลูโคสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าผลิตผลที่ได้มีทั้งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซมีเทน แสดงว่าที่ความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 0.1 กรดอินทรีย์ระเหยง่ายและแอลกอฮอล์ จะยับยั้ง กิจกรรมของ Methanogenic bacteria ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการเกิดก๊าซชีวภาพ โดยจุลินทรีย์จากถังหมักซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ย่อยสลายสารอาหารต่างๆ ในช่วงอุณหภูมิกว้างกว่าจุลินทรีย์จากถังหมักซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์จากถังหมักซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะผลิตก๊าซมีเทนได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และจุลินทรีย์จากถังหมักซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จะผลิตก๊าซมีเทนได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส การเกิดก๊าซมีเทนจะเกิดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ส่วนการย่อยสลายเซลลูโลส ไม่ว่าโดยจุลินทรีย์จากถังหมักใด การย่อยสลายเซลลูโลสเกิดได้ดีในช่วงของอุณหภูมิสูง

เกษแก้ว ปะนะมณฑา (2534) ศึกษาการย่อยสลายสับสเตรตต่างๆ โดยจุลินทรีย์จากถังหมักผลิตก๊าซชีวภาพ พบว่าการย่อยสลายเปลือกสับปะรด ในระยะแรกเป็นการย่อยสลาย น้ำตาลและสารประกอบที่ละลายน้ำได้ มากกว่าเป็นการย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น เซลลูโลสที่มีในเปลือกสับปะรด และผลจากการศึกษาการย่อยสลายสับสเตรตต่างๆ เปรียบเทียบกับการย่อยสลายเปลือกสับปะรด พบว่ามีวิธีการย่อยสลายที่นำไปสู่การเกิดก๊าซชีวภาพคล้ายกัน คือได้ผลิตผลเป็นกรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดไพรูวอิก

ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น ทำให้อัตราการใช้กรดอินทรีย์เกิดได้ช้าลงอาจเนื่องจาก Substrate inhibition ความเข้มข้นที่สูงของกรดอินทรีย์บางชนิดอาจเป็นพิษต่อเชื้อจุลินทรีย์ ชนิดของผลิตภัณฑ์สุดท้ายขึ้นกับความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น เช่น เมื่อสับสเตรทเริ่มต้นมีความเข้มข้นสูงจะได้เอทานอล นอกจากนี้ชนิดของกรดอินทรีย์ มีผลต่อปฏิกิริยาการย่อยสลาย พบว่าถ้ามีการโคพรีออนิกอยู่ร่วมกับกรดอะซิติกในปริมาณสูง จะมีผลยับยั้งการใช้กรดอะซิติกมากกว่าเมื่อมีการดอะซิติกอยู่เพียงชนิดเดียว

เสาวณีย์ มนัสสิริเกียรติ (2542) ศึกษาการย่อยสลายกลูโคสโดยจุลินทรีย์ ที่ได้จากถังหมักก๊าซชีวภาพด้วยเปลือกสับปะรด ในการศึกษาโดยใช้จุลินทรีย์ 5 สายพันธุ์ พบว่าจุลินทรีย์สามารถใช้สับสเตรทได้หลายชนิด จุลินทรีย์ A, XO 7.37 และ XO 5.37 จากถัง 37 องศาเซลเซียส เป็น Facultative anaerobe Hydrolytic / Fermentative bacteria ที่สามารถย่อยสลายกลูโคส ไชโลส และไซแลน โดย A และ XO 7.37 สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ด้วยจุลินทรีย์ B และ Z₈ จากถัง 55 องศาเซลเซียส เป็น Strictly anaerobe Hydrolytic/Fermentative bacteria ที่สามารถย่อยสลายกลูโคส ไชโลส ไซแลน และเซลลูโลสได้

สุวิมล ฤทธิ์เดช (2543) ศึกษาจำนวนและกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) พบว่าถึงแม้จำนวนจุลินทรีย์ในถังหมักที่อุณหภูมิสูง จะมีจำนวนน้อยกว่าที่อุณหภูมิปานกลางแต่กิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น แอลฟา-เซลลูโลส และ ไซแลน ที่อุณหภูมิสูงจะสูงกว่าที่อุณหภูมิปานกลาง และศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส ของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิปานกลางเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรทสำหรับชุดทดลองที่เติมกลูโคสร้อยละ 0.3 มีสัดส่วนของเชื้อที่ใช้กลูโคส และไซโลสเจริญเป็นกลุ่มหลัก ชุดทดลองที่เติมไซแลนร้อยละ 0.3 มีสัดส่วนของเชื้อที่ใช้กลูโคสและไซโลสเจริญเป็นกลุ่มหลัก และสัดส่วนของเชื้อที่ใช้ไซแลน เจริญเป็นกลุ่มรอง ชุดทดลองที่เติมแอลฟา-เซลลูโลส ร้อยละ 0.3 มีสัดส่วนของเชื้อที่ใช้ไซแลนเจริญเป็นกลุ่มหลัก และสัดส่วนของเชื้อที่ใช้กลูโคสและไซโลสเจริญเป็นกลุ่มรอง พบว่าจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิปานกลาง มีทั้งเชื้อกลุ่มที่ใช้กลูโคสอย่างเดียว กลุ่มที่ใช้ได้ทั้งกลูโคสและไซโลส และกลุ่มที่สามารถใช้ได้ทั้งกลูโคส ไซโลสและไซแลนได้ สำหรับสัดส่วนของเชื้อที่ใช้แอลฟา-เซลลูโลสพบน้อยมากเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ทุกกลุ่มที่ศึกษา

ตาราง 4 แสดงจำนวนและสัดส่วนของจุลินทรีย์ในถังหมักก๊าซชีวภาพเปลือกสับประรดที่อุณหภูมิปานกลาง ก่อนและหลังเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (สุวิมล ฤทธิ์เดช. 2543)

แหล่งคาร์บอน ที่ใช้	จำนวนและสัดส่วนของจุลินทรีย์		จำนวนและสัดส่วนของจุลินทรีย์ หลังเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ					
	ก่อนและหลังเติมแหล่งคาร์บอน		กลูโคสร้อยละ 0.3		ไซแลนร้อยละ 0.3		เซลลูโลสร้อยละ 0.3	
	จำนวน	สัดส่วน	จำนวน	สัดส่วน	จำนวน	สัดส่วน	จำนวน	สัดส่วน
	(MPN/ml)		(MPN/ml)		(MPN/ml)		(MPN/ml)	
กลูโคสร้อยละ 0.5	1×10^9	49.99	2×10^8	95.65	7×10^6	37.84	9×10^5	27.03
ไซโลสร้อยละ 0.5	1×10^9	50.00	8×10^6	3.82	7×10^6	37.84	9.3×10^5	27.93
ไซแลนร้อยละ 0.2	1×10^5	0.01	1.1×10^6	0.53	4.5×10^6	24.32	1.5×10^6	45.04
เซลลูโลสร้อยละ 0.2	9×10^2	0.00	93	0	120	0	90	0
รวม	200,100,900	100	209,100,093	100	18,500,120	100	3,330,090	100

ลอบ และ มาร์ติน (Laube and Martin. 1981.) ศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลส ไปเป็นมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์ โดย Triculture ของเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ *Acetivibrio cellulolyticus* *Desulfovibrio* sp. และ *Methanosarcina barkeri* พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสใน Monoculture และ Coculture โดย *A. cellulolyticus* ใช้เวลาในการย่อยสลายเซลลูโลสมากกว่า 4 วัน ส่วน Coculture ทั้งหมดใช้เวลาสั้นกว่า Monoculture โดยใช้เวลาประมาณ 3 วัน มีขั้นตอนการย่อยสลาย ดังนี้

ขั้นที่ 1 *Acetivibrio cellulolyticus* ย่อยสลายเซลลูโลสได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งย่อยต่อไปเป็นไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ อะซิเตทและเอทานอล

ขั้นที่ 2 *Desulfovibrio* sp. จะออกซิไดส์เอทานอลแล้วผลิตเป็นอะซิเตทและไฮโดรเจน โดยไฮโดรเจนที่สะสมสามารถยับยั้งการใช้เอทานอลได้

ขั้นที่ 3 *M. barkeri* ที่สามารถย่อยสลายอะซิเตทเป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการผลิตมีเทน

อะซิเตทจะเปลี่ยนเป็นเอทานอล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการย่อยน้ำตาลโดย *Thermoanaerobium brockii* เมื่อเจริญในที่นี้ *Methanobacterium thermoautotrophicum* อยู่ด้วย การผลิตอะซิเตทเกิดได้ง่ายกว่าเอทานอลใน Coculture ของ *Ruminococcus albus* และ *Vibrio succinogenes* ซึ่งเจริญในกลูโคสและในการย่อยเซลลูโลสด้วย Coculture ของ *Clostridium thermocellum* และ *M. thermoautotrophicum*

โวลิน และ มิลเลอร์ (Wolin and Miller. 1983) ศึกษา *Bacteroides ruminicola* และ *B. fibrisolvens* เป็นจุลินทรีย์หลักใน Rumen ของวัวที่ให้อาหาร เมื่อป้อนอาหารเพิ่มพบว่า *B. ruminicola* เพิ่มขึ้น และ *B. fibrisolvens* ลดลง โดย *B. succinogenes* กลับมาเป็น Predominant cellulolytic species ผลของการย่อยสลายน้ำตาลเฮกโซสซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเซลลูโลส เป็นดังสมการ :-



บาร์ดียา โซมายาจิ และ กานนา (Bardiya, Somayaji and Khanna. 1996) ศึกษาการผลิตก๊าซมีเทนจากเปลือกกล้วยและของเหลือทิ้งจากสับปะรด โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลง HRTs พบว่าอัตราการผลิตก๊าซจะสูงที่ HRT ต่ำ สำหรับการหมักเปลือกกล้วยมี HRT ต่ำสุดที่ 25 วัน ส่วนกระบวนการหมักของเหลือทิ้งจากสับปะรดที่ HRT 10 วัน จะได้ปริมาณก๊าซสูงสุด และ HRT ต่ำ ไม่มีผลต่อการผลิตก๊าซมีเทน

เลน (Lane. 1984) ศึกษาการย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศ โดยป้อนของเหลือทิ้งจากแอปเปิ้ล ข้าวโพด Apple press cake น้ำคั้นจาก Sugarbeet pulp สับปะรด หรือของเหลือทิ้งจากแอสฟาลท์ พบว่าสามารถทำให้ถึงหมักเสถียรได้มากกว่า 226 วัน อัตราการป้อนสารอินทรีย์ $3.5 - 4.25 \text{ kg. m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ ให้ผลผลิตของก๊าซอยู่ในช่วง 0.429-0.568 ลิตร (มีก๊าซมีเทนร้อยละ 50-60) ต่อกรัมของสารอินทรีย์ที่ป้อน

จากรายงานการวิจัยต่างๆ ทำให้เกิดความสนใจที่จะศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง เพื่อให้ทราบถึงข้อมูลเบื้องต้นและเกิดความรู้ความเข้าใจ เกี่ยวกับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง เมื่อป้อนสับปะรดเป็น กลูโคส ไชโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน ว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุม เปลี่ยนแปลง และพัฒนาระบบให้มีความเหมาะสมยิ่งขึ้น หรือให้เป็นไปในทิศทางที่ต้องการเพื่อการบำบัดของเสียที่มีเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นและนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในงานวิจัย เป็นการหมักเปลี่ยนสับปะรดในถังหมักก๊าซชีวภาพแบบอับอากาศ
ขั้นตอนเดียว โดยมีขั้นตอนการผลิตกรดอินทรีย์ และการผลิตก๊าซชีวภาพรวมอยู่ในถังหมัก
เดียวกัน ซึ่งพัฒนามาจากงานของ ธเนศ อุทิศธรรม ที่ได้ศึกษาการผลิตก๊าซชีวภาพที่
อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ส่วนงานวิจัยครั้งนี้จะศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้
คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ กลูโคส หรือไซโลส หรือCMC หรือแอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน
เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ได้ทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการ Waste
Utilization and Management มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางขุนเทียน

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. ขวดซีรัมขนาด 10 มิลลิลิตร
2. กระบอกตวง
3. ขวดรูปชมพู
4. ปิเปต
5. บีกเกอร์
6. ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเตรียมอาหาร
7. Volumetric flask
8. หลอดทดลอง
9. หม้อนึ่งความดัน
10. Gas Chromatograph แบบ Thermal Conductivity Detector (TCD)
11. Spectrophotometer
12. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)
13. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตรพร้อมขวดล้างและตัวยัดบิวเรต 2 ชุด
14. เครื่องกวนโดยใช้แท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)
15. เตาไฟฟ้า (Hot plate)
16. อ่างควบคุมอุณหภูมิน้ำ (Water bath)
17. ตู้บ่ม (Incubator)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

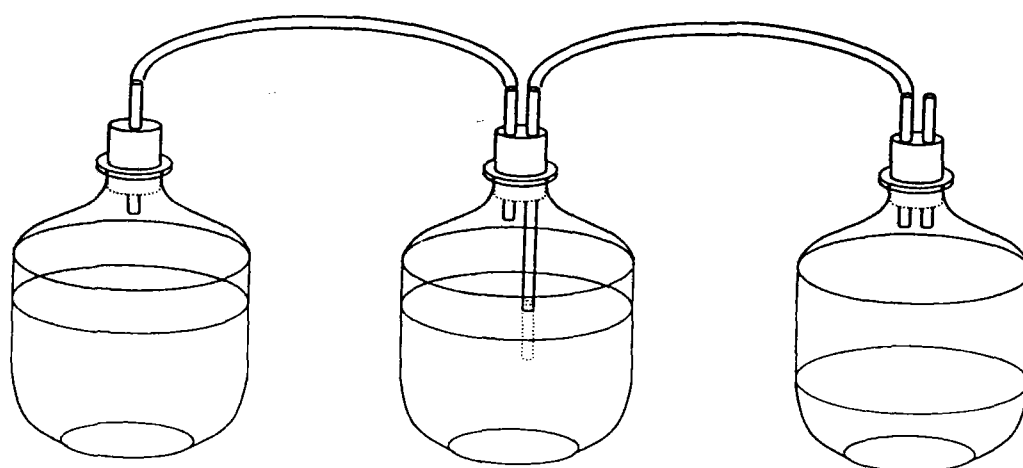
1. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก เข้มข้น 0.1 N
2. สารละลายมาตรฐานต่าง โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 N
3. D(+)Glucose monohydrate from Merck Chemical Co.
4. D(+)Xylose from Merck Chemical Co.
5. Carboxymethylcellulose (CMC sodium salt , low viscosity , Sigma C8758;Sigma St.Louis,MO.,USA)
6. Cellulose from Sigma Chemical Co.
7. Xylan from oat spelt, Sigma Chemical Co.
8. Sodium hydrogen carbonate
9. Potassium sodium tartrate
10. Sodium carbonate
11. Copper sulphate
12. Ammonium molybdate
13. Sodium sulphate
14. Sodium hydrogen arsenate
15. Phenol solution (ความเข้มข้นร้อยละ 5)
16. Conc.Sulfuric acid

วัตถุดิบในการผลิตก๊าซชีวภาพ

วัตถุดิบที่ใช้เป็นเปลือกสับปะรด จากโรงงานสับปะรดกระป๋องมาลี จังหวัดนครปฐม นำเปลือกสับปะรดมาบดละเอียด และแช่เย็นไว้จนกว่าจะนำมาใช้งาน

ถังหมักก๊าซชีวภาพ

ถังหมักก๊าซชีวภาพมีปริมาตรของน้ำหมัก 4 ลิตร ดังภาพประกอบ 5 ชุดถังหมักก๊าซชีวภาพ โดยแช่ถังหมักในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ป้อนเปลือกสับปะรด 10 กรัม และน้ำกลั่น 267 มิลลิลิตร ลงในถังหมักทุก 3 วัน ระยะเวลาเก็บกัก (Hydraulic Retention Time ; HRT) 45 วัน มีการควบคุมระบบให้อยู่ในสภาวะคงที่ตลอดการทดลอง โดยตรวจวัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นด้วยการแทนที่น้ำ วิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซที่เกิดขึ้น ค่า pH อยู่ในช่วง 7.0-7.2 ค่าอัลคาไลน์ตีประมาณ 1,000-3,000 มก./ล.ของ CaCO_3 และปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (แสดงในภาคผนวก ก ข้อ 6)



ถังหมักก๊าซชีวภาพ

ขวดเก็บก๊าซ

ขวดแทนที่น้ำ

ภาพประกอบ 5 ชุดถังหมักก๊าซชีวภาพ (ดัดแปลงมาจาก นพพร เจตน์ชัย. 2529)

วิธีดำเนินการวิจัย

ถังหมักก๊าซชีวภาพในงานวิจัยครั้งนี้ เป็นถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semicontinuous fermentor) โดยนำน้ำหมักจากถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) ปริมาตรการหมัก 1 ลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วยจุกยางที่เจาะด้านบนเพื่อระบายก๊าซที่เกิดขึ้นสู่อีกขวดหนึ่ง (ตามภาพประกอบ 5) ป้อนสับสเตรททุก 3 วัน มีระยะเวลาเก็บกัก 45 วัน ควบคุมระบบให้อยู่ในสภาวะคงที่ตลอดการทดลอง เมื่อครบกำหนด นำน้ำหมักมานับจำนวนจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Most Probable Number (MPN)

การศึกษานี้แบ่งเป็น 4 ส่วน คือ

1. ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต คือ จุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส จุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลส จุลินทรีย์ที่ใช้ CMC จุลินทรีย์ที่ใช้แอลฟา-เซลลูโลส และจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลน (โดยนับจำนวนจุลินทรีย์ในอาหารนับเชื้อที่มีกลูโคสหรือไซโลสความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ส่วน CMC หรือแอลฟา-เซลลูโลส หรือไซแลน ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.2) ในถังหมักเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส)

2. ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนด้วยสับสเตรท 5 ชนิด ได้แก่กลูโคส หรือ ไซโลส หรือ CMC หรือ แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน ใน Digestion fluid (แสดงวิธีเตรียมในภาคผนวก ก ข้อ 2) ซึ่งแต่ละชุดการทดลองทำโดยแบ่งน้ำหมักมาจากถังหมักเปลือกสับปะรด จำนวน 1 ลิตร และป้อนด้วยสับสเตรท 0.2 กรัมต่อลิตร ทุก 3 วัน ควบคุมสภาวะของถังหมักให้คงที่ตลอดการทดลองเป็นเวลา 45 วัน นำน้ำหมักมาศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต ควบคุมสภาวะของถังหมักให้คงที่ต่อไปอีก 45 วัน นำน้ำหมักมาศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต และนำจำนวนจุลินทรีย์

ที่นับได้ทั้งสองค่ามาหาค่าเฉลี่ย

3. ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) โดยศึกษาจากชุดทดลองที่ป้อนด้วยกลูโคส 0.2 กรัมต่อลิตร ใน Digestion fluid มาเป็นกลูโคส 0.2 กรัมต่อลิตร ใน Synthetic medium ทุก 3 วัน ควบคุมระบบให้อยู่ในสภาวะคงที่ตลอดการทดลอง เป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบกำหนด นำน้ำหมักมานับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต จากนั้นศึกษาผลของความเข้มข้นกลูโคสโดยป้อนกลูโคส 1 กรัมต่อลิตรใน Synthetic medium (แสดงวิธีเตรียมในภาคผนวก ก ข้อ 1) ทุก 3 วัน ควบคุมระบบให้อยู่ในสภาวะคงที่ตลอดการทดลอง เป็นเวลา 45 วัน เมื่อครบกำหนดนำน้ำหมักมานับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต

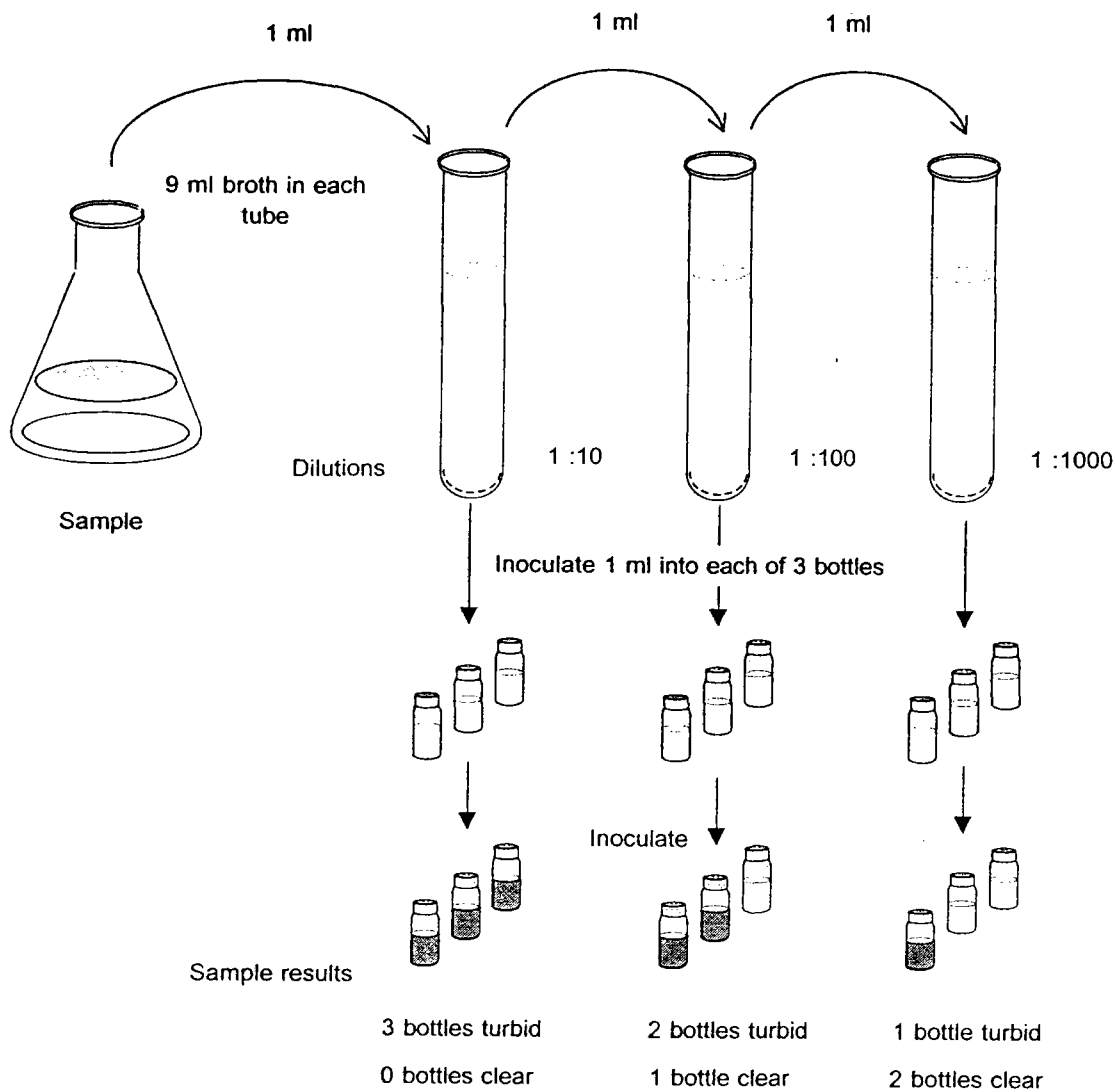
4. ศึกษากิจกรรมการใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 โดยนำน้ำหมักจากถังหมักเปลือกสับประดที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) มาศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์โดยใช้ Inoculum ร้อยละ 10 ตรวจสอบองค์ประกอบของก๊าซ ค่า pH และปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่

การนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี MPN

การวิจัยครั้งนี้ เป็นการนับจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้วิธี Most Probable Number (MPN) ซึ่งทำการทดลองในขวดซีรัมขนาด 10 มิลลิลิตร เจือจางเชื้อตัวอย่างด้วยอาหารนับจุลินทรีย์ (แสดงในภาคผนวก ก ข้อ 1) แบบ 10 เท่า (10-fold serial dilution) ที่ระดับความเจือจางละ 3 ขวด (นพพร เจตนชัย. 2529 ; สุวิมล ฤทธิ์เดช. 2543) ตามภาพประกอบ 6

1. ใส่อาหาร 4 ml ลงในขวดซีรัมขนาด 10 ml
2. ใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่เจือจางแบบ 10 เท่า ลงไป 4 ml
3. ปิดจุกยาง
4. ใช้เข็มฉีดยาดูดอากาศออก
5. ปิดฝาอลูมิเนียม
6. นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 วัน (Zhang and Noike. 1991)

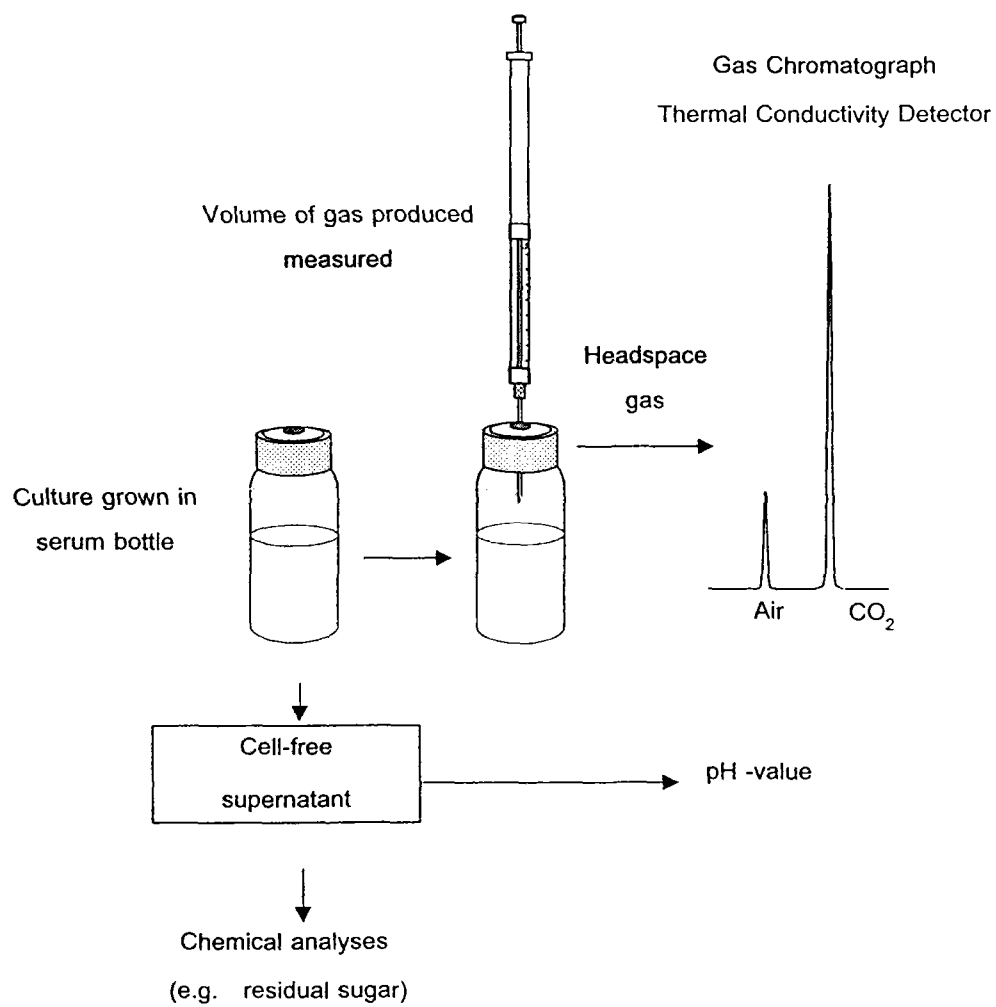
แล้วตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์



ภาพประกอบ 6 การนับจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้วิธี MPN (ดัดแปลงมาจาก Ingraham. 2000)

การตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์

การตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์ในขวดซีรัม สามารถศึกษาได้จากการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ดังภาพประกอบ 7 ได้แก่ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น ค่า pH ที่เปลี่ยนแปลง ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ (แสดงวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ก ข้อ 4 และ 5) ให้ผลเป็นบวกในขวดที่มีการเจริญของจุลินทรีย์ ให้เป็นลบในขวดที่ไม่มีการเจริญ และนำค่าที่ได้ไปเทียบค่าจากตาราง MPN (แสดงในภาคผนวก ก ข้อ 7)



ภาพประกอบ 7 การตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์ (ดัดแปลงมาจาก Tanticharoen, 1981)

วิธีวิเคราะห์

สภาวะต่างๆและการเตรียมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ แสดงในภาคผนวก ก

1.การวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซ : การวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซใช้ เครื่อง Gas Chromatograph (Shimadzu model GC 9A)

การติดตามการใช้สารอาหารของเชื้อ สามารถตรวจวัดได้จากองค์ประกอบของก๊าซที่เกิดขึ้นในช่องว่างเหนือของเหลวในขวดซีรัม ภายหลังการบ่มเชื้อตามระยะเวลาที่กำหนด โดยนำไซริงค์แบบ Gas type ดูดก๊าซในช่องว่างเหนือของเหลวในขวดซีรัมไปวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph แบบ Thermal Conductivity Detector (TCD) (สภาวะของเครื่องที่ใช้ในการวิเคราะห์ แสดงในภาคผนวก ก ข้อ 3)

2.การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Somogyi – Nelson

หลักการ : กลูโคสหรือไซโลสในสารละลายตัวอย่างจะรีดิวซ์ Coppe ในสารละลายต่างให้ Cuprous copper ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารละลาย Arseno molybdate ทำให้เกิดสีเขียวแกมน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (แสดงวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ก ข้อ 4)

3.การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (Total sugar) โดยวิธี Phenol sulfuric total sugar

หลักการ : สารตัวอย่างที่เป็นน้ำตาล Oligosaccharide Polysaccharide และอนุพันธ์ เมื่อทำปฏิกิริยากับฟีนอลและกรดซัลฟริกจะให้สีส้ม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (แสดงวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ก ข้อ 5)

4.การวิเคราะห์หาค่าอัลคาไลน์ตี (Alkalinity) และปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Total Volatile Acid)

ในการศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์โดยวิธีไตเตรท ซึ่งเป็นวิธีแบบหยาบๆสามารถนำไปใช้ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสีย ที่ทำงานภายใต้สภาวะไร้อากาศได้ เพื่อจะได้ทราบถึงการทำงานของจุลินทรีย์ภายในระบบ เนื่องจากใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นกว่าวิธีอื่นๆโดยวิธีนี้สามารถหาได้ทั้งค่าอัลคาไลน์ตี และปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (แสดงวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ก ข้อ 6)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการทดลอง แบ่งเป็น 4 ส่วน คือ

ส่วนที่หนึ่ง ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนสับสเตรทแต่ละชนิดเป็นกลูโคส ไชโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส ไชแลน ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid

ส่วนที่สอง ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนกลูโคสร้อยละ 0.02 ใน Synthetic medium

ส่วนที่สาม ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนกลูโคสร้อยละ 0.1 ใน Synthetic medium

ส่วนที่สี่ ศึกษากิจกรรมการใช้น้ำตาลกลูโคสและไชโลส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 โดยใช้จุลินทรีย์จากถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส)

การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนสับสเตรทแต่ละชนิดเป็นกลูโคส ไชโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส ไชแลน ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid

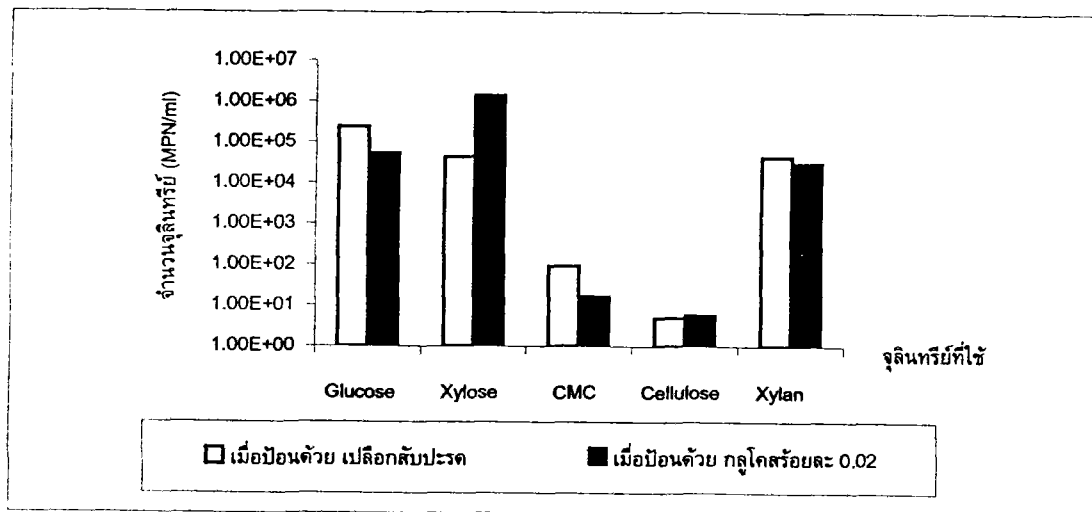
จากงานวิจัยของสุวิมล พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงมีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่า แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีกว่าถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิปานกลาง รวมทั้งได้มีการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต (ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส แอลฟา-เซลลูโลส และไชแลน) ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิปานกลางไปแล้วนั้น ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต (ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไชแลน) ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง โดยวิธี MPN จากผลการทดลองพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ในถังหมักก๊าซชีวภาพเมื่อป้อนด้วยเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิสูง คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไชแลน เป็น 2.4×10^5 4.3×10^4 93 0-10 และ 4.3×10^4 MPN/ml ตามลำดับ

เมื่อป้อนถึงหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงด้วยกลูโคส 0.2 กรัมต่อลิตร ทุก 3 วัน ควบคุมสภาวะของถังหมักให้คงที่ตลอดการทดลองเป็นเวลา 45 วัน ตามวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 2 นำน้ำหมักมาศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี MPN ควบคุมสภาวะของถังหมักให้คงที่ต่อไปอีก 45 วัน นำน้ำหมักมาศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตและนำจำนวนจุลินทรีย์ที่อ่านได้ทั้งสองค่ามาหาค่าเฉลี่ย ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 5 และภาพประกอบที่ 8

ตาราง 5 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วยกลูโคส ร้อยละ 0.02
ใน Digestion fluid และเปลือกสับปะรด

จุลินทรีย์ ที่ใช้	จำนวนจุลินทรีย์เมื่อป้อน (MPN /ml)	
	เปลือกสับปะรด	กลูโคส ร้อยละ 0.02
Glucose	2.4×10^5	5.35×10^4
Xylose	4.3×10^4	1.41×10^6
CMC	93	16.65
α -cellulose	0-10	5.8
Xylan	4.3×10^4	3.05×10^4
รวมทั้งหมด	3.3×10^5	1.5×10^6

พบว่า มีจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน เป็น 5.35×10^4 1.41×10^6 16.65 5.8 และ 3.05×10^4 MPN/ml ตามลำดับ



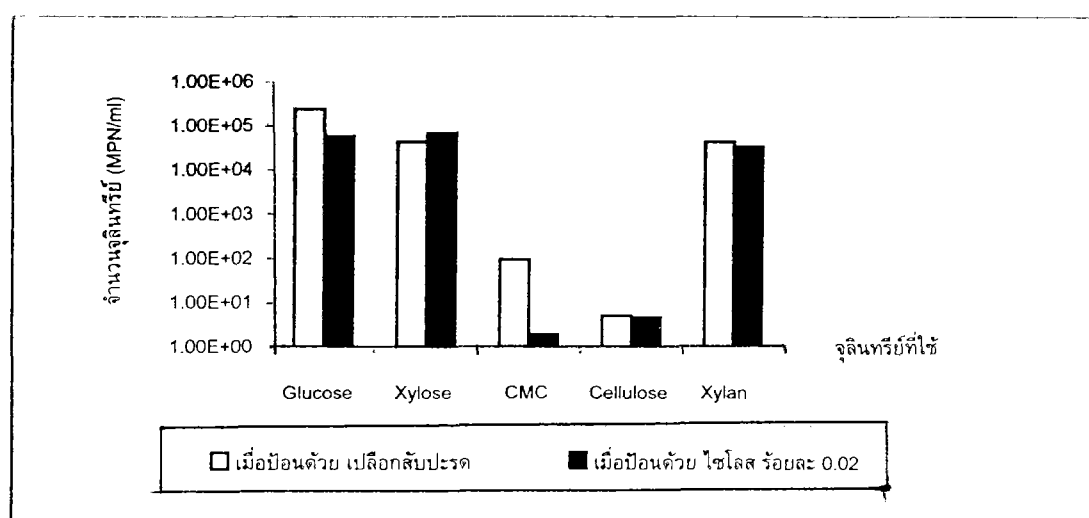
ภาพประกอบ 8 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วยกลูโคส ร้อยละ 0.02
ใน Digestion fluid

เมื่อป้อนถึงหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงด้วยไซโลส 0.2 กรัมต่อลิตร ทุก 3 วัน
ควบคุมสภาวะของถังหมักให้คงที่ตลอดการทดลองเป็นเวลา 45 วัน ตามวิธีดำเนินการวิจัย
ข้อ 2 นำน้ำหมักมาศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี MPN ควบคุมสภาวะ
ของถังหมักให้คงที่ต่อไปอีก 45 วัน นำน้ำหมักมาศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต
และนำจำนวนจุลินทรีย์ที่อ่านได้ทั้งสองค่ามาหาค่าเฉลี่ย ได้ผลการทดลองตาม ตารางที่ 6
และ ภาพประกอบที่ 9

ตาราง 6 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วยไซโลส ร้อยละ 0.02
ใน Digestion fluid และ เปลือกสับปะรด

จุลินทรีย์ ที่ใช้	จำนวนจุลินทรีย์เมื่อป้อน (MPN /ml)	
	เปลือกสับปะรด	ไซโลส ร้อยละ 0.02
Glucose	2.4×10^5	5.8×10^4
Xylose	4.3×10^4	6.8×10^4
CMC	93	1.9
α -cellulose	0-10	4.65
Xylan	4.3×10^4	3.35×10^4
รวมทั้งหมด	3.3×10^5	1.6×10^5

พบว่า มีจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไซโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน เป็น 5.8×10^4 6.8×10^4 1.9 4.65 และ 3.35×10^4 MPN/ml ตามลำดับ



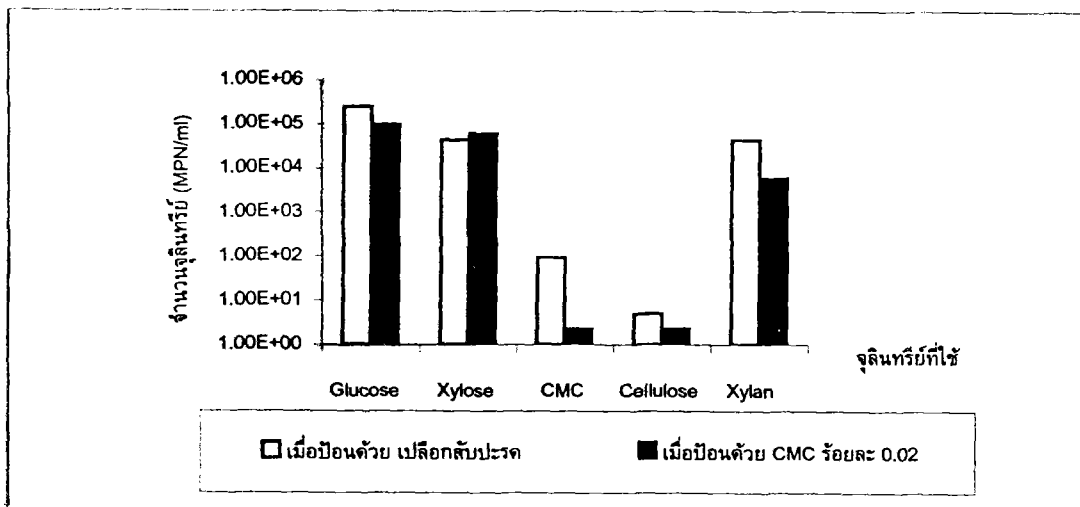
ภาพประกอบ 9 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วยไซโลส ร้อยละ 0.02
ใน Digestion fluid

เมื่อป้อนถึงหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงด้วย CMC 0.2 กรัมต่อลิตร ทุก 3 วัน
ควบคุมสภาวะของถังหมักให้คงที่ตลอดการทดลองเป็นเวลา 45 วัน ตามวิธีดำเนินการวิจัย
ข้อ 2 นำน้ำหมักมาศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี MPN ควบคุมสภาวะ
ของถังหมักให้คงที่ต่อไปอีก 45 วัน นำน้ำหมักมาศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต
และนำจำนวนจุลินทรีย์ที่อ่านได้ทั้งสองค่ามาหาค่าเฉลี่ย ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 7
และ ภาพประกอบที่ 10

ตาราง 7 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วย CMC ร้อยละ 0.02
ใน Digestion fluid และเปลือกสับปะรด

จุลินทรีย์ ที่ใช้	จำนวนจุลินทรีย์เมื่อป้อน (MPN /ml)	
	เปลือกสับปะรด	CMC ร้อยละ 0.02
Glucose	2.4×10^5	9.65×10^4
Xylose	4.3×10^4	5.9×10^4
CMC	93	2.3
α -cellulose	0-10	2.3
Xylan	4.3×10^4	5.9×10^3
รวมทั้งหมด	3.3×10^5	1.6×10^5

พบว่า มีจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส
และไซแลนเป็น 9.65×10^4 5.9×10^4 2.3 2.3 และ 5.9×10^3 MPN/ml ตามลำดับ



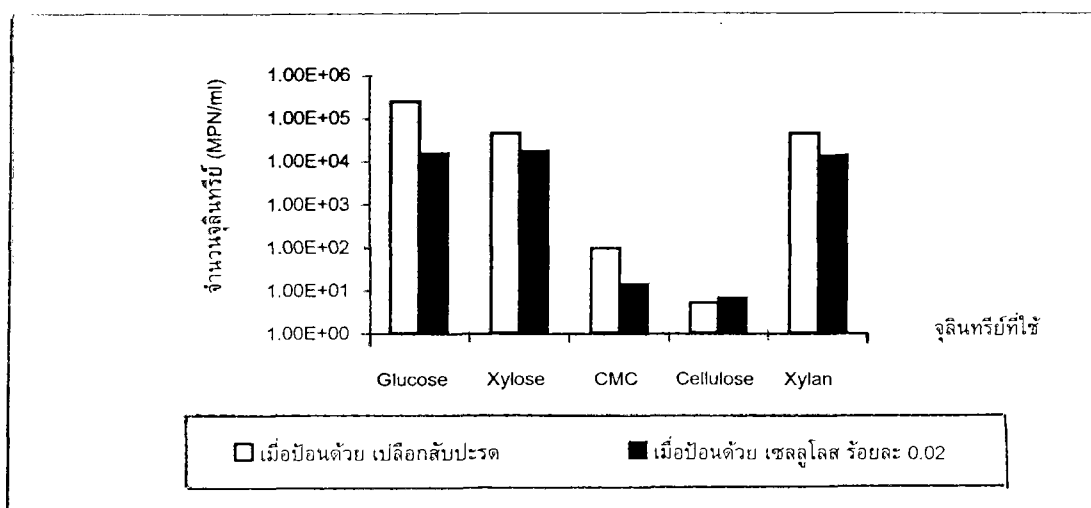
ภาพประกอบ 10 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วย CMC ร้อยละ 0.02
ใน Digestion fluid

เมื่อป้อนถึงหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงด้วยแอลฟา-เซลลูโลส 0.2 กรัมต่อลิตร ทุก 3 วัน ควบคุมสภาวะของถังหมักให้คงที่ตลอดการทดลองเป็นเวลา 45 วัน ตามวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 2 นำน้ำหมักมาศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี MPN ควบคุมสภาวะของถังหมักให้คงที่ต่อไปอีก 45 วัน นำน้ำหมักมาศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต และนำจำนวนจุลินทรีย์ที่อ่านได้ทั้งสองค่ามาหาค่าเฉลี่ย ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 8 และ ภาพประกอบที่ 11

ตาราง 8 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วยแอลฟา-เซลลูโลส ร้อยละ 0.02
ใน Digestion fluid และเปลือกสับปะรด

จุลินทรีย์ ที่ใช้	จำนวนจุลินทรีย์เมื่อป้อน (MPN /ml)	
	เปลือกสับปะรด	เซลลูโลส ร้อยละ 0.02
Glucose	2.4×10^5	1.51×10^4
Xylose	4.3×10^4	1.66×10^4
CMC	93	13.5
α -cellulose	0-10	6.5
Xylan	4.3×10^4	1.32×10^4
รวมทั้งหมด	3.3×10^5	4.5×10^4

พบว่า มีจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไซโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และ
ไซแลน เป็น 1.51×10^4 1.66×10^4 13.5 6.5 และ 1.32×10^4 MPN/ml ตามลำดับ



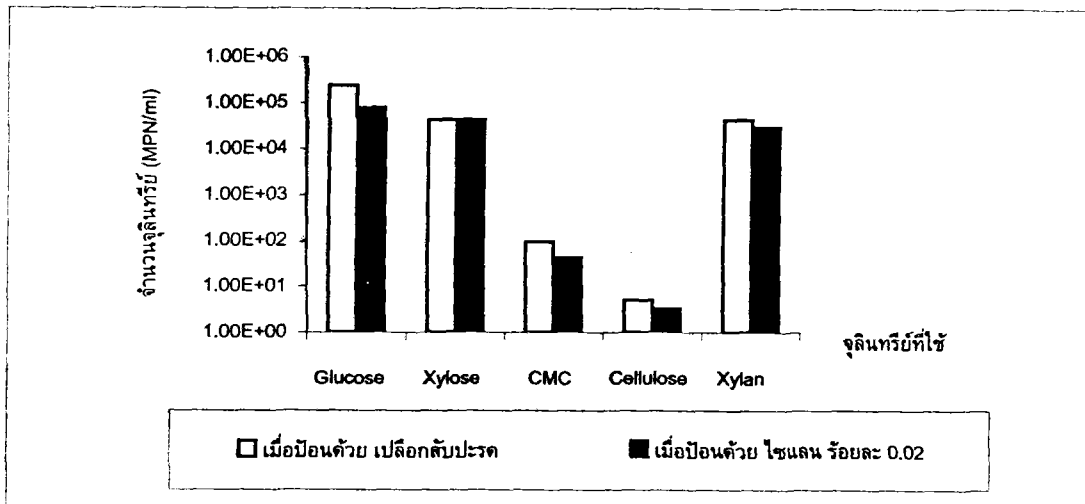
ภาพประกอบ 11 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วยแอลฟา-เซลลูโลส
ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid

เมื่อป้อนถึงหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงด้วยไซแลน 0.2 กรัมต่อลิตร ทุก 3 วัน ควบคุมสภาวะของถังหมักให้คงที่ตลอดการทดลองเป็นเวลา 45 วัน ตามวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 2 นำน้ำหมักมาศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี MPN ควบคุมสภาวะของถังหมักให้คงที่ต่อไปอีก 45 วัน นำน้ำหมักมาศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต และนำจำนวนจุลินทรีย์ที่อ่านได้ทั้งสองค่ามาหาค่าเฉลี่ย ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 9 และ ภาพประกอบที่ 12

ตาราง 9 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วยไซแลน ร้อยละ 0.02
ใน Digestion fluid และเปลือกสับปะรด

จุลินทรีย์ ที่ใช้	จำนวนจุลินทรีย์เมื่อป้อน (MPN /ml)	
	เปลือกสับปะรด	ไซแลน ร้อยละ 0.02
Glucose	2.4×10^5	7.97×10^4
Xylose	4.3×10^4	4.3×10^4
CMC	93	43
α -cellulose	0-10	3.3
Xylan	4.3×10^4	3.05×10^4
รวมทั้งหมด	3.3×10^5	1.53×10^5

พบว่า มีจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไซโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน เป็น 7.97×10^4 4.3×10^4 43 3.3 และ 3.05×10^4 MPN/ml ตามลำดับ



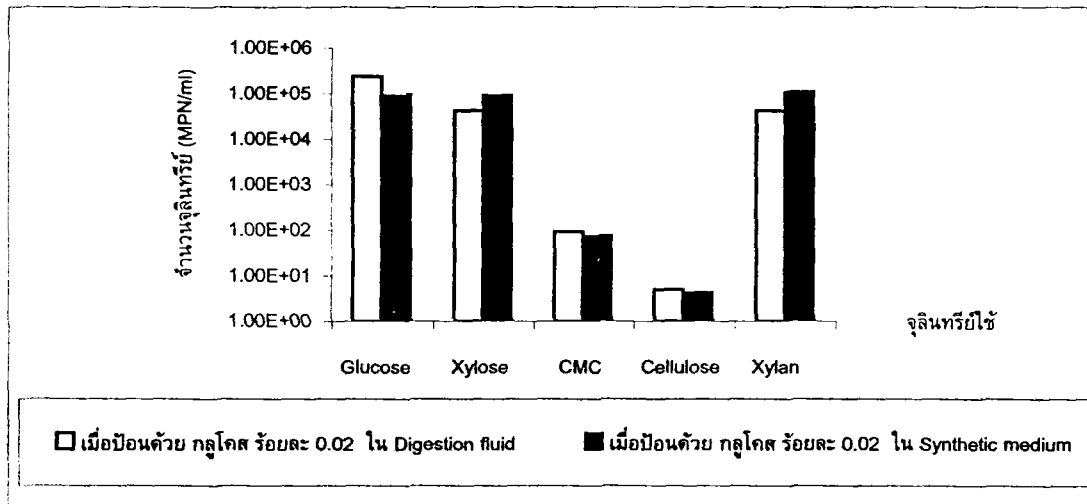
ภาพประกอบ 12 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วยไทรปตอน ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid

การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนด้วยกลูโคสร้อยละ 0.02 ใน Synthetic medium จากการทดลองที่ผ่านมา พบว่าจำนวนจุลินทรีย์แทบไม่เปลี่ยนแปลงหรือไม่เพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ขาดสารอาหารจำเป็นบางอย่างเนื่องจากการป้อนด้วย Digestion fluid ดังนั้นจึงทำการทดลองในถังหมักที่ป้อนด้วยกลูโคสร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid โดยเปลี่ยนมาป้อนด้วยกลูโคสร้อยละ 0.02 ใน Synthetic medium ทุก 3 วัน ควบคุมระบบให้อยู่ในสภาวะคงที่ตลอดการทดลอง เป็นเวลา 14 วัน นำน้ำหมักมานับจำนวนจุลินทรีย์ ซึ่งผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ แสดงในตารางที่ 10 และภาพประกอบที่ 13

ตาราง 10 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วยกลูโคส ร้อยละ 0.02
ใน Digestion fluid และ Synthetic medium

จุลินทรีย์ ที่ใช้	จำนวนจุลินทรีย์เมื่อป้อน กลูโคสร้อยละ 0.02	
	ใน Digestion fluid	ใน Synthetic medium
Glucose	5.35×10^4	9.3×10^4
Xylose	1.41×10^6	9.3×10^4
CMC	16.65	75
α -cellulose	5.8	43
Xylan	3.05×10^4	1.1×10^5
รวมทั้งหมด	1.5×10^6	2.97×10^5

พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และ ไชแลนในถังหมักก๊าซชีวภาพ ที่ป้อนด้วยกลูโคสใน Synthetic medium เป็น 9.3×10^4 9.3×10^4 75 43 และ 1.1×10^5 MPN/ml ตามลำดับ แม้ว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ กลูโคสมีจำนวนใกล้เคียงกับเมื่อป้อนด้วยกลูโคสใน Digestion fluid แต่จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ ไชโลสจะต่ำกว่ามาก ขณะที่จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ไชแลนจะสูงกว่าเพียงเล็กน้อย เมื่อ เทียบกับจำนวนจุลินทรีย์เมื่อป้อนด้วยกลูโคสใน Digestion fluid จำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมด เมื่อใช้ Synthetic medium เท่ากับ 2.97×10^5 MPN/ml ขณะที่เมื่อใช้ Digestion fluid มี จำนวนเท่ากับ 1.5×10^6 MPN/ml แสดงว่าการเลี้ยงจุลินทรีย์ใน Digestion fluid ไปนานๆนั้น ไม่ได้ทำให้ขาดสารอาหารจำเป็นตามที่สงสัย และ Digestion fluid ยังเหมาะที่จะใช้ในการ ศึกษาครั้งนี้มากกว่า ใช้ Synthetic medium ด้วย



ภาพประกอบ 13 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เมื่อป้อนด้วยกลูโคส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid และ Synthetic medium

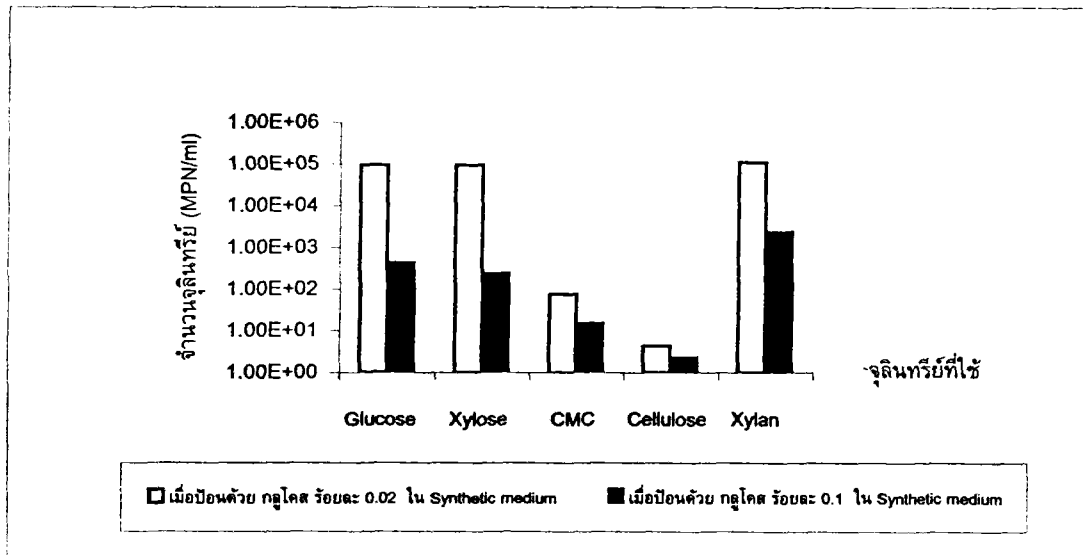
การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต ในหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนด้วยกลูโคสร้อยละ 0.1 ใน Synthetic medium

ดังนั้นจึงป้อนกลูโคส ร้อยละ 0.1 ใน Synthetic medium ทุก 3 วัน ตามวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 3 มีการควบคุมระบบให้อยู่ในสภาวะคงที่ตลอดการทดลอง เป็นเวลา 45 วัน เมื่อครบกำหนดน้ำหมักมานับจำนวนจุลินทรีย์ ด้วยวิธี MPN ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์แสดงในตารางที่ 11 และภาพประกอบที่ 14

ตาราง 11 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วยกลูโคส ร้อยละ 0.02 และ 0.1
ใน Synthetic medium

จุลินทรีย์ ที่ใช้	จำนวนจุลินทรีย์ใน Synthetic medium เมื่อป้อน	
	กลูโคสร้อยละ 0.02	กลูโคสร้อยละ 0.1
Glucose	9.3×10^4	4.3×10^2
Xylose	9.3×10^4	2.4×10^2
CMC	75	15
α -cellulose	43	2.3
Xylan	1.1×10^5	2.4×10^3
รวมทั้งหมด	2.97×10^5	3.09×10^3

พบว่า มีจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลนเป็น 4.3×10^2 2.4×10^2 15 2.3 และ 2.4×10^3 MPN/ml ตามลำดับ และจำนวนจุลินทรีย์รวมเท่ากับ 3.09×10^3 MPN/ml ขณะที่จำนวนจุลินทรีย์รวมในถังหมัก ก๊าซชีวภาพเมื่อป้อนด้วยกลูโคสร้อยละ 0.02 เป็น 2.97×10^5 MPN/ml จะเห็นว่ากลูโคสที่ ความเข้มข้นสูง เช่น ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จะมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ คาร์โบไฮเดรต เมื่อเทียบกับเมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคสที่มีความเข้มข้นต่ำ



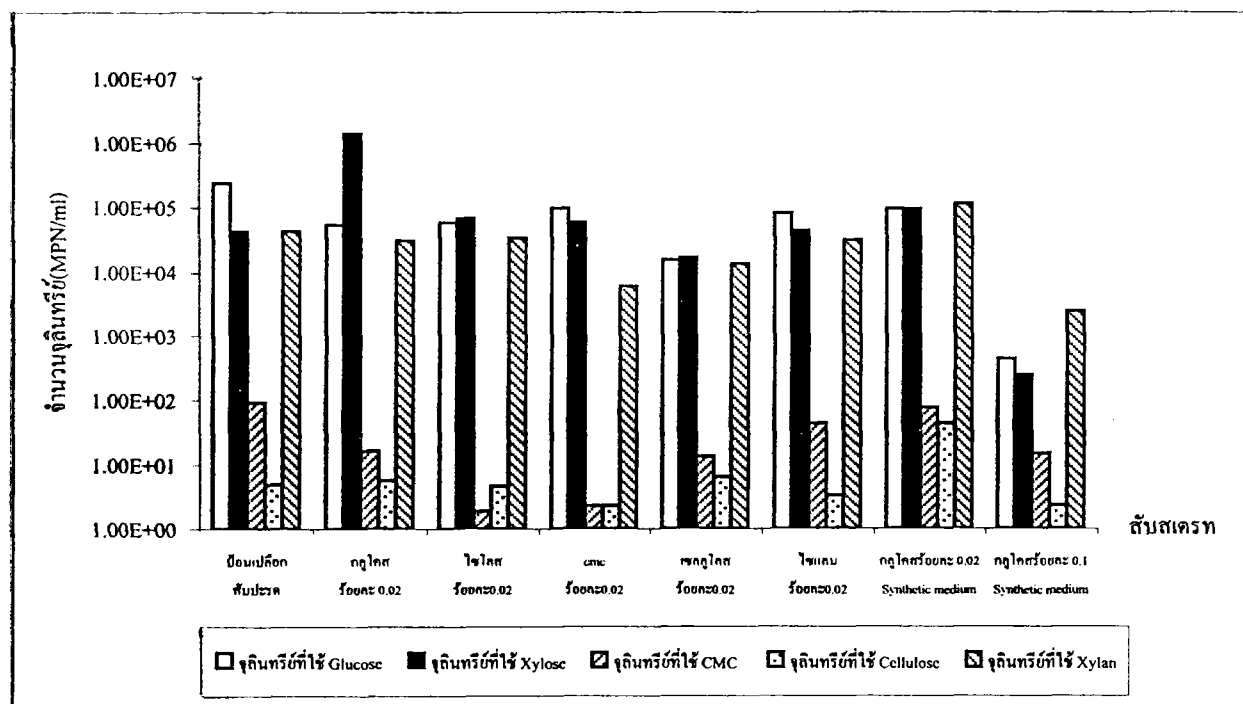
ภาพประกอบ 14 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วยกลูโคส ร้อยละ 0.02 และ 0.1 ใน Synthetic medium

การเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงเมื่อป้อนด้วยสับสเตรตต่าง ๆ

ภาพประกอบที่ 15 และตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิด และจำนวนจุลินทรีย์รวมในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง เมื่อป้อนด้วยเปลือกสับปะรด หรือกลูโคส หรือไซโลส หรือ CMC หรือแอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน พบว่ากลูโคสเป็นสับสเตรตที่ดีที่สุดสำหรับจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต รองลงมาเป็นเปลือกสับปะรด ส่วนที่เหลือจะใกล้เคียงกันคือไซโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน

ตาราง 12 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนด้วยสับเสตแตกต่างกัน

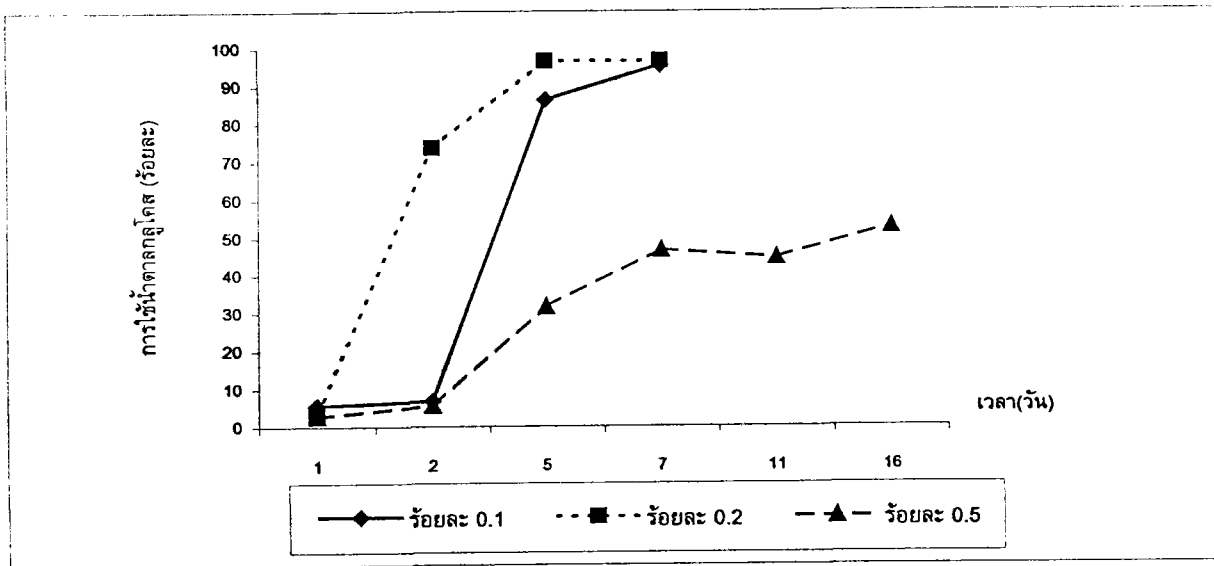
เมื่อป้อนด้วย		จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ (MPN/ml)				
		กลูโคส (ร้อยละ)	ไซโลส (ร้อยละ)	CMC (ร้อยละ)	เซลลูโลส (ร้อยละ)	รวมทั้งหมด (ร้อยละ)
เปลี่ยนสับเสต		2.4×10^5	4.3×10^4	93	0-10	3.3×10^5
		(73.59)	(13.19)	(0.03)	(0)	(100)
กลูโคส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid		5.35×10^4	1.41×10^6	16.65	5.8	1.5×10^6
		(3.58)	(94.38)	(0)	(0)	(100)
ไซโลส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid		5.8×10^4	6.8×10^4	1.9	4.65	1.6×10^5
		(36.36)	(42.64)	(0)	(0)	(100)
CMC ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid		9.65×10^4	5.9×10^4	2.3	2.3	1.6×10^5
		(59.79)	(36.55)	(0)	(0)	(100)
แอลฟา-เซลลูโลส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid		1.51×10^4	1.66×10^4	13.5	6.5	4.5×10^4
		(33.66)	(36.99)	(0.03)	(0)	(100)
ไซแลน ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid		7.97×10^4	4.3×10^4	43	3.3	1.53×10^5
		(52.01)	(28.06)	(0.03)	(0)	(100)
กลูโคส ร้อยละ 0.02 ใน Synthetic medium		9.3×10^4	9.3×10^4	75	43	2.97×10^5
		(31.41)	(31.41)	(0.03)	(0)	(100)
กลูโคส ร้อยละ 0.1 ใน Synthetic medium		4.3×10^2	2.4×10^2	15	2.3	3.09×10^3
		(13.93)	(7.77)	(0.49)	(0.07)	(100)



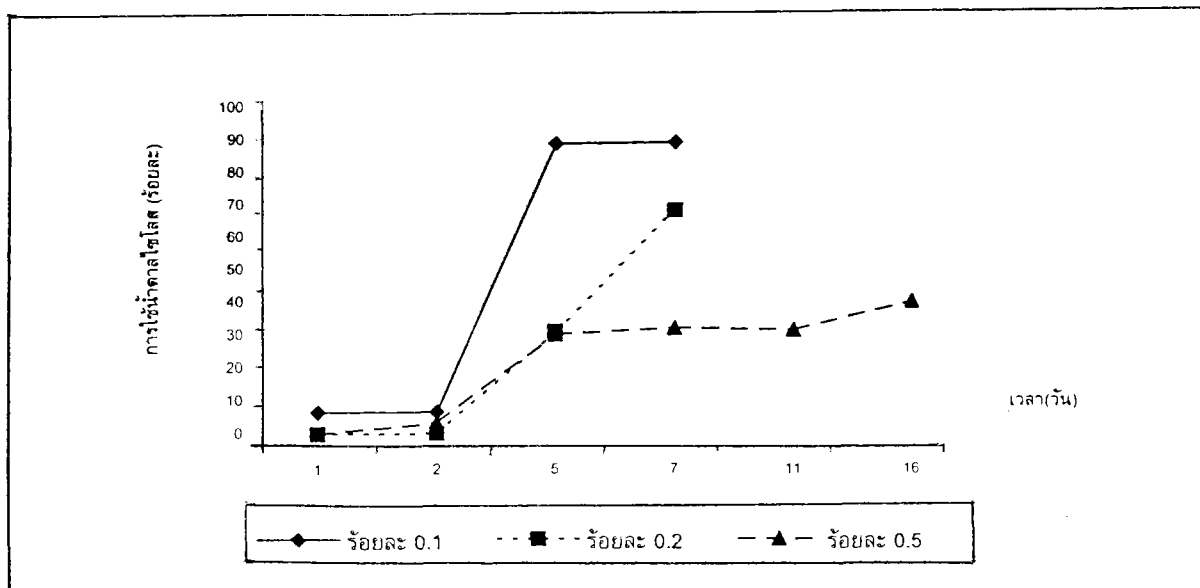
ภาพประกอบ 15 จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง เมื่อป้อนด้วยสับสเตรทต่างๆ

การศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์จากถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง ในการใช้กลูโคสและไซโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5

จากผลการทดลองพบว่า จุลินทรีย์ในถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนสับสเตรทที่เป็นกลูโคสแล้ว พบว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลสเจริญได้ดี จึงได้มีการศึกษาต่อไปว่าจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลชนิดใดได้ดีกว่ากัน โดยนำน้ำหมักจากถังหมักที่อุณหภูมิสูง ที่ป้อนด้วยเปลือกสับปะรด มาศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ในการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 ใน Synthetic medium โดยใช้ Inoculum ร้อยละ 10 ตรวจวัดกิจกรรมของจุลินทรีย์โดยการตรวจสอบองค์ประกอบของก๊าซ ค่า pH และปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ ตามวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 4 ได้ผลการทดลองตามภาพประกอบ 16 ถึง 19



ภาพประกอบ 16 การใช้น้ำตาลกลูโคส (ร้อยละ) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 ที่ระยะเวลาต่างๆ

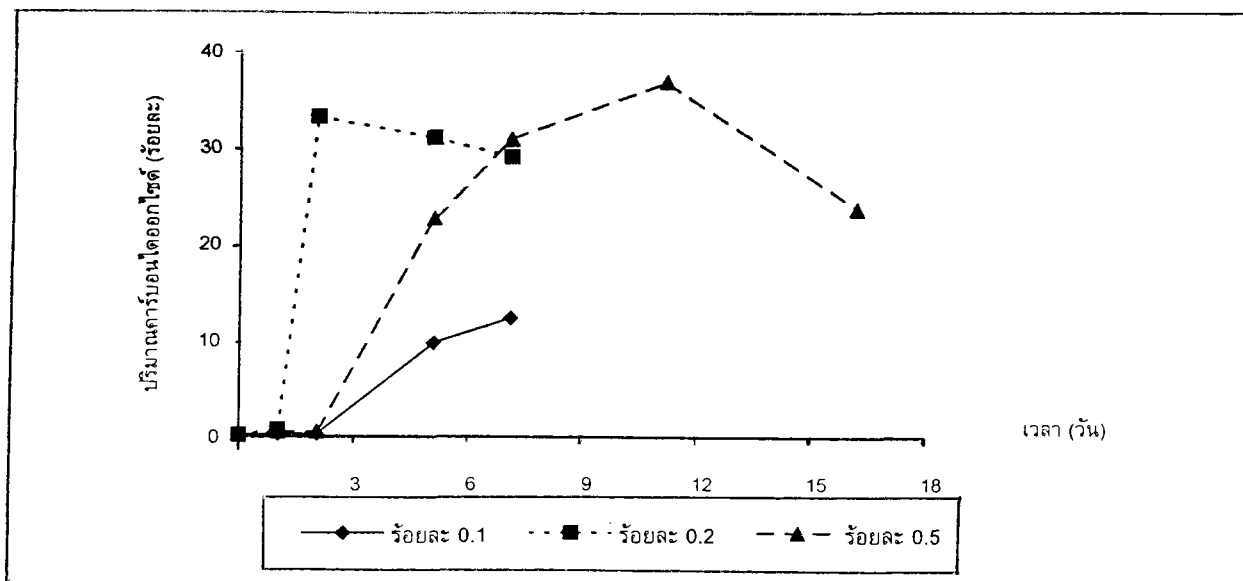


ภาพประกอบ 17 การใช้น้ำตาลไซโลส (ร้อยละ) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 ที่ระยะเวลาต่างๆ

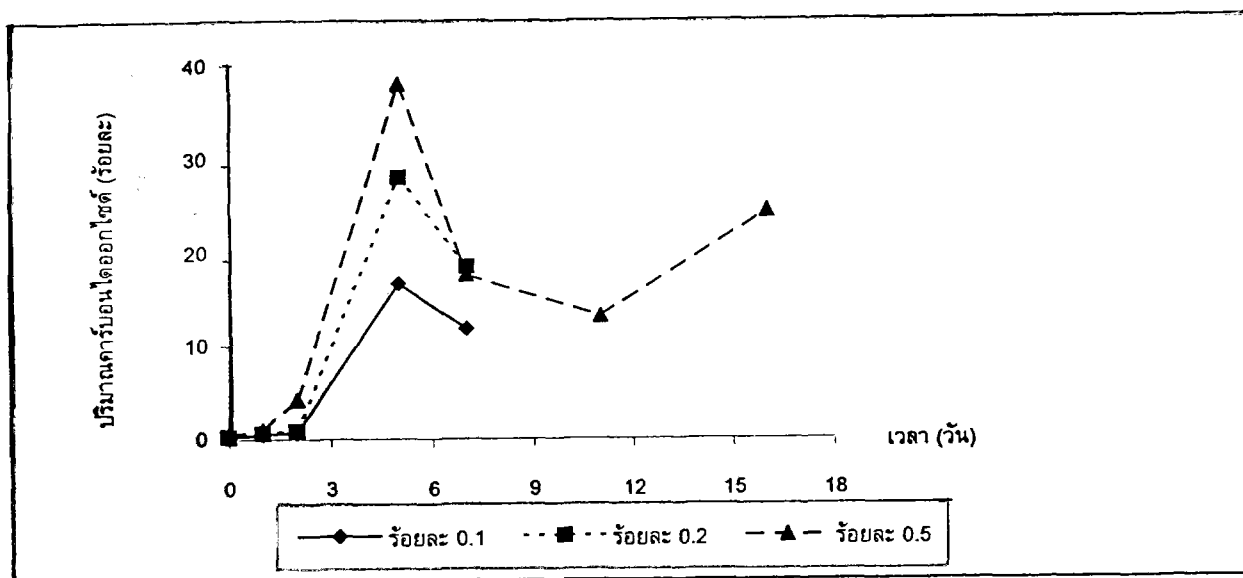
การใช้น้ำตาล

จุลินทรีย์สามารถใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ได้เร็วที่สุด และเร็วกว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.5 ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ถูกใช้ไปประมาณร้อยละ 74 ตั้งแต่วันที่ 2 ของการทดลอง และสามารถใช้ไซโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ได้ดีเป็นอันดับสอง กลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ถูกใช้ได้ช้าที่สุด โดยถูกใช้ไปร้อยละ 30-50 ในวันที่ 5 และไม่เกินร้อยละ 50 แม้จะทดลองไปนาน 16 วัน

จุลินทรีย์สามารถใช้ไซโลสความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ได้ช้ากว่าการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 แต่ดีกว่าการใช้ไซโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และ 0.5 โดยจุลินทรีย์ใช้ไซโลสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ไปประมาณร้อยละ 90 ในช่วงวันที่ 5-7 ของการทดลอง ไซโลสความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ถูกใช้รองจากความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยถูกใช้ไปประมาณร้อยละ 30 ในวันที่ 5 และประมาณร้อยละ 70 ในวันที่ 7 ส่วนที่ไซโลสความเข้มข้นร้อยละ 0.5 พบว่า ถูกใช้ช้าที่สุด โดยถูกใช้ไปประมาณร้อยละ 30 ในวันที่ 5-11 และร้อยละ 40 ในวันที่ 16 ในภาพรวมจะเห็นว่าจุลินทรีย์สามารถใช้กลูโคสได้ดีกว่าไซโลสซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในตาราง 12 และไม่สามารถเจริญหรือใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงได้ดี เช่น ที่ร้อยละ 0.5



ภาพประกอบ 18 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (ร้อยละ) เมื่อใช้กลูโคส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 ที่ระยะเวลาต่างๆ



ภาพประกอบ 19 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (ร้อยละ) เมื่อใช้ไซโลส ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 ที่ระยะเวลาต่างๆ

ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์

เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 จะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 จะมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรก และสูงกว่าที่ใช้กลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 0.1 เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วย ไซโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 จะเห็นว่าน้ำตาลไซโลสความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นมากกว่าการใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 และ 0.2

สามารถสรุปได้ว่าการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เกิดได้ดีที่สุด ดีกว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.5 เทียบจากร้อยละของการใช้น้ำตาลพบว่า ที่ 0.1 ใช้ได้ดีกว่าที่ 0.5 แม้ว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 0.5 จะเกิดขึ้นมากกว่าที่ 0.1 ก็ตาม แสดงว่า จุลินทรีย์สามารถนำกลูโคสบางส่วนของความเข้มข้นสูงไปใช้ได้เลย แต่ขณะเดียวกันที่ความเข้มข้น 0.5 นี้อาจจะสูงเกินไปและเกิดการสะสมของกลูโคสในจุลินทรีย์ที่มีผลต่อจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์นานขึ้น จากผลการใช้น้ำตาลไซโลสและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น แสดงว่าจุลินทรีย์สามารถใช้ไซโลสที่ความเข้มข้นต่ำได้เร็วกว่าที่ความเข้มข้นสูง และปริมาณ ผลผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะแปรผันตามความเข้มข้นของไซโลส

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัย เป็นการศึกษาน้ำจลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด (ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไซโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน) ในถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) และศึกษาน้ำจลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเมื่อป้อนด้วยสับสเตรทบริสุทธิ์แทนเปลือกสับปะรด โดยการแบ่งน้ำหมักมาจากถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง เพื่อเป็น starter 5 ชุดทดลอง แล้วป้อนสับสเตรทแต่ละชนิด ได้แก่กลูโคส ไซโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส ไซแลน ชุดทดลองละ 0.2 กรัม/ลิตร ใน Digestion fluid ทุก 3 วัน ควบคุมสภาวะของถังหมักให้คงที่ และศึกษาน้ำจลินทรีย์โดยวิธี MPN

จากงานวิจัยของสุวิมล พบว่าการย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่เกิดได้ดีที่อุณหภูมิสูง ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงจะน้อยกว่า แต่ด้วยสภาวะการทำงานที่เหมาะสมทำให้เอนไซม์เซลลูเลสและไซแลเนส สามารถแสดงกิจกรรมได้ดีกว่าถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิปานกลาง ทั้งนี้เนื่องมาจากความเหมาะสมของสภาวะการทำงานของเอนไซม์ รวมทั้งได้มีการศึกษาน้ำจลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต (ได้แก่จุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไซโลส เซลลูโลส และไซแลน) ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิปานกลาง เมื่อป้อนถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิปานกลางด้วยกลูโคส ร้อยละ 0.3 ทุก 3 วัน พบว่าจุลินทรีย์ทุกกลุ่มลดลงจากช่วงก่อนเติมกลูโคส เชื้อที่ใช้กลูโคสและไซโลสเจริญเป็นกลุ่มหลัก เมื่อเติมไซแลนร้อยละ 0.3 พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้กลูโคส ไซโลส และแอลฟา-เซลลูโลส มีแนวโน้มลดลงแต่กลุ่มที่ใช้ไซแลนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และพบสัดส่วนของเชื้อที่ใช้กลูโคสและไซโลสเจริญเป็นกลุ่มหลัก ส่วนกลุ่มที่ใช้ไซแลนเจริญเป็นกลุ่มรอง ชุดทดลองที่เติมแอลฟา-เซลลูโลสร้อยละ 0.3 พบว่ามีจำนวนและสัดส่วนน้อยทั้งในช่วงก่อนและหลังเติมแหล่งคาร์บอน สามารถสรุปได้จากผลการทดลองแสดงว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถใช้กลูโคสได้อย่างเดียว จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ได้ทั้งกลูโคสและไซโลส จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ได้ทั้งไซแลนและไซโลส และจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ได้ทั้งกลูโคส ไซโลสและไซแลนอยู่ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิปานกลาง

การป้อนแหล่งคาร์บอนเข้าสู่ระบบหมัก

แหล่งคาร์บอนที่ป้อนเข้าสู่ระบบ จะถูกจุลินทรีย์นำไปใช้เพื่อการสร้างเซลล์ใหม่และสร้างพลังงาน ซึ่งพลังงานเหล่านี้จุลินทรีย์จะนำไปใช้ใน Biosynthesis Active transport Motility ในการทดลองเมื่อป้อนถึงหมักก๊าซชีวภาพอุณหภูมิสูงด้วยกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ทุก 3 วัน แทนเปลือกสับปะรด พบว่าค่าอัลคาไลน์ลดลง เมื่อป้อนกลูโคสเข้าสู่ระบบนานขึ้น (แสดงในภาคผนวก ข ตาราง 1) มีค่า pH ก่อนข้างคงที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง Methanogen แต่เมื่อนับจำนวนจุลินทรีย์แล้วพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสไม่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการป้อนกลูโคส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid มีปริมาณกลูโคสน้อยเกินไปไม่เพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ เมื่อเทียบกับน้ำตาลในเปลือกสับปะรด ซึ่งมีกลูโคสร้อยละ 0.13 โดยน้ำหนักเปียก จึงทำให้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ในถังหมัก หรืออาจเกิดจากอิทธิพลของ Toxicity ในน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.5 ที่ใช้เป็นอาหารสำหรับนับจำนวนจุลินทรีย์ จากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ได้ซ้ำเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.2 และในการทดลองนับเชื้อโดยวิธี MPN ในกลูโคสร้อยละ 0.5 พบว่าจะมีปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ประมาณ 1,000 - 2,000 มก/ล หรือร้อยละ 0.1 และ 0.2 ปริมาณน้ำตาลดังกล่าวน่าจะมีมากเกินสำหรับการเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักที่อุณหภูมิสูง จากงานวิจัยของเสาวณีย์ พบว่ากลูโคสที่หายไปอาจถูกนำเข้าสู่เซลล์ แต่ก็ยังมีกลูโคสบางส่วนที่หลงเหลืออยู่ โดยเซลล์ไม่สามารถรับกลูโคสทั้งหมดเข้าสู่เซลล์ได้ เนื่องจากการสะสมของกลูโคสภายในเซลล์จะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นมีผลต่อปริมาณกลูโคสที่เข้าสู่เซลล์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสจากร้อยละ 0.1 เป็น 0.2 พบว่า B และ Z₈ (เป็นจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่แยกจากถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง) ไม่สามารถนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้หมด มีการสะสมของกลูโคสภายในเซลล์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ากลูโคสที่ความเข้มข้นสูงอาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์ จากผลการย่อยสลายกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.2 ความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้น มีผลต่อการย่อยสลายที่อุณหภูมิสูงมากกว่าที่อุณหภูมิปานกลาง ซึ่งนอกจากทำให้มีการสะสมของกลูโคสในสารละลายแล้วจุลินทรีย์อาจจะไม่สามารถใช้กลูโคสที่ถูกนำเข้าไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เกิดการสะสมของกลูโคสภายในเซลล์ ซึ่งน่าจะส่งผลต่อเนื่องต่อ Toxicity ของกลูโคสต่อเซลล์อีกด้วย

การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 โดยวัดค่าน้ำตาลที่เหลืออยู่ใน Effluent ไม่พบว่ามีน้ำตาลสะสมอยู่ในระบบ แสดงว่าน้ำตาลที่ถูกป้อนเข้าสู่ระบบถูกกำจัดได้หรือจุลินทรีย์สามารถใช้ได้หมด เมื่อคิดประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการใช้กลูโคสพบว่าอยู่ที่ร้อยละ 33 ต่อวัน งานวิจัยนี้พบจุลินทรีย์เด่นเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลส ซึ่งมีจำนวนเพิ่มขึ้นมาจากจำนวนจุลินทรีย์เมื่อป้อนเปลือกสับปะรดและ

มีสัดส่วนมากที่สุด จุลินทรีย์รองคือจุลินทรีย์ย่อยสลายกลูโคสและไซแลน ตามลำดับ จากผลการทดลอง ในภาพประกอบ 16 และ 17 แสดงว่าจุลินทรีย์จากถังหมักก๊าซชีวภาพอุณหภูมิสูงนี้ สามารถใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นต่ำๆได้ดีที่สุด ทำให้จำนวนจุลินทรีย์รวมในถังหมักเมื่อป้อนด้วยกลูโคสเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า เมื่อเทียบกับที่ป้อนด้วยเปลือกสับปะรด และจากตาราง 5 ที่พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลสสูงมาก อาจเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีทั้งที่สามารถใช้ได้ทั้งกลูโคสและไซโลสซึ่งเป็นกลุ่มใหญ่ และใช้ไซโลสได้อย่างเดียวหรือใช้กลูโคสได้อย่างเดียว

เมื่อป้อนถังหมักด้วยไซโลสความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ทุก 3 วัน พบว่าค่าอัลคาไลน์ลดลง (แสดงในภาคผนวก ข ตาราง 1) เมื่อป้อนไซโลสเข้าสู่ระบบนานขึ้น ค่า pH ก่อนข้างคอกที่และอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง Methanogen พบว่าจุลินทรีย์เด่นคือจุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลส มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากจำนวนจุลินทรีย์เมื่อป้อนด้วยเปลือกสับปะรด เนื่องจากไซโลสเป็นสับสเตรทสำหรับจุลินทรีย์กลุ่มนี้ ทำให้จุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถนำไปใช้สำหรับการสร้างจำนวนเซลล์ให้เพิ่มจำนวนขึ้นได้ จุลินทรีย์รองคือจุลินทรีย์ใช้ไซแลนและจุลินทรีย์ใช้กลูโคส สัดส่วนของจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสลดลงจากจำนวนจุลินทรีย์ที่ป้อนด้วยเปลือกสับปะรด เมื่อป้อนถังหมักด้วยไซโลสจะพบว่าจำนวนจุลินทรีย์รวมน้อยกว่าที่ป้อนด้วยเปลือกสับปะรด ประมาณครึ่งหนึ่ง จากตาราง 12 แสดงว่ากลูโคสจะทำหน้าที่เป็นสับสเตรทที่ดีที่สุด รองลงมาเป็นเปลือกสับปะรด และไซโลสตามลำดับ ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการใช้ไซโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 โดยวัดค่าน้ำตาลที่เหลืออยู่ใน Effluent พบว่าน้ำตาลที่ถูกป้อนเข้าสู่ระบบถูกกำจัด หรือจุลินทรีย์สามารถใช้ได้เกือบหมดจนเหลืออยู่ในระบบเพียงเล็กน้อย และระบบมีความสามารถในการบำบัดไซโลสอยู่ในระดับร้อยละ 33 ต่อวัน ในงานวิจัยของนพพรพบว่า ในการเลี้ยงจุลินทรีย์จากถังหมัก (55 องศาเซลเซียส) ด้วยไซโลส ก๊าซที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายมีเฉพาะคาร์บอนไดออกไซด์เพียงอย่างเดียวเท่านั้น แสดงว่าในถังหมักมี Methanogen อยู่่น้อยกว่าพวก Non-methanogen ซึ่งสาเหตุน่าจะเกิดจาก Methanogen ทำงานได้ไม่ดีที่อุณหภูมิสูงจึงถูกกำจัดออกไปจนเหลือแต่เชื้อที่ย่อยสลายไซโลสเท่านั้น หรือ Methanogen ที่มีอยู่ในถังหมักอุณหภูมิสูงมีจำนวนน้อยกว่าจุลินทรีย์ย่อยสลายไซโลสมากและเมื่อทดสอบโดยใช้กลูโคสร้อยละ 1 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจากถังหมักที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) พบว่าไม่สามารถผลิตก๊าซมีเทนได้เลย ซึ่งในกรณีนี้ที่เชื้อตั้งต้นจำนวนต่ำมากอาจกำจัด Methanogen ออกไปหมด แม้จะใช้ปริมาณสารอาหารตั้งต้นต่ำก็ไม่สามารถตรวจพบก๊าซมีเทนในก๊าซผสมได้

จุลินทรีย์ในถังหมักเปลือกสับปะรดที่ใช้ในการทดลองเป็นจุลินทรีย์ผสม ซึ่งมีความหลากหลายของสายพันธุ์ปะปนกันอยู่ ในการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายชนิด ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆซึ่งกันและกันในลักษณะเกื้อกูลกัน ได้แก่ การใช้ผลิตภัณฑ์ใดผลิตภัณฑ์หนึ่ง

ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากจุลินทรีย์อื่นที่สร้างขึ้นเพื่อนำมาใช้ต่อ ในลักษณะของความสัมพันธ์ที่ซับซ้อน และเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาของการหมัก ดังนั้นถ้าหากมีการเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยสับสเตรปรีซูทซ์ชนิดใดชนิดหนึ่ง อาจส่งผลให้มีการคัดเลือกจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งแล้วทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นถูกกำจัดออกจากระบบ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องอาศัยผลิตภัณฑ์เฉพาะจากจุลินทรีย์ชนิดนั้นในการดำรงชีวิต โดยอาจทำให้เกิดผลกระทบกับการทำงานร่วมกันเป็นชุด ของกลุ่มจุลินทรีย์หรือสมดุลของระบบโดยรวม (ชเนศ อุทิศธรรม, 2526 ; นพพร เจตนาชัย, 2529 และ สุวิมล ฤทธิ์เดช, 2543) ในการทดลองจะเห็นได้ว่าสภาวะของถังหมักมีความสำคัญอย่างมากต่อการทดลอง ประกอบด้วย ปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่า pH โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง Methanogen มีค่าเป็น 6.5-7.5 ซึ่งในการทดลองจะมีการเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตเมื่อค่า pH ลดลงต่ำกว่า 6.5 อัตราการป้อนสารอินทรีย์ต่อวัน องค์ประกอบ ปริมาณและความเข้มข้นของสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้าสู่ระบบ สารพิษ ระยะเวลาในการบำบัดของเสีย อาหารเสริม ค่าความเป็นด่างและอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องและทำให้มีผลต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ในถังหมัก และการที่จำนวนของจุลินทรีย์ในถังหมักไม่เพิ่มขึ้น อาจมีสาเหตุมาจากความไม่เหมาะสมของสภาวะถังหมักหรือขาดปัจจัยต่างๆที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญดังที่กล่าวมาแล้ว ทำให้จำกัดการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์

เมื่อป้อน CMC ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ทุก 3 วัน (แสดงในภาคผนวก ข ตาราง 2) พบว่าค่าอัลคาไลน์ลดลงมาก เมื่อมีการป้อน CMC นานขึ้น ค่า pH ก่อนข้างคงที่อยู่ในช่วง 7.0-7.5 จึงไม่มีการปรับค่า pH เนื่องจากเกรงว่าถ้าเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตจะส่งผลให้ค่า pH สูงเกินกว่าช่วงที่เหมาะสมสำหรับ Methanogen เมื่อนำมานับเชื้อด้วยวิธี MPN แล้ว พบว่าแทบไม่มีจุลินทรีย์ย่อยสลาย CMC หลงเหลืออยู่ในระบบเลยซึ่งจุลินทรีย์น่าจะถูกชะล้างออกไปจากระบบตั้งแต่ระยะแรกของการป้อนสับสเตรป และสามารถพบจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสเป็นจุลินทรีย์เด่น แม้จะมีจำนวนลดลงจากจำนวนเมื่อป้อนด้วยเปลือกสับปะรด แต่มีสัดส่วนมากที่สุด จุลินทรีย์รองได้แก่จุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลสและไซแลน ตามลำดับ โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลสมีการเพิ่มจำนวนขึ้น แม้จะมีสัดส่วนรองจากจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ส่วนจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลนมีจำนวนลดลง การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการใช้ CMC ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 โดยวัดค่าน้ำตาลที่เหลืออยู่ใน Effluent พบว่าน้ำตาลที่ถูกป้อนเข้าสู่ระบบมีการสะสมอยู่ในระบบ ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกำจัดของเสียของระบบลดลง อยู่ในช่วงร้อยละ 17-29

เมื่อป้อนถังหมักด้วยแอลฟา-เซลลูโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ทุก 3 วัน (แสดงในภาคผนวก ข ตาราง 2) พบว่าค่าอัลคาไลน์ลดลงเมื่อมีการป้อนเซลลูโลสเข้าสู่ระบบนานขึ้น จุลินทรีย์น่าจะถูกชะล้างออกไปจากระบบจะเห็นว่าเมื่อนำน้ำหมักมานับเชื้อด้วยวิธี

MPN แล้วพบว่าแทบไม่มีจุลินทรีย์ที่ใช้เซลลูโลสหลงเหลืออยู่ในระบบเลย ซึ่งจุลินทรีย์น่าจะถูกล้างออกไปจากระบบตั้งแต่ระยะแรกของการป้อนสับสเตรท จากงานวิจัยของเชน (Chen, 1983) พบว่าสามารถตรวจสอบการใช้เซลลูโลสของจุลินทรีย์ในถังหมักที่อุณหภูมิ 35 และ 50 องศาเซลเซียส ได้ภายใน 9 และ 20 วัน ตามลำดับ แต่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สามารถตรวจสอบได้หลังจาก 85 วัน และพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้เซลลูโลส $<1 \times 10^3$ MPN/ml ซึ่งมีจำนวนน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 35 และ 50 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์เด่นที่พบเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลสและกลูโคส มีสัดส่วนมากที่สุด แต่จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสจะน้อยกว่า เมื่อป้อนด้วยเปลือกสับประดจุลินทรีย์รองได้แก่จุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลน

เมื่อป้อนถังหมักไซแลนที่ความเข้มข้นของเป็นร้อยละ 0.02 ทุก 3 วัน (แสดงในภาคผนวก ข ตาราง 3) พบว่าค่า pH อยู่ในช่วง 6.5-7.5 ส่วนค่าอัลคาไลน์ติลดลง เมื่อป้อนไซแลนนานขึ้น จุลินทรีย์เด่นคือจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ซึ่งแม้จะมีสัดส่วนมากที่สุดแต่จำนวนลดลงจากตั้งต้นมาก จุลินทรีย์กลุ่มรองคือจุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลส (ไม่มีการเพิ่มจำนวนขึ้นจากตั้งต้น) และจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลน สำหรับการนับจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลน โดยวิธี MPN อาหารนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลนมีความเข้มข้นร้อยละ 0.02 พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถใช้อาหารได้เร็ว (20 วัน) และให้ผลอย่างชัดเจนในขวดที่ให้เครื่องหมายบวก ซึ่งหมายถึงจุลินทรีย์มีการเจริญ ตรวจวิเคราะห์ผลได้ง่ายและเห็นผลชัดเจนกว่าจุลินทรีย์ทุกกลุ่ม ไม่ว่าจะเป็นปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น ค่าความเป็น pH ที่ลดลง และปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่เทียบกับขวดควบคุม ประสิทธิภาพในการบำบัดไซแลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 เมื่อวัดค่าน้ำตาลที่เหลืออยู่จาก Effluent พบว่าประสิทธิภาพในการใช้ไซแลนของระบบอยู่ในช่วงร้อยละ 30-32 จากผลการทดลองนี้แสดงว่าจุลินทรีย์ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงนี้อาจจะสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภทเฮมิเซลลูโลสได้ดีว่าเซลลูโลส เหตุผลหนึ่งอาจเนื่องมาจากเฮมิเซลลูโลสละลายน้ำได้ดีกว่าเซลลูโลส

จากผลการทดลอง ในภาพประกอบ 16 และ 17 แสดงว่าจุลินทรีย์จากถังหมักก๊าซชีวภาพอุณหภูมิสูงนี้สามารถใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นต่ำๆได้ดีที่สุด ทำให้จำนวนจุลินทรีย์รวมในถังหมักเมื่อป้อนด้วยกลูโคสเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า เมื่อเทียบกับที่ป้อนด้วยเปลือกสับประด และจากตาราง 5 ที่พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลสสูงมาก แสดงว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีทั้งที่สามารถใช้ได้ทั้งกลูโคสและไซโลสซึ่งเป็นกลุ่มใหญ่ และใช้ไซโลสได้อย่างเดียวหรือใช้กลูโคสได้อย่างเดียว นั่นคือจุลินทรีย์ในถังหมักนี้น่าจะสามารถใช้สับสเตรทได้หลายชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Taya, et al. (1988). ที่พบว่าจุลินทรีย์มีความสามารถในการใช้สับสเตรทได้หลายชนิด โดยการแยกและศึกษาลักษณะของ Extremely thermophilic ; cellulolytic , anaerobic bacteria สายพันธุ์ NA10 จากน้ำพุร้อน ซึ่งเติบโตในช่วงอุณหภูมิ 50-85 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 75 องศาเซลเซียส เมื่อนำสายพันธุ์ NA10

มาทดสอบการย่อยคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ D-galactose D-glucose D-fructose D-mannose D-xylose Cellobiose Lactose Maltose Sucrose Raffinose Cellulose Starch Xylan พบว่าจุลินทรีย์สามารถย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ทุกชนิด (ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น และ pH ที่ลดลง) Wiegel., Ljungdah. and Rawson. (1979) ศึกษาคุณสมบัติของ Extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum* ที่แยกจากดิน พบว่า *Cl. thermohydrosulfuricum* สามารถเจริญบนเซลโลไบโอสและกลูโคส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยเซลลูโลส Sonne-Hansen., Mathrani. and Ahring. (1993) ศึกษา Anaerobe xylanolytic bacteria พบว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญบนแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันได้หลายชนิด สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆจากไซแลนและไซโลส

การใช้เปลือกสับประรดในเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ ทำให้สามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ได้มากกว่าเมื่อใช้สับสเตรทบริสุทธิ์อื่นที่ไม่ใช่กลูโคสในการเลี้ยงจุลินทรีย์ เนื่องจากในเปลือกสับประรดมีความหลากหลายของน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่มีความเหมาะสมต่อจุลินทรีย์ในถังหมัก ซึ่งส่วนใหญ่ดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันและมีความสัมพันธ์กันในลักษณะของ Symbiosis ที่ซับซ้อน (ชเนศ อุทิศธรรม. 2526 ; นพพร เจตนาชัย. 2529 และ สุวิมล ฤทธิ์เดช. 2543) ส่วนการเลี้ยงจุลินทรีย์ในกลูโคสที่ความเข้มข้นเหมาะสมทำให้จำนวนจุลินทรีย์สูงสุด เพราะกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถถูกย่อยสลายด้วย Anaerobe ผ่านวิถี Metabolism หลายวิถี

จากการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนด้วยกลูโคสร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid และ Synthetic medium

การป้อนถังหมักก๊าซชีวภาพด้วยกลูโคสร้อยละ 0.02 ใน Synthetic medium เพื่อศึกษาว่าการใช้ Digestion fluid ที่ป้อนเข้าสู่ระบบมีความเหมาะสมมากเพียงไร มีผลทำให้เชื้อขาดสารอาหารสำหรับการเจริญหรือไม่ เนื่องจากในการทดลองที่ผ่านมาจำนวนจุลินทรีย์ไม่เปลี่ยนแปลงหรือเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงได้มีการทดสอบโดยป้อนกลูโคสร้อยละ 0.02 ใน Synthetic medium แทนใน Digestion fluid พบว่าค่า pH ในถังหมักลดลงทำให้ต้องมีการปรับด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนตเพื่อให้ค่า pH รวมทั้งค่าอัลคาไลน์ตีของระบบเพิ่มขึ้น และมีปริมาณน้ำตาลที่มีสะสมอยู่ในระบบมีเหลืออยู่เพียงเล็กน้อย (แสดงในภาคผนวก ข ตาราง 4) จุลินทรีย์เด่นคือจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสและไซโลส พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสเพิ่มขึ้น ส่วนจุลินทรีย์ย่อยสลายไซโลสมีจำนวนลดลง ส่วนกลุ่มจุลินทรีย์รองคือจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลนซึ่งมีจำนวนเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการกำจัดของเสียอยู่ในระดับร้อยละ 33 ต่อวัน งานวิจัยในครั้งนี้เมื่อป้อนด้วยกลูโคสใน Synthetic medium พบว่าสามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ได้น้อย

กว่าเมื่อป้อนด้วย Digestion fluid แสดงว่า Digestion fluid มีสารอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ ไม่ได้มีผลทำให้จุลินทรีย์ขาดสารอาหารตามสมมติฐาน

การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เมื่อป้อนกลูโคสร้อยละ 0.02 และ 0.1 ใน Synthetic medium

จากการทดลองเป็นการศึกษาผลของ Glucose shock ต่อจำนวนจุลินทรีย์ โดยป้อนกลูโคสร้อยละ 0.1 ใน Synthetic medium ทุก 3 วัน ลงในถังหมักก๊าซชีวภาพที่เดิมป้อนด้วยกลูโคสร้อยละ 0.02 ใน Synthetic medium พบว่าค่า pH ลดลงทำให้ต้องมีการปรับด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต เพื่อให้ค่า pH และอัลคาไลน์ตีของระบบเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการป้อนสารอาหาร (ในทุก 3 วันที่มีการป้อนน้ำตาลเข้าสู่ระบบ) แสดงว่าการป้อนน้ำตาลที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น จุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้มากทำให้เกิดสภาวะการเป็นกรดมากขึ้น มีผลทำให้ค่า pH ของระบบลดลงอย่างรวดเร็ว (แสดงในภาคผนวก ข ตาราง 5) และจุลินทรีย์ทุกกลุ่มมีจำนวนลดลงจุลินทรีย์เด่นคือจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลน แม้จำนวนลดลงมากแต่ยังคงมีสัดส่วนมากที่สุดเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่น และมีความทนทานต่อสภาวะทดสอบได้ดีกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่น

ปริมาณน้ำตาลที่มีสะสมอยู่ในระบบมีหลงเหลืออยู่เพียง 20-40 มก/ล เท่านั้น พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดของเสียยังอยู่ในระดับร้อยละ 33 ต่อวัน แต่เมื่อนำน้ำหมักมานับเชื้อด้วยวิธี MPN พบว่ามีจำนวนของเชื้อลดลงอย่างมาก ซึ่งน่าจะเกิดจากปัจจัยอื่นด้วยนอกจาก Glucose shock ได้แก่ การสะสมของสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ในระบบ เป็นต้น

ศึกษากิจกรรมการใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 โดยใช้จุลินทรีย์จากถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส)

จากผลการทดลอง พบว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลสเจริญได้ดีในถังหมักที่ป้อนด้วยกลูโคสร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid จึงทำการทดสอบเพื่อศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) ในการใช้กลูโคสเปรียบเทียบกับไซโลส โดยใช้กลูโคสและไซโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 พบว่าจุลินทรีย์สามารถใช้กลูโคสได้ดีว่าไซโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และสามารถใช้กลูโคสที่ร้อยละ 0.2 ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.5 ในกรณีของการใช้น้ำตาลไซโลสจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ดีกว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และ 0.5 แต่ยังไม่ดีเท่ากับการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2

จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า

1. ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) โดยวิธี Most Probable Number (MPN) การนับจำนวนจุลินทรีย์ในถังหมักเมื่อป้อนด้วยเปลือกสับปะรด พบจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน เป็น 2.4×10^5 4.3×10^4 93 0-10 และ 4.3×10^4 MPN/ml ตามลำดับ เมื่อป้อนกลูโคส หรือไชโลส หรือแอลฟา-เซลลูโลส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid พบจุลินทรีย์เด่นคือจุลินทรีย์ที่ใช้ไชโลส จุลินทรีย์รองคือจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสและจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลน เมื่อป้อน CMC หรือ ไซแลน ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid พบจุลินทรีย์เด่นคือจุลินทรีย์ที่กลูโคส จุลินทรีย์รองคือจุลินทรีย์ที่ใช้ไชโลสและจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลน ส่วนจุลินทรีย์ที่ใช้ CMC และ แอลฟา-เซลลูโลส พบว่ามีจำนวนน้อยและไม่ได้เป็นทั้งจุลินทรีย์กลุ่มหลักหรือกลุ่มรองของระบบ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มนี้มีการเจริญช้าและอาจถูกชะล้างออกไปจากระบบ เมื่อป้อนกลูโคสเพิ่มขึ้นคือเป็น ร้อยละ 0.1 พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ลดลงทุกกลุ่ม จุลินทรีย์เด่นคือจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลน จุลินทรีย์รองคือจุลินทรีย์ที่กลูโคสและจุลินทรีย์ที่ใช้ไชโลส จำนวนจุลินทรีย์รวมลดลงมาก แสดงว่ากลูโคสความเข้มข้นสูงอาจจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ในถังหมัก

2. จุลินทรีย์จากถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงสามารถย่อยสลายไซแลนได้รวดเร็วและให้ผลชัดเจนกว่าใช้สับปะรดอื่น และสามารถวิเคราะห์ผลได้ง่ายกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ ไม่ว่าจะเป็นองค์ประกอบของก๊าซ ค่า pH และปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ แสดงว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถใช้ไซแลนได้ดี ดังนั้นจุลินทรีย์กลุ่มนี้น่าจะย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่าเซลลูโลส

3. จุลินทรีย์ในถังหมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) สามารถใช้สับปะรดได้หลายชนิด ได้แก่ กลูโคส ไชโลส CMC แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน

4. การใช้เปลือกสับปะรดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ได้มากกว่าเมื่อใช้สับปะรดบริสุทธิ์อื่นยกเว้นกลูโคสในการเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เนื่องมาจากในเปลือกสับปะรดมีความหลากหลายของน้ำตาลชนิดต่างๆที่มีความเหมาะสมต่อจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ ซึ่งส่วนใหญ่ดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันและมีความสัมพันธ์กันในลักษณะของ Symbiosis ที่ซับซ้อน

5. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ มีความจำเป็นอย่างยิ่งและความสำคัญอย่างมาก ในการควบคุมระบบให้สามารถดำเนินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากปัจจัยของอาหารแล้ว ปัจจัยอื่นก็มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต และการเพิ่มจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ ได้แก่ ค่า pH อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน ค่าอัลคาไลน์ตี ความเข้มข้นของสับปะรด สารพิษที่สะสมอยู่ในระบบ เป็นต้น

ข้อเสนอแนะ

1. ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาโดยใช้สับสเตรทบริสุทธิ์หลายชนิด และแต่ละชุดใช้เวลาศึกษานาน รวมทั้งศึกษาเฉพาะที่ความเข้มข้นของสับสเตรท 0.02 และ 0.1 เท่านั้น น่าจะศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นในระดับต่างๆในแต่ละถังหมัก ที่ป้อนสับสเตรทแตกต่างกัน เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดต่อไป
2. ศึกษาโดยป้อนสับสเตรทผสม เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับเมื่อป้อนสับสเตรทบริสุทธิ์
3. ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์เมื่อป้อนเปลือกสับปะรด และป้อนด้วยสับสเตรทบริสุทธิ์ในปริมาณเท่ากัน

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- เกษแก้ว ปะนะมณฑา. (2534). *ศึกษาการย่อยสลายสับสเตรตต่างๆโดยจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพ*. วิทยานิพนธ์ วท.ม.(เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ:บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- คณาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. (2538). *การควบคุมดูแลระบบบำบัดน้ำเสีย*. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ชินพงษ์ วั่งโน. (2538). *การกระจายตัวของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบมีตัวกรองภายใต้สภาวะไร้อากาศที่มีทิศทางการป้อนสารอาหารต่างกัน*. วิทยานิพนธ์ วท.ม.(เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ:บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- ธเนศ อุทิศธรรม. (2526). *การผลิตก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิต่างๆจากของเสียจากโรงงานสับประรดกระป๋อง*. วิทยานิพนธ์ วศ.ม.(เทคโนโลยีพลังงาน). กรุงเทพฯ:บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- ธงชัย พรธนะสวัสดิ์ และ วิบูลย์ลักษณ์ วิสุทธีศักดิ์. (2540). *คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย*. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ:สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย .
- นพพร เจตนาชัย. (2529). *การศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพอุณหภูมิสูงและอุณหภูมิปานกลาง*. วิทยานิพนธ์ วท.ม.(เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ:บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- วรารุณี ครุสงฆ์และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. (2532). *เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ:ภาคอุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร.มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สุวิมล ฤทธิ์เดช. (2543). *การศึกษาจำนวนและกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรด*. วิทยานิพนธ์ กศ.ม.(ชีววิทยา). กรุงเทพฯ:บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.ถ่ายเอกสาร.
- เสาวณีย์ มั่นสสิริเกียรติ. (2542). *การย่อยสลายกลูโคสโดยจุลินทรีย์ที่มาจากถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรด*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ:บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.ถ่ายเอกสาร.

- หัตถยา ทิพย์วัฒน์. (2531). การศึกษากลุ่มจุลินทรีย์และสารตัวกลางในกระบวนการย่อยสลายเปลือกสับปะรดในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิปานกลาง. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ:บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- Bardiya,N.,Somayaji,D. and Khanna,S. (1996). "Biomethanation of Banana Peel and Pineapple Waste," *Bioresource Technology*. 58 : 73-76.
- Bitton,G. (1999). *Wastewater Microbiology*. 2nd.ed. USA : Wiley-Liss,Inc.
- Chen,M. (1983). "Adaptation of Mesophilic Anaerobic Sewage Fermentor Population to Thermophile Temperatures," *Applied and Environmental Microbiology*. 45(4) : 1271-1276.
- Dubois,M. et al. (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substance," *Analytical Chemistry*. 28 (3) : 350-356.
- Ghosh,S.,Henry,M.P.and Christopher,R.W. (1985). "Hemicellulose Conversion by Anaerobic Digestion," *Biomass*. 6 : 257-269.
- Henze,M. and Harremoes,P. (1983). "Anaerobic Treatment of Wastewater in Fixed-Film Reactor-A Literature Review," *Water Sciences and Technology*. 15(8) : 1-101.
- Ingraham,J.L. and Ingraham,C.A. (2000). Introduction to *Microbiology*. 2nd ed. California : Wedwoth Publisning Company.
- Jay,J.M. (1996). *Modern Food Microbiology*. 5th ed. USA : Chapman-Hall.
- Lane,A.G. (1984). "Laboratory Scale Anaerobic Digestion of Fruit and Vegetable Solid Waste," *Biomass*. 5 : 245-259.
- Laube,V.M. and Martin,S.M. (1981). "Conversion of Cellulose to Methane Carbon Dioxide by Triculture of *Acetivibrio cellulolyticus*, *Desulfovibrio* sp., *Methanosarcina barkeri*," *Applied and Environmental Microbiology*. 42(3) : 413-420.
- Lederberg,J.,et al. (2000). *Encyclopedia of Microbiology*. 2th ed. Vol.1-4. USA : Acadamic press.
- Mackie,R.I.,White,B.A. and Bryant,M.P. (1992). "Methanogenesis,Biochemistry," *Encyclopedia of Microbiology*. Vol.3. USA : Acadamic press.
- Madigan,M.T.,Martinko,J.M.and Parker,J. (2000). *Brock Biology of Microorganisms*. 9th ed. U.S.A : Prentice Hall International.

- Nelson, N. (1944). "A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose," *Journal Biological Chemistry* .153 : 375-380.
- Noike, T. et al. (1985). "Characteristics of Carbohydrate Degradation and the Rate-limiting Step in Anaerobic Digestion," *Biotechnology and Bioengineering*. 27 : 1482-1489.
- Pilot Plant Development and Training Institute. (2001). *Workshop on Fluorescence in situ Hybridisation (FISH) Characterisation of Microbial Cells Without Cultivation*. 5-7 November 2001. King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (1999). *Microbiology*. 4th ed. USA : WCB McGraw-Hill.
- Russell, J.B. (2000). *Encyclopedia of Microbiology*. 2th ed. Vol.4. USA : Academic press.
- Sonne-Hansen, J., Mathrani, I.M. and Ahring, B.K. (1993). "Xylanolytic Anaerobic Thermophiles from Icelandic Hot-springs," *Applied Microbiology and Biotechnology*. 38 : 537-541.
- Stronach, S.M., Rudd, T. and Lester, J.N. (1986). *Anaerobic Digestion Processes in Industrial Wastewater Treatment*. Vol.2. New York : Springer-Verlag.
- Tabassum, R. and Rajoka, M.I. (2000). Methanogenesis of Carbohydrates and their Fermentation Products by Syntrophic Methane Producing Bacteria Isolated from Freshwater Sediments," *Bioresource Technology*. 72 : 199-205.
- Tanticharoen, M. (1981, March). "General Microbiological Principles," *Proceeding of the First Asean Seminar Workshop on Biogas Technology*. P.16-21. Manila, Philippines.
- Taya, M., et al. (1988). "Isolation and Characterization of an Extremely Thermophilic, Cellulolytic, Anaerobic Bacterium," *Applied Microbiology and Biotechnology*. 29 : 474-479.
- Update Guide Book on Biogas Development. (1984). "Energy Resource Development Series 27," New York : United Nation.
- Winter, J., et al. (1999). "2 Bacterial Metabolism in Wastewater Treatment System," *Biotechnology 2nd ed. Volume 11a, Environmental Processes I. Wastewater Treatment*. Germany : Wiley-VCH.

- Wolin, M.J. and Miller, T.L. (1983). "Interactions of Microbial Populations in Cellulose Fermentation," *Federation Proceedings*. 42 : 109-113.
- Zhang, T.C. and Noike, T. (1991). "Comparison of One-Phase and Two-Phase Anaerobic Digestion Processes in Characteristics of Substrate Degradation and Bacterial Population Levels," *Water Science and Technology*. 23 : 1157-1166.

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหาร และ วิถีวิเคราะห์

1.synthetic media ที่ปรับจากสูตรของ Zhang and Noike. (1991)

สารเคมี	ปริมาณ (ก/ล)
K_2HPO_4	0.40
KH_2PO_4	0.40
$MgCl_2$	0.10
NH_4Cl	1.00
Mineral solution a	10 ml
Vitamin solution b	10 ml
L-cysteine.HCl.H ₂ O	0.50
$Na_2S \cdot 9H_2O$	0.50
pH	7-7.2

Component a		Component b	
Mineral solution		Vitamin solution	
สารเคมี	ปริมาณ (ก/ล)	สารเคมี	ปริมาณ (มก/ล)
Nitriloacetic acid	4.50	Biotin	2.00
$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	0.40	Folic acid	2.00
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.12	Pyridoxine HCl	10.00
$AlK(SO_4)_2$	0.01	Thiamine HCl	5.00
NaCl	1.00	Riboflavin	5.00
$CaCl_2$	0.02	Nicotinic acid	5.00
Na_2MoO_4	0.01	DL-calcium pantothenate	5.00
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.10	Vitamin B ₁₂	0.10
$ZnCl_2$	0.10	p - aminobenzoic acid	5.00
H_3BO_3	0.01	Lipoic acid	5.00
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01		
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0.02		

2. การเตรียม Digestion fluid

จุลินทรีย์ในถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปรดเป็นเชื้อผสม ประกอบด้วย จุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้นอกจากจะต้องการแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแล้ว บางชนิดยังต้องการสารพวกวิตามิน หรือ Growth factor บางอย่างด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ได้ Digestion fluid ที่มีองค์ประกอบครบถ้วน และเตรียมได้ง่าย (เกษแก้ว ปะนะมณฑา. 2534)

น้ำของเหลว (Digestion fluid) ที่ได้จากน้ำขาออก (Effluent) ของถังหมักแบบ มีตัวกรองที่ใช้บำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานแปรงมัน มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน เพื่อให้เกิดการย่อยสลายต่อโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิม จนกระทั่งไม่มีสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเหลืออยู่ พบว่าน้ำหมักจะใสขึ้นและยังคงมีสารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส สารอนินทรีย์ และ Growth factor อย่างเพียงพอ กรองน้ำหมักด้วย กระดาษกรองวอทแมน (Whatman) เบอร์ 5 และเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 จะได้ Basal medium นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilization) ด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.2 ก.ก./ตร.ซม. นาน 15 นาที

**3. การวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซ : การวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซใช้
เครื่อง Gas Chromatograph (Shimadzu model GC 9A)
สภาวะที่ใช้**

1. คอลัมน์ : Porapack – N 80/100 ยาว 2 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1/8 นิ้ว
2. เครื่องตรวจวัดแบบ Thermal Conductivity Detector (TCD)
3. อุณหภูมิของฉีดตัวอย่าง (Temperature of Injection) 120 องศาเซลเซียส
4. อุณหภูมิคอลัมน์ 70 องศาเซลเซียส
5. อุณหภูมิของ TCD 120 องศาเซลเซียส
6. Current bridges 100 mA
7. Carrier gas คือ ฮีเลียม มีอัตราการไหล 50 มิลลิลิตร/นาที

วิธีวิเคราะห์

ใช้ไซริงค์แบบ Gas type ขนาด 100 ไมโครลิตร ตูดก๊าซจากช่องว่าง
เหนือของเหลวในขวดซีรัม 50 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatograph ร้อยละ
ของส่วนประกอบของก๊าซ จะแสดงออกมา โดย Integrator ของ Shimadzu model C-R3A

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของ Somogyi – Nelson (Nelson. 1944)

หลักการ : กลูโคสหรือไซโลสในสารละลายตัวอย่าง จะรีดิวซ์ Copper ในสารละลายต่าง ให้ Cuprous copper ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารละลาย Arseno molybdate ทำให้เกิดสีเขียวแกมน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

การเตรียมสารเคมี

Somogyi 1 : ละลาย Na_2SO_4 288 กรัม Potassium sodium tartrate 24 กรัม Na_2CO_3 48 กรัม NaHCO_3 32 กรัมในน้ำกลั่น 160 มิลลิลิตร

Somogyi 2 : ละลาย Na_2SO_4 72 กรัม และ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 8 กรัม ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร

ผสม Somogyi 1 และ Somogyi 2 ในอัตราส่วน 1 : 4 โดยปริมาตร ก่อนใช้แต่ละครั้ง

Nelson : ละลาย Ammonium molybdate 100 กรัม ในน้ำกลั่น 1800 มิลลิลิตร เติม H_2SO_4 เข้มข้นลงไป 84 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายของ Sodium hydrogen arsenate (12 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

วิธีวิเคราะห์

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Somogyi 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 15 นาที ปลอຍให้เย็นแล้วเติมสารละลาย Nelson 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

ทำ Standard curve ของกลูโคสและไซโลส เพื่อใช้เทียบหาค่าน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่างกราฟมาตรฐาน

5. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (Total sugar) โดยวิธี Phenol sulfuric total

sugar (Dubois. 1956)

หลักการ : สารตัวอย่างที่เป็นน้ำตาล Oligosaccharide Polysaccharide และอนุพันธ์ เมื่อทำปฏิกิริยากับฟีนอลและกรดซัลฟูริกจะให้สีส้ม
การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (Glucose analytical reagent) ชั่งกลูโคส 0.35 กรัม อย่างละเอียดใส่ใน Volumetric flask เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปต 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้เต็ม ผสมให้เข้ากัน ซึ่งจะใช้เป็น Stock solution ปิเปต Stock solution มา 1 5 5 และ 2 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำกลั่น 6 5 2 และ 0 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะได้สารละลายที่มีกลูโคส 10 35 50 และ 70 ไมโครกรัม / 2 มิลลิลิตร

2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น

3. สารละลายฟีนอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยละลายฟีนอล 5 กรัมลงในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. เติมสารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่แช่อยู่ในน้ำแข็ง

2. เติมสารละลายฟีนอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที จึงนำมาวางที่อุณหภูมิห้อง

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ไม่เกิน 20 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน โดยกราฟมาตรฐานได้จากการใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 10 35 50 และ 70 ไมโครกรัม / 2 มิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน

6. การวิเคราะห์หาค่าอัลคาไลน์ตี (Alkalinity) และปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Total Volatile Acid) (ธงชัย พรรณสวัสดิ์ และ วิบูลย์ลักษณ์ วิสุมิศักดิ์. 2540)

ในการศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์โดยวิธีไตเตรท ซึ่งเป็นวิธีแบบหยาบๆ สามารถนำไปใช้ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียที่ทำงานภายใต้สภาวะไร้อากาศได้ เพื่อจะได้ทราบถึงการทำงานของจุลินทรีย์ภายในระบบ เนื่องจากใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นกว่าวิธีอื่นๆ โดยวิธีนี้สามารถหาได้ทั้งค่าอัลคาไลน์ตี และปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย

วิธีวิเคราะห์

ตัวอย่างน้ำเสียที่นำมาวิเคราะห์ควรทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้วรินเอาส่วนใส (Supernatant) หรือนำน้ำเสียไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ประมาณ 5 นาที ไม่ควรใช้วิธีการกรองหรือเติมสารช่วยในการตกตะกอน เพราะจะทำให้ผลที่วิเคราะห์ได้ คลาดเคลื่อน เลือกปริมาตรตัวอย่างน้ำเสียที่จะวิเคราะห์ให้เหมาะสม เพื่อที่จะได้ใช้สารละลายมาตรฐานในการไตเตรทไม่เกิน 25 มิลลิลิตร โดยทั่วไปใช้ตัวอย่างน้ำเสียประมาณ 50 หรือ 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. ใช้ตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2. วัดความเป็นกรด-ด่าง ของตัวอย่างน้ำเสียด้วยเครื่อง pH-meter ที่ผ่านการปรับมาตรฐานกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ทราบ pH ที่แน่นอนมาแล้ว

3. ไตเตรทตัวอย่างน้ำเสีย ด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟริก เข้มข้น 0.1 N ผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic stirrer จนกระทั่ง pH เป็น 4 จดปริมาตรกรดที่ใช้เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหา ค่าอัลคาไลน์ตีของตัวอย่างน้ำเสีย หลังจากนั้นไตเตรทต่อจนตัวอย่างน้ำเสียมีค่า pH อยู่ในช่วง 3.3-3.5

4. ต้มตัวอย่างน้ำเสียจากข้อ 3 ให้เดือดเบาๆ ประมาณ 3 นาที แล้วทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิเท่าเดิม

5. ไตเตรทตัวอย่างน้ำเสียด้วยสารละลายมาตรฐานด่าง โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N จน pH เป็น 4 แล้วไตเตรทต่อจน pH มีค่าเพิ่มขึ้นถึง 7 จดปริมาตรด่างที่ใช้ไตเตรทจาก pH 4 เป็น 7 เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย

การคำนวณ

1.การคำนวณหาค่าอัลคาไลน์ิตี้ของตัวอย่างน้ำเสีย

$$\begin{aligned} \text{ค่าอัลคาไลน์ิตี้(มิลลิกรัมของแคลเซียมคาร์บอเนต / ลิตร)} = \\ \frac{(\text{ปริมาตรกรดซัลฟริกที่ใช้ในการปรับ pH เป็น 4})(N \text{ ของกรดซัลฟริก}) \times 50 \times 1,000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำเสีย}} \end{aligned}$$

2.การคำนวณหาปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายของตัวอย่างน้ำเสีย

$$\begin{aligned} \text{ค่าปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย(มิลลิกรัมของแคลเซียมคาร์บอเนต / ลิตร)} = \\ \frac{(\text{ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการปรับ pH จาก 4 เป็น 7})(N \text{ ของ NaOH}) \times 50 \times 1,000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำเสีย}} \end{aligned}$$

7. ตารางเอ็มพีเอ็น (ธงชัย พรรณสวัสดิ์ และวิบูลย์ลักษณ์ วิสุทธศักดิ์. 2540)

ตารางเอ็มพีเอ็นและขีดจำกัดความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แบบ 3 หลอด

combination	number of tubes per dilution			combination	number of tubes per dilution		
of positive	MPN index	95% confidence limits		of positive	MPN index	95% confidence limits	
	/100 ml	lower	upper		/100 ml	lower	upper
0-0-0	<3			3-0-0	23	4	120
0-0-1	3	<0.5	9	3-0-1	39	7	130
0-1-0	3	<0.5	13	3-0-2	64	15	380
0-2-0	-	-	-	3-1-0	49	7	130
1-0-0	4	<0.5	20	3-1-1	75	14	230
1-0-1	7	1	21	3-1-2	120	30	380
1-1-0	7	1	23	3-2-0	93	15	380
1-1-1	11	3	36	3-2-1	150	30	440
1-2-0	11	3	36	3-2-2	210	35	470
2-0-0	9	1	36	3-3-0	240	36	1,300
2-0-1	14	3	37	3-3-1	460	71	2,400
2-1-0	15	3	44	3-3-2	1,100	150	4,800
2-1-1	20	7	89	3-3-3	>2,400		
2-2-0	21	4	47				
2-2-1	28	10	150				
2-3-0	-	-	-				

ภาคผนวก ข
ข้อมูลจากการวิจัย

ตาราง 1 การวิเคราะห์ค่า pH Alkalinity TVA และประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อป้อนด้วย

กลูโคส หรือไซโลส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid, HRT 45 วัน ป้อนทุก 3 วัน

เมื่อป้อนด้วยกลูโคส

เมื่อป้อนด้วยไซโลส

วัน ที่	pH	Alkalinity (มก/ล)	TVA (มก/ล)	Residual		วัน ที่	pH	Alk (มก/ล)	TVA (มก/ล)	Residual	
				sugar (มก/ล)	Efficiency (%)					sugar (มก/ล)	Efficiency (ร้อยละ)
0	7.55	1713	798	2732	-	0	6.89	1406	879	2632	-
3	7.62	1602	396	-	-	3	7.04	1338	588	-	-
11	7.37	1434	993	-	-	9	6.92	1196	690	-	-
14	7.17	1351	642	-	-	16	7.00	1074	639	-	-
17	7.03	1276	848	-	-	23	7.19	967	411	-	-
24	7.20	1147	537	-	-	27	7.10	927	357	9	33.22
27	7.29	1089	641	-	-	30	6.84	889	333	6	33.26
34	7.06	966	393	-	-	34	7.21	844	157	6	33.26
38	7.03	952	396	0	33.33	37	6.87	818	383	-	-
41	7.04	869	357	0	33.33	41	7.03	781	348	-	-
45	7.54	920	330	0	33.33	44	7.02	765	285	19	33.09
48	7.16	691	371	-	-	48	6.96	632	401	-	-
55	7.08	639	359	0	33.33	51	6.75	614	408	6	33.26
59	6.97	619	362	-	-	55	7.31	590	281	-	-
62	6.58	598	443	0	33.33	59	6.67	587	278	6	33.26
66	6.94	568	321	0	33.33	63	6.54	559	336	-	-
70	7.07	749	345	0	33.33	66	6.51	526	281	16	33.13
74	6.71	527	410	-	-	70	6.87	504	342	-	-
77	6.48	464	410	-	-	72	6.63	471	369	16	33.13
81	6.90	472	507	0	33.33	76	6.16	426	447	11	33.19
83	6.25	448	515	-	-	79	6.86	655	611	-	-
87	5.98	544	656	0	33.33	82	6.19	644	659	12	33.18
90	6.64	838	597	-	-	89	6.68	777	480	-	-

- : ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูล

ตาราง 2 การวิเคราะห์ค่า pH Alkalinity TVA ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อป้อนด้วย

CMC หรือแอลฟา-เซลลูโลส ร้อยละ 0.2 ใน Digestion fluid , HRT 45 วัน ป้อนทุก 3 วัน

เมื่อป้อนด้วย CMC

เมื่อป้อนด้วยแอลฟา-เซลลูโลส

เมื่อป้อนด้วย CMC						เมื่อป้อนด้วยแอลฟา-เซลลูโลส					
วัน	pH	Alkalinity	TVA	Residual sugar	Efficiency	วัน	pH	Alk	TVA	Residual sugar	Efficiency
ที่		(มก/ล)	(มก/ล)	(มก/ล)	(%)	ที่		(มก/ล)	(มก/ล)	(มก/ล)	(ร้อยละ)
0	7.07	1548	642	2203	-	0	7.14	1738	933	2778	-
3	7.69	1496	740	-	-	3	7.35	1632	348	-	-
13	7.57	1130	275	-	-	7	7.52	1594	285	75	32.43
17	8.10	1061	381	304	28.73	10	7.21	1460	327	58	32.64
20	7.48	953	153	373	27.69	14	7.20	1368	314	127	21.81
24	7.98	895	404	664	23.29	21	7.13	1281	386	-	32.09
27	7.55	802	357	-	-	24	6.90	1195	393	104	31.70
34	7.22	740	333	703	22.70	28	7.17	1150	471	-	31.59
38	7.29	686	368	-	-	21	7.24	1079	510	136	30.33
41	7.38	666	425	847	20.76	35	7.05	1030	491	-	30.30
45	7.67	642	455	-	-	39	7.40	1017	345	145	29.64
49	7.59	515	137	831	19.49	43	7.44	968	148	-	30.80
53	7.25	503	275	-	-	46	7.33	874	130	250	31.21
56	7.37	505	175	915	16.67	50	7.19	784	443	-	-
62	7.08	447	164	-	-	52	7.34	756	174	-	-
66	7.30	475	166	1101	17.43	56	6.82	706	323	253	31.50
69	7.06	456	165	-	-	59	7.04	661	363	-	-
72	6.84	479	288	1051	16.67	62	6.25	628	384	283	32.77
75	6.88	440	137	-	-	69	6.63	722	548	211	32.64
79	7.24	464	279	1093	15.25	72	7.09	800	483	-	-
82	6.90	472	178	-	-	76	6.92	710	600	-	-
86	7.35	445	326	1195	17.17	83	6.96	817	578	-	-
90	6.64	-	-	-	-	90	6.27	811	519	-	-

: ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูล

ตาราง 3 การวิเคราะห์ค่า pH Alkalinity TVA ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อบ้อนด้วยไซแลน HRT 45 วัน บ้อนทุก 3

วันที่	pH	Alkalinity (มก/ล)	TVA (มก/ล)	Residual	
				sugar (มก/ล)	Efficiency (ร้อยละ)
0	7.87	1640	366	2738	-
4	7.42	1575	351	117	31.91
11	7.40	1438	356	-	-
14	7.30	1346	417	142	31.01
18	7.38	1268	416	-	-
21	7.29	1193	524	168	31.29
25	7.34	1145	497	-	-
29	7.43	1124	536	-	-
33	7.18	1066	357	-	-
36	7.36	1017	138	-	-
40	7.19	968	410	-	-
42	7.18	928	168	-	-
46	7.27	1090	308	165	31.33
49	7.27	745	180	-	-
52	6.78	775	141	171	31.25
55	6.76	734	133	-	-
59	6.70	727	152	238	30.44
62	6.97	752	290	-	-
66	6.78	669	159	290	29.80
73	6.54	703	117	270	30.05
80	6.53	636	320	-	-
87	6.50	595	444	357	28.99
90	6.30	-	-	-	-

- : ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูล

ตาราง 4 การวิเคราะห์ค่า pH Alkalinity TVA ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อป้อนด้วยกลูโคส

ร้อยละ 0.02 ใน synthetic medium, HRT 45 วัน ป้อนทุก 3 วัน

วันที่	pH	Alkalinity (มก/ล)	TVA (มก/ล)	Residual	
				sugar (มก/ล)	Efficiency (ร้อยละ)
0	6.58	858	174	5	33.27
3	6.58	923	154	6	33.26
7	6.67	881	305	6	33.26
10	6.84	929	468	5	33.27
14	6.85	1465	618	6	33.26

ตาราง 5 การวิเคราะห์ค่า pH Alkalinity TVA ประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำตาล เมื่อป้อนด้วยกลูโคส
ร้อยละ 0.1 ใน synthetic medium, HRT 45 วัน ป้อนทุก 3 วัน

วัน ที่	pH	Alkalinity (มก/ล)	TVA (มก/ล)	Residual		เดิม
				sugar (มก/ล)	Efficiency (ร้อยละ)	NaHCO ₃ (ก/ล)
0	6.75	-	-	13047	-	-
4	6.68	1168	327	-	-	0.25
7	6.64	1080	447	-	-	0.50
10	6.79	-	-	-	-	0.40
14	6.85	1465	618	47	33.21	0.30
17	6.69	-	-	-	-	0.40
20	6.78	1606	726	-	-	0.50
24	6.84	-	-	-	-	0.30
27	6.82	-	-	-	-	0.30
32	6.97	-	-	23	33.27	-
34	6.85	-	-	-	-	0.35
41	7.39	-	-	41	33.29	-
45	7.17	-	-	-	-	-
47	6.81	-	-	-	-	0.35
51	6.94	-	-	-	-	0.35
53	7.39	-	-	-	-	-
60	6.87	-	-	18	33.28	0.35
65	7.06	-	-	-	-	-
68	6.94	-	-	-	-	-
76	6.82	-	-	-	-	0.35
81	6.90	-	-	24	33.27	-
86	7.04	-	-	-	-	-
89	6.75	-	-	-	-	-

- : ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูล

ตาราง 6 การใช้น้ำตาลกลูโคส (ร้อยละ) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 ที่ระยะเวลาต่างๆ

วันที่	ความเข้มข้นกลูโคส		
	ร้อยละ 0.1	ร้อยละ 0.2	ร้อยละ 0.5
1	5.68	3.43	2.79
2	6.82	73.71	5.58
5	86.36	96.57	31.63
7	95.45	96.57	46.74
11			44.65
16			52.79

ตาราง 7 การใช้น้ำตาลไซโลส (ร้อยละ) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 ที่ระยะเวลาต่างๆ

วันที่	ความเข้มข้นไซโลส		
	ร้อยละ 0.1	ร้อยละ 0.2	ร้อยละ 0.5
1	6.52	0	0
2	6.52	0	3.21
5	88.59	30.89	30.12
7	89.13	68.06	31.93
11			31.33
16			39.96

ตาราง 8 ค่า pH เมื่อใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 ที่ระยะเวลาต่างๆ

วันที่	ความเข้มข้นกลูโคส		
	ร้อยละ 0.1	ร้อยละ 0.2	ร้อยละ 0.5
0	7.57	7.56	7.56
1	7.51	7.34	7.27
2	7.41	4.60	7.26
5	5.16	4.23	4.57
7	5.07	4.3	4.19
11			4.06
16			4.04

ตาราง 9 ค่า pH เมื่อใช้ไซโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 ที่ระยะเวลาต่างๆ

วันที่	ความเข้มข้นไซโลส		
	ร้อยละ 0.1	ร้อยละ 0.2	ร้อยละ 0.5
0	7.71	7.61	7.35
1	7.51	7.32	6.98
2	7.26	7.19	6.50
5	5.15	4.56	4.52
7	5.02	4.60	4.61
11			4.43
16			4.30

ตาราง 10 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (ร้อยละ) เมื่อใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 ที่ระยะเวลาต่างๆ

วันที่	ความเข้มข้นกลูโคส		
	ร้อยละ 0.1	ร้อยละ 0.2	ร้อยละ 0.5
0	0.27	0.33	0.27
1	0.40	0.90	0.65
2	0.44	33.26	0.65
5	9.84	31.03	22.67
7	12.38	29.04	30.86
11			36.77
16			23.64

ตาราง 11 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (ร้อยละ) เมื่อใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.5 ที่ระยะเวลาต่างๆ

วันที่	ความเข้มข้นไซโลส		
	ร้อยละ 0.1	ร้อยละ 0.2	ร้อยละ 0.5
0	0.21	0.24	0.49
1	0.54	0.64	0.99
2	0.70	0.92	4.26
5	16.75	28.06	38.03
7	11.81	18.53	17.65
11			13.14
16			24.46

ตาราง 12 แสดงการนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี MPN
เมื่อป้อนด้วยเปลือกสับปะรด

จุลินทรีย์ที่ใช้	กลูโคส	ไซโตส	CMC	เซลลูโลส	ไซแลน
(MPN/ml)	$(3-3-0) \times 10^3 = 2.4 \times 10^5$	$(3-0-0) \times 10^4 = 2.3 \times 10^5$	93	$(3-1-0) \times 10^3 = 4.3 \times 10^4$, $(1-0-0) \times 10^4 = 4 \times 10^4$	$(3-1-0) \times 10^3 = 4.3 \times 10^4$

เมื่อป้อนด้วยกลูโคส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid

จุลินทรีย์ที่ใช้	กลูโคส	ไซโตส	CMC	เซลลูโลส	ไซแลน
1 HRT (MPN/ml)	$(2-0-1) \times 10^3 = 1.4 \times 10^4$	$(2-2-0) \times 10^3 = 2.1 \times 10^4$	9.3	2.3	$(3-2-1) \times 10^2 = 1.5 \times 10^4$
2 HRT (MPN/ml)	$(3-2-0) \times 10^3 = 9.3 \times 10^4$, $(2-0-0) \times 10^4 = 9 \times 10^4$	$(2-2-1) \times 10^5 = 2.8 \times 10^6$	24	9.3	$(3-3-1) \times 10^2 = 4.6 \times 10^4$
ค่าเฉลี่ย	5.35×10^4	1.41×10^6	16.65	5.8	3.05×10^4

เมื่อป้อนด้วยไซโตส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid

จุลินทรีย์ที่ใช้	กลูโคส	ไซโตส	CMC	เซลลูโลส	ไซแลน
1 HRT (MPN/ml)	$(3-0-0) \times 10^3 = 2.3 \times 10^4$	$(3-1-0) \times 10^3 = 4.3 \times 10^4$, $(1-0-0) \times 10^4 = 4 \times 10^4$	1.5	4.3	$(3-1-0) \times 10^3 = 4.3 \times 10^4$
2 HRT (MPN/ml)	$(3-2-0) \times 10^3 = 9.3 \times 10^4$, $(2-0-0) \times 10^4 = 9 \times 10^4$	$(3-2-0) \times 10^3 = 9.3 \times 10^4$, $(2-0-0) \times 10^4 = 9 \times 10^4$	2.3	0-10	$(3-3-0) \times 10^2 = 2.4 \times 10^4$, $(3-0-0) \times 10^3 = 2.3 \times 10^4$
ค่าเฉลี่ย	5.8×10^4	6.8×10^4	1.9	4.65	3.35×10^4

เมื่อป้อนด้วย CMC ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid

จุลินทรีย์ที่ใช้	กลูโคส	ไซโลส	CMC	เซลล์โลส	ไซเลน
1 HRT (MPN/ml)	$(3-2-1) \times 10^3 = 1.5 \times 10^5$, $(2-1-0) \times 10^4 = 1.5 \times 10^5$	$(3-1-1) \times 10^3 = 7.5 \times 10^4$	2.3	2.3	$(3-1-0) \times 10^2 = 4.3 \times 10^3$
2 HRT (MPN/ml)	$(3-1-0) \times 10^3 = 4.3 \times 10^4$, $(1-0-0) \times 10^4 = 4 \times 10^4$	$(3-3-1) \times 10^2 = 4.6 \times 10^4$, $(3-1-0) \times 10^3 = 4.3 \times 10^4$	2.3	2.3	$(3-1-1) \times 10^2 = 7.5 \times 10^3$
ค่าเฉลี่ย	9.65×10^4	5.9×10^4	2.3	2.3	5.9×10^3

เมื่อป้อนด้วยเซลล์โลส ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid

จุลินทรีย์ที่ใช้	กลูโคส	ไซโลส	CMC	เซลล์โลส	ไซเลน
1 HRT (MPN/ml)	$(3-2-2) \times 10^2 = 2.1 \times 10^4$, $(2-2-0) \times 10^3 = 2.1 \times 10^4$	$(3-3-0) \times 10^2 = 2.4 \times 10^4$, $(3-0-0) \times 10^3 = 2.3 \times 10^4$	4	4	$(3-3-0) \times 10^2 = 2.4 \times 10^4$
2 HRT (MPN/ml)	$(3-2-0) \times 10^2 = 9.3 \times 10^3$, $(2-0-0) \times 10^3 = 9 \times 10^3$	$(3-2-0) \times 10^2 = 9.3 \times 10^3$, $(2-0-0) \times 10^3 = 9 \times 10^3$	23	9	$(3-3-0) \times 10^2 = 2.4 \times 10^3$, $(3-0-0) \times 10^3 = 2.3 \times 10^3$
ค่าเฉลี่ย	1.51×10^4	1.66×10^4	13.5	6.5	1.32×10^4

เมื่อป้อนด้วยไซเลน ร้อยละ 0.02 ใน Digestion fluid

จุลินทรีย์ที่ใช้	กลูโคส	ไซโลส	CMC	เซลล์โลส	ไซเลน
1 HRT (MPN/ml)	$(3-3-2) \times 10^2 = 1.1 \times 10^5$, $(3-2-1) \times 10^3 = 1.5 \times 10^5$	$(3-3-1) \times 10^2 = 4.6 \times 10^4$, $(3-1-0) \times 10^3 = 4.3 \times 10^4$	43	4.3	$(3-3-1) \times 10^2 = 4.6 \times 10^4$
2 HRT (MPN/ml)	$(3-2-0) \times 10^2 = 9.3 \times 10^3$, $(2-0-0) \times 10^3 = 9 \times 10^3$	$(3-3-1) \times 10^2 = 4.6 \times 10^4$, $(3-1-0) \times 10^3 = 4.3 \times 10^4$	43	2.3	$(3-3-2) \times 10^2 = 1.1 \times 10^3$, $(3-2-1) \times 10^2 = 1.5 \times 10^4$
ค่าเฉลี่ย	7.97×10^4	4.3×10^4	43	3.3	3.05×10^4

เมื่อป้อนด้วยกลูโคส ร้อยละ 0.02 ใน Synthetic medium

จุลินทรีย์ที่ใช้	กลูโคส	ไซโลส	CMC	เซลล์โลส	ไซเลน
(MPN/ml)	$(3-2-0) \times 10^3 = 9.3 \times 10^4$, $(2-0-0) \times 10^4 = 9 \times 10^4$	$(3-2-0) \times 10^3 = 9.3 \times 10^4$, $(2-0-0) \times 10^4 = 9 \times 10^4$	75	43	$(3-3-2) \times 10^2 = 1.1 \times 10^5$

เมื่อป้อนด้วยกลูโคส ร้อยละ 0.1 ใน Synthetic medium

จุลินทรีย์ที่ใช้	กลูโคส	ไซโลส	CMC	เซลล์โลส	ไซเลน
(MPN/ml)	$(3-3-1) = 4.6 \times 10^2$, $(3-1-0) \times 10 = 4.3 \times 10^2$	$(3-3-0) = 2.4 \times 10^2$, $(3-0-0) \times 10 = 2.3 \times 10^2$	15	2.3	$(3-3-0) \times 10 = 2.4 \times 10^3$, $(3-0-0) \times 10^2 = 2.3 \times 10^3$

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล	นางสาวจรรยารัตน์ จงจิตวิมล
วันเดือนปีเกิด	20 พฤษภาคม 2512
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	97/34 หมู่ 11 หมู่บ้านสินเพชร ซ.ชนสิทธิ์ ถ.เทพารักษ์ ด.บางปลา อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ รหัสไปรษณีย์ 10540

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2530	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนพระโขนงพิทยาลัย
พ.ศ. 2534	กศ.บ.วิชาเอกชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2544	กศ.ม.วิชาเอกชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ