

การศึกษาเซลล์เฟร็ดริคซิงก์แบคทีเรียและมีเทนแบคทีเรีย
ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่อุณหภูมิปานกลาง

ปริญญานิพนธ์
ของ
อุบลวรรณ ไชโย

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
มีนาคม 2544
ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาซัลเฟตรีดิวซิงก์แบคทีเรียและมีเทนแบคทีเรีย
ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่อุณหภูมิปานกลาง

บทคัดย่อ
ของ
อุบลวรรณ ไชโย

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
มีนาคม 2544

อุบลวรรณ ไชโย. (2544). การศึกษาซัลเฟตรีดิวซิงก์แบคทีเรียและมีเทนแบคทีเรียในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่อุณหภูมิปานกลาง. วิทยานิพนธ์ กศ.ม.(ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม : อาจารย์ ดร.ยุวดี นาคะผดุงรัตน์, ศาสตราจารย์ ดร.มรกต ตันติเจริญ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์.

ในระบบบำบัดแบบไร้ออกซิเจน กรดอะซิติกเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทนโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม Methane-Producing Bacteria(MPB) จากการศึกษาการใช้กรดอะซิติกในจุลินทรีย์ผสมพบว่าช่วงแรกมีการใช้กรดอะซิติกแต่ไม่มีก๊าซมีเทนเกิดขึ้นหลังจากใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนานขึ้น พบว่ามีการใช้กรดอะซิติกเปลี่ยนไปเป็นก๊าซมีเทนเกิดขึ้น ทำให้เข้าใจว่า มีจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งซึ่งสามารถใช้กรดอะซิติกได้แต่ไม่ผลิตก๊าซมีเทน นอกจากนี้จุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถใช้ซัลเฟตในการรับอิเล็กตรอนได้ด้วยเรียกจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ว่า Sulfate-Reducing Bacteria(SRB) แสดงว่าในขั้นตอนการย่อยสลายกรดอะซิติกไปเป็นก๊าซชีวภาพ มีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 กลุ่มคือ MPB และSRB งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB และSRB ในการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ และศึกษาสัณฐานวิทยา(morphology) ของจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB หลังจากที่ได้ enrichment ด้วยสารอาหารที่จำเพาะกับจุลินทรีย์นี้แล้ว ซึ่งจะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจกิจกรรมของจุลินทรีย์ในขั้นตอนการผลิตก๊าซมีเทนมากขึ้น

เมื่อนำจุลินทรีย์ผสมจากถังหมักเปลือกสับปะรดไปเลี้ยงในอาหารเหลวตามสูตร Postgate's medium B ที่มีกรดอะซิติก ร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งคาร์บอน และทำการถ่ายเชื้อไปในอาหารดังกล่าวทุก 3 สัปดาห์ ทำให้มีจำนวนของ SRB 7.0×10^5 MPN/ml และไม่พบ MPB จากการนับจำนวนด้วยวิธี MPN จากการศึกษารูปร่างของจุลินทรีย์ด้วย Scanning Electron Microscope พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่ใน enriched SRB มีรูปร่างคล้าย genera *Desulfovibrio*. นำ enriched SRB ที่เลี้ยงด้วยกรดอะซิติกมาเลี้ยงในอาหารเหลวตามสูตร Postgate's medium B ที่มีกรดแลคติก ร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งคาร์บอน และถ่ายเชื้อไปในอาหารดังกล่าวทุก 3 สัปดาห์ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวน SRB ที่ใช้กรดแลคติก จากเดิม 4.3×10^5 MPN/ml เป็น 2.4×10^8 MPN/ml แสดงให้เห็นว่า SRB ที่ย่อยสลายกรดแลคติกมีจำนวนมากกว่า SRB ที่ย่อยสลายกรดอะซิติกซึ่ง SRB บางชนิดที่ย่อยสลายกรดแลคติกอาจจะย่อยสลายกรดอะซิติกได้ด้วยเมื่อนำมาศึกษารูปร่างด้วย Scanning Electron Microscope พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่มี flagella และเป็นเกลียวโค้งเล็กน้อย

การใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ ของจุลินทรีย์ผสม พบว่าที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 10 มิลลิโมลาร์ จุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB มีการเจริญและเพิ่มจำนวนจาก 9.3×10^6 MPN/ml เป็น 1.5×10^8 MPN/ml ส่วน MPB มีจำนวนคงที่ที่ 9.3×10^6 MPN/ml ผลการทดลองที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 10 30 และ 50 มิลลิโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกต่ำ SRB มีการเจริญและเพิ่มจำนวนได้ก่อน MPB ส่วนที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 120 มิลลิโมลาร์ พบว่าในช่วงท้ายของการทดลอง SRB มีแนวโน้มลดลงจากเดิม 9.3×10^6 MPN/ml เป็น 1.5×10^5 MPN/ml ส่วน MPB มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 9.3×10^6 MPN/ml เป็น 2.4×10^8 MPN/ml ผลการทดลองที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงขึ้น MPB สามารถใช้กรดอะซิติกในการเพิ่มจำนวนและกิจกรรมได้ดีขึ้น แสดงว่ากิจกรรมการใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ผสมในช่วงแรกเป็นการใช้กรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB และเป็น predominant เมื่อใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้นพบว่ามีการใช้กรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซมีเทนโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB สอดคล้องกับจำนวนของ MPB ที่เพิ่มขึ้น และจากการเปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติกระหว่างจุลินทรีย์ผสมกับจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA พบว่า ในช่วงแรกเป็นการใช้กรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB เป็นกลุ่มแรกและเป็น predominant ซึ่งผลการทดลองในการใช้กรดอะซิติกของ enriched SRB ให้ผลที่สอดคล้องกัน

STUDY ON ACETIC ACID UTILIZATION OF SULFATE-REDUCING BACTERIA AND
METHANE-PRODUCING BACTERIA AT MESOPHILIC TEMPERATURE

AN ABSTRACT
BY
UBONWAN CHAIYO

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in Biology
at Srinakharinwirot University
March 2001

Ubonwan Chaiyo. (2001). *Study on Acetic Acid Utilization of Sulfate-Reducing Bacteria and Methane-Producing Bacteria at Mesophilic Temperature*. Master thesis, M.Ed.(Biology). Bangkok:Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Dr.Yuvadee Nakapadungrat, Prof.Dr.Morakot Tanticharoen, Asst.Prof. Pornpan Lerstaveesin.

Methane-Producing Bacteria will utilize acetic acid which is the important intermediate to produce methane gas. It was reported that the mixed culture from anaerobic reactor of pineapple peel could utilize acetic acid without producing methane gas in the initial stage but the methane gas was produced in the later stage of digestion. A group of bacteria from anaerobic reactor that used sulfate as electron acceptor was named Sulfate-Reducing Bacteria (SRB). Therefore, there were at least 2 groups of bacteria, Methane-Producing Bacteria (MPB) and SRB involved in the acetic acid utilization at anaerobic condition. So, the objective of this research was to study the competition between MPB and SRB in utilizing acetic acid at various concentrations. The enrichment of SRB population was performed and the characteristics morphology of enriched SRB was examined by the scanning electron microscope. The results will illustrate the knowledge of the activity of microorganism in the methanogenesis.

The mixed culture from anaerobic reactor of pineapple peel was transferred into the Postgate's medium B containing 0.1% acetic acid as sole carbon source. The transfer was conducted every 3 weeks. After 6 transfers, SRB was predominant with the population of 7.0×10^5 MPN/ml. The MPB was not found by examining with the MPN method. The enriched SRB was mainly spiral to vibrio-shaped, non-motile and motile by single polar flagella. These characteristics were similar to genera *Desulfovibrio*. Enrichment of lactic acid utilized SRB from acetic acid utilized SRB was succeeded by transferring the SRB into the Postgate's medium B containing 0.1% lactic acid as sole carbon source. The transfer was conducted every 3 weeks. After 3 transfers, the number of lactic acid utilized SRB in enriched culture was increased to 2.4×10^8 MPN/ml compared with 4.3×10^5 MPN/ml in the enriched acetic acid utilized SRB. The most cell in enriched culture was spiral to spiral vibrio-shaped with flagella.

The experiment of acetic acid utilization at various concentrations by the mixed culture was performed. Adding 10 mM acetic acid to the mixed culture resulted in SRB increasing from 9.3×10^6 MPN/ml to 1.5×10^8 MPN/ml. Furthermore, MPB yielded the constant population of 9.3×10^6 MPN/ml. The results that were studied at 10, 30 and 50 mM acetic acid showed that SRB was capable to develop in particular at low concentration of acetic acid. SRB trend is decreased from 9.3×10^6 MPN/ml to 1.5×10^5 MPN/ml in last step at acetic acid concentration of 120 mM. In addition, MPB showed the trend increasing from 9.3×10^6 MPN/ml to 2.4×10^8 MPN/ml. The results study at 70, 90 and 120 mM acetic acid illustrated that at the high concentration of acetic acid, the population and activity of MPB could easily increase, compared with those at the low concentration of acetic acid. These results concluded that SRB intensified as the predominant microorganism involved in the acetic acid consumption in the first stage. Then MPB produced the methane gas from acetic acid in the later stage which accordance with the number of the magnification of MPB in the reactor. In comparison with acetic acid utilization between mixed culture and mixed culture in the presence of inhibitor, 2-BESA also gave the similar results. Thus, SRB first took advantage in acetic acid utilization in particular at the beginning, then followed by MPB. These were accordance with the results of acetic acid utilization of enriched SRB.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

การศึกษาเซลล์เฟร็ดเวิร์กแบบที่เรียและมีเทนแบคทีเรีย
ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่อุณหภูมิปานกลาง

ของ
นางสาวอุบลวรรณ ไชโย

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.เสริมศักดิ์ วิชาลาภรณ์)
วันที่.....เดือน.....ปี พ.ศ. 2544

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(อาจารย์ ดร.ยุวดี นาคะผดุงรัตน์)
.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.มรกต ตันติเจริญ)
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์)
.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รองศาสตราจารย์ จริยา สันติสุข)
.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวิณี ชัยประเสริฐ)

ประกาศคุณูปการ

การทำงานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.ยุวดี นาคะผดุงรัตน์ ศ.ดร.มรกต ตันติเจริญ และ ผศ.พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์ ที่กรุณาให้แนวคิดและคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย และให้คำปรึกษาแก้ไขปัญหาต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ตลอดจน รศ.จริยา สินเต็มสุข และ ผศ.ดร.ภาวิณี ชัยประเสริฐ ที่กรุณาสละเวลาเพื่อพิจารณาตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้ข้อคิดเห็นต่องานวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณอาจารย์ นักวิจัย นักศึกษา และเจ้าหน้าที่ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ท้ายที่สุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ๆ ที่คอยสนับสนุนช่วยเหลือด้านทุนทรัพย์ และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนเสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

อุบลวรรณ ไชโย

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซชีวภาพ.....	5
Sulfate-reducing bacteria.....	11
Methane-producing bacteria.....	21
ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของแบคทีเรีย	
ในกลุ่ม SRB และMPB.....	28
3 วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า.....	33
แหล่งของจุลินทรีย์.....	33
การนับจำนวนจุลินทรีย์.....	33
การศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ผสมในการใช้กรดอะซิติก	
เปรียบเทียบกับเมื่อเติมสารยับยั้ง.....	34
ขั้นตอนการทำ enrichment ของจุลินทรีย์กลุ่ม SRB	
ด้วยกรดอะซิติกร้อยละ 0.1 ร่วมกับซัลเฟต.....	34
ขั้นตอนการทำ enrichment ของจุลินทรีย์กลุ่ม SRB	
ด้วยกรดแลคติกร้อยละ 0.1 ร่วมกับซัลเฟต.....	36
การตรวจสอบว่าเป็น enriched SRB.....	37
การศึกษากิจกรรมการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ	
ของ enriched SRB	37
วิธีการวิเคราะห์.....	37
การวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซ.....	37
การวิเคราะห์หากรดอะซิติก.....	38

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	39
การศึกษาจำนวน SRB และMPB ในถังหมักก๊าซชีวภาพ จากเปลือกสับประรดแบบไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	39
การทำ enrichment ของจุลินทรีย์กลุ่ม SRB และศึกษาสัณฐานวิทยา.....	41
การศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ผสม SRB และMPB ในการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	47
การศึกษาการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10-120 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม.....	47
การศึกษาการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10-120 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	59
เปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์ ระหว่างจุลินทรีย์ผสม และจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง.....	71
การศึกษาการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10-120 มิลลิโมลาร์ ของ enriched SRB.....	74
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	76
สรุป และอภิปรายผล.....	76
ข้อเสนอแนะ.....	79

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม.....	80
ภาคผนวก.....	85
ภาคผนวก ก.....	86
ภาคผนวก ข.....	93
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	110

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ปฏิบัติการการเกิดมีเทนจากสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ.....	7
2 ความสำคัญของปฏิบัติการย่อยสลายที่เกิดขึ้นในจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม ภายใต้สภาวะที่มีการย่อยสลายสารอินทรีย์ไปเป็นก๊าซชีวภาพ.....	9
3 ความแตกต่างของ sulfate-or sulfur-reducing bacteria ใน subgroup1.....	13
4 ความแตกต่างของ sulfate-or sulfur-reducing bacteria ใน subgroup2.....	17
5 ความแตกต่างของ sulfate-or sulfur-reducing bacteria ใน subgroup3.....	19
6 ความแตกต่างของ sulfate-or sulfur-reducing bacteria ใน subgroup4.....	20
7 จำนวนของ MPB และSRB ที่พบในจุลินทรีย์ผสม ในถังหมักก๊าซชีวภาพ จากเปลือกสับปะรดแบบไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	40
8 จำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB และSRB ที่พบใน enriched culture.....	42
9 ปริมาณกรดอะซิติกที่ถูกใช้โดยจุลินทรีย์ผสม ความเข้มข้นของกรดอะซิติก เริ่มต้น 10 30 50 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์.....	47
10 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม MPB และSRB ที่อุณหภูมิปานกลาง.....	48
11 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม MPB และSRB ที่อุณหภูมิปานกลาง.....	49
12 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม MPB และSRB ที่อุณหภูมิปานกลาง.....	51
13 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม MPB และSRB ที่อุณหภูมิปานกลาง.....	53
14 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม MPB และSRB ที่อุณหภูมิปานกลาง.....	55
15 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม MPB และSRB ที่อุณหภูมิปานกลาง.....	57
16 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	59

บัญชีตาราง(ต่อ)

ตาราง	หน้า
17 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	61
18 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	63
19 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	65
20 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	67
21 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	69
22 MPN(Most Probable Number): 3 tube :dilution.....	92
23 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม MPB และSRB ที่อุณหภูมิปานกลาง.....	94
24 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม MPB และSRB ที่อุณหภูมิปานกลาง.....	95
25 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม MPB และSRB ที่อุณหภูมิปานกลาง.....	96
26 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม MPB และSRB ที่อุณหภูมิปานกลาง.....	97
27 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม MPB และSRB ที่อุณหภูมิปานกลาง.....	98
28 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม MPB และSRB ที่อุณหภูมิปานกลาง.....	99
29 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	100
30 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	100

บัญชีตาราง(ต่อ)

ตาราง	หน้า
31 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	101
32 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	102
33 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	103
34 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	104
35 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดย enriched SRB.....	105
36 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดย enriched SRB.....	105
37 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดย enriched SRB.....	106
38 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ โดย enriched SRB.....	107
39 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ โดย enriched SRB.....	108
40 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ โดย enriched SRB.....	109

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ขั้นตอนการย่อยสลายสารอินทรีย์ไปเป็นก๊าซชีวภาพ ในระบบบำบัดแบบไร้ออกซิเจน.....	8
2 รูปร่างลักษณะของเซลล์ <i>Desulfobulbus propionicus</i> Bar, 10 μm รูปร่างลักษณะของเซลล์ a: <i>Desulfovibrio sapovorans</i> (x2000) b: <i>Desulfovibrio baasii</i> (x2000).....	14 16
3 รูปร่างลักษณะของเซลล์ <i>Desulfobacter postgatei</i> Bar, 10 μm	18
4 โครงสร้างของ Coenzyme F ₄₂₀	22
5 โครงสร้างของ Methanofuran (MFR).....	23
6 โครงสร้างของ tetrahydromethanopterin (H ₄ MPT).....	23
7 โครงสร้างของ F ₄₃₀	24
8 โครงสร้างของ Component B.....	25
9 การเกิดมีเทนจากกรดอะซิติก.....	26
10 การเกิดมีเทนจากคาร์บอนไดออกไซด์.....	27
11 รูปร่างของ enriched SRB ที่เลี้ยงด้วยกรดอะซิติกร้อยละ 0.1.....	45
12 รูปร่างของ enriched SRB ที่เลี้ยงด้วยกรดแลคติกร้อยละ 0.1.....	46
13 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม.....	48
14 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม.....	50
16 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม.....	52
17 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม.....	54

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
18 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม.....	56
19 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม.....	58
20 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	60
21 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	62
22 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	64
23 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	66
24 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	68
25 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA.....	70
26 เปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ ระหว่างจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง.....	71
27 เปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ ระหว่างจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง.....	72

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
28 เปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ ระหว่างจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง.....	73
29 การใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10-120 มิลลิโมลาร์ ของ enriched SRB.....	75

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ได้ศึกษาการย่อยสลายเปลือกสับปะรด ด้วยกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจนมาตั้งแต่ พ.ศ. 2521 วัตถุประสงค์เพื่อบำบัดน้ำเสีย ของเหลือทิ้ง และผลิตพลังงาน โดยศึกษาตั้งแต่หาข้อมูลพื้นฐาน เกี่ยวกับสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมแก่การผลิตก๊าซชีวภาพ และปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตก๊าซชีวภาพ เช่น อุณหภูมิ สารตัวกลาง ปฏิริยาชีวเคมี เป็นต้น ผลการศึกษามีดังนี้

การศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในถังหมักเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) ในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ทั้งสองอุณหภูมิ ไม่สามารถใช้กรดไพรูวอนิกในการผลิตก๊าซชีวภาพได้ เมื่อมีความเข้มข้นของกรดไพรูวอนิกร้อยละ 5 และพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด โดยที่อุณหภูมิสูงจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายกรดอินทรีย์ระเหยง่าย และอัลกอฮอล์บางชนิดได้ดีกว่าที่อุณหภูมipานกลาง (นพพร เจตนชัย. 2529)

การศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้ เซลลูโลส กลูโคส กรดอินทรีย์ระเหยง่าย และอัลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ทั้งสองถัง มีความสามารถในการย่อยสลายชนิดของคาร์บอนได้ใกล้เคียงกัน ยกเว้นกรณีของกรดไพรูวอนิก การย่อยสลายกรดไพรูวอนิกที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าจุลินทรีย์ไม่ว่ามาจากถังปฏิกรณ์ใด ไม่สามารถย่อยสลายกรดไพรูวอนิกที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสได้ ถ้าเปลี่ยนอุณหภูมิในการย่อยสลายเป็น 37 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ 37 และ 55 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายกรดไพรูวอนิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.5 และ 1.0 ได้ ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับการใช้สารยับยั้งเพื่อศึกษากรดอินทรีย์ที่เป็นสารตัวกลางในระหว่างการย่อยสลาย และพบสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์ 37 องศาเซลเซียส เป็นกรดอะซิติก กรดไพรูวอนิก กรดบิวทิริก และเอทานอล ส่วนในถังปฏิกรณ์ 55 องศาเซลเซียส สารตัวกลางที่พบเป็น กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ไม่พบกรดไพรูวอนิก (หัตยา ทิพย์วัฒน์. 2531)

การย่อยสลายเปลือกสับปะรด และสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยจุลินทรีย์จากถังหมักเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าถ้ามีกรดไพรฟอนิก และกรดบิวทิริกความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ในระบบมากกว่ากรดอะซิติก และกรดไพรฟอนิกที่ได้จากการย่อยสลายกรดแลคติกจะทำให้มีผลต่อการย่อยสลายกรดแลคติก และกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ มากกว่าผลที่เกิดจากกรดแลคติกเอง (เกษแก้ว ปาณะมณฑา. 2535)

การศึกษาผลของกรดอะซิติก กรดไพรฟอนิก กรดบิวทิริกต่อจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซชีวภาพ พบว่ากรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญในการยับยั้งการย่อยสลายของกรดอินทรีย์ชนิดอื่น คือ กรดอะซิติก โดยพบว่าในที่มีกรดอะซิติกอยู่นั้น จุลินทรีย์จะใช้กรดอะซิติกก่อนจึงจะใช้กรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ นั่นคือ ถ้าจุลินทรีย์ที่ใช้กรดอะซิติกไม่สามารถดึงกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นไปใช้ได้เร็ว ทำให้กรดไพรฟอนิก และกรดบิวทิริกไม่สามารถถูกย่อยสลายต่อไปได้ ทำให้เกิดการสะสมกรดพวกนี้อยู่ ดังนั้นในระบบที่ล้มเหลวจึงมักพบว่ามีการสะสมกรดไพรฟอนิก และกรดบิวทิริกสะสมอยู่ (จงกล พูนทวี. 2537)

การศึกษาผลของกรดแลคติกต่อการเกิดก๊าซชีวภาพ พบว่าการย่อยสลายกรดแลคติกจะถูกยับยั้งเมื่อมีการสะสมของกรดอะซิติก 40 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อมีความเข้มข้นของกรดแลคติก 100 มิลลิโมลาร์ จะมีการใช้กรดแลคติกได้ช้าลง แม้ว่าจะมีกรดอะซิติกสะสมอยู่ไม่ถึง 20 มิลลิโมลาร์ (มาลินี จงเจริญใจ. 2541)

การใช้กรดอะซิติกระหว่างจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์ที่ผ่านการ enrichment ด้วยกรดอะซิติกในการผลิตก๊าซชีวภาพ พบว่าในช่วงแรก enriched acetoclastic methanogens สามารถใช้กรดอะซิติกเป็นก๊าซมีเทนได้เร็วกว่า และได้ผลผลิตของก๊าซมีเทนสูงกว่าเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ผสม แต่การเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มใกล้เคียงกัน ในขณะที่การใช้กรดอะซิติกในจุลินทรีย์ผสมในช่วงแรกพบว่าการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่าก๊าซมีเทน แสดงว่าในจุลินทรีย์ผสมนอกจาก acetoclastic methanogens แล้วยังมีจุลินทรีย์ในกลุ่ม sulfate-reducing bacteria ที่ใช้กรดอะซิติกได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในระบบที่มีจำนวนของจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทนมากขึ้นจะช่วยเร่งการเปลี่ยนกรดอะซิติกเป็นก๊าซมีเทน การใช้กรดอะซิติกใน enriched culture ไม่พบผลการยับยั้งเมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 120 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่จุลินทรีย์ผสมถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงกว่า 70 มิลลิโมลาร์ (พวงทอง เม้งเกร็ด. 2541)

จากการศึกษาของจงกล และจากรายงานต่างๆ พบว่ากรดอะซิติกเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพเนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทน มีอัตราการเจริญช้ากว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ ที่อยู่ในระบบบำบัด ทำให้ขั้นตอนการเปลี่ยนกรดอะซิติกไปเป็นก๊าซชีวภาพเป็น rate-limiting step ของการเกิดก๊าซชีวภาพ

และนอกจากนี้ยังพบว่า การใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ผสมในช่วงแรกมีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่ามีเทน ซึ่งแสดงให้เห็นว่านอกจาก acetoclastic methanogens แล้ว ยังมีจุลินทรีย์ในกลุ่ม sulfate-reducing bacteria ที่สามารถใช้กรดอะซิติกได้ด้วย (พวงทอง เม้งเกร็ด. 2541) แสดงว่าในขั้นตอนของการย่อยสลายกรดอะซิติกไปเป็น ก๊าซชีวภาพมี จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 กลุ่มคือ methane-producing bacteria และ sulfate-reducing bacteria จึงมีความสนใจที่จะศึกษาจำนวนและกิจกรรมการใช้กรดอะซิติกของ จุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ในการควบคุมระบบบำบัดให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาจำนวนของ SRB และ MPB ในถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดแบบไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
2. เพื่อศึกษากิจกรรมการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ ของจุลินทรีย์ผสม SRB และ MPB เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง
3. เพื่อทำ enrichment ของจุลินทรีย์กลุ่ม SRB และศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology)
4. เพื่อศึกษากิจกรรมการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ enriched SRB

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทำให้ทราบความสัมพันธ์ของ SRB และ MPB ในการย่อยสลายกรดอะซิติก
2. ทำให้ทราบผลของความเข้มข้นของกรดอะซิติกต่อการย่อยสลายกรดอะซิติกของ SRB และ MPB
3. ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ในการควบคุมระบบบำบัดให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น และยังสามารถนำไปสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของแบคทีเรียที่ย่อยสลายกรดอะซิติกได้

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาจำนวนแบคทีเรียในกลุ่ม SRB และ MPB ที่ใช้กรดอะซิติกในถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดแบบไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) โดยวิธี Most Probable Number (MPN)
2. ศึกษากิจกรรมการใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ผสมเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง โดยใช้ serum vial technique
3. ทำการ enriched จุลินทรีย์กลุ่ม SRB จากจุลินทรีย์ผสมในถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี dilution ร่วมกับ enrichment ด้วยกรดอะซิติกร่วมกับซัลเฟต และศึกษาสัณฐานวิทยาของ enriched SRB ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
4. ศึกษากิจกรรมการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ enriched SRB เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ผสม ในการเกิดก๊าซชีวภาพโดยใช้ serum vial technique

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

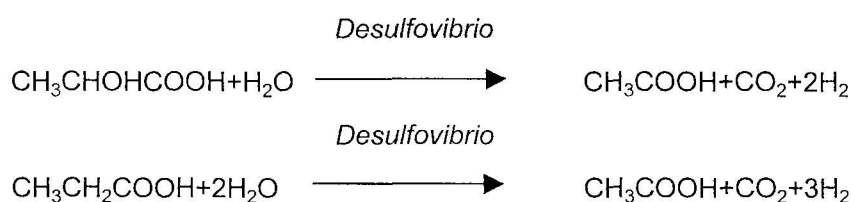
การย่อยสลายสารอินทรีย์เพื่อผลิตก๊าซชีวภาพในระบบบำบัดแบบไร้ออกซิเจน ประกอบไปด้วยขั้นตอนไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซึ่งในขั้นตอนนี้จุลินทรีย์พวก hydrolytic bacteria และ fermentative bacteria จะย่อยสลายสารอินทรีย์เชิงซ้อนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยคาร์โบไฮเดรตจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (simple sugar) โปรตีนถูกเปลี่ยนเป็นเปปไทด์หรือกรดอะมิโน ไขมันจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอล นอกจากนี้ยังพบสารประกอบพวกแอลกอฮอล์ ไฮโดรเจน และ คาร์บอนไดออกไซด์รวมอยู่ด้วย ผลผลิตที่ได้จากขั้นตอนไฮโดรไลซิสจะถูกย่อยสลายต่อใน ขั้นตอนการผลิตกรดอินทรีย์ (acid formation) โดยกลุ่ม non-methanogenic bacteria ได้เป็น กรดอินทรีย์ระเหยง่าย เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และกรดแวลริก เป็นต้น แบคทีเรียในกลุ่ม methanogenic bacteria นำผลผลิตจากขั้นตอนการผลิตกรดอินทรีย์ไปใช้ในการสร้างก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในขั้นตอนการผลิตก๊าซมีเทน (methane formation)

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซชีวภาพ

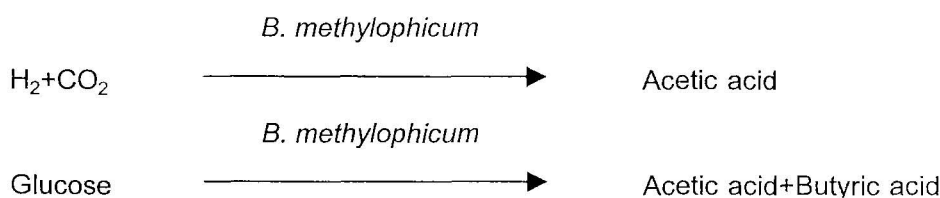
จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซชีวภาพ จำแนกเป็น 4 กลุ่มย่อยคือ

1. Fermentative bacteria ทำหน้าที่ในขั้นตอนไฮโดรไลซิส และขั้นตอนการผลิตกรดอินทรีย์ จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เซลลูโลส แป้ง โปรตีน และไขมัน ให้เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลง เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน และกรดไขมัน สารต่างๆ เหล่านี้จะผ่านเข้าไปในเซลล์ และถูกเปลี่ยนไปเป็น อะซิเตท โพรพิโอนะต แลคเตท บิวทิเรท และเอทานอล เป็นต้น ผลผลิตที่ได้ในขั้นตอนนี้ขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นและสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตในสภาวะที่มีก๊าซไฮโดรเจนต่ำจุลินทรีย์จะผลิตสารอินทรีย์พวก อะซิเตท คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน แต่ในสภาวะแวดล้อมที่มีก๊าซไฮโดรเจนสูง จุลินทรีย์จะผลิต โพรพิโอนะต แลคเตท และเอทานอล เป็นต้น

2. Hydrogen-producing acetogenic bacteria จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ในการย่อยสลายไพรรพืออเนท เอทานอล และกรดอินทรีย์อื่นๆ ได้เป็น กรดอะซิติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน เช่น



3. Homoacetogenic bacteria จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เป็นพวกที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ผลผลิตเป็นกรดอะซิติก และถ้าใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนหลายอะตอม เช่น แลคเตท ไพรูเวท และเฮกโซส จะให้ผลผลิตเป็นกรดอะซิติก และกรดบิวทิริก เช่น *Butyrobacterium methylophilum*



4. Methanogenic bacteria เป็นจุลินทรีย์ที่สร้างก๊าซมีเทน จุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นพวก obligate anaerobes คือ สามารถเจริญได้ดีในสภาวะไร้ออกซิเจนเท่านั้น จุลินทรีย์เหล่านี้จะย่อยสลายอะซิเตท ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ได้เป็นก๊าซมีเทน และสามารถเจริญได้ทั้งในช่วงอุณหภูมิปานกลาง (35-40 องศาเซลเซียส) และช่วงอุณหภูมิสูง (55-60 องศาเซลเซียส) pH ที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตก๊าซมีเทน อยู่ในช่วงระหว่าง 6.8-7.2 สิ่งที่ต้องการมากที่สุดคือ เกลือแร่ (mineral salts) กับคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนแอมโมเนียและซัลไฟด์ หรือ ซีสเทอีน (cysteine) เป็นสารที่จุลินทรีย์ต้องการเพิ่มเติม ซึ่งถ้าแบ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มตามการใช้สารตั้งต้นแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ

1. Methylophilic bacteria ใช้ อะซิเตท เมทานอล และ methylated amine
2. Non-methylophilic bacteria ใช้ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และ

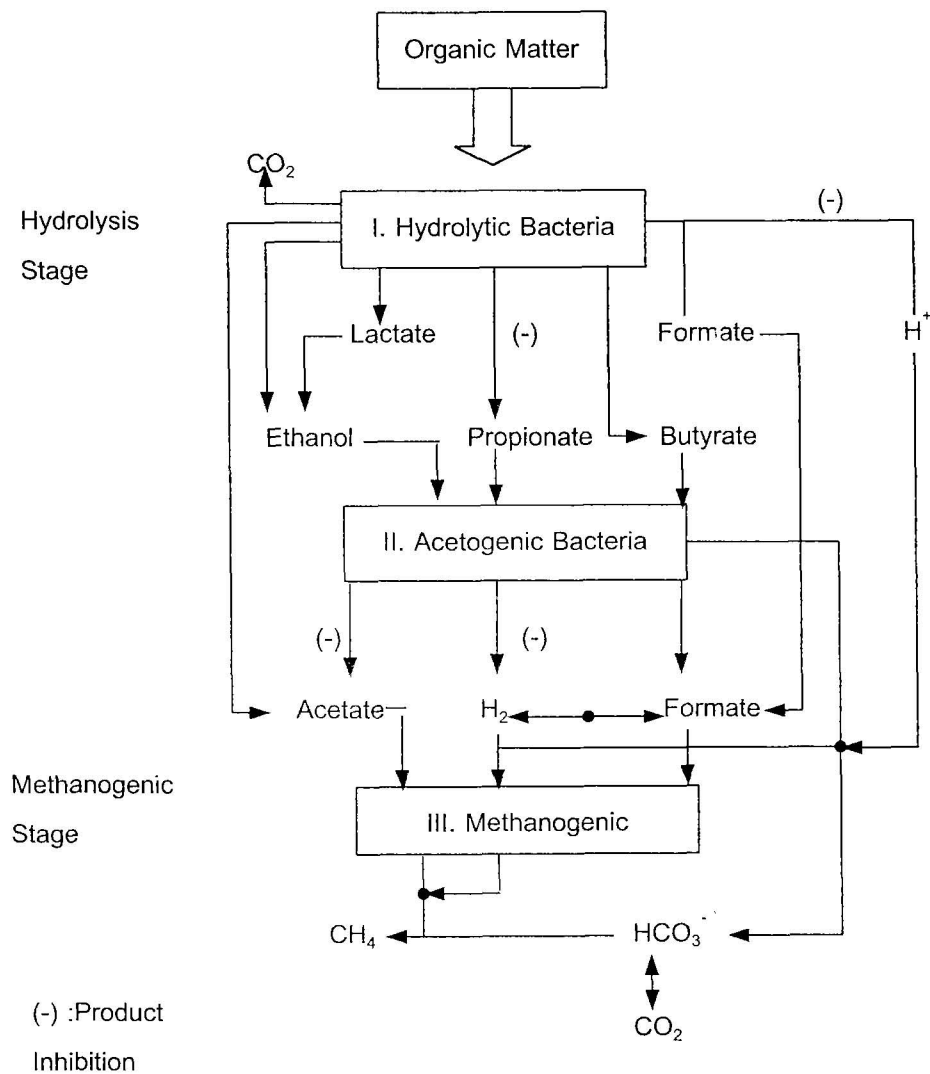
ฟอร์เมท

ปฏิกิริยาการเกิดมีเทนของสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ดังตาราง 1 และภาพประกอบ 1

ตาราง 1 ปฏิกริยาการเกิดมีเทนจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ

Substrate	Reaction	ΔG^0 (kJ/mole CH_4)
1. ไฮโดรเจน	$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-130.4
2. ฟอร์มิก	$4\text{HCOOH} \longrightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-119.5
3. เมทานอล	$4\text{CH}_3\text{OH} \longrightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-103
4. โมโนเมทิลามีน	$4\text{CH}_3\text{NH}_3^+ + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 3\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_4^+$	-74
5. ไดเมทิลามีน	$2(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2^+ + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 3\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{NH}_4^+$	-74
6. ไตรเมทิลามีน	$4(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+ + 6\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 9\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_4^+$	-74
7. อะซิติก	$\text{CH}_3\text{COOH} \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-32.5

ที่มา : Zinder, S.H. (1992). "Methanogenesis and Biochemistry," *Encyclopedia of Microbiology*. New York: John Wiley & Sons.



ภาพประกอบ 1 ขั้นตอนการย่อยสลายสารอินทรีย์ไปเป็นก๊าซชีวภาพในระบบบำบัด แบบไร้ออกซิเจน

ที่มา : Thiele, J.H. and Zeikus, J.G. (1988). "The Anion-Exchange Substrate Shuttle Process: A New Approach to Two-Stage Biomethanation of Organic and Toxic Waste," *Biotechnology and Bioengineering*. 31(2): 521-535.

ตาราง 2 ความสำคัญของปฏิกิริยาการย่อยสลายที่เกิดขึ้นในจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มภายใต้สภาวะที่มี
การย่อยสลายสารอินทรีย์ไปเป็นก๊าซชีวภาพ

Reaction	G, kJ/reaction
A. Fermentative reactions:	
(1) $C_6H_{12}O_6 + 3H_2O \longrightarrow 3CH_4 + 3HCO_3^- + 3H^+$	-403.6
(2) $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \longrightarrow 2ethanol + 2HCO_3^- + 2H^+$	-225.4
(3) $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2lactate + 2H^+$	-198.1
(4) $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \longrightarrow butyrate + 2HCO_3^- + 3H^+ + 2H_2$	254.4
(5) $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 3acetate + 3H^+$	-310.6
(6) $3lactate \longrightarrow 2propionate + acetate + HCO_3^- + H^+$	-164.8
B. Syntrophic acetogenic reactions:	
(7) $lactate + 2H_2O \longrightarrow acetate + 2H_2 + HCO_3^- + H^+$	-3.96
(8) $ethanol + 2HCO_3^- \longrightarrow acetate + 2formate + H_2O + H^+$	+7.0
(9) $ethanol + 2H_2O \longrightarrow acetate + 2H_2 + H^+$	+9.6
(10) $butyrate + 2H_2O \longrightarrow 2acetate + 2H_2 + H^+$	+48.1
(11) $benzoate + 7H_2O \longrightarrow 2acetate + 3H_2 + HCO_3^- + 2H^+$	+53.0
(12) $propionate + 3H_2O \longrightarrow acetate + 3H_2 + HCO_3^- + H^+$	+76.1
C. Methanogenic reactions:	
(13) $acetate + H_2O \longrightarrow methane + HCO_3^-$	-31.0.
(14) $4H_2 + HCO_3^- + H^+ \longrightarrow methane + H_2O$	-135.6
(15) $4formate + H^+ + H_2O \longrightarrow methane + 3HCO_3^-$	130.4
D. Sulfidogenic reactions:	
(16) $2lactate + SO_4^{2-} \longrightarrow 2acetate + 3HCO_3^- + 2HS^- + H^+$	-161.1
(17) $2lactate + 3SO_4^{2-} \longrightarrow 6HCO_3^- + 3HS^- + H^+$	-225.3
(18) $4H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \longrightarrow 4H_2O + HS^-$	-152.2
(19) $acetate + SO_4^{2-} \longrightarrow 2HCO_3^- + HS^-$	-47.6
(20) $4propionate + 3SO_4^{2-} \longrightarrow 4acetate + 4HCO_3^- + 3HS^-$	-150.6
(21) $2butyrate + SO_4^{2-} \longrightarrow 4acetate + HS^- + H^+$	-28.0

ที่มา : Thiele, J.H. and Zeikus, J.G. (1988). "The Anion-Exchange Substrate Shuttle Process: A New Approach to Two-Stage Biomethanation of Organic and Toxic Waste," *Biotechnology and Bioengineering*. 31(2):521-535.

ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจนที่มีซัลเฟตพบว่าจุลินทรีย์จะใช้ซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนและไปมีผลต่อการสร้างก๊าซมีเทน ทั้งในแง่ของการพึ่งพา (mutualism) และการแข่งขัน (competition) ระหว่าง SRB และ MPB ซึ่ง SRB จะใช้ไฮโดรเจน ฟอर्मेट และอะซิเตท ได้ดีกว่า MPB แต่ยังมีปัจจัยอื่นๆ อีกที่มีความสำคัญต่อความสามารถในการใช้สารอาหารได้แก่ ค่า affinity จำนวนแบคทีเรีย และสภาวะของถังปฏิกรณ์ เช่น pH อุณหภูมิและความเข้มข้นของซัลไฟด์ ในสภาวะที่ไม่มีซัลเฟต SRB มีคุณสมบัติในการเจริญเป็นแบบกลุ่ม fermentative bacteria ย่อยสลายกรดไพรูวอิก และกรดบิวทิริกทำให้ MPB มีบทบาทสำคัญในการสร้างก๊าซมีเทนจากผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายกรดเหล่านี้ และยังพบว่าในสภาวะที่มีซัลเฟต SRB จะใช้ผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลายกรดไพรูวอิก และกรดบิวทิริกด้วยทำให้มีการแข่งขันระหว่าง MPB และ SRB (Elferink, Oude & Visser. 1994)

ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจนที่มีซัลเฟตอยู่จะมีผลกระทบต่อการสร้างก๊าซมีเทนเนื่องจากการเกิด sulfate reduction ทำให้มีผลดังนี้

1. ซัลเฟตถูกรีดิวซ์ไปเป็น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ซึ่งจะยับยั้งการสร้างมีเทนและทำให้คุณภาพของก๊าซมีเทนต่ำลง และมีผลกระทบต่อดัชนีกลุ่มอื่นที่อยู่ในระบบบำบัดแบบไร้ออกซิเจน
2. ซัลไฟด์ที่เกิดขึ้นมีความเป็นพิษ มีกลิ่นเหม็นและเป็นสาเหตุทำให้เกิดสนิม
3. ซัลไฟด์ที่ออกมาคือน้ำทิ้งมีความต้องการออกซิเจนในการย่อยสลายสูงและส่งกลิ่นเหม็นรบกวน
4. SRB จะแข่งขันกับ MPB ในการใช้สารอาหารทำให้มีผลต่อการสร้างมีเทน

จากรายงานต่างๆ พบว่า ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจน นอกจาก MPB แล้ว ยังมี SRB ซึ่งสามารถใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (Cappenberg & Prins. 1974); (Parkin, et al. 1989); (Choi & Rim. 1991) จึงแข่งขันกับ MPB ในการใช้อะซิเตท ซึ่ง SRB สามารถใช้อะซิเตทได้ดีกว่า MPB (Widdel. 1988) โดยเฉพาะในสภาวะที่มีซัลเฟต SRB จะใช้อะซิเตทและไฮโดรเจนได้มากกว่า MPB (Shonheit, Kristjansson & Thauer. 1982); (Lovley. 1982); (Isa, Grusenmeyer & Verstrate. 1986); (Yoda & Kitagawa. 1987)

Sulfate-reducing bacteria

Sulfate-reducing bacteria เป็นแบคทีเรียแกรมลบใช้ซัลเฟต สารประกอบซัลเฟอร์ และธาตุซัลเฟอร์ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน รีดิวซ์สารอินทรีย์ได้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ภายในเซลล์ประกอบด้วยไซโตโครมชนิด a และ b หรือ มีทั้ง a และ b บางชนิดมี sulfide reductase desulfoviridin desulforubidin หรือ P582 และบางชนิดพบว่ามีเอนไซม์ hydrogenase สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้แอมโมเนีย ในบางสายพันธุ์ตรึงไนโตรเจนได้ในระดับ genera และ species จำแนกความแตกต่างโดยดูการใช้สารประกอบอินทรีย์ เช่น บาง species มีการออกซิไดซ์สารอาหารไม่สมบูรณ์

Sulfate- or Sulfur-reducing bacteria จัดอยู่ใน Group 7 แบ่งออกเป็น 4 subgroup ดังนี้

- | | |
|------------|-------------------------------------|
| Subgroup 1 | Genus <i>Desulfotomaculum</i> |
| Subgroup 2 | Genus <i>Desulfobulbus</i> |
| | Genus <i>Desulfomicrobium</i> |
| | Genus <i>Desulfomonas</i> |
| | Genus <i>Desulfovibrio</i> |
| | Genus <i>Thermodesulfobacterium</i> |
| Subgroup 3 | Genus <i>Desulfobacter</i> |
| | Genus <i>Desulfococcus</i> |
| | Genus <i>Desulfosarcina</i> |
| Subgroup 4 | Genus <i>Desulfurella</i> |
| | Genus <i>Desulfuromonas</i> |

● ลักษณะรูปร่าง

- กลม ปลายมนข้างหนึ่งอีกข้างปลายแหลม (ovoid)
- แท่ง (rod)
- เกลียว (spiral)
- vibrioid

● ขนาดรูปร่างและการจัดเรียงตัว

เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4-3.0 μm เป็นเซลล์เดี่ยว คู่ บางครั้งรวมกันเป็นกระจุก มี filament หลายเส้น

- การเคลื่อนที่

มีทั้งเคลื่อนที่ได้ และเคลื่อนที่ไม่ได้

- สภาพแวดล้อมในการเจริญ

Sulfate-reducing bacteria เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะไร้ออกซิเจน (strictly anaerobe) โดยเฉพาะในสภาวะที่มีไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และซัลเฟต สามารถใช้ไฮโดรเจนหรือสารประกอบอินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน บางชนิดใช้ แลคเตท กรดไขมัน เอทานอล หรือ dicarboxylic acid และไซแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้ซัลเฟตหรือซัลเฟอร์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ออกซิไดซ์สารอินทรีย์ไม่สมบูรณ์จะได้อะซิเตทเป็นผลผลิตในขั้นตอนสุดท้ายหรือได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เมื่อมีการออกซิไดซ์ที่สมบูรณ์

- แหล่งที่พบจุลินทรีย์

ในน้ำจืด น้ำเค็มหรือบริเวณที่มีความเค็มสูง บางชนิดอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีความร้อนสูงและในน้ำร้อน

Subgroup 1

Genus *Desulfotomaculum*

- แกรมบวก มีขนาด 0.5-2x2-9 μm รูปร่างคล้ายหยดน้ำ ใช้ซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน สร้างสปอร์ได้ทั้งหมด มีเอนโดสปอร์อยู่บริเวณกลางเซลล์ และบริเวณปลายเซลล์ เคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลลา(flagella) ซึ่งมีทั้งแบบ peritrichous flagella และ polar flagella

- เจริญในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนใช้ซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนรีดิวซ์ซัลไฟต์ thiosulfate ได้ H_2S สามารถใช้ไฮโดรเจน แลคเตท monocarboxylic acid เป็นตัวให้อิเล็กตรอน บางชนิดสามารถใช้น้ำตาล ในกลุ่มที่เป็น heterotrophic จะใช้ H_2 เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนพวก autotrophic ใช้อะซิเตท ออกซิไดซ์สารอินทรีย์สมบูรณ์ได้ CO_2 และ ออกซิไดซ์ไม่สมบูรณ์จะได้อะซิเตท

- ทุก species เจริญใน simple media และ defined media ใช้ yeast extract ในการเจริญ ต้องการวิตามิน pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.6-7.4 เจริญในช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส และ 40-65 องศาเซลเซียส ดังตาราง 3

- แหล่งที่พบ ในน้ำจืด น้ำเค็ม ทางเดินอาหารของสัตว์

- ตัวอย่างเช่น *Desulfotomaculum nigrificans*.

ตาราง 3 ความแตกต่างของ sulfate- or sulfur-reducing bacteria ใน subgroup 1

Characteristic	1. Spore-forming sulfate-reducing bacteria	2. Non-spore-forming sulfate-reducing bacteria; incomplete substrate oxidation	3. Non-spore-forming sulfate-reducing bacteria; complete substrate oxidation	4. Sulfur-reducing bacteria
Sulfate reduced to sulfide	+	+	+	-
Sulfur reduced to sulfide	-	+or-	-	+
Organic substrates completely oxidized to CO ₂	+or-	-	+	+

ที่มา : Widdel, F. and Pfennig, N. (1988). "Dissimilatory Sulfate-or Sulfur-Reducing Bacteria," *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

Subgroup 2

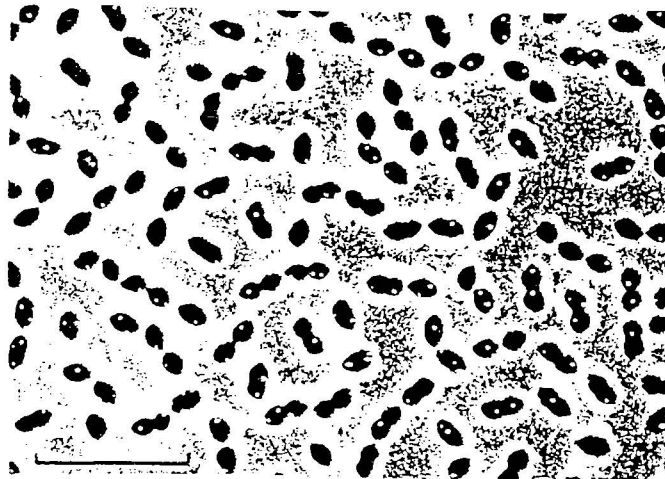
Genus *Desulfobulbus*

- แกมมลบ มีขนาด 0.6-1.3x1.5-2.5 μm รูปร่างเป็นแท่ง กลมคล้ายผลส้ม เรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม มีทั้งพวกที่เคลื่อนที่ได้โดยใช้ single polar flagella และพวกที่เคลื่อนที่ไม่ได้ ดังภาพประกอบ 2

- เจริญในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน ใช้ซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน รีดิวิซัลไฟด์ thiosulfate ได้ H_2S ไม่รีดิวิซัลเฟอร์ ใช้ แลคเตท โปรพิอเนท เอทานอล และก๊าซไฮโดรเจนเป็นตัวให้อิเล็กตรอน

- ทุก species เจริญใน simple media และ defined media ต้องการ p-aminobenzoate pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.6-7.5 เจริญในช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส ดังตาราง 4

- แหล่งที่พบ ในน้ำจืด และในน้ำเค็ม
- ตัวอย่างเช่น *Desulfobulbus propionicus*



ภาพประกอบ 2 รูปร่างลักษณะของเซลล์ *Desulfobulbus propionicus* Bar, 10 μm

ที่มา : Widdel, F. and Pfennig, N. (1988). "Dissimilatory Sulfate-or Sulfur-Reducing Bacteria," *Berkey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

Genus *Desulfomicrobium*

- แกรมลบ ขนาดเซลล์ 0.6x1.3 μm รูปร่างแท่งมีทั้งพวกที่เคลื่อนที่ได้โดยอาศัย single polar flagella และพวกที่เคลื่อนที่ไม่ได้
- อยู่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน รีดิวซ์ซัลเฟต ซัลไฟด์ และ thiosulfate ได้ H_2S บางครั้งรีดิวซ์ซัลเฟอร์ ใช้ แลคเตท malate และก๊าซไฮโดรเจน เป็นตัวให้อิเลคตรอน
- เจริญใน simple media และ defined media และต้องการ yeast extract ในการเจริญ pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.6-7.5 เจริญในช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส ดังตาราง 4
- แหล่งที่พบ ในน้ำเค็ม บริเวณที่มีน้ำมัน
- ตัวอย่างเช่น *Desulfomicrobium baculatum*

Genus *Desulfomonas*

- แกรมลบ มีขนาด 0.8-1.3x1.2-5 μm รูปร่างแท่ง เคลื่อนที่ไม่ได้
- แบคทีเรียในจินัสนี้เจริญอยู่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน รีดิวซ์ซัลเฟต ได้ H_2S ใช้

แลคเตท เอทานอล และก๊าซไฮโดรเจน เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

● เจริญใน simple media และ defined media ต้องการ yeast extract และ p-aminobenzoate ในการเจริญ pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.6-7.5 ต้องการอุณหภูมิในการเจริญอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ดังตาราง 4

- แหล่งที่พบ ในน้ำจืด และในน้ำเค็ม
- ตัวอย่างเช่น *Desulfomonas pigra*

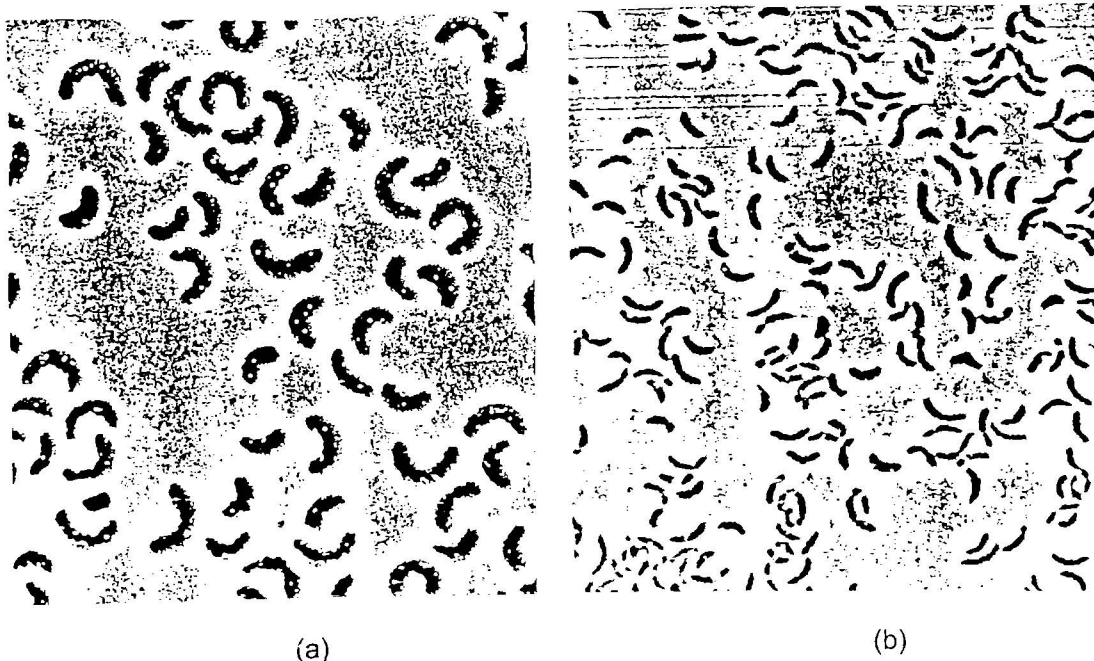
Genus *Desulfovibrio*

● แกรมลบ มีขนาด 0.5-1.3x0.8-5 μm รูปร่างเกลียว และ vibrioid เคลื่อนที่ได้โดยอาศัย single polar flagella และ tufts of polar flagella ดังภาพประกอบ 3

● อยู่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน รีดิวซ์ซัลเฟต ซัลไฟด์ thiosulfate ได้ H_2S ใช้แลคเตท เอทานอล malate fumarate และก๊าซไฮโดรเจน เป็นตัวให้อิเล็กตรอน บาง species ใช้พวกน้ำตาล glycerol choline หรือ กรดอะมิโน

● เจริญใน simple media และ defined media ต้องการ yeast extract มีส่วนน้อยที่ต้องการ biotin หรือ วิตามิน ในการเจริญ pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.6-7.5 อุณหภูมิในการเจริญอยู่ในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส ดังตาราง 4

- แหล่งที่พบ ในน้ำเสียจากแหล่งอุตสาหกรรม ลำไส้ของสัตว์ และในตะกอนน้ำเค็ม
- ตัวอย่างเช่น *Desulfovibrio desulfuricans*



ภาพประกอบ 3 รูปร่างลักษณะของเซลล์ a: *Desulfovibrio saproovorans* (x2000)

b: *Desulfovibrio baasii* (x2000)

ที่มา : Widdel, F. and Pfennig, N. (1988). "Dissimilatory Sulfate-or Sulfur-Reducing Bacteria," *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

Genus *Thermodesulfobacterium*

- แกรมลบ มีขนาด 0.3x0.9-2.5 μm รูปร่างคล้ายไข่ และเป็นแท่ง เคลื่อนที่ได้โดยอาศัย single polar flagella และเคลื่อนที่ไม่ได้
- เจริญในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน รีดิวซ์ซัลเฟต ได้ H_2S ใช้ แลคเตท และก๊าซไฮโดรเจน เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ไม่ใช่เอทานอล
- ต้องการ yeast extract ในการเจริญ pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.6-7.5 อุณหภูมิในการเจริญอยู่ในช่วง 65-70 องศาเซลเซียส ดังตาราง 4
- แหล่งที่พบ ในพื้นที่ที่มีคราบน้ำมัน และน้ำพุร้อน
- ตัวอย่างเช่น *Thermodesulfobacterium commune*

ตาราง 4 ความแตกต่างของ sulfate- or sulfur-reducing bacteria ใน subgroup 2

Characteristic	<i>Desulfobulbus</i>	<i>Desulfomicrobium</i>	<i>Desulfomonas</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Thermodesulfobacter</i>
Cells spiral or vibrioid-shaped	-	-	-	+	-
Cells ovoid to rod-shaped	+	+	+	-	+
Motile by polar flagella	+or-	+	-	+or-	+or-
Optimum temperature range:					
25-40°C	+	+	+	+	-
65-70°C	-	-	-	-	+
Utilized with sulfate:					
H ₂ +CO ₂ + acetate as carbon source	+	+	+	+	+
Lactate	+	+	+	+	+
Propionate	+	-	-	-	-
Desulfovirdin present	-	-	+	+	-

ที่มา : Widdel, F. and Pfennig, N. (1988). "Dissimilatory Sulfate-or Sulfur-Reducing Bacteria," *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

Subgroup 3

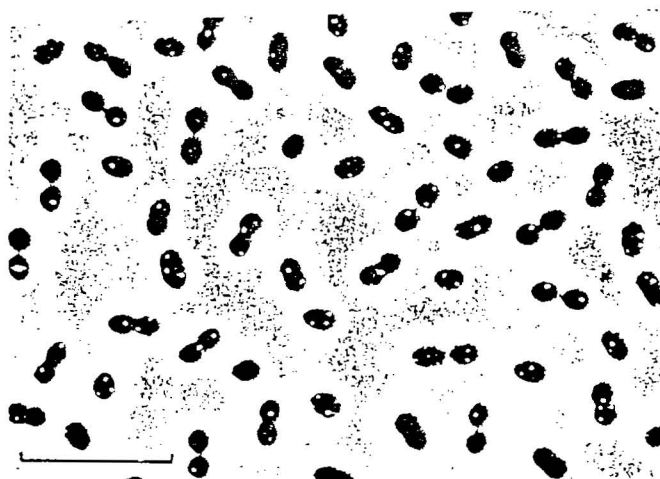
Genus *Desulfobacter*

- แกรมลบ มีขนาด 0.5-2.4x1.7-7 µm รูปร่างแท่ง และ vibrioid มีทั้งพวกที่เคลื่อนที่ได้โดยอาศัย single polar flagella และเคลื่อนที่ไม่ได้ ดังภาพประกอบ 4

- อยู่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน รีดิวซ์ซัลเฟต ซัลไฟด์ และ thiosulfate ได้ H₂S ใช้อะซิเตท เป็นตัวให้อิเล็กตรอน บางชนิดใช้ เอทานอล แลคเตท และก๊าซไฮโดรเจน

- เจริญใน simple media และ defined media ต้องการวิตามิน ในการเจริญ pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.6-7.4 ต้องการอุณหภูมิในการเจริญอยู่ในช่วง 20-33 องศาเซลเซียส ดังตาราง 5

- ตัวอย่างเช่น *Desulfobacter hydrogenophilus*



ภาพประกอบ 4 รูปร่างลักษณะของเซลล์ *Desulfobacter postgatei* Bar, 10 μm

ที่มา : Widdel, F. and Pfennig, N. (1988). "Dissimilatory Sulfate-or Sulfur-Reducing Bacteria," *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

Genus *Desulfosarcina*

- แกรมลบ มีขนาด 1.0-1.5x1.5-2.5 μm รูปร่างแท่ง ทรงกลม และ oval-shaped
- เจริญได้ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน รีดิซัลไฟด์ ซัลไฟด์ และ thiosulfate ได้ H_2S ใช้ฟอร์เมท แลคเตท ฟูมาเรท เบนโซเอท และก๊าซไฮโดรเจน เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่ใช้อะซิเตทได้ไม่ค่อยดี
- เจริญใน simple media และ defined media ต้องการวิตามิน ในการเจริญ pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 7.2-7.6 ต้องการอุณหภูมิในการเจริญประมาณ 33 องศาเซลเซียส ดังตาราง 5
- แหล่งที่พบ ในตะกอนน้ำเค็ม
- ตัวอย่างเช่น *Desulfosarcina variabilis*

ตาราง 5 ความแตกต่างของ sulfate- or sulfur-reducing bacteria ใน subgroup 3

Characteristic	<i>Desulfobacter</i>	<i>Desulfobactrium</i>	<i>Desulfococcus</i>	<i>Desulfomonile</i>	<i>Desulfonema</i>	<i>Desulfosarcina</i>
Desulfoviridin present	-	-	+	+	+or-	-
Cells spiral or vibrioid-shaped	+or-	-	-	-	-	-
Cells ovoid to rod-shaped	+or-	+	-	+	-	-
Cells spherical	-	+or-	+	-	-	+or-
Multicellular filaments						
Motility:						
Flagella	+or-	+or-	-	-	-	+or-
Gliding	-	-	-	-	+	-
Utilized with sulfate:						
Acetate:						
Doubling time						
15-30 h	+	-	-	-	-	-
≥ 35 h	-	+	+	+	+	+
Fatty acids						
(C ₄ -C ₈)	-	+or-	+	-	+	+
Benzoate	-	+or-	+or-	+	+or-	+

ที่มา : Widdel, F. and Pfennig, N. (1988). "Dissimilatory Sulfate-or Sulfur-Reducing Bacteria," *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

Subgroup 4

Genus *Desulfurella*

- แกรมลบ มีขนาด 0.4-0.8x1-4 μm รูปร่างแท่ง และ curved cells
- อยู่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน รีดิซัลเฟอร์ ได้ H_2S ใช้อะซิเตท เป็นตัวให้อิเล็กตรอน
- เจริญใน simple media และ defined media ต้องการ yeast extract ในการเจริญ pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.8-7.0 อุณหภูมิในการเจริญอยู่ในช่วง 52-57 องศาเซลเซียส ดังตาราง 6

- ตัวอย่างเช่น *Desulfurella acetivorans*

Genus *Desulfuromonas*

- แกรมลบ มีขนาด 0.4-0.8x1-4 μm รูปร่างเป็นแท่ง และ curved cells
- อยู่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน รีดิซัลเฟอร์ ได้ H_2S ใช้อะซิเตท โพรพิอเนท เอทานอล เป็นตัวให้อิเล็กตรอน
- เจริญใน simple media และ defined media ต้องการ biotin ในการเจริญ pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.8-7.5 อุณหภูมิในการเจริญประมาณ 30 องศาเซลเซียส ดังตาราง 6
- แหล่งที่พบ ในตะกอนน้ำเค็ม

ตาราง 6 ความแตกต่างของ sulfate- or sulfur-reducing bacteria ใน subgroup 4

Characteristic	<i>Desulfurella</i>	<i>Desulfuromonas</i>
Electron acceptor reduce to sulfide:		
Sulfate	-	-
Sulfur	+	+
Optimum temperature range:		
25-40°C	-	+
50-57°C	+	-
Color of colonies in agar:		
Pink to reddish brown	-	+
Whitish	+	-
Growth in absence of sulfur on fumarate or malate with or without acetate as additional substrate	-	+or-

ที่มา : Widdel, F. and Pfennig, N. (1988). "Dissimilatory Sulfate-or Sulfur-Reducing Bacteria," *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

Methane-producing bacteria

Methane-producing bacteria มีการเจริญเป็นแบบ chemolithotrophically และ organotrophically อาจเป็นพวก mesophilic bacteria หรือ thermophilic bacteria ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ ใน order เดียวกันมีทั้งแกรมบวก และแกรมลบ รูปร่างมีหลายแบบ เช่น spherical loped spiral plate และ rod อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือต่อกันเป็นสายยาวเกาะกลุ่มกัน เส้นผ่าศูนย์กลางมีตั้งแต่ 0.1-1.5 μm ความยาวของสายอาจถึง 200 μm สืบพันธุ์โดยวิธี binary fission budding constiction และ fragmentation

การแบ่ง Methanogenic bacteria สามารถแบ่งโดยใช้หลักดังนี้

1. Phylogenic แบ่ง Methanogen ออกได้เป็น 3 division

- Methanobacterials มีรูปร่างเป็นแท่ง เป็นพวก autotroph ใช้ $\text{H}_2\text{-CO}_2$ หรือ ฟอิร์เมท ผนังเซลล์เป็นแบบ pseudomurein
- Methanococcal มีรูปร่างกลม เป็นพวก autotroph ใช้ $\text{H}_2\text{-CO}_2$ หรือ ฟอิร์เมท ผนังเซลล์เป็นโปรตีน
- Methanomicrobials มีรูปร่างเป็นแท่งและกลม โดยรูปร่างกลมจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆ ละ 8 เซลล์ เป็นพวก heterotroph ใช้ $\text{H}_2\text{-CO}_2$ ฟอิร์เมท เมทานอล อะซิเตท และ methylamine ผนังเซลล์เป็นแบบ heteropolysaccharide โปรตีน และ glycoprotein

2. แบ่งตามรูปร่าง คือ

- Methanobacterium มีรูปร่างเป็นแท่ง
- Methanosarcina มีรูปร่างกลมและอยู่เป็นกลุ่ม โดยอยู่กลุ่มละ 8 เซลล์
- Methanococcus มีรูปร่างกลม

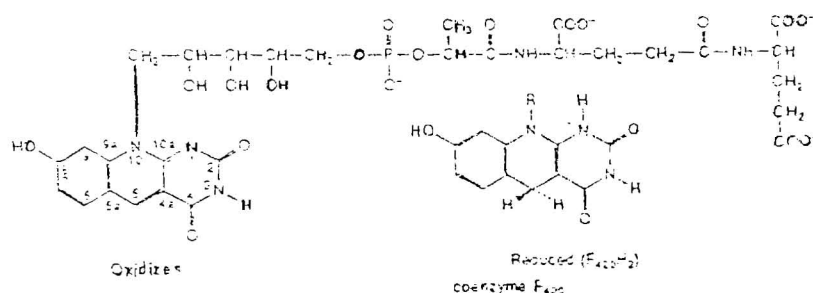
3. แบ่งตามชนิดของสารตั้งต้นที่ใช้ เป็น 2 กลุ่มคือ

- Methylophilic ใช้ อะซิเตท เมทานอล และ methylated amine
- Non-methanogenic bacteria ใช้ $\text{H}_2\text{-CO}_2$ และ ฟอิร์เมท

Cofactor ของ Methanogenic bacteria

Coenzyme F₄₂₀

Coenzyme F₄₂₀ ในสภาพ oxidized ทำให้เซลล์ของ methanogenic bacteria เรืองแสงได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 420 nm เมื่อ F₄₂₀ อยู่ในสภาพรีดิวซ์ ค่า redox potential E₀ ของ F₄₂₀ อยู่ระหว่าง -340 ถึง -350 mV. ดังนั้น Coenzyme F₄₂₀ จึงมีศักยภาพต่ำในการเป็นตัวนำอิเล็กตรอน คล้ายกับ nicotinamide cofactor ใน Methanogenic bacteria F₄₂₀ จะทำหน้าที่แทน ferredoxin ทำให้ไม่มี ferredoxin ใน Methanogenic bacteria ส่วนใหญ่ ยกเว้นใน Methanosarcina ที่ผลิตมีเทนจากอะซิเตทจะมี ferredoxin ทำให้มีปริมาณ F₄₂₀ ต่ำ ลักษณะโครงสร้างดังภาพประกอบ 5



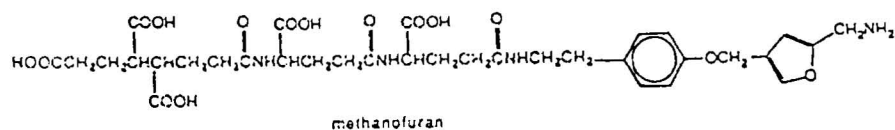
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของ Coenzyme F₄₂₀

ที่มา: Zinder, S.H. (1992). "Methanogenesis and Biochemistry," *Encyclopedia of Microbiology*. New York: John Wiley & Sons.

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา oxidation-reduction ของ F₄₂₀ คือ hydrogenase, formate dehydrogenase, CO dehydrogenase, NADP⁺ reductase, pyruvate synthase และ ketoglutarate synthase Coenzyme F₄₂₀ ที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการ reduction ของคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นมีเทน

2. Methanofuran (MFR)

Methanofuran สกัดจากเซลล์ของ *Methanobacterium thermoautotrophicum* จะพบเฉพาะใน methanogenic bacteria เท่านั้น MFR ทำหน้าที่เป็นตัวนำหมู่ formyl ในกระบวนการเกิดมีเทนและการเกิดกรดอะซิติก ลักษณะโครงสร้างดังภาพประกอบ 6

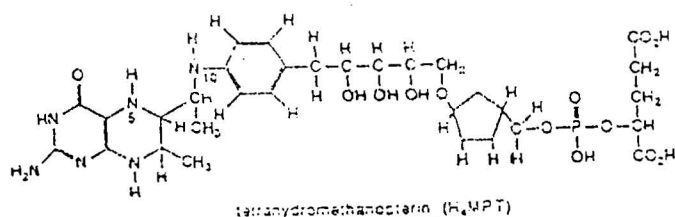


ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของ Methanofuran (MFR)

ที่มา: Zinder, S.H. (1992). "Methanogenesis and Biochemistry," *Encyclopedia of Microbiology*. New York: John Wiley & Sons.

3. Methanopterin

Methanopterin เป็นสารเรืองแสงสีน้ำเงิน เรียกว่า F_{432} สกัดได้จากเซลล์ของ *Methanobacterium thermoautotrophicum* ดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 342 nm เป็นอนุพันธ์ของ 7-methylpterin Methanopterin ในรูป reduced (H_4MPT) มีหน้าที่ในการนำคาร์บอน 1 อะตอม ใช้ในการสร้างมีเทน จาก formyl methyl methylene และ methyl derivative ลักษณะโครงสร้างดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของ tetrahydromethanopterin (H_4MPT)

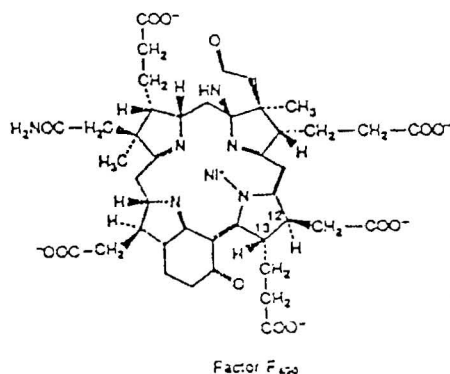
ที่มา: Zinder, S.H. (1992). "Methanogenesis and Biochemistry," *Encyclopedia of Microbiology*. New York: John Wiley & Sons.

4. Coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid)

Coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid) เป็น Coenzyme ที่พบเฉพาะใน methanogenic bacteria มีหน้าที่ในการนำหมู่เมทิลไปใช้ในการสร้างมีเทน อาจพบอยู่ในรูปของ disulfide form หรือรูปผลสมระหว่าง disulfide กับสารที่ยังไม่พบโครงสร้าง โดย methyl Coenzyme M. ($\text{CH}_3\text{-S-CoM}$) และ 2-methylthioethanesulfonic acid ($\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$) จะถูกรีดิวซ์เป็นมีเทน และ HS-CoM ในขั้นตอนสุดท้ายของการเกิดมีเทน นอกจากนี้ Coenzyme M ยังเป็น growth factor ซึ่ง methanogenic bacteria สามารถสังเคราะห์เองได้

5. Factor F_{430}

Factor F_{430} เป็น tetrapyrrole ที่มีนิเกิลเป็นองค์ประกอบ โครงสร้าง F_{430} เป็น uroporphinoid ที่สัมพันธ์กับ porphyrin และ corrin นอกจากนี้ยังพบว่า F_{430} เป็นสารประกอบสีเหลืองของ component C ของ $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ methylreductase system ลักษณะโครงสร้างดัง ภาพประกอบ 8

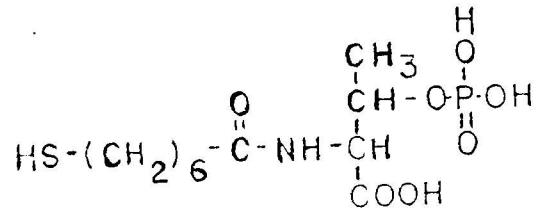


ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของ F_{430}

ที่มา: Zinder, S.H. (1992). "Methanogenesis and Biochemistry," *Encyclopedia of Microbiology*. New York: John Wiley & Sons.

6. Component B

Component B ของ $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ methylreductase system เป็น cofactor ที่ไม่มีสี มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและจำเป็นสำหรับการสร้างมีเทนจาก $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ นอกจากนี้ Component B ยังประกอบด้วย thiol ซึ่งเกี่ยวข้องในปฏิกิริยาการถ่ายทอดเมทิล หรือ อิเล็กตรอนลักษณะ โครงสร้างดังภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของ Component B

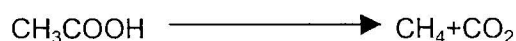
ที่มา: Zinder, S.H. (1992). "Methanogenesis and Biochemistry," *Encyclopedia of Microbiology*. New York: John Wiley & Sons.

Coenzyme อื่นๆ ของ methanogenic bacteria

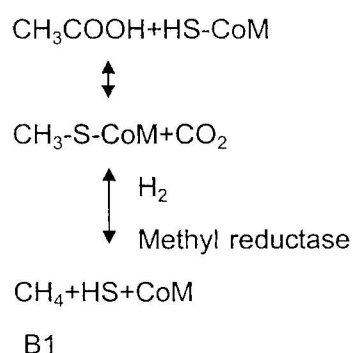
1. Thiamine(vitamin B1)
2. Riboflavin(vitamin B2)
3. Pyridoxin(vitamin B6)
4. Corrin(vitamin B12) พบในปริมาณมาก
5. Panthothenate
6. Folate พบในปริมาณต่ำ
7. Molybdoterin และ Proteinaceous Cofactor

Coenzyme เหล่านี้มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการเมทาบอลิซึมของ จุลินทรีย์ ให้ดำเนินไปได้อย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพ

การย่อยสลายกรดอะซิติกไปเป็นมีเทน

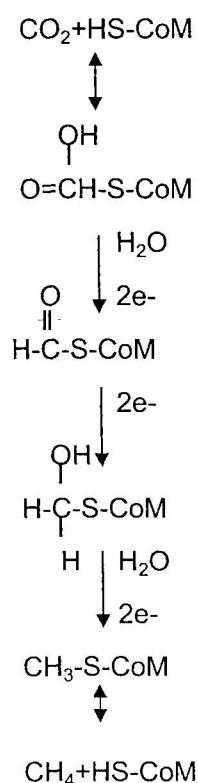


การย่อยสลายกรดอะซิติกไปเป็นมีเทน จุลินทรีย์ที่ใช้กรดอะซิติกได้ขึ้นอยู่กับความสามารถของเซลล์ในการย่อยสลายกรดอะซิติก โดยรีดิวซ์หมู่เมทิลไปเป็นมีเทน และออกซิไดซ์หมู่คาร์บอกซิลไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ในการย่อยสลายนี้ได้พลังงาน 31 kJ/mole CH_4 กลไกการเกิดมีเทนจากกรดอะซิติก Coenzyme M เป็นตัวพาหมู่เมทิลไปเป็นมีเทน และยังมีพบเอนไซม์อีก 3 ชนิดคือ CO dehydrogenase acetate kinase และ phosphate acetyltransferase นอกจากนี้ยังมี Coenzyme ที่สำคัญ 2 ตัวคือ HS-CoM และ $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ ซึ่งพบใน MPB ทุกชนิด และ $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ methylreductase ดังนั้น $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ เป็นสารตั้งต้นของการเกิดก๊าซมีเทน โดยมีขั้นตอนดังภาพประกอบ 10 และ 11



ภาพประกอบ 10 แสดงการเกิดมีเทนจากกรดอะซิติก

ที่มา: Bhada, A., Mukhopadhyay, S.H. and Ghose, T.K. (1984). "A Kinetic Model for Methanogenesis of Acetic Acid in Multireactor System," *Biotechnology and Bioengineering*. 26(1): 257-264.



ภาพประกอบ 11 แสดงการเกิดมีเทนจากคาร์บอนไดออกไซด์

ที่มา: Bhada, A., Mukhopadhyay, S.H. and Ghose, T.K. (1984). "A Kinetic Model for Methanogenesis of Acetic Acid in Multireactor System," *Biotechnology and Bioengineering*. 26(1): 257-264.

รายงานวิจัยเกี่ยวกับความสามารถของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซมีเทนในการใช้กรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ กรดอะซิติก กรดไพรูวอิก และกรดบิวทิริก เป็นสารอาหาร และศึกษาความสามารถในการใช้กรดอินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิดเป็นสารอาหาร พบว่าเมื่อใช้กรดอะซิติกเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ เกิดการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้กรดอะซิติก และกรดอะซิติกความเข้มข้น 3.3 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้กรดไพรูวอิกในการย่อยสลายกรดไพรูวอิกไปเป็นกรดอะซิติก ส่วนกรดบิวทิริกมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ใช้กรดบิวทิริกมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ในกรณีของการใช้กรดอินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิดระหว่างกรดอะซิติกกับกรดบิวทิริก กรดอะซิติกกับกรดไพรูวอิก และกรดบิวทิริกกับกรดไพรูวอิก พบว่าจุลินทรีย์ที่ใช้กรดบิวทิริกทนต่อกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นสูงได้มากกว่าจุลินทรีย์ที่ใช้กรดไพรูวอิก ส่วนกรดอะซิติกสามารถยับยั้งการใช้กรดไพรูวอิกของจุลินทรีย์และส่งผลต่อการใช้กรดบิวทิริก (จงกล พูนทวี. 2537)

การใช้กรดอะซิติกระหว่างจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์ที่ผ่านการ enrichment ด้วย กรดอะซิติกในการผลิตก๊าซชีวภาพ พบว่าในช่วงแรก enriched acetoclastic methanogen สามารถเปลี่ยนกรดอะซิติกไปเป็นก๊าซมีเทนได้เร็วกว่า และได้ผลผลิตของก๊าซมีเทนสูงกว่าเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ผสม แต่การเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าในระบบที่มีจำนวนของจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทนมากขึ้นจะช่วยเร่งการเปลี่ยนกรดอะซิติกเป็น ก๊าซมีเทน เมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 120 มิลลิโมลาร์ ใน enriched culture จึงไม่พบ ผลการยับยั้งในขณะที่ยุติการเจริญของจุลินทรีย์ผสมที่ยังอยู่เมื่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงกว่า 70 มิลลิโมลาร์ (พวงทอง เม้งเกร็ด. 2541)

การใช้สารอาหารในตะกอนน้ำกร่อยในการสร้างก๊าซมีเทน พบว่า SRB สามารถใช้ ไฮโดรเจน และอะซิเตท หรือ ทั้งไฮโดรเจนและอะซิเตทได้ดี จึงไม่แข่งขันกับ MPB ในการใช้สาร ประกอบพวกเมทานอล trimethylamine หรือ methionine เพื่อผลิตก๊าซมีเทน แต่การใช้ อะซิเตทของ SRB มีผลทำให้การเกิดก๊าซมีเทนของระบบลดลง (Oremland & Polcin. 1982)

การศึกษาผลของซัลไฟด์ที่มีต่อการเปลี่ยนอะซิเตทไปเป็นก๊าซมีเทน นำ granular sludge จากถังปฏิกรณ์ชนิด UASB(Upflow Anaerobic Sludge Blanket) มาใช้ศึกษาในถัง ปฏิกรณ์แบบ batch เมื่อวิเคราะห์ความเป็นพิษของซัลไฟด์ที่อยู่ในรูปของ H_2S อิสระ พบว่าใน ช่วง pH 6.4-7.2 ความเป็นพิษของซัลไฟด์จะมีผลยับยั้ง granular sludge (Koster & Rinzema. 1986)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในกลุ่ม SRB และ MPB

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในกลุ่ม SRB และ MPB ในระบบ บำบัดแบบไร้ออกซิเจนได้แก่ ความเข้มข้นของกรดอะซิติก อัตราส่วนของกรดอะซิติกต่อ ซัล เฟตหรือปริมาณซัลเฟต อัตราส่วนของแบคทีเรียในกลุ่ม SRB และ MPB pH อุณหภูมิ ค่า K_m μ_{max} และ ΔG^0 ดังผลการศึกษาดังต่อไปนี้

ความเข้มข้นของกรดอะซิติก

SRB มีค่า K_m เป็น 0.2 ส่วน MPB มีค่า K_m เป็น 3.0 ทำให้พบว่าที่ความเข้มข้น ของอะซิเตทต่ำๆ SRB สามารถใช้อะซิเตทได้ดีกว่า MPB และเป็น predominant เมื่อมีความ เข้มข้นของอะซิเตทสูงๆ MPB สามารถที่จะใช้อะซิเตทได้ดีกว่า SRB ทำให้ MPB เป็น predominant (Shonheit, Kristjansson & Thauer. 1982) แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีความเข้มข้นของ กรดอะซิติกสูงๆ จะมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ผสมซึ่งมีจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB มากกว่าจุลินทรีย์

ในกลุ่ม MPB ส่วนใน enriched culture ซึ่งมี MPB อยู่ร้อยละ 90 สามารถที่จะใช้ กรดอะซิติก เมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกมากกว่า 120 มิลลิโมลาร์ และไม่เห็นผลยับยั้ง (พวงทอง เม่งเกร็ด. 2541)

อัตราส่วนของกรดอะซิติกต่อซัลเฟต หรือปริมาณซัลเฟต

ในการย่อยสลายกรดอะซิติกในสภาวะที่มีอัตราส่วนของอะซิเตตต่อซัลเฟตน้อยกว่า 1.7 จุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB สามารถใช้อะซิเตตได้ดีกว่า MPB และเมื่อมีอัตราส่วนของอะซิเตตต่อซัลเฟตมากกว่า 2.7 อัตราการย่อยสลายอะซิเตตโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB ลดลง และพบว่า จุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB สามารถที่จะใช้อะซิเตตได้ดีกว่าและเป็น predominant (Choi, et al. 1990)

การศึกษาการแข่งขันระหว่าง SRB และ MPB ในการใช้อะซิเตต โดยใช้วิธี fluidized-bed ใช้ น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของอะซิเตต และซัลเฟตเมื่อใช้อัตราส่วนของอะซิเตตต่อซัลเฟตต่ำ โดยใช้อะซิเตตความเข้มข้น 1.7 mgC/l และซัลเฟตเข้มข้น 78.5 mg/l พบว่ามีการย่อยสลายอะซิเตตไปเป็นก๊าซมีเทน โดยมวลเซลล์ของ MPB มีแนวโน้มลดลง ปริมาณของซัลเฟตที่ถูกรีดิวซ์เพิ่มขึ้น สัมพันธ์กับมวลเซลล์ของ SRB ที่เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่า SRB สามารถใช้อะซิเตตได้ดีกว่า MPB ในสภาวะที่อะซิเตตมีความเข้มข้นต่ำ และในสภาวะที่มีความเข้มข้นของอะซิเตตสูงๆ พบว่า MPB มีความสามารถในการเกาะกับ biofilm ได้เร็วกว่า SRB ทำให้ MPB สามารถใช้อะซิเตตได้ดีกว่า SRB (Yoda & Kitagawa. 1987)

การแข่งขันการใช้สารอาหารระหว่าง SRB และ MPB และการศึกษาผลของซัลไฟด์ที่เกิดจากการใช้ซัลเฟตรับอิเล็กตรอนในระบบบำบัดแบบไร้ออกซิเจนทำการทดลองเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ $COD:SO_4^{2-}$ สารอาหารที่ใช้มีทั้งสารอาหารที่สังเคราะห์ขึ้น และของเสียจากอุตสาหกรรม จุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB และ MPB มีการแข่งขันกันมากเมื่อมีอัตราส่วนของ $COD:SO_4^{2-}$ ในช่วง 1.7-2.7 เมื่ออัตราส่วนมากขึ้นพบว่า MPB เป็น predominant และในทางตรงข้ามเมื่ออัตราส่วนน้อยลง SRB เป็น predominant โดยมีซัลไฟด์อยู่ในช่วง 160-200 มิลลิกรัมต่อลิตร (3,000 มิลลิกรัมซัลเฟตต่อลิตร) และ เมื่อมีซัลไฟด์ในช่วง 120-140 มิลลิกรัมต่อลิตร (1,200 มิลลิกรัมซัลเฟตต่อลิตร) สามารถยับยั้ง MPB ในสารอาหารที่สังเคราะห์ขึ้น (Choi & Rim. 1991)

กิจกรรมของ MPB และ SRB ในถังปฏิกรณ์ชนิด aerobic biofilm และชนิด activated sludge พบว่า SRB ใช้แลคเตท และโพรพิอเนท ไดไฮโดรเจน และอะซิเตต ซึ่ง acetotrophic และ hydrogenotrophic MPB นำไปใช้สร้างก๊าซมีเทน เมื่อเปรียบเทียบการเกิดก๊าซมีเทนในถังปฏิกรณ์ชนิด aerobic biofilm น้อยกว่าในถังปฏิกรณ์ชนิด anaerobic UASB sludge อยู่ร้อยละ 1 และ SRB ที่ออกซิไดซ์แลคเตทในถังปฏิกรณ์ชนิด aerobic biofilm มีจำนวน $5.7 \times 10^7 - 1.1 \times 10^8$ CFU/gVSh ซึ่งสูงกว่าในถังปฏิกรณ์ชนิด activated sludge 10^3 เท่า

นอกจากนี้ SRB ยังสามารถใช้ซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากแลคเตทได้ $10 \text{ mgSO}_4^{2-}/\text{gVSh}$ แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของ SRB ขึ้นกับรูปแบบของถังปฏิกรณ์ ภาระการรับสารอินทรีย์ และความเข้มข้นของซัลเฟตในน้ำเสียที่นำมาบำบัด (Lens, et al. 1995)

การแข่งขันระหว่าง SRB และ MPB ในการศึกษาใช้ถังปฏิกรณ์แบบ batch และ chemostats บำบัดน้ำเสียที่มีซัลเฟตและกรดอะซิติก พบว่า ค่าคงที่ของการย่อยสลายกรดอะซิติกของ SRB เป็น 2.4 ต่อวัน และของ MPB เป็น 3.2 ต่อวัน และ ค่า Ks ของ SRB เป็น 102 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน MPB มีค่า Ks เป็น 116 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราส่วนของอะซิเตทต่อซัลเฟตที่ให้อยู่ในช่วง 0.66 ถึง 3.33 พบว่า SRB ที่ศึกษาใน batch ใช้กรดอะซิติกน้อยกว่าการศึกษาใน chemostats แต่การใช้อะซิเตทของ SRB เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 35 เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่า redox potential จาก -175 ถึง -70 มิลลิโวลต์ (Bhattacharya & Uberoi. 1996)

ผลของซัลเฟอร์ในการย่อยสลายเบนโซเอท ในถังปฏิกรณ์แบบ chemostat ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเบนโซเอท 1,250-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในรูปของ COD และความเข้มข้นของซัลเฟตเป็น 167-1,670 มิลลิกรัมต่อลิตรในรูปซัลเฟต (S) ปฏิกริยาระหว่าง MPB และ SRB ขึ้นกับความเข้มข้นของ COD:S ในน้ำเสีย ที่อัตราส่วนของ COD:S มากกว่า 3.0 มีการย่อยสลายเบนโซเอทได้ อะซิเตท ไฮโดรเจน และฟอร์เมท MPB จะนำไปใช้สร้างก๊าซมีเทน และที่อัตราส่วนของ COD:S 1.5 หรือ ต่ำกว่า SRB เท่านั้นที่สามารถใช้เบนโซเอท มีซัลไฟด์เกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์และไปมีผลยับยั้งการผลิตก๊าซมีเทนของ MPB (Li & Lam. 1996)

ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้อะซิเตทของ SRB และ MPB คือ อัตราส่วน $\text{COD}:\text{SO}_4^{2-}$ พบว่าที่อัตราส่วนเป็น 1:1.5 SRB ใช้อะซิเตทได้เร็วและมีการเจริญของ acetotrophic และ hydrogenotrophic SRB แต่ในสภาวะที่มีซัลเฟตน้อยพบว่า MPB จะใช้อะซิเตทได้มากกว่า โดยสัดส่วนของจำนวนเชื้อ SRB ต่อ MPB ใน seed sludge มีผลต่อการใช้อะซิเตท (Kalyuzhni & Fedorovich. 1997)

การศึกษาผลของการใช้ซัลเฟตรับอิเล็กตรอนในระยะที่จุลินทรีย์ย่อยสลายกรดโดยทำการศึกษาในระบบ chemostat ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้ซูโครสเป็นแหล่งของอาหาร เวลาที่ใช้ในการเก็บกักของเหลวในระบบ chemostat เป็น 2 4 6 8 และ 10 ชั่วโมง และใช้ซัลเฟตความเข้มข้น 600 1,200 และ 2,400 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดควบคุมไม่มีซัลเฟตในระบบเวลาในการเก็บกักที่ 2 ชั่วโมง ทุกชุดการทดลอง SRB ใช้ซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนสัมพันธ์กับปริมาณซัลไฟด์ที่เพิ่มขึ้น และพบว่าที่ระยะเวลาเก็บกัก 4 ชั่วโมง SRB ใช้ซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อมีความเข้มข้นของซัลเฟตเป็น 600 และ 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับที่ระยะเวลาเก็บกัก 2 ชั่วโมง และระยะเวลาเก็บกักมากกว่า

8 ชั่วโมง มีไฮโดรเจนซัลไฟด์อิสระเกิดขึ้นสูงถึงร้อยละ 99 แต่พบว่าไม่มีผลยับยั้งการย่อยสลายซูโครส ที่ความเข้มข้นของซัลเฟต 2,400 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาเก็บกัก 2 ชั่วโมง พบว่าจำนวนของ SRB ที่ย่อยสลายไฮโดรเจน และแลคเตท มีจำนวนเพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 10^8 และ 10^9 MPN/ml เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีซัลเฟตมี SRB อยู่ 10^5 - 10^7 MPN/ml ซึ่งแสดงให้เห็นว่า SRB สามารถเจริญได้ในที่มีการสร้างกรด (Mizuno & Li. 1998)

อัตราส่วนของแบคทีเรียในกลุ่ม SRB และ MPB

การใช้กรดอะซิติกระหว่างจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์ที่ผ่านการ enrichment ด้วยกรดอะซิติกในการผลิตก๊าซชีวภาพ พบว่าในช่วงแรก enriched acetoclastic methanogen สามารถเปลี่ยนกรดอะซิติกไปเป็นก๊าซมีเทนได้เร็ว และได้ผลผลิตของก๊าซมีเทนสูงกว่าเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ผสมซึ่งมี MPB อยู่เพียง 10^4 MPN/ml และมี SRB อยู่ประมาณ 10^7 MPN/ml แต่ใน enriched culture มี MPB อยู่ถึงร้อยละ 90 หรือประมาณ 10^8 MPN/ml แสดงให้เห็นว่าในระบบที่มีจำนวนของ MPB มากขึ้นจะช่วยเร่งการเปลี่ยนกรดอะซิติกเป็นมีเทนและเป็น predominant (พวงทอง เม้งเกร็ด. 2541)

pH และอุณหภูมิ

ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจนที่มีสภาวะของ pH ต่ำๆ จะพบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB เป็น predominant เนื่องจากที่ pH ประมาณ 6.9 จุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB สามารถที่จะย่อยสลายกรดอะซิติกได้ดีกว่า SRB ในทางตรงกันข้ามเมื่อ pH สูงกว่า 7.7 จุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB สามารถใช้กรดอะซิติกได้ดีกว่า MPB ทำให้ SRB เป็น predominant เมื่อมี pH สูงขึ้น (Visser, Pol & Lettinga. 1996) ส่วนผลของอุณหภูมิ ในถังปฏิกรณ์ที่มีความเข้มข้นของซัลเฟตสูง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่ามีการย่อยสลายอะซิเตทไปเป็นก๊าซมีเทนโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB เมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็น 55 องศาเซลเซียสพบว่าการย่อยสลายอะซิเตทส่วนใหญ่เกิดจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB แต่จำนวนของจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มไม่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นไปจากเดิม (Rintala & Lettinga. 1992) และเมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจากการนำเชื้อเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมาศึกษาการย่อยสลายอะซิเตทที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พบว่ามีการย่อยสลายอะซิเตทโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB เพียงกลุ่มเดียว (Visser, Gao & Lettinga. 1993) แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมิผลต่อจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB มากกว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB (Elferink, Oude & Visser. 1994)

การศึกษาการแข่งขันระหว่าง acetotrophic methanogenic bacteria (AMB) กับ acetotrophic sulfate reducing bacteria (ASRB) ในถังปฏิกรณ์แบบ batch โดยศึกษาอัตราการเจริญ กิจกรรม การใช้อะซิเตท และซัลเฟตเมื่อมีความแตกต่างของ pH และความเข้มข้นของซัลไฟด์ ทั้งใน anaerobic granular sludge และ suspended anaerobic sludge พบว่าที่ pH ต่ำกว่า 6.9 AMB จะใช้ อะซิเตทได้ดีกว่า ASRB ในทางตรงกันข้ามเมื่อ pH สูงกว่า 7.7 ASRB จะสามารถใช้อะซิเตทได้ดีกว่า AMB ซึ่ง ASRB และ AMB ใน granular sludge สามารถเจริญได้

ในช่วง pH ที่กว้างกว่าใน suspended sludge ดังนั้น การใช้อะซิเตท และความเป็นพิษของ ซัลไฟด์จึงขึ้นอยู่กับรูปแบบลักษณะของ sludge ใน granular sludge พบว่าทั้ง ASRB และ AMB ใช้อะซิเตทได้ใกล้เคียงกัน ส่วนใน suspended sludge พบว่า ASRB ใช้อะซิเตทได้ไม่ดี เท่ากับ AMB ผลการทดลองได้ชี้ให้เห็นว่าที่ pH สูงกว่า 7 ซัลไฟด์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดไปมีผลยับยั้ง ต่อ granular sludge ซึ่งแตกต่างจาก suspended sludge ที่การยับยั้งเกิดจากไฮโดรเจนซัลไฟด์ อิสระเท่านั้น (Visser, Pol & Lettinga. 1996)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

แหล่งของจุลินทรีย์และถึงปฏิกรณ์

เชื้อเริ่มต้นเป็นจุลินทรีย์ผสมที่นำมาจากถังหมักเปลือกสับประดแบบไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ได้ทำการศึกษา มาตั้งแต่ พ.ศ. 2521 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อบำบัดของเสียและผลิตพลังงาน ถึงปฏิกรณ์ที่ใช้ในการผลิตก๊าซชีวภาพเป็นขวดแก้วสีชาขนาด 1 แกลลอน มีความจุประมาณ 5 ลิตร ปริมาตรของเหลวที่ใช้ในการหมักเท่ากับ 4 ลิตร การผลิตก๊าซชีวภาพทำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การควบคุมอุณหภูมิของถึงปฏิกรณ์ทำได้โดยการแช่ถึงปฏิกรณ์ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เก็บก๊าซที่เกิดขึ้นและวัดปริมาตรโดยการแทนที่น้ำ ในการหมักต้องรักษาระบบให้คงที่ตลอดการทดลองจึงต้องมีการควบคุมปัจจัยต่างๆ โดยมีการเติมเปลือกสับประดลงในถึงปฏิกรณ์ 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 267 มิลลิลิตร โดยป้อนสารอาหารทุกๆ 3 วัน (นพพร เจตนชัย.2529)

การนับจำนวนจุลินทรีย์

ก. การนับจำนวน MPB

การนับจำนวน MPB ใช้วิธี Most Probable Number (MPN) ทำในขวดซีรัมขนาด 10 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 ขวด โดยการเจือจางแบบ 10 เท่า(10-fold Serial Dilution Method) และนำเชื้อที่เจือจางในช่วง 10^{-4} - 10^{-9} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดซีรัมที่มีอาหารเหลว(สูตรอาหารตามภาคผนวก ก.1) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง ครบทั้งจุกยางด้วยฝาลูมิเนียมแล้วบีบให้แน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ในแต่ละความเจือจาง ถ้ามีก๊าซมีเทนเกิดขึ้นให้เป็นบวก ถ้าไม่มีก๊าซมีเทนเกิดขึ้นให้ผลเป็นลบ (Zhang & Noike. 1991) นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับตาราง MPN (ภาคผนวก ก.5) คำนวณจำนวน MPB ต่อความเจือจางเป็น MPN ต่อ มิลลิลิตร

ข. การนับจำนวน SRB

การนับจำนวน SRB ใช้วิธี Most Probable Number (MPN) ทำในขวดซีรัมขนาด 10 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 ขวด โดยการเจือจางแบบ 10 เท่า(10-fold Serial Dilution Method) และนำเชื้อที่เจือจางในช่วง 10^{-4} - 10^{-9} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดซีรัมที่มีอาหาร

เหลว (สูตรอาหารตามภาคผนวก ก.2) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง กรอบทับจุกยางด้วย ฝาลูมิเนียมแล้วบีบให้แน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ในแต่ละ ความเจือจาง ถ้ามีตะกอนสีดำของ FeS เกิดขึ้นให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่มีตะกอนสีดำของ FeS เกิด ขึ้นให้ผลเป็นลบ (Mizuno, Li & Noike. 1994) ; (Li & Lam. 1996)) นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับ ตาราง MPN (ภาคผนวก ก. 5) คำนวณจำนวน SRB ต่อความเจือจางเป็น MPN ต่อ มิลลิลิตร

การศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ผสมในการใช้กรดอะซิติกเปรียบเทียบกับเมื่อ เดิมสารยับยั้ง

ศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ผสมที่นำมาจากถังหมักเปลือกสับปะรดแบบไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับเมื่อเติม 2-bromoethane sulfonic acid (2-BESA) ซึ่งเป็นสารยับยั้งที่มีผลต่อการดึงหมู่เมทิลไปใช้ในการ สร้างก๊าซมีเทนของจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB ให้มีความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ serum vial technique เลี้ยงเชื้อในขวดซีรัมขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใช้ digestion fluid ร้อยละ 50 (ปริมาตร ต่อปริมาตร) เป็น basal media และเติม yeast extract ร้อยละ 0.02 (ปริมาตรต่อปริมาตร) pH 7.0~7.2 (ภาคผนวก ก. 3) เชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษาใช้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และแหล่ง คาร์บอนที่ใช้ คือ กรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 10 30 50 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์ บ่ม เชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และติดตามผลของอัตราการใช้กรดอะซิติก การเพิ่มจำนวน ของ MPB และ SRB การผลิตก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ขั้นตอนการทำ enrichment ของจุลินทรีย์กลุ่ม SRB ด้วยกรดอะซิติกร้อยละ

0.1 ร่วมกับซัลเฟต

ใช้วิธีทำให้เจือจาง (dilution technique) ร่วมกับ enriched culture technique โดยการนำจุลินทรีย์ผสมจากถังหมักเปลือกสับปะรดมาเจือจางและเลี้ยงในขวดซีรัมที่มีอาหารเหลว ตามสูตร Postgate's medium B pH 7.0~7.2 ที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 0.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ก.2) ในสภาวะไร้ออกซิเจน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตว่ามีตะกอน ดำของ FeS แสดงว่ามี SRB เจริญในขวดนั้น นำ SRB ที่เจริญในความเจือจางสูงสุดมาเลี้ยงใน อาหารสูตรเดิม pH 7.0~7.2 ที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 0.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่ง คาร์บอน ในการทำ enrichment นั้นจะทำการถ่ายเชื้อโดยการทำให้เจือจางและเลี้ยงในสูตร อาหารข้างต้น ถ่ายเชื้อด้วยวิธีนี้หลายๆ ครั้งจนได้ enriched culture ดังขั้นตอนต่อไปนี้

จุลินทรีย์ 5 มิลลิลิตร + สารอาหารที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 0.1 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (1:10)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 วัน

↓
ถ่ายเชื้อครั้งที่ 1

จุลินทรีย์ 5 มิลลิลิตร + สารอาหารที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 0.1 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (1:10)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 วัน

↓
ถ่ายเชื้อครั้งที่ 2

จุลินทรีย์ 5 มิลลิลิตร + สารอาหารที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 0.1 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (1:10)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 วัน

↓
ถ่ายเชื้อครั้งที่ 3

จุลินทรีย์ 25 มิลลิลิตร + สารอาหารที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 0.1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (1:1)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน

↓
ถ่ายเชื้อครั้งที่ 4

จุลินทรีย์ 25 มิลลิลิตร + สารอาหารที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 0.1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (1:1)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน

↓
ถ่ายเชื้อครั้งที่ 5

จุลินทรีย์ 25 มิลลิลิตร + สารอาหารที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 0.1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (1:1)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน

↓
ถ่ายเชื้อครั้งที่ 6

Enriched SRB

ถ่ายเชื้อครั้งที่ 7-10 เจือจาง 1:1

ขั้นตอนการทำ enrichment ของจุลินทรีย์กลุ่ม SRB ด้วยกรดแลคติกร้อยละ

0.1 ร่วมกับซัลเฟต

นำ enriched culture SRB ที่เลี้ยงด้วยกรดอะซิติกร้อยละ 0.1(ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในขวดซีรัมที่มีอาหารเหลวตามสูตร Postgate's medium B pH 7.0~7.2 ที่มีกรดแลคติกร้อยละ 0.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ก.2) ในสภาวะไร้ออกซิเจน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตว่ามีตะกอนดำของ FeS แสดงว่ามี SRB เจริญ นำมาถ่ายเชื้อและเลี้ยงในสูตรอาหารข้างต้นด้วยวิธีนี้หลายๆ ครั้งจนได้ enriched culture SRB ด้วยกรดแลคติกถึงขั้นตอนต่อไปนี้

จุลินทรีย์ 5 มิลลิลิตร + สารอาหารที่มีกรดแลคติกร้อยละ 0.1 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (1ต่อ10)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 วัน

ถ่ายเชื้อครั้งที่ 1

จุลินทรีย์ 5 มิลลิลิตร + สารอาหารที่มีกรดแลคติกร้อยละ 0.1 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (1ต่อ10)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 วัน

ถ่ายเชื้อครั้งที่ 2

จุลินทรีย์ 5 มิลลิลิตร + สารอาหารที่มีกรดแลคติกร้อยละ 0.1 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (1ต่อ10)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 วัน

ถ่ายเชื้อครั้งที่ 3

Enriched SRB

ถ่ายเชื้อครั้งที่ 4-8 เจือจาง 1:1

การตรวจสอบว่าเป็น enriched SRB

ก. นับจำนวนเชื้อในการถ่ายเชื้อแต่ละครั้งถ้าจำนวนเชื้อที่ได้มีค่าคงที่แสดงว่า จุลินทรีย์นั้นเป็น enriched culture แล้ว

ข. การศึกษาสัณฐานวิทยาโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเปรียบเทียบกับ จุลินทรีย์ผสม ถ้าจุลินทรีย์ที่มีรูปร่างคล้ายกันหรือเหมือนกันเกือบทั้งหมดและมีลักษณะที่คล้าย กับ SRB ใน Bergey's manual แสดงว่าจุลินทรีย์นั้น enriched แล้ว

การศึกษากิจกรรมการใช้กรดอะซิดิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ enriched SRB

ศึกษาการใช้กรดอะซิดิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้ จุลินทรีย์ที่ผ่านการ enriched ด้วยกรดอะซิดิกร้อยละ 0.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) การศึกษาในที่นี้ จะใช้ serum vial technique ทำการเลี้ยงเชื้อในขวดซีรัมขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใช้ digestion fluid ร้อยละ 50 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็น basal media และเติม yeast extract ร้อยละ 0.02 (ปริมาตรต่อปริมาตร) pH 7.0~7.2 (ภาคผนวก ก. 3) เชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษาใช้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ กรดอะซิดิกที่มีความเข้มข้น 10 30 50 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และติดตามผลของอัตราการใช้ กรดอะซิดิกการเพิ่มจำนวนของ SRB การผลิตก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพ

Shimadzu Gas Chromatography Model GC-9A

- Thermal Conductivity Detector (TCD)
- 80/100 mesh porapak N. column
- อุณหภูมิคอลัมน์ 70 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิของ injector port 100 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิของ detector 120 องศาเซลเซียส

วิธีวิเคราะห์

ใช้ syringe แบบ gas type ขนาด 250 ไมโครลิตร ดูดก๊าซจากช่องว่างเหนือของเหลวในขวดซีรัมมา 50 ไมโครลิตร ฉีด เข้าไปยัง injector port ก๊าซตัวอย่างจะถูกส่งผ่านเข้าไปในคอลัมน์ ซึ่งสามารถแยกก๊าซออกจากกันโดยมี ก๊าซฮีเลียม เป็น carrier gas และก๊าซที่แยกได้จะเลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ผ่านเข้าไปใน detector และส่งสัญญาณไปยัง recorder บันทึกเป็น peak ของโครมาโตแกรมและบอกค่าก๊าซที่แยกได้เป็นร้อยละของก๊าซทั้งหมดก๊าซที่วิเคราะห์ได้มีก๊าซไนโตรเจน มีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ ตามลำดับ

การวิเคราะห์หากรดอะซิติก

การเตรียมตัวอย่าง : ตีตัวอย่างจากขวดซีรัม 0.5 มิลลิลิตร โดยใช้ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ทำสารละลายให้เป็นกรด โดยเติมกรดออกซาลิก 0.2 N ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5,000 g ประมาณ 5 นาที เพื่อแยกเซลล์และตะกอนของแข็งต่างๆ ออกจากสารละลาย ดูดเอาเฉพาะส่วนใสมาวิเคราะห์โดยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

อุปกรณ์ : เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ Shimadzu model GC 14A

- คอลัมน์ Cabo-pak B-DA/4% cabovax 20 โมลาร์
- เครื่องตรวจวัดแบบ Flame Ionization Detector (FID)
- อุณหภูมิคอลัมน์ 170 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิช่องฉีดตัวอย่าง 230 องศาเซลเซียส
- carrier gas คือ ไนโตรเจนที่อัตราไหล 60 มิลลิลิตรต่อนาที

วิธีวิเคราะห์

ดูดของเหลวใส 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟพี คำนวณหาความเข้มข้นของกรดอะซิติกในสารตัวอย่างโดยเทียบกับ peak area ของกรดอะซิติกมาตรฐานที่ฉีดเข้าไป ซึ่งคำนวณจาก integrator ของ Shimadzu model C-R3A

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกเป็นการศึกษาจำนวนของ SRB และ MPB ในถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประดแบบไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 2 เป็นการทำ enrichment ของจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB และศึกษาสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ผสมในถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประดแบบไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ scanning electron microscope และส่วนสุดท้ายเป็นการศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ผสม SRB และ MPB ในการใช้กรดอะซิติก

การศึกษาจำนวน SRB และ MPB ในถังหมักก๊าซชีวภาพ จากเปลือกสับประดแบบไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ในการศึกษาการผลิตก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประดพบว่าการย่อยสลายเปลือกสับประดได้เป็นกรดอินทรีย์ ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่จะถูกย่อยสลายต่อจนได้ก๊าซมีเทน ในการย่อยสลายกรดอินทรีย์หรือสารตัวกลางไปเป็นก๊าซมีเทนนี้มีกรดอะซิติกเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการเปลี่ยนไปเป็นก๊าซมีเทนโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB เมื่อนำจุลินทรีย์ผสมจากถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มาศึกษาการใช้กรดอะซิติกพบว่าในช่วงแรกมีการใช้กรดอะซิติกแต่ไม่มีก๊าซมีเทนเกิดขึ้น เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้นพบว่าการผลิตก๊าซมีเทน(จงกล พูนทวี. 2537)ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการใช้กรดอะซิติกระหว่างจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์ที่ผ่านการ enrichment ด้วยกรดอะซิติกในการผลิตก๊าซชีวภาพที่พบว่าในช่วงแรก enriched acetoclastic methanogens สามารถใช้กรดอะซิติกได้เร็วกว่าและได้ผลผลิตของก๊าซมีเทนสูงกว่าเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ผสมในขณะที่ใช้กรดอะซิติกในจุลินทรีย์ผสมในช่วงแรกพบว่า มีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่าก๊าซมีเทน ซึ่งแสดงว่าในจุลินทรีย์ผสมนอกจาก acetoclastic methanogens แล้วยังมีจุลินทรีย์ในกลุ่ม sulfate-reducing bacteria(พวงทอง เม้งเกร็ด. 2541) ทำให้เข้าใจว่าในระบบการย่อยสลายเปลือกสับประดไปเป็นก๊าซชีวภาพนั้นมีจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งนอกเหนือจาก MPB ซึ่งสามารถใช้กรดอะซิติกได้แต่เชื้อกลุ่มนี้ไม่ได้ใช้กรดอะซิติกในการผลิตก๊าซมีเทนเหมือนกับ MPB จากรายงานวิจัยต่างๆ พบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถใช้กรดอะซิติกได้แต่ไม่ผลิตก๊าซมีเทนนี้สามารถใช้เซลล์เฟดในการรับอิเล็กตรอนได้ด้วยเรียกจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ว่า SRB ทำให้ทราบว่าขั้นตอนการย่อยสลายกรดอะซิติกไปเป็นก๊าซชีวภาพมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 กลุ่ม คือ MPB และ SRB

ในการหาจำนวนแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีของ Zhang และ Noike (Zhang & Noike. 1991) ในการศึกษา MPB ใช้กรดอะซิติกเป็นสารอาหารตั้งต้น (ภาคผนวก ก.1) และวิเคราะห์ก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้น การคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียใช้เทียบกับตาราง MPN(ภาคผนวก ก.5)ดังรายละเอียดในวิธีดำเนินการ ส่วนการศึกษาจำนวนของ SRB ใช้สูตรอาหารตาม Postgate's medium B (Macfarlane & Gibson. 1991) (ภาคผนวก ก.2) มีกรดอะซิติกเป็นสารอาหารตั้งต้นทำการวิเคราะห์ตะกอนดำของ FeS (Li & Lam. 1996)คำนวณหาจำนวนโดยเทียบกับตาราง MPN (ภาคผนวก ก.5) ดังรายละเอียดในวิธีดำเนินการผลการทดลองพบว่า มี MPB และ SRB ในถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดแบบไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังตาราง 9

ตาราง 9 จำนวนของ MPB และ SRB ที่พบในจุลินทรีย์ผสม ในถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดแบบไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ครั้งที่นับ	Mixed Culture	
	MPB	SRB
	(MPN/ml)	(MPN/ml)
1	2.3×10^7	Nd
2	9.3×10^5	Nd
3	Nd	2.3×10^6
4	2.1×10^5	2.3×10^7
5	2.3×10^7	Nd
6	2.3×10^5	4.3×10^5
7	2.3×10^6	4.0×10^6
8	8.3×10^6	7.0×10^6
9	8.3×10^6	7.4×10^6
10	9.3×10^7	9.3×10^7
เฉลี่ย	1.77×10^7	1.96×10^7

Nd =Not determine

ในระบบบำบัดแบบไร้ออกซิเจนอาศัยการทำงานที่สัมพันธ์กันของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ได้แก่ non-methanogenic bacteria และ methanogenic bacteria ในจุลินทรีย์ผสมจากถังหมักเปลือกสับปะรด พบว่าขั้นตอนการย่อยสลายกรดอะซิติกไปเป็นก๊าซชีวภาพมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 กลุ่มคือ จุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB และ SRB ซึ่งจากการนับจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มในถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดมีระยะเวลาในการนับแต่ละครั้งห่างกันประมาณ 30 วัน โดยใช้เทคนิค MPN มีจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB และ SRB ใกล้เคียงกัน คือมีกลุ่ม MPB อยู่ประมาณ 1.77×10^7 MPN/ml ส่วนจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB มีอยู่ประมาณ 1.96×10^7 MPN/ml แสดงว่าในจุลินทรีย์ผสมมีจำนวนของ MPB และ SRB ที่ใช้กรดอะซิติกค่อนข้างเท่ากันที่ 10^7 MPN/ml

การทำ enrichment ของจุลินทรีย์กลุ่ม MPB SRB และ ศึกษาสัณฐานวิทยา

การทำ enrichment ของจุลินทรีย์กลุ่ม MPB และ SRB

เมื่อนำจุลินทรีย์ผสมจากถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงในสารอาหารที่จำเพาะต่อจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB โดยใช้สูตรอาหารดังใน ภาคผนวก ก.3 ซึ่งมีกรดอะซิติกร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งคาร์บอน และถ่ายเชื้อในอาหารสูตรเดิม (พวงทอง เม่งเกร็ด, 2541) พร้อมทั้งนับจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB และ SRB จำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB มีจำนวนที่เพิ่มขึ้นเป็น 9.3×10^7 MPN/ml ส่วนจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB มีแนวโน้มลดลงและค่อนข้างคงที่ที่ 10^5 MPN/ml (ดังตาราง 10) แสดงว่าเมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ผสมในอาหารที่จำเพาะต่อจุลินทรีย์กลุ่ม MPB ก็จะทำให้จุลินทรีย์ MPB เจริญได้ดีขึ้นและเป็น predominant ในขณะที่จุลินทรีย์กลุ่ม SRB จะมีปริมาณคงที่เนื่องจากปริมาณซัลเฟตในสารอาหารที่จำกัดยังไรก็ตามแสดงว่าใน enriched MPB แม้จะมี MPB เป็น predominant ก็ยังพบ SRB ด้วย

ในการทำ enrichment ของ SRB จากจุลินทรีย์ผสม เนื่องจากในจุลินทรีย์ผสมมีทั้ง non-methanogens และ methanogens ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้มีปริมาณของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ จึงใช้สูตรอาหารที่จำเพาะกับ SRB โดยการนำจุลินทรีย์ที่เจือจางแบบ 10 เท่า ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} นำเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดซีรัมที่มีอาหารเหลวสูตร Postgate's medium B บรรจุอยู่ มีกรดอะซิติกร้อยละ 0.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ปิดด้วยจุกยางและครอบทับจุกยางด้วยฟาลูมิเนียม บีบฝาให้แน่นนำไปหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 14 วัน สังเกตว่าในขวดใดมีตะกอนดำของ FeS แสดงว่ามี SRB เจริญในขวดนั้น เลือกขวดที่ได้ทำการเจือจางมากที่สุดที่มีตะกอนดำของ FeS นำมาถ่ายเชื้อลงในขวดซีรัมที่มีอาหารสูตรเดิม ในช่วงแรกๆ ใช้อัตราส่วนของจุลินทรีย์ต่อปริมาณสารอาหารใหม่ ปริมาตร 1 ต่อ 10 เมื่อถ่ายเชื้อและเลี้ยงไปหลายๆ ครั้งในสารอาหารที่มีกรดอะซิติกเป็น

แหล่งคาร์บอน และมีซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน คาดว่าจำนวนของ non-methanogens ที่ไม่สามารถใช้กรดอะซิติกได้น่าจะลดจำนวนลง และ MPB ที่สามารถใช้กรดอะซิติกได้แต่มีการเจริญที่ค่อนข้างช้ากว่า SRB ก็ลดน้อยลงไปด้วยเนื่องจากพบว่าไม่มีก๊าซมีเทนเกิดขึ้นเลยดังนั้น SRB จึงสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้เพียงกลุ่มเดียว และเป็น predominant โดยมีจำนวน SRB เป็น 7.0×10^5 MPN/ml ดังตาราง 10 ในการถ่ายเชื้อครั้งต่อๆ มาจึงใช้ปริมาตรของเชื้อตั้งต้นเพิ่มขึ้นเป็น 50 มิลลิลิตร ต่อสารอาหารใหม่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (สัดส่วน 1 ต่อ 1) ดังรายละเอียดในวิธีดำเนินการ SRB สามารถที่จะเจริญและใช้กรดอะซิติกได้ดีกว่า MPB ทำให้ SRB เป็น predominant ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการแข่งขันการใช้สารอาหารที่มีอัตราส่วนของอะซิเตตต่อซัลเฟตเป็น 1:1.5 จุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB สามารถใช้อะซิเตตได้ดีกว่า MPB เนื่องจากในระบบมีซัลเฟตมาก (Kalyuzhni & Fedorovich, 1997) และจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มมีการแข่งขันกันมากเมื่ออัตราส่วนของ $\text{COD}:\text{SO}_4^{2-}$ อยู่ในช่วง 1.7-2.7 ซึ่ง MPB จะเป็น predominant ได้ก็ต่อเมื่ออัตราส่วนของ $\text{COD}:\text{SO}_4^{2-}$ มากกว่า 2.7 และในทางตรงกันข้าม SRB จะเป็น predominant ได้เมื่อในระบบมี $\text{COD}:\text{SO}_4^{2-}$ น้อยกว่า 1.7 นั่นคือในระบบมีซัลเฟตมากนั่นเอง (Choi & Rim, 1991)

ตาราง 10 จำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB และ SRB ที่พบใน enriched culture

ครั้งที่นับ	Enriched MPB		Enriched SRB	
	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)	Acetic acid + SO_4^{2-} (MPN/ml)	Lactic acid + SO_4^{2-} (MPN/ml)
1	4.0×10^2	2.4×10^6	4.3×10^5	4.3×10^5
2	2.3×10^8	Nd*	9.3×10^5	2.3×10^6
3	9.3×10^5	9.3×10^5	4.3×10^5	2.4×10^8
4	2.8×10^5	9.0×10^5	9.3×10^5	ND
5	2.4×10^6	7.0×10^3	Nd	Nd
6	2.4×10^5	4.3×10^4	7.0×10^5	2.4×10^8
7	2.4×10^6	4.0×10^4	-	-
8	2.4×10^7	2.4×10^6	-	-
9	9.3×10^7	2.3×10^5	-	-
10	9.3×10^7	9.3×10^5	-	-

Nd = Not determine

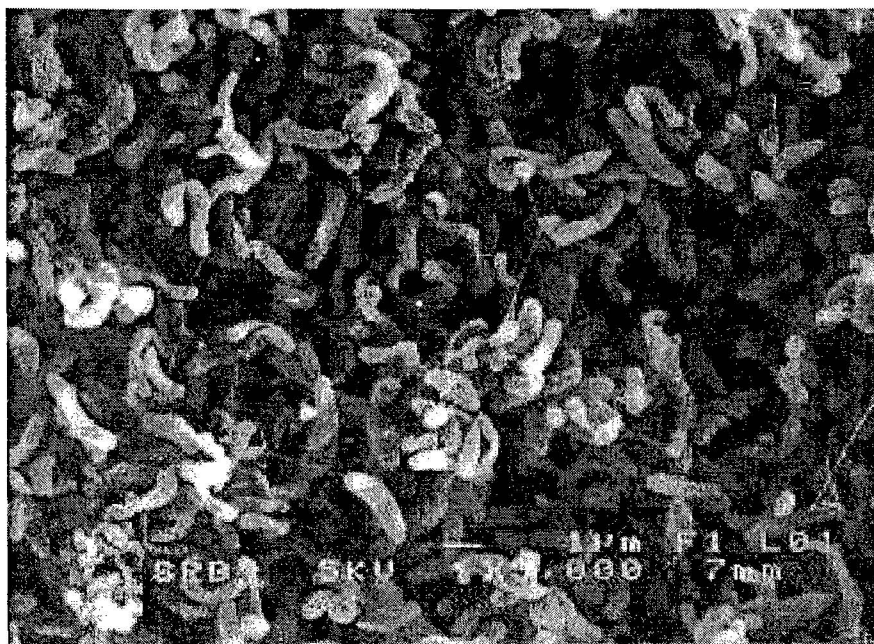
เมื่อนำ enriched SRB ไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกรดแลคติก ร้อยละ 0.1 สามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB จากเดิม 4.3×10^5 MPN/ml เป็น 2.4×10^8 MPN/ml ดังตาราง 10 แสดงให้เห็นว่า SRB ที่เจริญในแหล่งคาร์บอนที่เป็นกรดแลคติกมีจำนวนมากกว่า SRB ที่เจริญในแหล่งคาร์บอนที่เป็นกรดอะซิติก SRB สามารถใช้กรดแลคติกได้ดีกว่ากรดอะซิติก ขั้นตอนการทำ enrichment จุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB ด้วยกรดแลคติกดังรายละเอียดในวิธีดำเนินการ ซึ่งการที่จำนวนของ SRB ที่ใช้กรดแลคติกมีจำนวนมากเป็นผลดีต่อ MPB ในกรณีที่ไม่มีซัลเฟตหรือมีซัลเฟตในปริมาณที่น้อยๆ SRB สามารถย่อยสลายกรดแลคติกได้เป็นกรดอะซิติกซึ่ง MPB สามารถที่จะใช้กรดอะซิติกในการเปลี่ยนไปเป็นก๊าซมีเทน (Thiele & Zeikus, 1988)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของ enriched SRB

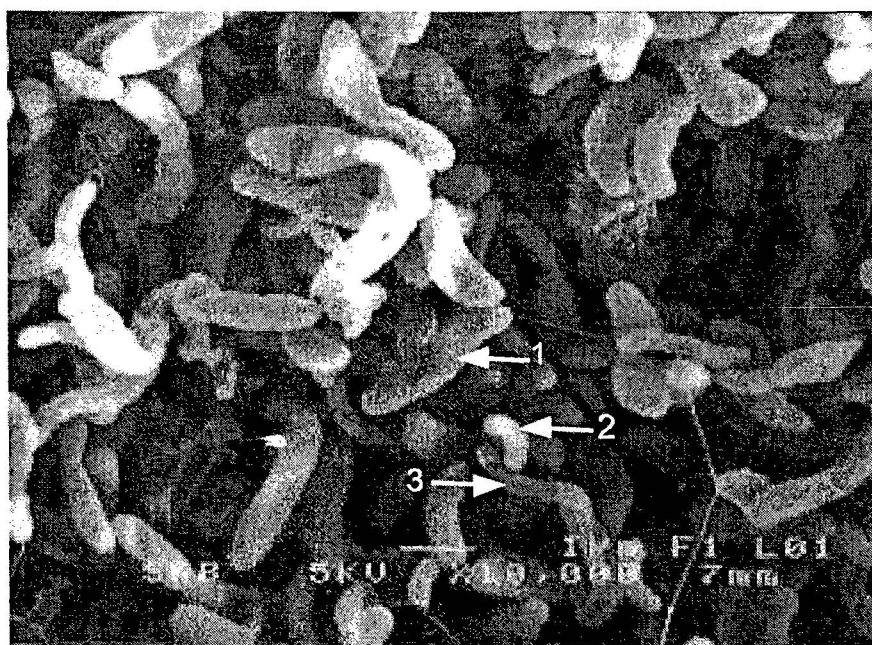
จุลินทรีย์ผสมมีจุลินทรีย์หลากหลายชนิด มีรูปร่าง ขนาด การจัดเรียงตัวต่างกัน (พวงทอง เม็งเกร็ด, 2541) เมื่อทดลอง enriched แบคทีเรียในกลุ่ม SRB นั้นได้ใช้สารอาหารที่จำเพาะกับแบคทีเรียในกลุ่มนี้ตามสูตรของ Postgate's medium B ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ใช้ enriched SRB และใช้กรดอะซิติกร้อยละ 0.1 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการเจือจางและถ่ายลงในอาหารสูตรเดิมตลอดการทดลองเมื่อทำการถ่ายเชื้อไปประมาณ 6 ครั้ง ได้นำจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในสารอาหารนี้มาตรวจดูรูปร่างพบว่าจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในสารอาหารที่มีกรดอะซิติกตามสูตรของ Postgate's medium B ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นเกลียวโค้งเล็กน้อย ลักษณะคล้ายเซลล์ของ SRB ใน genera *Desulfovibrio* หรือ genera *Desulfobulbus* ความกว้างของเซลล์ประมาณ 0.3-0.6 ไมโครเมตร ยาว 1-2 ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 13) จัดจำแนกตาม Bergey's Manual (Stateley, et al. 1989) ดังนี้

1. เซลล์ที่มีรูปร่างเป็นเกลียวโค้งมี flagellum ขนาดของเซลล์ประมาณ 0.7×2.5 ไมโครเมตร ซึ่งสามารถใช้ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดโพรพิโอนิก และเอทานอล โดยมีซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน และผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ อุณหภูมิในการเจริญ 25-40 องศาเซลเซียส pH 6.6-7.5 (ภาพประกอบ 13)
2. เซลล์ที่มีรูปร่างโค้ง ไม่มี flagellum ขนาดของเซลล์ประมาณ 0.4×0.8 ไมโครเมตร จุลินทรีย์กลุ่มนี้ไม่เคลื่อนที่สามารถใช้ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดโพรพิโอนิก และเอทานอล โดยมีซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน และผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ อุณหภูมิในการเจริญ 25-40 องศาเซลเซียส pH 6.6-7.5 (ภาพประกอบ 13)
3. เซลล์ที่มีรูปร่างเป็นเกลียวพอมโค้ง ไม่มี flagellum ขนาดเซลล์ประมาณ 0.3×1.7 ไมโครเมตร พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้ไม่เคลื่อนที่ สามารถใช้ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดโพรพิโอนิก และ เอทานอล โดยมีซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน

และผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ อุณหภูมิในการเจริญ 25-40 องศาเซลเซียส pH 6.6-7.5 (ภาพประกอบ 13) ดังนั้นจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB น่าจะเป็น genera *Desulfobulbus* และ *Desulfovibrio* เมื่อนำ enriched SRB ที่เลี้ยงด้วยกรดอะซิติกร้อยละ 0.1 ที่มีจำนวน 4.3×10^5 MPN/ml มาเลี้ยงในสารอาหารตามสูตรของ Postgate's medium B (ภาคผนวก ข) โดยใช้ กรดแลคติกร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์โดยทำการเจือจางและถ่ายลงในอาหารสูตรเดิมตลอดเมื่อทำการถ่ายเชื้อไปประมาณ 3 ครั้ง พบว่ามีจำนวน SRB ที่ใช้ กรดแลคติกเป็น 2.4×10^8 MPN/ml เมื่อนำมาตรวจดูรูปร่างพบว่าจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในสารอาหาร ที่มีกรดแลคติกตามสูตรของ Postgate's medium B ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นเกลียวโค้งเล็กน้อยมีแฟลกเจลลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ น่าจะเป็น SRB ใน genera *Desulfobulbus* มีขนาดความกว้างของเซลล์ประมาณ 0.3-0.6 ไมโครเมตร ยาว 1-2 ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 14)

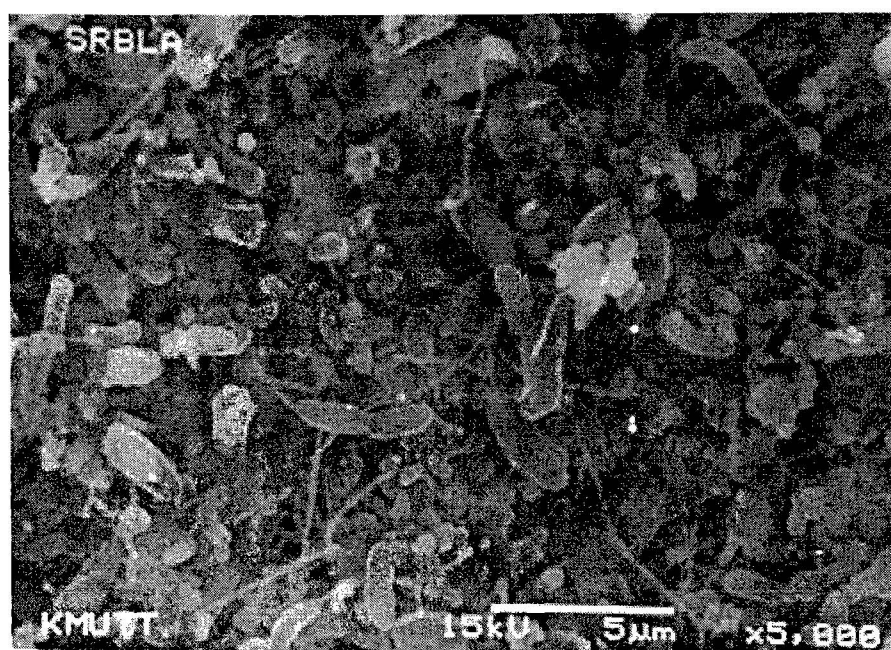


ก) กำลังขยาย 5,000 เท่า

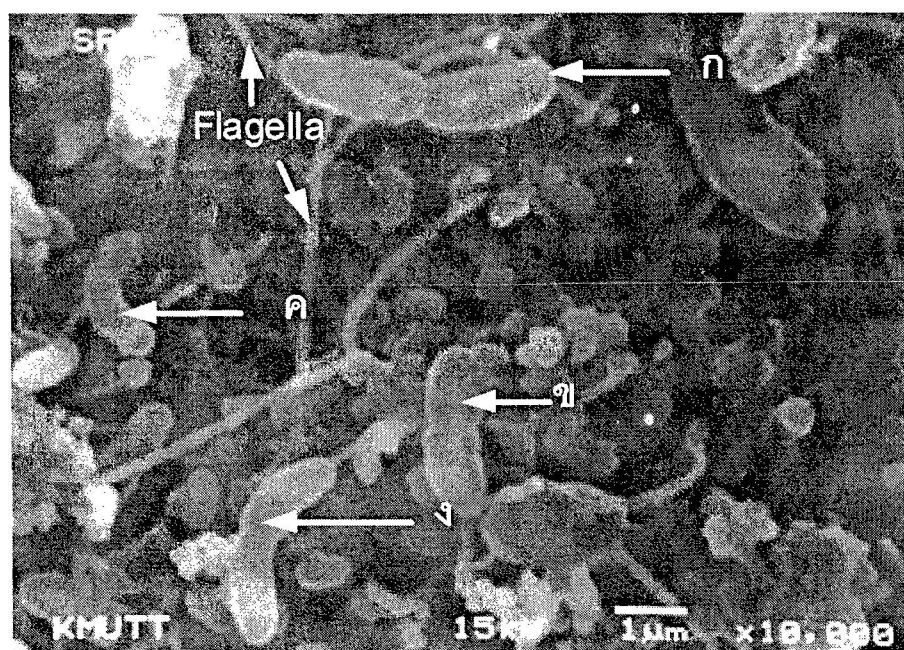


ข) กำลังขยาย 10,000 เท่า

ภาพประกอบ 13 รูปร่างของ enriched SRB ที่เลี้ยงด้วยกรดอะซิติกร้อยละ 0.1



ก) กำลังขยาย 5,000 เท่า



ข) กำลังขยาย 10,000 เท่า

ภาพประกอบ 14 รูปร่างของ enriched SRB ที่เลี้ยงด้วยกรดแลคติกร้อยละ 0.1

การศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ผสม SRB และ MPB ในการใช้ กรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

การศึกษาการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10-120 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม

การใช้กรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ผสมในช่วงเวลาต่างๆ พบว่า ในช่วงแรกมีการย่อยสลายกรดอะซิติกไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นการใช้กรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ใน กลุ่ม SRB เมื่อเวลาผ่านไปพบว่าการผลิตก๊าซมีเทนเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีกิจกรรมการใช้กรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพของจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB จากการทดลองพบว่าการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 30 50 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์ ของแบคทีเรียทั้งในกลุ่ม MPB และ SRB หมดภายใน 20 32 38 40 45 และ 78 วัน ตามลำดับดังตาราง 11

ตาราง 11 ปริมาณกรดอะซิติกที่ถูกใช้โดยจุลินทรีย์ผสม ความเข้มข้นของกรดอะซิติกเริ่มต้น
10 30 50 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์

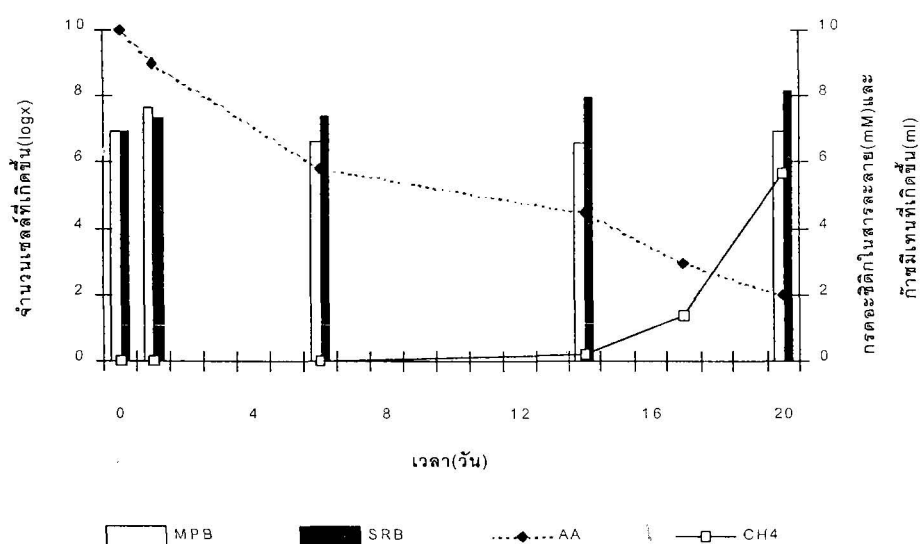
ความ เข้มข้น ตั้งต้น (mM)	ปริมาณกรดอะซิติกที่ถูกใช้สะสม(มิลลิโมลาร์)									
	วันที่ 1	วันที่ 6	วันที่ 14	วันที่ 20	วันที่ 25	วันที่ 32	วันที่ 38	วันที่ 40	วันที่ 45	วันที่ 78
10	0.83	4.19	5.53	8.02						
30	5.62	7.63	Nd	9.19	19.29	25.84				
50	8.78	17.84	20.06	23.62	37.40	44.45	48.93			
70	6.43	12.03	Nd	25.33	51.75	64.31	Nd	68.01		
90	1.84	7.89	27.97	37.34	50.73	66.51	ND	83.20	86.27	
120	1.46	18.03	42.46	65.81	67.15	71.85	76.34	79.55	83.42	116.4

Nd=Not determine

ตาราง 12 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสมที่อุณหภูมิปานกลาง

Incubation time (day)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)	Acetic acid utilization (mM)	CH ₄ Production (ml)	CO ₂ Production (ml)
0	9.3×10^6	9.3×10^6	0.00	0.00	0.00
1	4.3×10^7	2.3×10^7	0.83	0.00	0.00
6	4.3×10^6	2.4×10^7	4.19	0.00	0.00
14	3.9×10^6	9.3×10^7	5.53	0.22	0.18
17	Nd	Nd	7.03	1.38	0.62
20	9.3×10^6	1.5×10^8	8.02	5.64	1.06
Total			8.02	7.24	1.86

Nd=Not determine



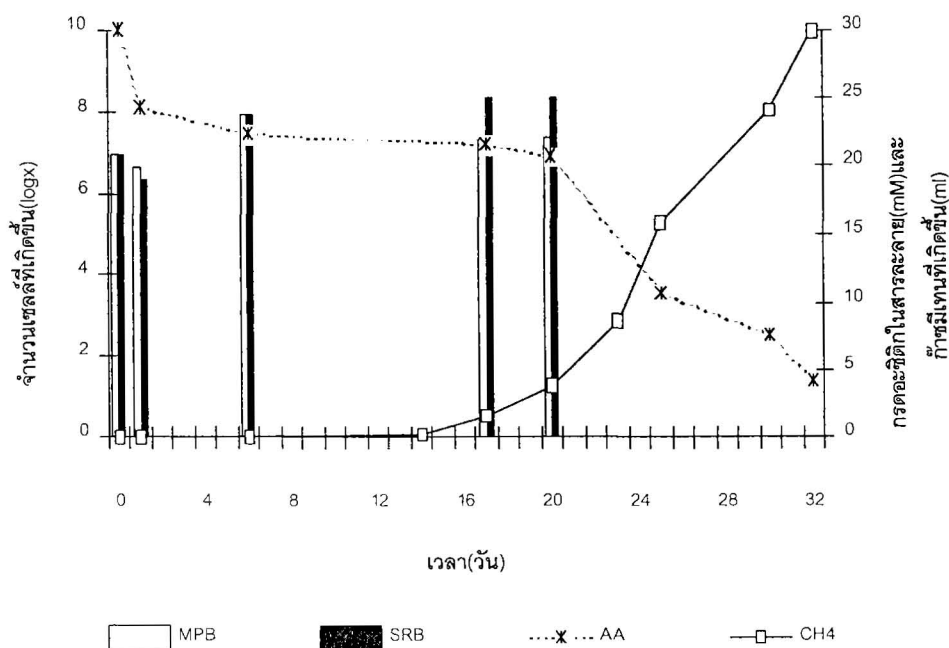
ภาพประกอบ 15 จำนวนของ MPB SRB และ การผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม

การใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ผสมในช่วงเวลาต่างๆ ปริมาณกรดอะซิติกที่ถูกใช้ขึ้นกับความเข้มข้น โดยที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 10 มิลลิโมลาร์ ถูกใช้หมดภายในเวลาประมาณ 20 วัน (ตาราง 12) จำนวนของ MPB ก่อนข้างคองที่ ส่วน SRB มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จากเดิมที่มีจำนวนของ MPB และ SRB เริ่มต้นที่เท่ากันที่ 9.3×10^6 MPN/ml (ภาพประกอบ 15) แสดงให้เห็นว่า SRB เป็น predominant แสดงว่าเมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกต่ำๆ SRB สามารถใช้กรดอะซิติกได้ดีกว่า MPB ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Yoda & Kitagawa.(Yoda & Kitagawa. 1987) และด้วยเหตุผลว่า SRB มีค่า Km ต่ำกว่า MPB จึงทำให้ SRB เป็น predominant เมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกต่ำๆ (Isa, Grusemeyer & Verstrate. 1986); (Yoda & Kitagawa. 1987)

ตาราง 13 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิปานกลาง

Incubation time (day)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)	Acetic acid utilization (mM)	CH ₄ Production (ml)	CO ₂ Production (ml)
0	9.3×10^6	9.3×10^6	0.00	0.00	0.00
1	4.3×10^6	2.3×10^6	5.62	0.00	0.00
6	9.3×10^7	9.3×10^7	7.63	0.00	0.00
14	Nd	Nd	Nd	0.20	0.30
17	2.1×10^7	2.3×10^6	8.35	1.35	1.05
20	2.4×10^7	2.4×10^8	9.19	2.29	0.91
23	Nd	Nd	Nd	4.78	0.52
25	Nd	Nd	19.29	7.28	0.42
30	Nd	Nd	22.32	8.20	0.20
32	Nd	Nd	25.84	5.79	0.21
Total			25.84	29.69	3.61

Nd=Not determine



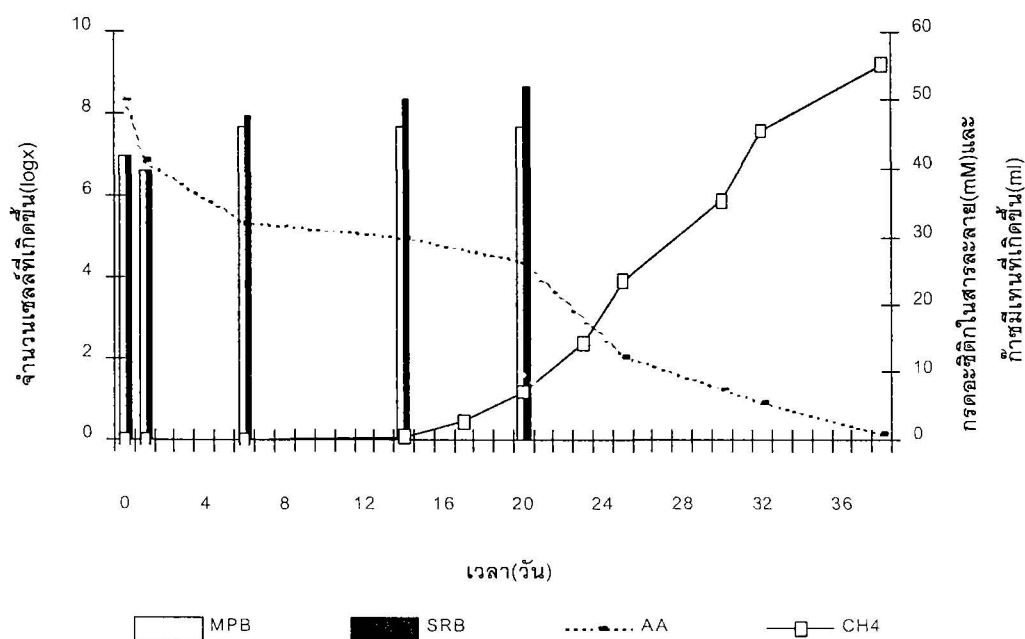
ภาพประกอบ 16 จำนวนของ MPB SRB และ การผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม

กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ กรดอะซิติกถูกใช้หมดภายในเวลาประมาณ 32 วัน (ตาราง 13) ในช่วง 20 วันแรก MPB มีจำนวนค่อนข้างคงที่ ส่วน SRB มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น หลังจากใช้เวลาในการย่อยสลายนานขึ้นพบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB มีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 10^6 MPN/ml เป็น 10^8 MPN/ml ส่วน MPB ค่อนข้างคงที่ที่ 10^7 MPN/ml (ภาพประกอบ 16) แสดงว่า SRB มีการใช้กรดอะซิติกในช่วงแรกหลังจากนั้นจึงเป็นกิจกรรมการใช้กรดอะซิติกเพื่อสร้างก๊าซมีเทนโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB ซึ่งสอดคล้องกับงานของ พวงทอง เม้งเกร็ด (พวงทอง เม้งเกร็ด. 2541) และจงกล พูนทวี (จงกล พูนทวี. 2527) ที่พบว่า การใช้กรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ผสมในช่วงแรกเป็นการใช้กรดอะซิติกเพื่อสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ก่อนหลังจากใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนานขึ้นพบว่าการใช้กรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซมีเทนโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB

ตาราง 14 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสมที่อุณหภูมิปานกลาง

Incubation time (day)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN)ml)	Acetic acid utilization (mM)	CH ₄ Production (ml)	CO ₂ Production (ml)
0	9.3x10 ⁶	9.3x10 ⁶	0.00	0.00	0.00
1	4.3x10 ⁶	4.3x10 ⁶	8.78	0.00	0.00
6	4.6x10 ⁷	9.3x10 ⁷	17.84	0.00	0.00
14	4.6x10 ⁷	2.3x10 ⁸	20.06	0.25	0.35
17	Nd	Nd	Nd	1.19	0.81
20	4.6x10 ⁷	4.6x10 ⁸	23.62	3.41	0.99
23	Nd	Nd	Nd	6.82	0.58
25	Nd	Nd	37.40	8.80	0.40
30	Nd	Nd	42.51	11.27	0.33
32	Nd	Nd	44.45	10.04	0.26
38	Nd	Nd	48.93	9.37	0.23
Total			48.93	51.15	3.95

Nd=Not determine



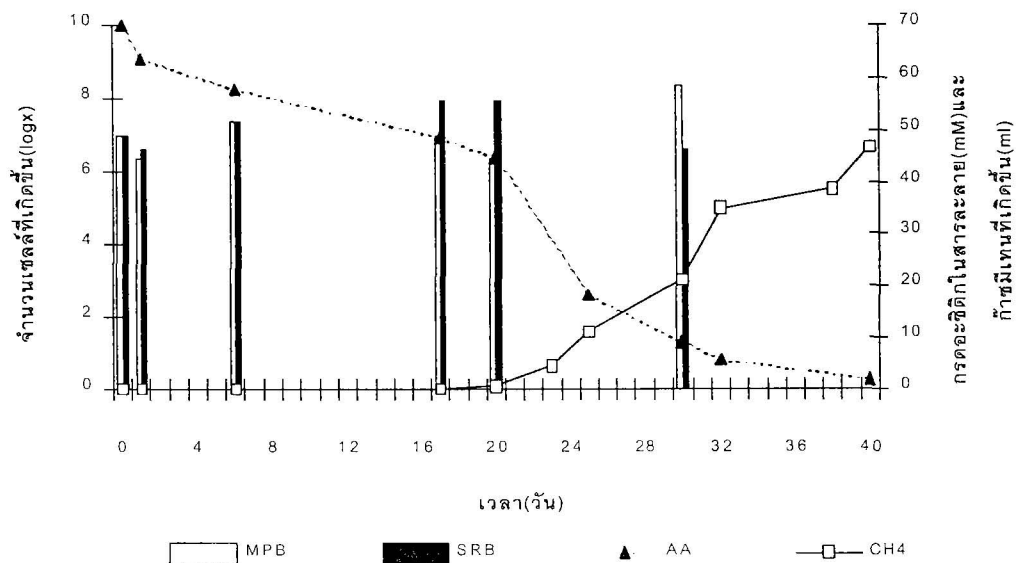
ภาพประกอบ 17 จำนวนของ MPB SRB และ การผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม

เมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกเริ่มต้น 50 มิลลิโมลาร์ กรดอะซิติกถูกใช้หมดภายใน 38 วัน (ตาราง 14) โดยที่จำนวน MPB ในช่วง 20 วันแรก มีจำนวนค่อนข้างคงที่ ส่วน SRB มีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 9.3×10^6 MPN/ml เป็น 4.6×10^8 MPN/ml หลัง 20 วันผ่านไปมีการผลิตก๊าซมีเทนมากขึ้นจำนวน MPB เพิ่มขึ้นจาก 9.3×10^6 MPN/ml เป็น 4.6×10^7 MPN/ml แสดงว่ามีการเพิ่มจำนวนของ MPB และกิจกรรมการย่อยสลายกรดอะซิติก เพื่อผลิตก๊าซมีเทนได้มากขึ้น ส่วน SRB มีจำนวนค่อนข้างคงที่ที่ 10^8 MPN/ml กิจกรรมการย่อยสลายกรดอะซิติกหลัง 20 วันผ่านไปจึงเป็นกิจกรรมการย่อยสลายกรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซมีเทนของจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB ทำให้ MPB เป็น predominant ในช่วงหลัง (ภาพประกอบ 17) สอดคล้องกับงานของ พวงทองเม้งเกร็ด ที่พบว่าการใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ผสมในช่วงแรกเป็นการใช้กรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (พวงทอง เม้งเกร็ด. 2541) และจากผลการทดลองในตาราง 14 แสดงให้เห็นว่า SRB ใช้กรดอะซิติกในช่วงแรกและเป็น predominant

ตาราง 15 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสมที่อุณหภูมิปานกลาง

Incubation time	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN)ml)	Acetic acid utilization (mM)	CH ₄ Production (ml)	CO ₂ Production (ml)
0	9.3x10 ⁶	9.3x10 ⁶	0.00	0.00	0.00
1	2.3x10 ⁶	4.3x10 ⁶	6.43	0.00	0.00
6	2.4x10 ⁷	2.4x10 ⁷	12.03	0.00	0.00
14	Nd	Nd	Nd	0.00	0.00
17	9.3x10 ⁶	9.0x10 ⁷	21.16	0.05	0.05
20	2.3x10 ⁶	9.3x10 ⁷	25.33	0.41	0.29
23	Nd	Nd	Nd	4.07	1.03
25	Nd	Nd	51.75	6.65	0.95
30	2.4x10 ⁸	4.3x10 ⁶	60.87	10.14	0.56
32	Nd	Nd	64.31	13.60	0.40
38	Nd	Nd	Nd	3.88	0.12
40	Nd	Nd	68.01	8.07	0.21
Total			68.01	46.86	3.62

Nd=Not determine



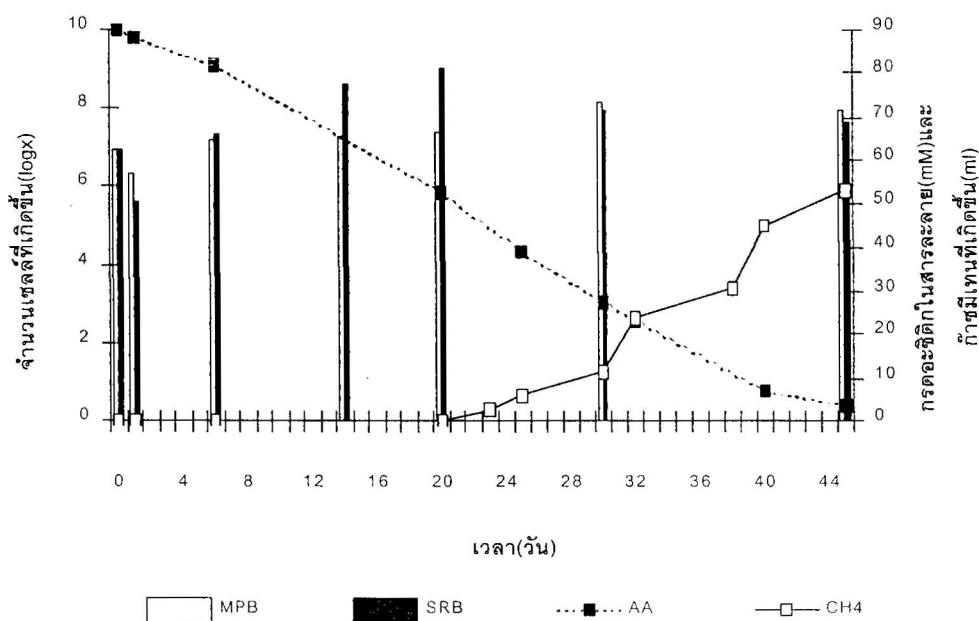
ภาพประกอบ 18 จำนวนของ MPB SRB และ การผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม

ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดอะซิติก 70 มิลลิโมลาร์ กรดอะซิติกถูกใช้หมด ภายใน 40 วัน (ตาราง 15) จำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB ค่อนข้างคงที่ในช่วง 20 วันแรก ส่วน SRB เพิ่มขึ้นจากเดิม 9.3×10^6 MPN/ml เป็น 9.3×10^7 MPN/ml การย่อยสลายกรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซมีเทนในช่วงนี้มีน้อยมาก หลัง 20 วันผ่านไป พบว่ามีการผลิตก๊าซมีเทนเพิ่มขึ้น และมีจำนวน MPB เพิ่มขึ้นจากเดิม 9.3×10^6 MPN/ml เป็น 2.4×10^8 MPN/ml ส่วน SRB ค่อนข้างคงที่ (ภาพประกอบ 18) แสดงว่า SRB จะใช้กรดอะซิติกในช่วงแรก ทำให้จำนวนของ SRB เพิ่มขึ้น หลังจากนั้น MPB จึงใช้กรดอะซิติกเพื่อสร้างก๊าซมีเทนและมีจำนวนของ MPB เพิ่มขึ้นเหมือนที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 10 30 และ 50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสอดคล้องกับงานของ พวงทอง เม้งเกร็ด (พวงทอง เม้งเกร็ด. 2541) และ จงกล(จงกล พูนทวี. 2527)

ตาราง 16 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสมที่อุณหภูมิปานกลาง

Incubation time (day)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN)ml)	Acetic acid utilization (mM)	CH ₄ Production (ml)	CO ₂ Production (ml)
0	9.3x10 ⁶	9.3x10 ⁶	0.00	0.00	0.00
1	2.3x10 ⁶	4.3x10 ⁵	1.84	0.00	0.00
6	1.5x10 ⁷	2.3x10 ⁷	7.89	0.00	0.00
14	2.1x10 ⁷	4.3x10 ⁸	27.97	0.00	0.00
17	Nd	Nd	Nd	0.00	0.00
20	2.4x10 ⁷	1.1x10 ⁹	37.34	0.05	0.05
23	Nd	Nd	Nd	2.49	0.91
25	Nd	Nd	50.73	3.38	0.72
30	1.5x10 ⁸	9.3x10 ⁷	62.38	5.24	0.46
32	Nd	Nd	66.51	12.57	0.43
38	Nd	Nd	Nd	7.02	0.18
40	Nd	Nd	83.20	14.31	0.29
45	9.3x10 ⁷	4.6x10 ⁶	86.27	7.98	0.12
Total			86.27	53.05	3.35

Nd=Not determine



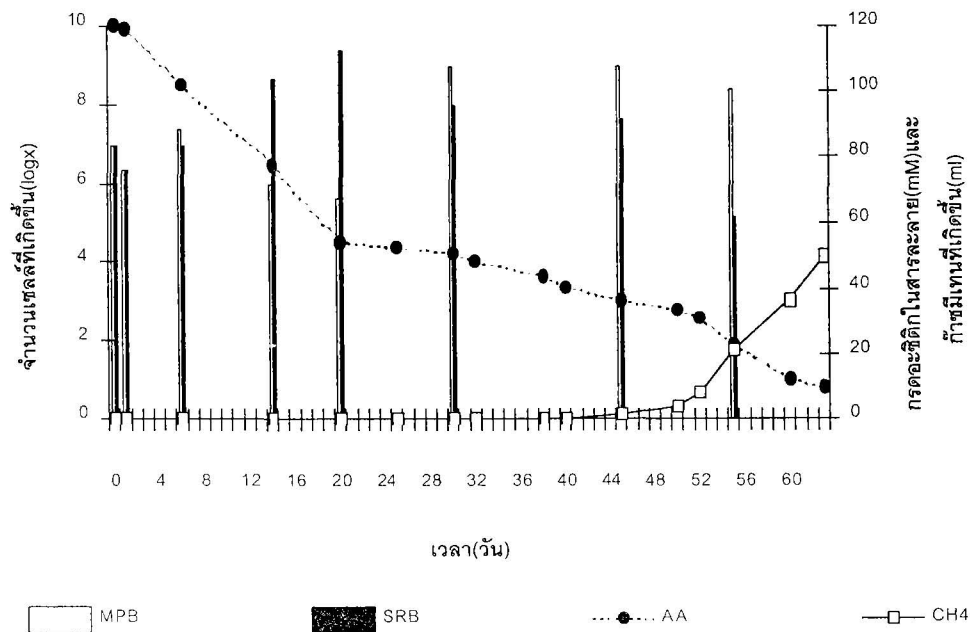
ภาพประกอบ 19 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม

เมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกเริ่มต้นเป็น 90 มิลลิโมลาร์ กรดอะซิติกถูกใช้หมดภายใน 45 วัน ในช่วง 20 วันแรกพบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB ค่อนข้างคงที่ ส่วนจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB มีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 9.3×10^6 MPN/ml เป็น 1.1×10^9 MPN/ml เมื่อใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายมากขึ้นพบว่า มีการย่อยสลายกรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซมีเทน และมีจำนวน MPB เพิ่มขึ้นเป็น 9.3×10^7 MPN/ml แสดงว่ามีการเพิ่มจำนวน และกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB (ภาพประกอบ 19) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 10 30 50 และ 70 มิลลิโมลาร์

ตาราง 17 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสมที่
อุณหภูมิปานกลาง

Incubation time (day)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN)ml)	Acetic acid utilization (mM)	CH ₄ Production (ml)	CO ₂ Production (ml)
0	9.3x10 ⁶	9.3x10 ⁶	0.00	0.00	0.00
1	2.3x10 ⁶	2.3x10 ⁶	1.46	0.00	0.00
6	2.4x10 ⁷	9.3x10 ⁶	18.03	0.00	0.00
14	9.3x10 ⁵	4.3x10 ⁸	42.46	0.00	0.00
17	Nd	Nd	Nd	0.00	0.00
20	4.3x10 ⁵	2.4x10 ⁹	65.81	0.00	0.00
23	Nd	Nd	Nd	0.00	0.00
25	Nd	Nd	67.15	0.00	0.00
30	9.3x10 ⁸	9.3x10 ⁷	69.37	0.00	0.00
32	Nd	Nd	71.85	0.00	0.00
38	Nd	Nd	76.34	0.00	0.00
40	Nd	Nd	79.55	0.00	0.00
45	9.3x10 ⁸	4.3x10 ⁷	83.42	1.64	0.86
50	Nd	Nd	86.70	2.40	0.30
52	Nd	Nd	89.12	4.17	0.33
55	2.4x10 ⁸	1.5x10 ⁵	96.97	13.15	0.35
60	Nd	Nd	107.85	15.20	0.30
63	Nd	Nd	110.36	13.24	0.26
70	Nd	Nd	Nd	14.73	0.27
78	Nd	Nd	116.4	9.29	0.21
Total			116.4	73.82	2.88

Nd=Not determine



ภาพประกอบ 20 จำนวนของ MPB SRB และ การผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสม

การใช้กรดอะซิติกเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ คือมีการใช้กรดอะซิติกในช่วงแรกแต่ไม่มีการผลิตก๊าซมีเทน มีการเพิ่มจำนวนของ SRB ในช่วงแรก เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายนานขึ้นประมาณ 45 วัน จึงพบว่าการย่อยสลายกรดอะซิติกไปเป็นก๊าซมีเทนและมีจำนวนของ MPB เพิ่มขึ้น ส่วน SRB มีแนวโน้มลดลง(ภาพประกอบ 20) และกรดอะซิติกจะถูกนำไปใช้หมดภายใน 78 วัน ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 10 30 50 70 และ 90 มิลลิโมลาร์

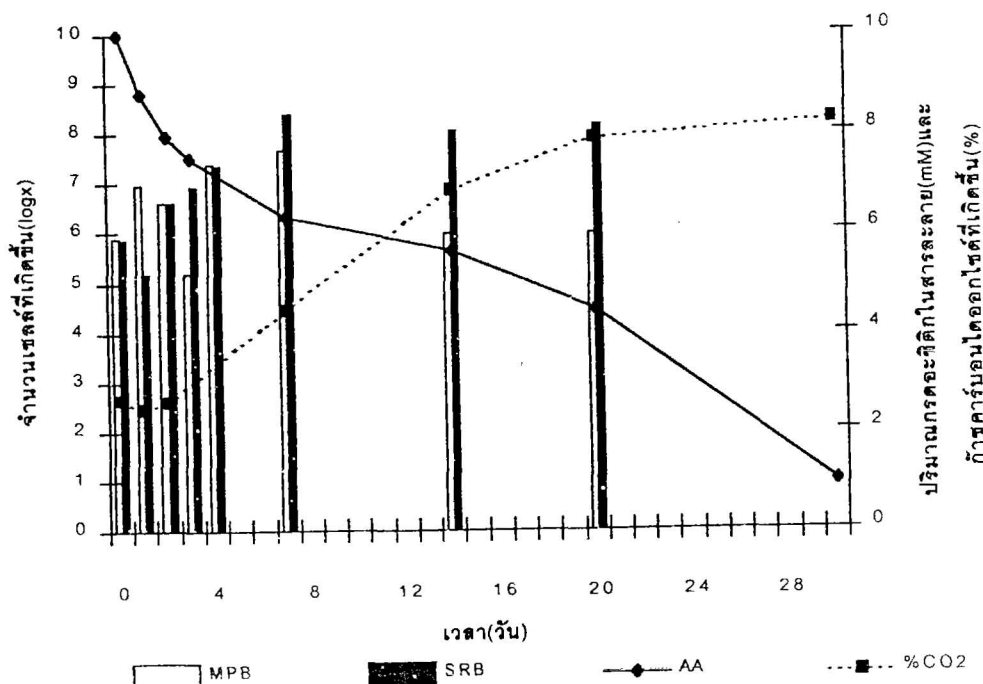
การศึกษาการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10-120 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

การศึกษาถึงความสามารถของ SRB เพียงกลุ่มเดียวในการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 10 30 50 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์ เพื่อเปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติกในช่วงวันแรกๆ ระหว่างจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้งว่าจุลินทรีย์ที่ใช้กรดอะซิติกในช่วงแรกเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB หรือ MPB โดยที่สารยับยั้งที่ใส่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการตั้งหมูเมทิลไปใช้ในการสร้างก๊าซมีเทนของแบคทีเรียในกลุ่ม MPB ดังนั้นจึงเป็นการใช้กรดอะซิติกโดยแบคทีเรียในกลุ่ม SRB เพียงกลุ่มเดียว

ตาราง 18 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

Incubation time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)	Acetic acid utilization (mM)
0	97.28	0.07	2.65	8.3x10 ⁵	7.4x10 ⁵	0.00
1	97.49	0.06	2.44	9.3x10 ⁶	1.5x10 ⁵	1.19
2	97.18	0.21	2.61	4.3x10 ⁶	4.3x10 ⁶	2.04
3	Nd	Nd	Nd	1.5x10 ⁵	9.0x10 ⁶	2.50
4	Nd	Nd	Nd	2.4x10 ⁷	2.3x10 ⁷	Nd
7	95.15	0.39	4.46	4.6x10 ⁷	2.4x10 ⁸	3.67
14	92.80	0.36	6.84	9.3x10 ⁵	1.1x10 ⁸	4.36
20	91.76	0.34	7.90	9.3x10 ⁵	1.5x10 ⁸	5.54
30	91.46	0.32	8.22	Nd	Nd	9.06

Nd=Not determine



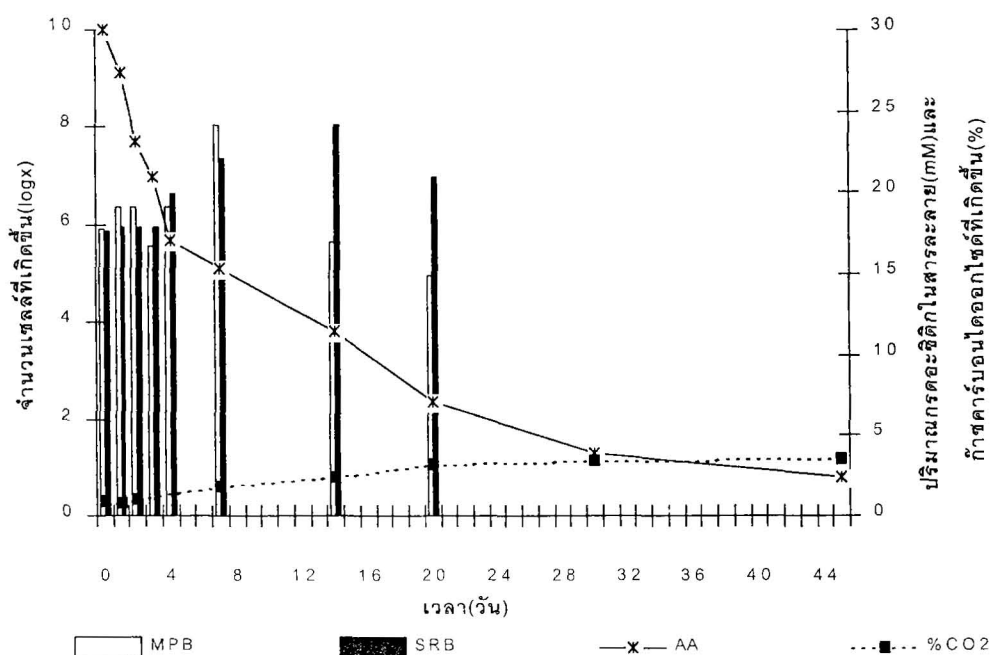
ภาพประกอบ 21 จำนวนของ MPB SRB และ การผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

การใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA พบว่ามีการใช้กรดอะซิติกได้หมดภายใน 30 วัน และจากจำนวนของจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB และ SRB ในช่วงแรก มีจำนวนของ MPB และ SRB ที่ใกล้เคียงกัน หลังจากใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายหลัง 7 วัน ไปแล้ว MPB มีแนวโน้มลดลงส่วนจำนวนของ SRB จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตั้งแต่ช่วงแรกๆ โดยเฉพาะที่วันที่ 20 มีจำนวนของจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB อยู่ประมาณ 1.5×10^8 MPN/ml ส่วน MPB มีจำนวนประมาณ 9.3×10^5 MPN/ml จากเริ่มต้นที่มีจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB อยู่ประมาณ 7.4×10^5 MPN/ml และ MPB อยู่ประมาณ 8.3×10^5 MPN/ml (ตาราง 18 และภาพประกอบ 21) แสดงว่าการดื้ออะซิติกที่ลดลงนั้นเกิดจากการใช้ของจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB เพียงกลุ่มเดียวและจะเห็นว่าจุลินทรีย์ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA ซึ่งมี SRB เป็น predominant ใช้กรดอะซิติก 10 มิลลิโมลาร์ หมดภายในเวลา 30 วัน ซึ่งใช้เวลานานกว่าจุลินทรีย์ผสมโดย SRB จะใช้กรดอะซิติกในช่วงแรกและหลังจากนั้นมี MPB ช่วยใช้กรดอะซิติกเพื่อเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทนด้วย

ตาราง 19 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

Incubation time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN)ml)	Acetic acid utilization (mM)
0	99.07	0.06	0.87	8.3×10^5	7.4×10^5	0.00
1	99.10	0.10	0.80	2.4×10^6	9.3×10^5	2.63
2	98.67	0.25	1.08	2.4×10^6	9.0×10^5	6.89
3	Nd	Nd	Nd	3.9×10^5	9.3×10^5	9.00
4	Nd	Nd	Nd	2.4×10^6	3.3×10^6	12.98
7	97.78	0.39	1.83	1.1×10^8	2.4×10^7	14.62
14	97.18	0.40	2.45	4.3×10^5	1.1×10^8	18.58
20	96.37	0.37	3.26	9.0×10^4	9.3×10^6	22.94
30	96.25	0.34	3.41	Nd	Nd	26.13
45	96.14	0.31	3.55	Nd	Nd	27.62

Nd=Not determine



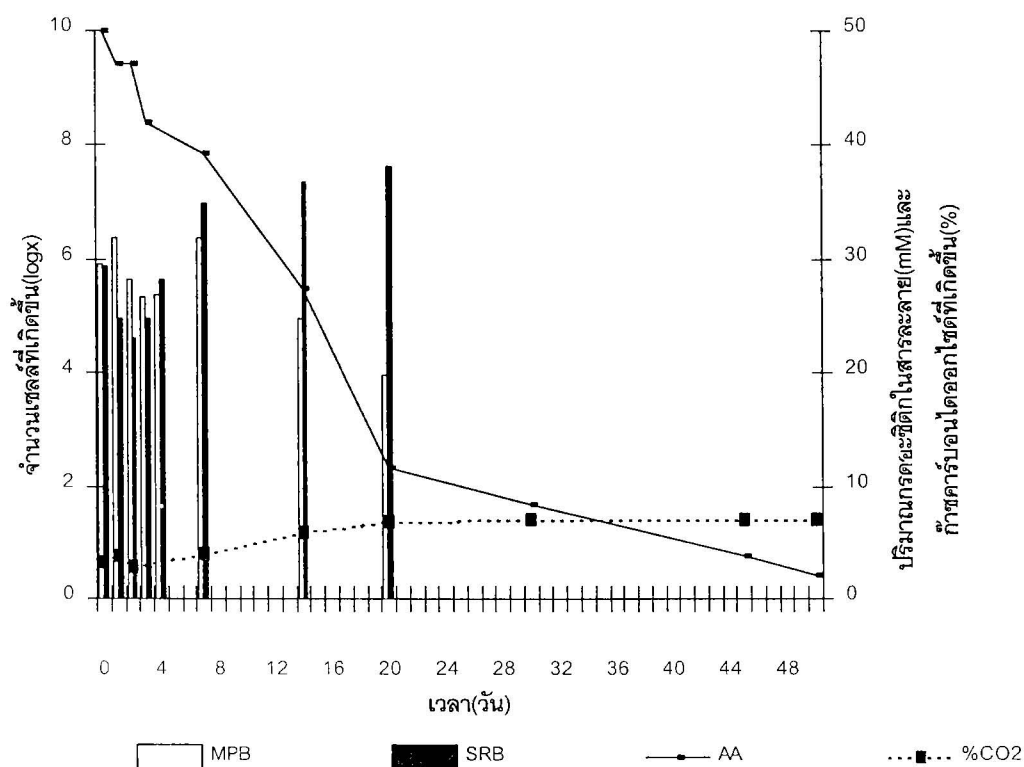
ภาพประกอบ 22 จำนวนของ MPB SRB และ การผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

การใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ สามารถใช้กรดอะซิติกได้หมดภายใน 45 วัน ซึ่งจากการนับจำนวนของจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB และ MPB พบว่า ในช่วง 7 วันแรกของการใช้กรดอะซิติกจำนวนของ MPB และ SRB ใกล้เคียงกัน หลังจากใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนาน 14 วัน พบว่า MPB มีแนวโน้มลดลง ส่วน SRB มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จากเริ่มต้นที่มีจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB อยู่ประมาณ 8.3×10^5 MPN/ml ส่วน SRB มีอยู่ประมาณ 7.4×10^5 MPN/ml เมื่อเวลาผ่านไป 20 วัน พบว่า MPB ลดลงเป็น 9.0×10^4 MPN/ml ส่วน SRB เพิ่มขึ้นเป็น 9.3×10^6 MPN/ml (ตาราง 19 และภาพประกอบ 22) และจะเห็นว่าในการทดลองนี้ใช้เวลาในการใช้กรดอะซิติก 30 มิลลิโมลาร์ ให้หมดนั้นใช้เวลานานกว่าการทดลองที่ใช้จุลินทรีย์ผสมซึ่งมีทั้ง SRB และ MPB ที่ใช้กรดอะซิติก

ตาราง 20 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

Incubation time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)	Acetic acid utilization (mM)
0	96.81	0.02	3.17	8.3x10 ⁵	7.4x10 ⁵	0.00
1	96.16	0.02	3.82	2.4x10 ⁶	9.0x10 ⁴	2.90
2	97.09	0.01	2.90	4.3x10 ⁵	4.3x10 ⁴	6.81
3	Nd	Nd	Nd	2.3x10 ⁵	9.0x10 ⁴	8.05
4	Nd	Nd	Nd	2.4x10 ⁵	4.3x10 ⁵	Nd
7	95.47	0.19	4.04	2.4x10 ⁶	9.3x10 ⁶	10.66
14	93.00	0.18	5.92	9.0x10 ⁴	2.4x10 ⁷	22.49
20	92.89	0.16	6.95	9.0x10 ³	4.3x10 ⁷	38.29
30	92.82	0.15	7.03	Nd	Nd	41.51
45	92.74	0.16	7.10	Nd	Nd	46.25
50	92.71	0.18	7.11	Nd	Nd	47.81

Nd=Not determine



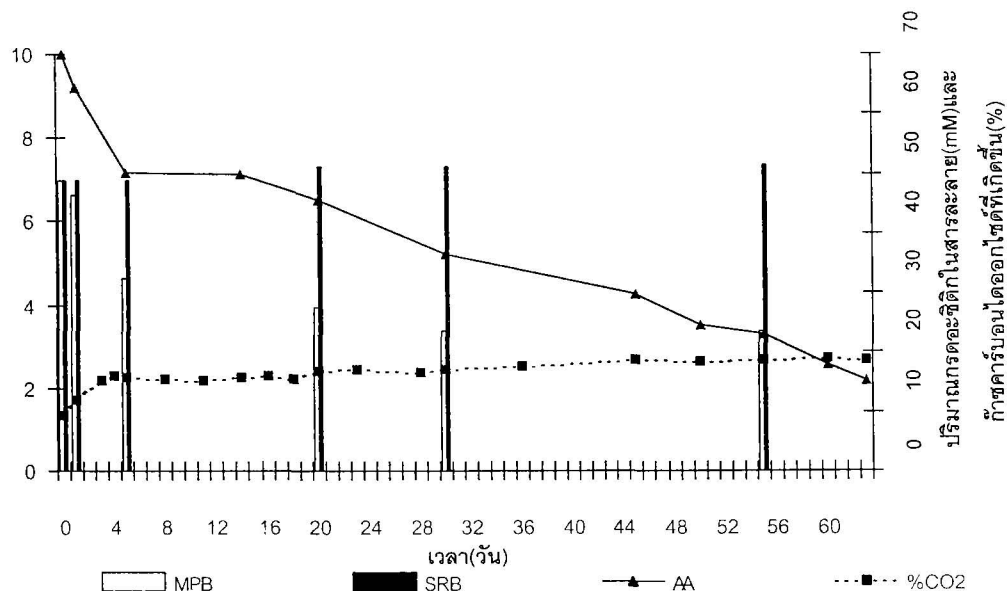
ภาพประกอบ 23 จำนวนของ MPB SRB และ การผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

อัตราการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในช่วง 7 วันแรกค่อนข้างน้อย หลังจากใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนานขึ้นพบว่ามีการใช้กรดอะซิติกอย่างรวดเร็วและค่อนข้างลดลงในช่วงวันที่ 20 ถึงวันที่ 50 ซึ่งมีกรดอะซิติกเหลือน้อยทำให้อัตราการใช้ลดน้อยลงไปด้วย เมื่อพิจารณาจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB และ SRB พบว่าหลังจาก 7 วันผ่านไปจำนวนของ MPB มีแนวโน้มลดลง ส่วน SRB มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จากจำนวนเริ่มต้นที่มี MPB อยู่ประมาณ 8.3×10^5 MPN/ml ส่วน SRB มีอยู่ประมาณ 7.4×10^5 MPN/ml เมื่อทำการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มหลังจากใช้เวลาในการย่อยสลายนาน 20 วันพบว่ามี MPB ลดลงเหลือประมาณ 9.0×10^3 MPN/ml ส่วน SRB เพิ่มขึ้นจากเดิมเป็น 4.3×10^7 MPN/ml (ตาราง 20 และ ภาพประกอบ 23) และจะเห็นว่าการใช้กรดอะซิติก 50 มิลลิโมลาร์ ของ SRB อย่างเดียวจะใช้เวลานานกว่าการทดลองที่ใช้จุลินทรีย์ผสมซึ่งมี SRB ใช้กรดอะซิติกในช่วงแรกและหลังจากนั้น MPB จะใช้กรดอะซิติกเพื่อสร้างก๊าซมีเทนด้วย

ตาราง 21 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

Incubation time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)	Acetic acid utilization (mM)
0	90.48	0.00	9.52	9.3x10 ⁶	9.3x10 ⁶	0.00
1	87.84	0.00	12.16	4.3x10 ⁶	9.3x10 ⁶	5.50
2	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
3	84.72	0.00	15.28	Nd	Nd	Nd
4	84.04	0.00	15.96	Nd	Nd	Nd
5	84.12	0.00	15.88	4.3x10 ⁴	9.3x10 ⁶	19.80
14	84.13	0.00	15.87	Nd	Nd	20.16
20	82.98	0.00	17.02	9.3x10 ³	2.1x10 ⁷	24.47
30	82.78	0.00	17.22	2.3x10 ³	2.1x10 ⁷	33.41
45	81.19	0.00	18.81	Nd	Nd	40.36
50	81.57	0.00	18.43	Nd	Nd	45.28
55	81.36	0.00	18.64	2.3x10 ³	2.3x10 ⁷	47.03
60	81.02	0.00	19.98	Nd	Nd	52.16
63	81.34	0.00	18.66	Nd	Nd	54.17

Nd=Not determine



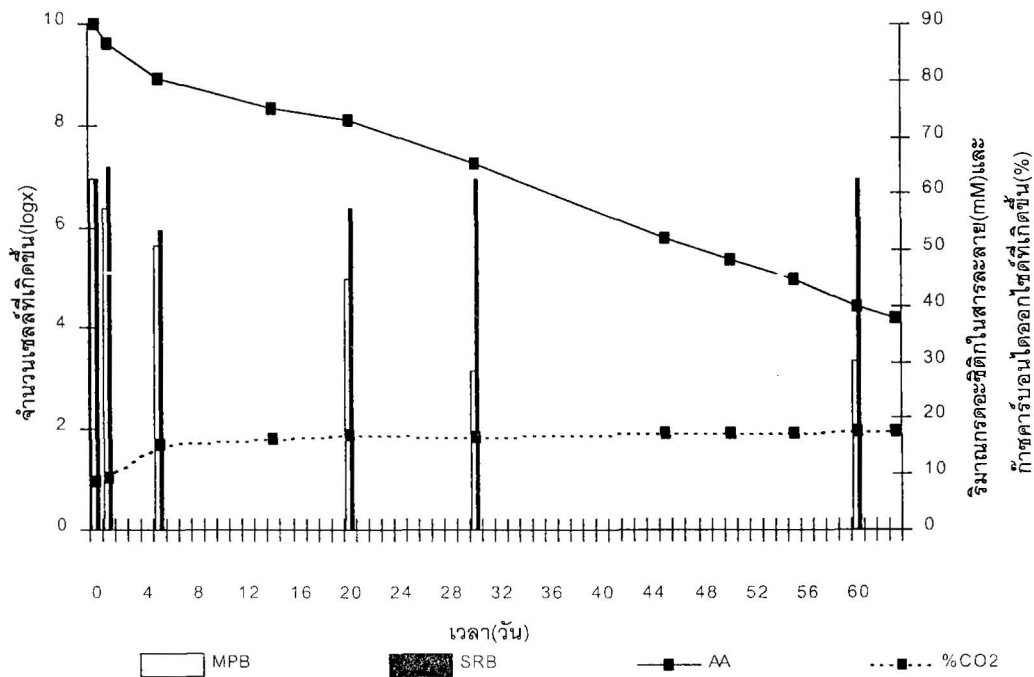
ภาพประกอบ 24 จำนวนของ MPB SRB และการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

อัตราการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ ในช่วง 5 วันแรก กรดอะซิติกลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนานขึ้นพบว่าสามารถใช้กรดอะซิติกได้หมดภายใน 63 วัน จากจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB เริ่มต้น 9.3×10^6 MPN/ml เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า MPB ลดจำนวนลงเหลือเพียง 2.3×10^3 MPN/ml ส่วน SRB เริ่มต้นมีอยู่ประมาณ 9.3×10^6 MPN/ml เมื่อสิ้นสุดการทดลองมี SRB เพิ่มขึ้นจากเดิมเป็น 2.3×10^7 MPN/ml เป็นการใช้อะซิติกโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB ทำให้ SRB เป็น predominant โดยเฉพาะในช่วงวันที่ 5 จนสิ้นสุดการทดลองมี SRB เพิ่มขึ้น ส่วน MPB มีแนวโน้มลดลง (ตาราง 21 และภาพประกอบ 24) ผลการทดลองเป็นทำนองเดียวกับที่ใช้กรดอะซิติก 50 มิลลิโมลาร์ แต่จะเห็นว่าแม้ทำการทดลองไปประมาณ 2 เดือน SRB ในจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA ยังไม่สามารถใช้อะซิติก 70 มิลลิโมลาร์ได้หมด

ตาราง 22 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

Incubation time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)	Acetic acid utilization (mM)
0	91.32	0.00	8.68	9.3×10^6	9.3×10^6	0.00
1	90.56	0.00	9.44	2.3×10^6	9.3×10^6	3.45
2	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
3	86.86	0.00	13.14	Nd	Nd	Nd
5	84.76	0.00	13.92	4.3×10^5	9.0×10^5	9.80
7	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
14	86.06	0.00	16.36	Nd	Nd	14.86
20	83.14	0.00	16.86	9.3×10^4	2.3×10^6	17.05
30	83.33	0.00	16.67	1.5×10^3	9.0×10^6	24.77
45	82.62	0.00	17.38	Nd	Nd	37.84
50	82.55	0.00	17.45	Nd	Nd	41.68
55	82.53	0.00	17.47	Nd	Nd	45.23
60	82.19	0.00	17.81	2.3×10^3	9.0×10^6	50.02
63	82.42	0.00	17.58	Nd	Nd	52.19

Nd=Not determine



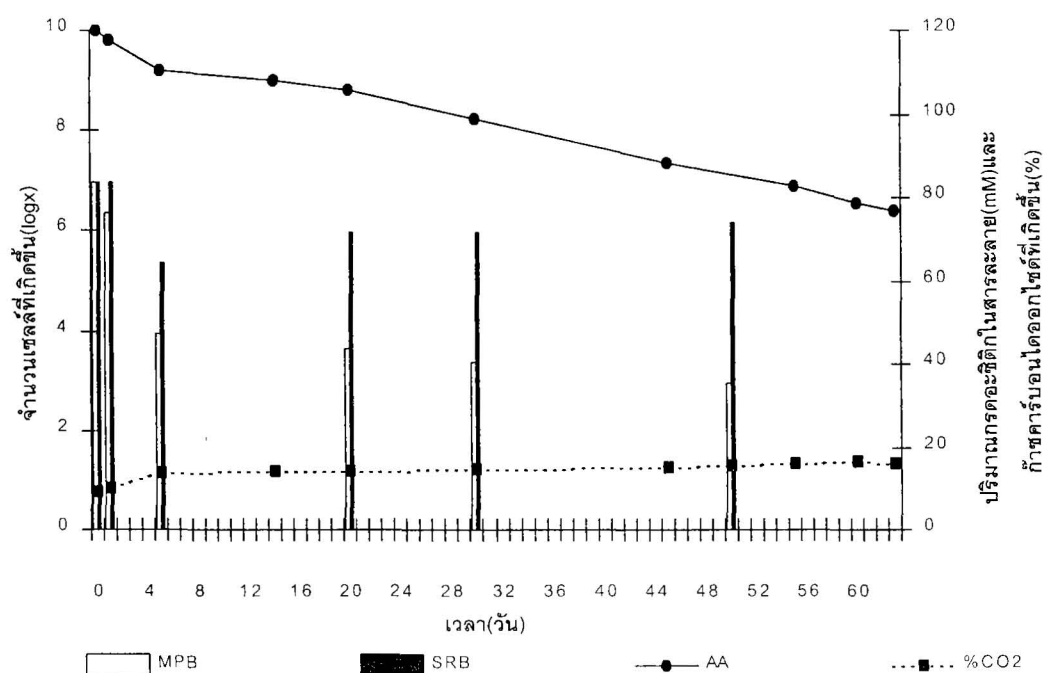
ภาพประกอบ 25 จำนวนของ MPB SRB และ การผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

มีการใช้กรดอะซิติกได้ค่อนข้างช้าซึ่งใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายมากกว่า 63 วัน เมื่อเวลาผ่านไป 63 วัน สามารถใช้กรดอะซิติกได้เพียง 52.19 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าเมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกมากขึ้นจะใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายมากขึ้นด้วย จากจำนวนของ MPB และ SRB ที่เปลี่ยนแปลงไปพบว่า MPB มีแนวโน้มลดลง จากเริ่มต้นมีอยู่ประมาณ 9.3×10^6 MPN/ml เมื่อทำการนับวันที่ 60 ของการทดลองพบว่า MPB ลดลงเหลือประมาณ 2.3×10^3 MPN/ml ส่วนจำนวนเริ่มต้นของ SRB มีอยู่ประมาณ 9.3×10^6 MPN/ml หลังจากใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนาน 60 วัน พบว่ามีจำนวนค่อนข้างคงที่ที่ 10^6 MPN/ml (ตาราง 22 และภาพประกอบ 25) ผลการทดลองเป็นทำนองเดียวกับที่ใช้กรดอะซิติก 70 มิลลิโมลาร์ และจะเห็นว่าแม้ทำการทดลองประมาณ 2 เดือน SRB ในจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA ยังไม่สามารถใช้กรดอะซิติก 90 มิลลิโมลาร์ ได้หมด ในขณะที่การทดลองที่ใช้จุลินทรีย์ผสมสามารถใช้กรดอะซิติก 90 มิลลิโมลาร์ ได้หมดในเวลาประมาณ 45 วัน (ตาราง 16) แสดงว่าปริมาณซัลเฟตที่จำกัดลงในช่วงท้ายๆ ของการทดลองทำให้ SRB ไม่สามารถใช้กรดอะซิติกได้ดีและมีจำนวน SRB ค่อนข้างคงที่หรือมีการยับยั้งการใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์กลุ่ม SRB เมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติก 90 มิลลิโมลาร์

ตาราง 23 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม ที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

Incubation time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)	Acetic acid utilization (mM)
0	90.96	0.00	9.04	9.3x10 ⁶	9.3x10 ⁶	0.00
1	90.10	0.00	9.90	2.3x10 ⁶	9.3x10 ⁶	2.25
2	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
3	86.89	0.00	13.11	Nd	Nd	Nd
5	86.30	0.00	13.70	9.0x10 ³	2.3x10 ⁵	9.44
7	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
14	85.66	0.00	14.34	Nd	Nd	12.13
20	85.62	0.00	14.38	4.3x10 ³	9.3x10 ⁵	14.26
30	85.31	0.00	14.69	2.3x10 ³	9.3x10 ⁵	21.17
45	84.65	0.00	15.35	Nd	Nd	31.87
50	84.39	0.00	15.61	9.3x10 ²	1.5x10 ⁶	Nd
55	83.90	0.00	16.10	Nd	Nd	37.24
60	83.57	0.00	16.43	Nd	Nd	41.53
63	83.85	0.00	16.15	Nd	Nd	43.21

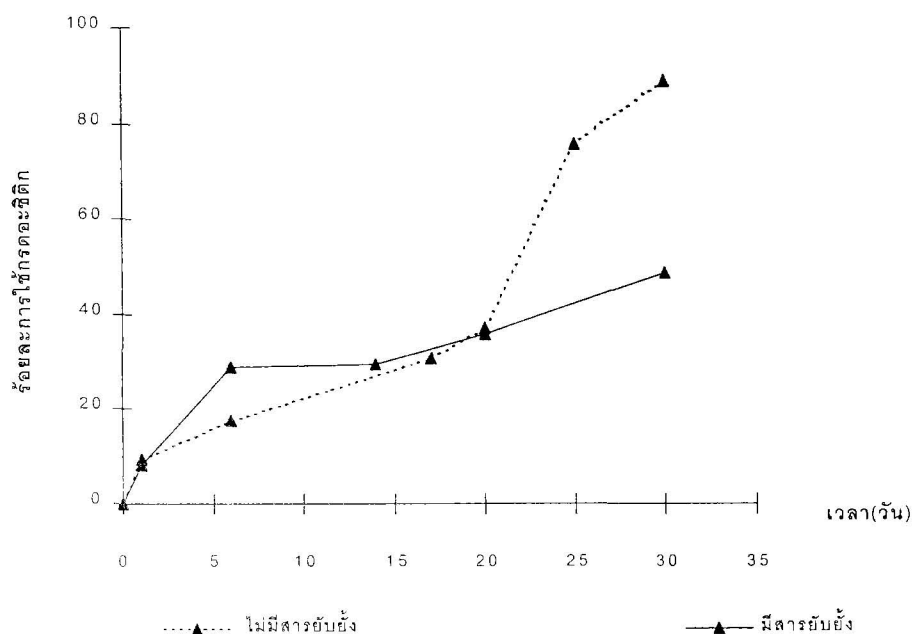
Nd=Not determine



ภาพประกอบ 26 จำนวนของ MPB SRB และ การผลิตก๊าซมีเทนในช่วงเวลาต่างๆ ในการย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

อัตราการใช้กรดอะซิติกค่อนข้างช้า ใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายมากกว่า 63 วัน และสามารถใช้อะซิติกได้เพียง 43.21 มิลลิโมลาร์ ส่วนจำนวนของ MPB มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ จากจำนวนเริ่มต้นมี MPB อยู่ประมาณ 9.3×10^6 MPN/ml เมื่อใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนาน 50 วัน พบว่ามี MPB ลดลงเหลืออยู่ประมาณ 9.3×10^2 MPN/ml ส่วน SRB มีจำนวนค่อนข้างคงที่ที่ 10^6 MPN/ml ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการยับยั้งการใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB เมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกเป็น 120 มิลลิโมลาร์

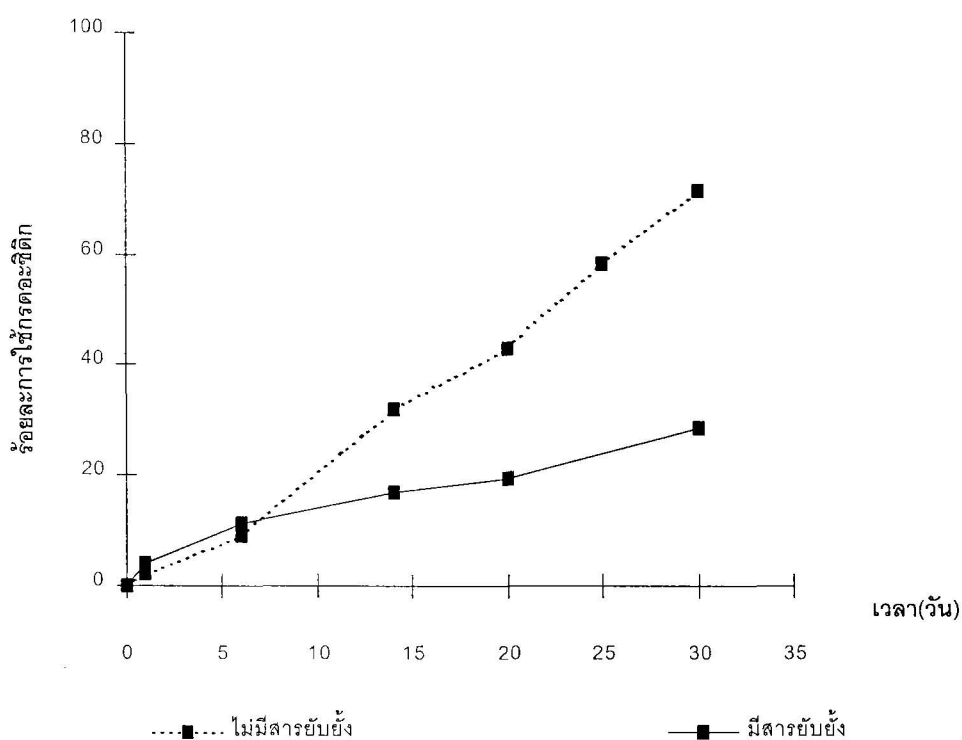
เปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์
ระหว่างจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง



ภาพประกอบ 27 เปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์
ระหว่างจุลินทรีย์ผสม และจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง

การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ พบว่าการใช้กรดอะซิติกในช่วงวันแรกๆ ระหว่างจุลินทรีย์ผสม และจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง พบว่ามีร้อยละของการใช้กรดอะซิติกที่ใกล้เคียงกันมาก แสดงให้เห็นว่าเป็นการใช้กรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB เป็นกลุ่มแรก (ภาพประกอบ 27) เนื่องจากการใช้กรดอะซิติกในจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้งเป็นการใช้โดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB เพียงกลุ่มเดียว จากภาพประกอบพบว่าในจุลินทรีย์ผสมเป็นการใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งมีการใช้กรดอะซิติกในช่วงวันแรกที่ใกล้เคียงกับการใช้กรดอะซิติกในจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้งซึ่งมีการใช้กรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB เพียงกลุ่มเดียว ส่วน MPB ถูกยับยั้งกิจกรรมการใช้ด้วย 2-BESA เมื่อใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนานขึ้นจะพบว่าการใช้กรดอะซิติกในจุลินทรีย์ผสมมีการใช้ที่ค่อนข้างมากกว่าการใช้ในจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง (ภาพประกอบ 27) แสดงให้เห็นว่า ในช่วง 20 วันแรก เป็นกิจกรรมการใช้กรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB ก่อน หลังจากนั้นจึงเป็นกิจกรรมการใช้กรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซมีเทนของจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB ซึ่งสอดคล้องกับค่า ΔG^0 ของการย่อย

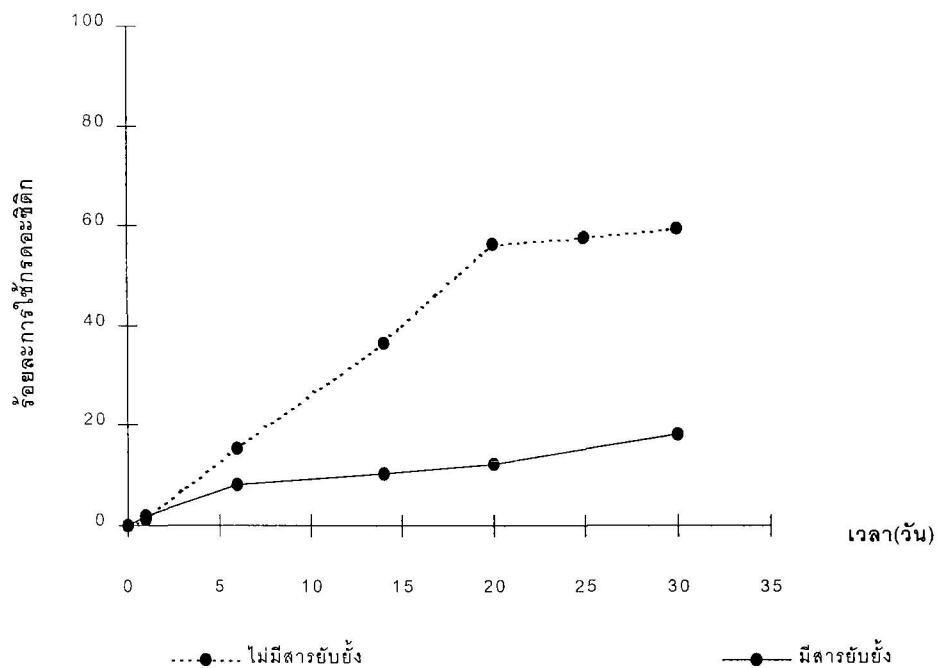
สลายกรดอะซิติก (ตาราง 3) โดยที่ SRB มีค่า ΔG^0 ของการย่อยสลายกรดอะซิติก เป็น -147.6 ส่วน MPB มีค่า ΔG^0 เป็น -31.0 ทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายกรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB เกิดขึ้นก่อนจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB และจากภาพประกอบ 18 พบว่า ในช่วง 20 วันแรกของการย่อยสลายกรดอะซิติกยังไม่มีการผลิตก๊าซมีเทนในระบบ หลังจากใช้ระยะเวลา มากกว่า 20 วัน จึงพบว่ามีกิจกรรมการย่อยสลายกรดอะซิติกไปเป็นก๊าซมีเทน ซึ่งผลการทดลองที่เกิดขึ้นในจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้งสอดคล้องกันคือ ในช่วง 20 วันแรกเป็นกิจกรรมการใช้กรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB ก่อนเป็นกลุ่มแรก หลังจาก 20 วันผ่านไป เป็นส่วนใหญ่เป็นกิจกรรมการใช้กรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซมีเทนของจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB (ภาพประกอบ 27)



ภาพประกอบ 28 เปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ ระหว่างจุลินทรีย์ผสม และจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง

การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติก ระหว่างจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้งในช่วง 5 วันแรก พบว่ามีการใช้กรดอะซิติกในจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้งใกล้เคียงกับการใช้กรดอะซิติกในจุลินทรีย์ผสม (ภาพประกอบ 28) แสดงว่าในช่วง 5 วันแรก การใช้กรดอะซิติกในจุลินทรีย์ผสมเป็นการใช้

กรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB หลังจากใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนานขึ้น MPB เริ่มมีบทบาทในการใช้ ส่วนในจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้งพบว่าการใช้กรดอะซิติกเพิ่มขึ้นจากเดิมน้อยมากอาจเกิดจากเมื่อกรดอะซิติกมีความเข้มข้นสูงขึ้นเริ่มมีผลยับยั้งการย่อยสลายกรดอะซิติกของจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB สอดคล้องกับการใช้กรดอะซิติกในจุลินทรีย์ผสมเมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงกว่า 70 มิลลิโมลาร์ เริ่มเห็นผลยับยั้งการใช้กรดอะซิติกในจุลินทรีย์ผสม (พวงทอง เม่งเกร็ด. 2541) ซึ่งค่า Km ของการใช้กรดอะซิติก ของ SRB มีค่า Km เป็น 0.2 ส่วน MPB มีค่า Km 3.0 ทำให้ SRB มี affinities ต่ออะซิเตตต่ำกว่า MPB เมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงๆ ทำให้ MPB เป็น predominant ส่วน SRB จะถูกยับยั้งการใช้กรดอะซิติก (Shonheit, Kristjansson and Thauer. 1992) และเมื่อมีอัตราส่วนของอะซิเตตต่อซัลเฟตในระบบบำบัดมากกว่า 3.0 นั่นคือมีอะซิเตตมาก จะมีการย่อยสลายอะซิเตตไปเป็นก๊าซมีเทนโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB ทำให้มีกิจกรรมของ MPB เติ่งกว่า SRB (Li & Lam. 1996)

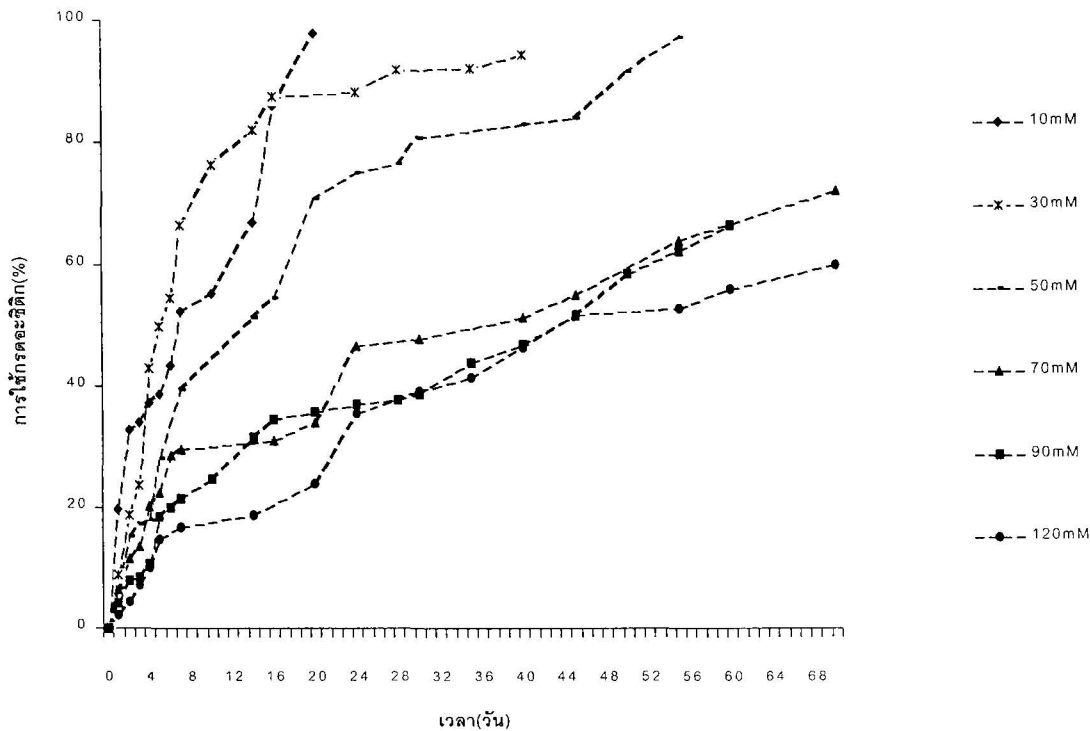


ภาพประกอบ 29 เปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ ระหว่างจุลินทรีย์ผสม และจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง

เปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ ระหว่างจุลินทรีย์ผสม และจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง (ภาพประกอบ 29) การใช้กรดอะซิติกในช่วงวันแรกๆ พบว่ามี กิจกรรมการใช้กรดอะซิติกที่ใกล้เคียงกันแสดงว่าการใช้กรดอะซิติกในช่วงนี้เป็นการใช้ กรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB เพียงกลุ่มเดียว หลังจากนั้นจะพบว่าการใช้กรดอะซิติกใน จุลินทรีย์ผสมมีมากกว่าการใช้ในจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง แสดงให้เห็นว่า SRB เริ่มถูกยับยั้ง กิจกรรมเมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้นสอดคล้องกับค่า Km ของการใช้กรดอะซิติก ซึ่ง SRB มีค่า Km 0.2 ส่วน MPB มีค่า Km 3.0 ทำให้ SRB มี affinities ต่ออะซิเตตต่ำกว่า MPB เมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงๆ ทำให้ MPB เป็น predominant ส่วน SRB จะถูกยับยั้งการใช้ กรดอะซิติก (Shonheit, Kristjansson and Thauer. 1992)

การศึกษาการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10-120 มิลลิโมลาร์ ของ enriched SRB

เมื่อนำ enriched SRB จำนวน 9.3×10^6 MPN/ml ศึกษาการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 30 50 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์ พบว่า ที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 10 30 และ 50 มิลลิโมลาร์ enriched SRB สามารถใช้กรดอะซิติกได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นสูง คือ 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า enriched SRB ถูกยับยั้งเมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่สูงขึ้น ดังภาพประกอบ 27



ภาพประกอบ 30 การใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10-120 มิลลิโมลาร์ ของ enriched SRB

การใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ enriched SRB พบว่า การใช้กรดอะซิติกในช่วงวันแรกๆ ขึ้นกับความเข้มข้นของกรดอะซิติกเริ่มต้น เมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกเริ่มต้นต่ำๆ enriched SRB สามารถใช้กรดอะซิติกได้ดีกว่ามีกรดอะซิติกเริ่มต้นสูง เมื่อใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนานขึ้นพบว่าที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 10-50 มิลลิโมลาร์ มีการใช้กรดอะซิติกได้หมด และมีร้อยละของการใช้กรดอะซิติกมากกว่าร้อยละ 90 ส่วนความเข้มข้นของกรดอะซิติก 70-120 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการใช้กรดอะซิติกได้ค่อนข้างใกล้เคียงกันและใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายมากกว่า 70 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า SRB ถูกยับยั้งเมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงขึ้น ดังภาพประกอบ 30

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

กระบวนการย่อยสลายกรดอะซิติกไปเป็นก๊าซชีวภาพ อาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ในกลุ่มต่างๆ ทั้ง non-methanogenic bacteria และ methanogenic bacteria จากการศึกษาการใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ผสม พบว่า ในช่วงแรกของการใช้กรดอะซิติกไม่มีการผลิตก๊าซมีเทนแต่มีการใช้กรดอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นพบว่าการใช้กรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซมีเทน (จงกล พูนทวี. 2537) และจากงานของฟางทอง ที่ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทนจากกรดอะซิติก (acetoclastic methanogens) โดยทำการ enrichment และศึกษาปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดอะซิติกไปเป็นก๊าซมีเทนพบว่าในช่วงแรก enriched acetoclastic methanogens สามารถใช้กรดอะซิติกเปลี่ยนไปเป็นก๊าซมีเทนได้เร็วกว่า และได้ผลผลิตก๊าซมีเทนสูงกว่าในจุลินทรีย์ผสม (ฟางทอง เม้งเกร็ด. 2541) ที่เป็นเช่นนั้นเพราะในจุลินทรีย์ผสมมีสัดส่วนของจุลินทรีย์ที่ใช้กรดอะซิติกแต่ไม่ผลิตก๊าซมีเทน คือ จุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB ต่อจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่าใน enriched MPB และ SRB มีอัตราการเจริญสูงกว่า MPB ดังนั้นในช่วงแรกของการใช้กรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ผสม SRB จึงสามารถใช้กรดอะซิติกได้ก่อนและเป็น predominant หลังจากนั้นจึงเป็นการใช้กรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซมีเทนของกลุ่ม MPB จึงพบว่าในช่วงท้ายๆ ของการทดลองจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB เป็น predominant

จากการนับจำนวน MPB และ SRB ในจุลินทรีย์ผสม พบว่ามี MPB และ SRB ใกล้เคียงกันคือประมาณ 1.77×10^7 MPN/ml และ 1.96×10^7 MPN/ml ตามลำดับ แต่เนื่องจาก MPB มีการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างช้ากว่า SRB ซึ่งเมื่อนำ MPB มาเลี้ยงในอาหารที่จำเพาะกับ MPB พบว่ามีจำนวนของ MPB เพิ่มขึ้นเป็น 9.3×10^7 MPN/ml และจำนวน SRB ลดลงเหลือ 9.3×10^5 MPN/ml ในการ enriched ครั้งที่ 10 พบว่าปริมาณของ MPB ค่อนข้างคงที่ที่ 10^7 MPN/ml ส่วน SRB ก็ค่อนข้างคงที่ที่ 10^5 MPN/ml แสดงว่าจากเดิมที่มีจำนวน MPB และ SRB ในจุลินทรีย์ผสมจากถังหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดใกล้เคียงกัน เมื่อนำมาเลี้ยงในสารอาหารที่จำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB และมีการถ่ายเชื้อหลายครั้งพบว่า MPB มีจำนวนเพิ่มขึ้นและเป็น predominant ส่วน SRB ซึ่งสามารถใช้กรดอะซิติกได้เช่นเดียวกับ MPB แต่มีจำนวนค่อนข้างคงที่ที่ 10^5 MPN/ml ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณซัลเฟตในสารอาหารที่ใช้เลี้ยงมีอยู่จำกัด และเป็นสารอาหารที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB ดังนั้นจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB จึงมีจำนวนค่อนข้างคงที่ที่ 10^5 MPN/ml ซึ่งสอดคล้องกับงานของฟางทองเมื่อนำจุลินทรีย์ผสมจากถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพ มาเลี้ยงในสารอาหารที่จำเพาะกับ

จุลินทรีย์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่งก็จะทำให้จุลินทรีย์กลุ่มนั้นเจริญได้อย่างรวดเร็วและเป็น predominant ในที่สุดแม้จะมีจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ อยู่ร่วมกันตั้งแต่ต้นซึ่งจากการนำจุลินทรีย์ผสมจากถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกรดอะซิติก 15 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน และทำการถ่ายเชื้อไปในอาหารดังกล่าวทุก 2 สัปดาห์ สามารถเพิ่มจำนวนของ acetoclastic methanogens จาก 2.4×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 89 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด (พวงทอง เม้งเกร็ด. 2541)

ในการทำ enriched SRB ด้วยกรดอะซิติกร้อยละ 0.1 ร่วมกับซัลเฟตพบว่ามีจำนวนของ SRB 7.0×10^5 MPN/ml ไม่พบ MPB ดังนั้น SRB จึงสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้เพียงกลุ่มเดียวและเป็น predominant และเมื่อนำ enriched SRB มาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่มีกรดแลคติกร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามี SRB เพิ่มขึ้นจากเดิม 4.3×10^5 MPN/ml เป็น 2.4×10^8 MPN/ml แสดงว่า SRB สามารถใช้กรดแลคติกได้ดีกว่ากรดอะซิติก หรือ SRB ที่สามารถใช้กรดแลคติกบางชนิดอาจใช้กรดอะซิติกได้ด้วย

การใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ผสมที่ความเข้มข้น 10 30 และ 50 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกเป็น 10 มิลลิโมลาร์ ในช่วงแรกมีการใช้กรดอะซิติกแต่ไม่มีการผลิตก๊าซมีเทน ซึ่งจากจำนวนเริ่มต้นพบว่ามี MPB และ SRB จำนวนที่เท่ากันคือ 9.3×10^6 MPN/ml หลังจากนั้นพบว่า SRB เพิ่มจำนวนขึ้นในช่วง 6 วันแรกเป็น 2.4×10^7 MPN/ml ส่วน MPB มีแนวโน้มลดลงเป็น 4.3×10^6 MPN/ml แสดงให้เห็นว่า SRB มีการเจริญและเพิ่มจำนวนได้ก่อน MPB และใช้กรดอะซิติกในช่วงแรก ทำให้ไม่พบการสร้างก๊าซมีเทนในช่วงแรก SRB จึงเป็น predominant แสดงว่า SRB สามารถใช้กรดอะซิติกได้ดีกว่า MPB ที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Yoda & Kitagawa. (Yoda & Kitagawa. 1987) และด้วยเหตุผลว่า SRB มีค่า K_s เมื่อมีอะซิเตทเป็นสับสเตรท เท่ากับ 102 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MPB มีค่า K_s เป็น 116 มิลลิกรัมต่อลิตร (Bhattachaya & Uberoi. 1996) การใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 และ 50 มิลลิโมลาร์ ก็เช่นกัน พบว่าในช่วงแรกๆ เป็นการใช้กรดอะซิติกโดยกลุ่ม SRB คล้ายกับการทดลองที่ใช้กรดอะซิติก 10 มิลลิโมลาร์ แม้ SRB จะใช้กรดอะซิติกในช่วงแรกก็ยังมีกรดอะซิติกเหลือให้ MPB ใช้จึงพบว่าในช่วงหลังมีจำนวนของ MPB เพิ่มขึ้น และเป็น predominant โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกเป็น 120 มิลลิโมลาร์ ในช่วงหลัง SRB มีจำนวน 1.5×10^5 MPN/ml เท่านั้น ส่วน MPB มีจำนวน 2.4×10^8 MPN/ml ซึ่งสัมพันธ์กับการผลิตก๊าซชีวภาพที่มีการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงท้ายๆ ของการใช้กรดอะซิติก

อัตราการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 30 50 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์ของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง ในช่วงแรกมีอัตราการใช้กรดอะซิติกที่ใกล้เคียงกันและการใช้กรดอะซิติกของแบคทีเรียในกลุ่ม SRB ที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 10 30 และ 50 มิลลิโมลาร์ สูงกว่าการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์ ในช่วงตั้งแต่วันที่ 30 ไปจนถึงวันที่ 50 พบว่า SRB ใช้กรดอะซิติกเพื่อการเจริญเพิ่มจำนวน จากที่มี SRB เริ่มต้น 7.4×10^5 MPN/ml เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามี SRB 1.5×10^8 MPN/ml ที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกเป็น 10 มิลลิโมลาร์ ส่วนที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 30 และ 50 มิลลิโมลาร์ก็เช่นกัน พบว่า SRB เพิ่มจำนวนแต่อัตราการใช้กรดอะซิติกค่อนข้างน้อยกว่าในจุลินทรีย์ผสม โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบว่าในช่วงท้ายๆ ซึ่งเป็นการใช้กรดอะซิติกของทั้ง MPB และ SRB ในจุลินทรีย์ผสม มีการใช้กรดอะซิติกได้เร็วกว่าในจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง ซึ่งเป็นการทำงานของกลุ่ม SRB เพียงกลุ่มเดียว อัตราการใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้งมีอัตราการใช้กรดอะซิติกที่ค่อนข้างช้า โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสูงซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของ SRB จึงพบว่าจำนวนของ SRB ค่อนข้างคงที่ที่ 10^6 MPN/ml ส่วนจำนวนของ MPB มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ

จากการเปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 30 50 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์ ระหว่างจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA เป็นข้อมูลที่ใช้สนับสนุนการทดลองว่าในช่วงแรกเป็นการใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB และหลังจากใช้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้นจึงพบว่าการใช้กรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซมีเทนโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม MPB ซึ่งจากค่า ΔG^0 ของปฏิกิริยาการใช้กรดอะซิติกพบว่า SRB สามารถใช้กรดอะซิติกได้ดีกว่า MPB และค่า Km ของ SRB ต่ำกว่า MPB ดังนั้นในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกต่ำๆ SRB สามารถใช้กรดอะซิติกได้ดีกว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงๆ SRB มีค่า Km สำหรับอะซิเตท 0.2 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท และ Km ของ MPB เท่ากับ 3.0 มิลลิโมลาร์ (Isa, Grusenmeyer & Verstrate. 1986) ; (Yoda & Kitagawa. 1987) จากการที่ค่า Km ของอะซิเตทของ SRB ต่ำกว่า MPB ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของอะซิเตทต่ำๆ SRB จึงแข่งขันกับ MPB ที่ความเข้มข้นของอะซิเตทสูงๆ พบว่า MPB สามารถแข่งขันได้กับ SRB ในการใช้อะซิเตท สัมพันธ์กับการใช้กรดอะซิติกในจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA เป็นการใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB เพียงกลุ่มเดียว และไม่มีการผลิตก๊าซมีเทนในช่วงนี้ แต่ในช่วงท้ายๆ ของการทดลอง MPB มีบทบาทในการใช้กรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซมีเทนและเป็น predominant เนื่องจาก MPB มีความสามารถในการเจริญได้ค่อนข้างช้ากว่า SRB จึงพบว่า MPB เจริญและใช้กรดอะซิติกได้หลังจากที่ SRB ใช้ไปแล้วในช่วงแรก สัมพันธ์กับการผลิตก๊าซมีเทนที่พบที่เกิดขึ้นในช่วงท้ายๆ ของการทดลอง

จากผลการทดลองการใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA และ enriched SRB สอดคล้องกันเมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติก 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าเมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงขึ้น SRB ถูกยับยั้งการใช้กรดอะซิติก เมื่อเปรียบเทียบการใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ผสม จุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA และ enriched SRB พบว่า ในช่วงแรกมีการใช้กรดอะซิติกแต่ไม่มีการผลิตก๊าซมีเทน ผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าเป็นกิจกรรมการใช้กรดอะซิติกของจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB จากจำนวนของ SRB ที่เพิ่มขึ้น และเป็น predominant เป็นข้อมูลที่ใช้ในการสนับสนุน และหลังจากนั้นพบว่ามีการใช้กรดอะซิติกเพื่อใช้ในการผลิตก๊าซมีเทนซึ่ง MPB มีกิจกรรมเด่นชัดกว่า SRB และทำให้ MPB เป็น predominant ในตอนท้ายๆ ของการใช้กรดอะซิติก

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษา Interaction ของ SRB และ MPB ที่ใช้กรดอะซิติกในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจนจะให้เห็นผลที่ชัดเจนขึ้นควรศึกษาโดยการใช้เชื้อบริสุทธิ์หรือเปลี่ยนแปลงไปใช้กรดอินทรีย์ตัวอื่น
2. ผลจากการศึกษาการใช้กรดอะซิติกโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม SRB และ MPB ควรนำมาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในขั้นตอนของการย่อยสลายกรดอะซิติกไปเป็นก๊าซชีวภาพเพื่อนำมาใช้ในการทำนายการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นและควบคุมหรือปรับปรุงระบบบำบัด

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- เกษแก้ว ปาณะมณฑา. (2535). การศึกษาการย่อยสลายเปลี่ยนสัปประรดและสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยจุลินทรีย์จากถ้ำหมักเปลี่ยนสัปประรดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- ๕๔ คณะกรรมการจัดทำคู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย. (2535) คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สมาคมวิศวกรสิ่งแวดลอมไทย (สวสท.) และ World Environment Center (WEC).
- ๖๔ จงกล พูนทวี. (2537). ผลของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายต่อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- ๖๕ นพพร เจตนาชัย. (2529). การศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิปานกลาง. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- ๖๖ พวงทอง เม้งเกร็ด. (2541). การใช้กรดอะซิติกระหว่างจุลินทรีย์ผสมและจุลินทรีย์ที่ผ่านการ enrichment ด้วยกรดอะซิติกในการผลิตก๊าซชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- Bhattachaya, S.K. and Uberoi, V. (1994). "Interaction between Acetate Fed Sulfate Reducers and Methanogenesis," *Water Research*. 30(10) : 2239-2246.
- Bhada, A., Mukhopadhyay, S.H., and Ghose, T.K. (1984). "A Kinetic Model for Methanogenesis of Acetic Acid in Multireactor System," *Biotechnology and Bioengineering*. 26(1) : 257-264.
- Cappenberg, T.E. and Prins, R.A. (1974). "Interactions between Sulfate Reducing and Methane Producing Bacteria in Bottom Deposits of Frech-Water Lake," *Antonie van Leeuwenhoek*. 40(2) : 457-469.
- Choi, E. and Rim, J.M. (1991). "Competition and Inhibition of Sulfate Reducers and Treatment," *Water Science and Technology*. 23(5) : 1259-1264.

- Elferink, S.J., Oude, W.H. and Visser, A. (1994). "Sulfate Reduction in Methanogenic Bioreactors," *FEMS Microbiology Review*. 15 : 119-136.
- Isa, Z., Grusenmeyer, S. and Verstrate, W. (1986). "Sulfate Reduction Relative to Methane Production in High-Rate Anaerobic Digestion: Technical Aspect," *Applied and Environmental*. 51(5) : 572-579.
- Kalyuzhnyi, S. and Fedorovich, V. (1997). "Integrated Mathematical Model of UASB Reactor for Competition between Sulphate Reduction and Methanogenesis," *Water Science and Technology*. 36(6-7) : 201-208.
- Koster, I.W. and Rinzema, A. (1986). "Sulfide Inhibition of The Mathanogenic Activity of Granular Sludge at Various pH-Levels," *Water Research*. 20(12): 1561-1567.
- Lens, P.N., et al. (1995). "Sulfate Reducing and Methane Producing Bacteria in Aerobic Wastewater Treatment System," *Water Research*. 29(3) : 871-880.
- . (1997). "Kinetic of Acetate Oxidation by Two Sulfate Reducers Isolated from Anaerobic Granular Sludge," *Applied and Environmental Microbiology*. 64(6) : 2301-2303.
- Li, Y.Y. and Lam, S. (1996). "Interaction between Methanogenic Sulfate-Reducing and Syntrophic Acetogenic Bacteria in the Anaerobic Degradation of Benzoate," *Water Science and Technology*. 30(7) : 1555-1562.
- Lovley, D.R., Dwyer, D.F. and Klung, M.J. (1982) "Kinetic Analysis of Competition between Sulfate-Reducers and Methanogens in Sediment," *Applied and Environmental Microbiology*. 43(12) : 1373-1379.
- Macfalane, G.T. and Gibson, G.R. (1991). "Sulfate-Reducing Bacteria," *Anaerobic a Practical Approach*. 201-220.
- Mizuno, O., Li, Y.Y. and Noike, T. (1994). "Effect of Sulfate Concentration and Sludge Retention Time on the Interaction between Methane Production and Sulfate Reduction for Butyrate," *Water Science and Technology*. 30(6) : 45-54.

- Mizuno, O. and Li, Y.Y. (1997). "The Behavior of Sulfate –Reducing Bacteria in Acidogenic Phase of Anaerobic Digestion," *Water Science and Technology*. 30(7) : 1346-1350.
- Oremland, R.S. and Polcin, S. (1982). "Methanogenesis and Sulfate Reduction : Competitive and Noncompetitive Substrates in Estuarine Sediments," *Applied and Environmental Microbiology*. 44(5) : 1270-1279.
- Parkin, G.J., et al. (1989). "Interaction between Sulfate-Reducing Bacteria within Marine and Estuarine Sediments with Different Rates of Sulfate Reduction," *Journal of General Microbiology*. 135(1) : 175-187.
- Shonheit, P., Kristjansson, J.K. and Thauer, R.K. (1982). "Kinetic Mechanism for the Cultivation of Pure Cultures of Methanogens in Synthetic Media," *Journal of Applied Bacteriology*. 45(2) : 346-356.
- 3 E Staley, J.M., Bryant, M.P. and Pfennig, N. R. G. (1989). *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. 8th ed. Baltimore USA.
- Tanaka, N. and Tanaka, K. (1995). "Control of Hydrogen Sulfide and Degradation of Organic Matter by Air Injection Into a Wastewater Force Main," *Water Science Technology*. 31(7) : 273-282.
- Visser, A., Pol, L.W.H. and Lettinga, G. (1996). "Competition of Methanogenic and Sulfidogenic Bacteria," *Water Science and Technology*. 33(3) : 99-110.
- Widdel, F., and Pfennig, N. (1988). "Dissimilatory Sulfate-or Sulfur-Reducing Bacteria," *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th ed.* Baltimore : Williams and Wilkins.
- Yoda, M. and Kitagawa, M. (1987). "Long Term Competition between Sulfate-Reducing and Methane-Producing Bacteria for Acetate in Anaerobic Biofilm," *Water Research*. 21(12) : 1547-1556.
- Zhang, T.C. and Noike, T. (1991). "Comparison of One-Phase Anaerobic Digestion Processes in Characteristics of Substrate Degradation and Bacterial Population Levels," *Water Science and Technology*. 23 : 1157-1166.

Zinder, S.H. (1992). "Methanogenesis and Biochemistry," Encyclopedia of Microbiology.
New York : John Willey & Sons. 3: 81-109.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก

ก.1 สูตรอาหารที่ใช้ในการนับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม MPB (กรัม/ลิตร)

Acetic acid	5.00 g
Methanol	5.00 ml
KH_2PO_4	0.40 g
K_2HPO_4	0.40 g
NH_4Cl	1.00 g
MgCl_2	0.10 g
Mineral solution ^a	10.00 ml
Vitamin solution ^b	10.00 ml
NaHCO_3	5.00 g
L-Cysteine $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.50 g
$\text{NaS}_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.50 g
Resazurin	0.002 g
pH	7.0~7.2

Component a.

Mineral solution (g/l)

Nitritotriacetic acid	4.50 g
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.40 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.12 g
$\text{ALK} (\text{SO}_4)_2$	0.01 g
NaCl	1.00 g
CaCl_2	0.02 g
Na_2MoO_4	0.10 g
ZnCl_2	0.10 g
H_3BO_3	0.01 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02 g

component b.Vitamin solution(g/l)

Biotin	2.00 g
Folic acid	2.00 g
Pyridoxine HCl	10.00 g
Thiamine HCl	5.00 g
Riboflavin	5.00 g
Nicotinic acid	5.00 g
DL-Calcium panthothenate	5.00 g
Vitamin B ₁₂	0.10 g
p-aminobenzoic acid	5.00 g
Lipoic acid	5.00 g

ก.2 สูตรอาหารที่ใช้ในการ enrichment และนับเชื้อ SRB (g/l)

Acetic acid	5.00 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
NH ₄ Cl	1.00 g
Na ₂ SO ₄	1.00 g
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.10 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.20 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.10 g
Sodium thioglycolate	0.10 g
Ascorbic acid	0.10 g
Yeast extract	1.00 g
pH	7.0~7.2

**ก.3 สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงและศึกษากิจกรรมการใช้กรดอะซิติกของแบคทีเรียใน
กลุ่ม MPB และ SRB**

กรดอะซิติกความเข้มข้น 10 30 50 70 90 และ 120 มิลลิโมลาร์

Digestion fluid	50.00% (v/v)
Distilled water	50.00% (v/v)
Yeast extract	0.02% (v/v)
pH	7.0~7.2

ก.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาด้วย SEM(Scanning Electron Microscope)

1. ร้อยละ 2.5 Glutaraldehyde ใน 0.1 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.2
2. ร้อยละ 1 OsO_4 ใน 0.1 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.2
3. 0.1 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.2
4. เอทานอล หรือ อะซิโตน ความเข้มข้นร้อยละ 30 50 70 90 และร้อยละ 100

วิธีการ

1. ตัดตัวอย่างที่ติดอยู่บนอาหารให้มีขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร
2. แช่ตัวอย่าง(Pre-fix) ในร้อยละ 2.5 Glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 1 ชั่วโมง หรือ ขำมคั้นในตู้เย็น
3. ล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 3 ครั้งๆ ละ 10-15 นาที
4. แช่ตัวอย่าง(Pre-fix) ร้อยละ 1 OsO_4 ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 หรือน้ำกลั่น นาน 1-2 ชั่วโมง
5. ล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 หรือน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 10-15 นาที
6. ขจัดน้ำออกจากตัวอย่างด้วยเอทานอล หรือ อะซิโตนความเข้มข้นร้อยละ 30 50 70 90 และร้อยละ 100 ในแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 2 ครั้งใช้เวลาครั้งละประมาณ 10-15 นาที ตามลำดับ
7. ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่องทำให้แห้ง(critical point dryer)
8. ติดตัวอย่างบนฐานรองตัวอย่าง(stub) ด้วยเทป 2 หน้าหรือกาว
9. นำตัวอย่างไปฉาบทอง(ion sputter)
10. นำไปส่องดูด้วย SEM

ก.5 ตาราง 22 MPN (Most Probable Number) : 3 tube : dilution

Combination of Positive	MPN Index 100 ml	95% Confidence		Combination of Positive	MPN Index 100 ml	95% Confidence	
		Limits				Limits	
		Lower	Upper			Lower	Upper
0-0-0	<3						
0-0-1	3	<0.5	9	3-0-0	23	44	120
0-1-0	3	<0.5	13	3-0-1	39	7	130
0-2-0	-	-	-	3-0-2	64	15	380
1-0-0	4	<0.5	21	3-1-0	43	7	210
1-0-1	7	1	21	3-1-1	75	14	230
1-1-0	7	1	23	3-1-2	120	30	380
1-1-1	11	3	36	3-2-0	93	15	380
1-2-0	11	3	36	3-2-1	150	30	440
2-0-0	9	1	36	3-2-2	210	35	470
2-0-1	14	3	37	3-3-0	240	36	1,300
2-1-0	15	3	44	3-3-1	460	71	2,400
2-1-1	20	7	89	3-3-2	1,100	150	4,800
2-2-0	21	4	47	3-3-3	>2,400		
2-2-1	28	10	150				
2-3-0	-	-	-				

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข

ตาราง 23 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม

incubation time (day)	%CH ₄	%CO ₂	total gas production (ml/day)	CH ₄ production (ml/day)	CO ₂ Production (ml/day)	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	acetic acid utilization (%)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)
0	5.55	94.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.3*10 ⁶	9.3*10 ⁶
1	7.57	92.43	0.00	0.00	0.00	0.83	0.83	10.33	4.3*10 ⁷	2.3*10 ⁷
6	22.88	77.12	0.00	0.00	0.00	4.19	0.70	52.14	4.3*10 ⁶	2.4*10 ⁷
14	54.21	45.79	0.40	0.22	0.18	5.53	0.39	68.82	3.9*10 ⁶	9.3*10 ⁷
17	69.24	30.76	2.00	1.38	0.62	7.03	0.41	87.49	Nd	Nd
20	84.12	15.88	6.70	5.64	1.06	8.02	0.40	99.81	9.3*10 ⁶	1.5*10 ⁸
Total			9.10	7.24	1.86	8.02				

ตาราง 24 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม

Incubation time (day)	%CH ₄	%CO ₂	total gas production (ml/day)	CH ₄ production (ml/day)	CO ₂ Production (ml/day)	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	acetic acid utilization (%)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)
0	5.33	94.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.3*10 ⁶	9.3*10 ⁶
1	7.80	92.20	0.00	0.00	0.00	5.62	5.62	21.63	4.3*10 ⁶	2.3*10 ⁶
6	19.38	80.62	0.00	0.00	0.00	7.63	1.27	29.37	9.3*10 ⁷	9.3*10 ⁷
14	39.69	60.31	0.50	0.20	0.30	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
17	56.39	43.61	2.40	1.35	1.05	8.35	0.49	32.14	2.1*10 ⁷	2.3*10 ⁸
20	71.70	28.30	3.20	2.29	0.91	9.19	0.46	35.37	2.4*10 ⁷	2.4*10 ⁸
23	90.11	9.89	5.30	4.78	0.52	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
25	94.59	5.41	7.70	7.28	0.42	19.29	0.77	74.25	Nd	Nd
30	97.64	2.36	8.40	8.20	0.20	22.32	0.74	85.91	Nd	Nd
32	96.45	3.55	6.00	5.79	0.21	25.84	0.81	99.46	Nd	Nd
Total			33.50	29.89	3.61	25.84				

ตาราง 25 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม

Incubation time (day)	%CH ₄	%CO ₂	total gas production (ml/day)	CH ₄ production (ml/day)	CO ₂ Production (ml/day)	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	acetic acid utilization (%)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)
0	5.84	94.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.3*10 ⁵	9.3*10 ⁵
1	8.26	91.74	0.00	0.00	0.00	8.78	8.78	19.67	4.3*10 ⁶	4.3*10 ⁶
6	17.29	82.71	0.00	0.00	0.00	17.84	2.97	36.40	4.6*10 ⁷	9.3*10 ⁷
14	41.38	58.62	0.60	0.25	0.35	20.06	1.43	40.93	4.6*10 ⁷	2.3*10 ⁸
17	59.63	40.37	2.00	1.19	0.81	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
20	77.43	22.57	4.40	3.41	0.99	23.62	1.18	48.19	4.6*10 ⁷	4.6*10 ⁸
23	92.19	7.81	7.40	6.82	0.58	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
25	95.63	4.37	9.20	8.80	0.40	37.40	1.50	76.31	Nd	Nd
30	97.18	2.82	11.60	11.27	0.33	42.51	1.42	86.43	Nd	Nd
32	97.48	2.52	10.30	10.04	0.26	44.45	1.39	90.69	Nd	Nd
38	97.64	2.36	9.60	9.37	0.23	48.93	1.29	99.83	Nd	Nd
Total			55.10	51.15	3.95					

ตาราง 26 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม

Incubation time (day)	%CH ₄	%CO ₂	total gas production (ml/day)	CH ₄ production (ml/day)	CO ₂ Production (ml/day)	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	acetic acid utilization (%)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)
0	6.28	93.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.3*10 ⁶	9.3*10 ⁶
1	8.36	91.64	0.00	0.00	0.00	6.43	6.43	9.40	2.3*10 ⁶	4.3*10 ⁶
6	18.61	81.39	0.00	0.00	0.00	12.03	2.01	17.58	2.4*10 ⁷	2.4*10 ⁷
14	30.41	69.59	0.00	0.00	0.00	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
17	45.55	54.45	0.10	0.05	0.05	21.16	1.24	30.93	9.3*10 ⁶	9.0*10 ⁷
20	58.05	41.95	0.70	0.41	0.29	25.33	1.27	37.03	2.3*10 ⁶	9.3*10 ⁷
23	79.80	20.20	5.10	4.07	1.03	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
25	87.49	12.51	7.60	6.65	0.95	51.75	2.07	75.64	Nd	Nd
30	94.79	5.21	10.70	10.14	0.56	60.87	2.03	88.97	2.4*10 ⁸	4.3*10 ⁶
32	97.17	2.83	14.00	13.60	0.40	64.31	2.01	94.00	Nd	Nd
38	96.98	3.02	4.00	3.88	0.12	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
40	97.41	2.59	8.28	8.07	0.21	68.01	1.70	99.41	Nd	Nd
Total			50.48	46.86	3.62					

ตาราง 27 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม

Incubation time (day)	%CH ₄	%CO ₂	total gas production (ml/day)	CH ₄ production (ml/day)	CO ₂ Production (ml/day)	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	acetic acid utilization (%)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)
0	7.36	92.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.3*10 ⁶	9.3*10 ⁶
1	8.34	91.66	0.00	0.00	0.00	1.84	1.84	2.11	2.3*10 ⁶	4.3*10 ⁵
6	20.81	79.19	0.00	0.00	0.00	7.89	1.31	9.06	1.5*10 ⁷	2.3*10 ⁷
14	25.90	74.10	0.00	0.00	0.00	27.97	2.00	31.13	2.1*10 ⁷	4.3*10 ⁸
17	34.47	65.53	0.00	0.00	0.00	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
20	48.76	51.24	0.10	0.05	0.05	37.34	1.87	42.90	2.4*10 ⁷	1.1*10 ⁹
23	73.20	26.80	3.40	2.49	0.91	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
25	82.33	17.67	4.10	3.38	0.72	50.73	2.03	58.28	Nd	Nd
30	91.98	8.02	5.70	5.24	0.46	62.38	2.08	71.66	1.5*10 ⁸	9.3*10 ⁷
32	96.73	3.27	13.00	12.57	0.43	66.51	2.08	76.41	Nd	Nd
38	97.46	2.54	7.20	7.02	0.18	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
40	98.04	1.96	14.60	14.31	0.29	83.20	2.08	95.58	Nd	Nd
45	96.20	1.42	8.30	7.98	0.12	86.27	1.92	99.11	9.3*10 ⁷	4.6*10 ⁶
Total			56.40	53.05	3.35	86.27				

ตาราง 28 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสม

Incubation time (day)	%CH ₄	%CO ₂	total gas production (ml/day)	CH ₄ production (ml/day)	CO ₂ production (ml/day)	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	acetic acid utilization (%)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)
0	7.39	92.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.3*10 ⁶	9.3*10 ⁶
1	8.89	91.11	0.00	0.00	0.00	1.46	1.46	1.25	2.3*10 ⁶	2.3*10 ⁶
6	18.93	81.07	0.00	0.00	0.00	18.03	3.01	15.46	2.4*10 ⁷	9.3*10 ⁶
14	19.06	80.94	0.00	0.00	0.00	42.46	3.03	36.42	9.3*10 ⁵	4.3*10 ⁸
17	19.43	80.57	0.00	0.00	0.00	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
20	22.92	77.08	0.00	0.00	0.00	65.81	3.29	56.44	4.3*10 ⁵	2.4*10 ⁹
23	28.12	71.88	0.00	0.00	0.00	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
25	28.70	71.30	0.00	0.00	0.00	67.15	2.69	57.59	Nd	Nd
30	31.00	69.00	0.00	0.00	0.00	69.37	2.31	59.50	9.3*10 ⁸	9.3*10 ⁷
32	31.05	68.95	0.00	0.00	0.00	71.85	2.25	61.62	Nd	Nd
38	34.62	65.38	0.00	0.00	0.00	76.34	2.01	65.48	Nd	Nd
40	45.76	54.24	0.00	0.00	0.00	79.55	1.99	68.23	Nd	Nd
45	65.47	34.53	2.5	1.64	0.86	83.42	1.85	71.55	9.3*10 ⁸	4.3*10 ⁷
50	88.71	11.29	2.7	2.40	0.30	86.70	1.73	74.36	Nd	Nd
52	92.65	7.35	4.5	4.17	0.33	89.12	1.71	76.44	Nd	Nd
55	97.42	2.58	13.5	13.15	0.35	96.97	1.76	83.17	2.4*10 ⁸	1.5*10 ⁵
60	98.07	1.93	15.5	15.20	0.30	107.85	1.8	92.50	Nd	Nd
63	98.07	1.93	13.5	13.24	0.26	110.36	1.75	94.65	Nd	Nd
70	98.22	1.78	15	14.73	0.27	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
78	97.77	2.23	9.5	9.29	0.21	116.4	1.49	99.83	Nd	Nd
Total			76.7	73.82	2.88					

ตาราง 29 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

Incubation time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	acetic acid utilization (%)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)
0	97.28	0.07	2.65	0.00	0.00	0.00	8.3*10 ⁵	7.4*10 ⁵
1	97.49	0.06	2.44	1.19	1.19	12.28	9.3*10 ⁶	1.5*10 ⁵
2	97.18	0.21	2.61	2.04	1.02	21.05	4.3*10 ⁶	4.3*10 ⁶
3	Nd	Nd	Nd	2.50	0.83	25.80	1.5*10 ⁵	9.0*10 ⁵
4	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	2.4*10 ⁷	2.3*10 ⁷
7	95.15	0.39	4.46	3.67	0.52	37.87	4.6*10 ⁷	2.4*10 ⁸
14	92.80	0.36	6.84	4.36	0.31	45.00	9.3*10 ⁵	1.1*10 ⁶
20	91.76	0.34	7.90	5.54	0.28	57.17	9.3*10 ⁵	1.5*10 ⁸
30	91.46	0.32	8.22	9.06	0.30	93.50	Nd	Nd

ตาราง 30 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

Incubation Time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	acetic acid utilization (%)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)
0	99.07	0.06	0.87	0.00	0.00	0.00	8.3*10 ⁵	7.4*10 ⁵
1	99.10	0.10	0.80	2.63	2.63	9.26	2.4*10 ⁶	9.3*10 ⁵
2	98.67	0.25	1.08	6.89	3.45	24.25	2.4*10 ⁶	9.0*10 ⁵
3	Nd	Nd	Nd	9.00	3.00	31.68	3.9*10 ⁵	9.3*10 ⁵
4	Nd	Nd	Nd	12.98	3.25	45.69	2.4*10 ⁶	4.3*10 ⁶
7	97.78	0.39	1.83	14.62	51.46	51.46	1.1*10 ⁸	2.4*10 ⁷
14	97.18	0.40	2.45	18.58	65.40	65.40	4.3*10 ⁵	1.1*10 ⁸
20	96.37	0.37	3.26	22.94	80.75	80.75	9.0*10 ⁴	9.3*10 ⁶
30	96.25	0.34	3.41	26.13	91.97	91.97	Nd	Nd
45	96.14	0.31	3.55	27.62	97.22	97.22	Nd	Nd

ตาราง 31 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

Incubation Time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	Acetic acid utilization (%)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)
0	96.81	0.02	3.17	0.00	0.00	0.00	8.3*10 ⁵	7.4*10 ⁵
1	96.16	0.02	3.82	2.90	2.90	5.95	2.4*10 ⁶	9.0*10 ⁴
2	97.09	0.01	2.90	6.81	3.41	13.97	4.3*10 ⁵	4.3*10 ⁴
3	Nd	Nd	Nd	8.05	2.68	16.52	2.3*10 ⁵	9.0*10 ⁴
4	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	2.4*10 ⁵	4.3*10 ⁵
7	95.47	0.19	4.04	10.66	1.52	21.87	2.4*10 ⁶	9.3*10 ⁵
14	93.00	0.18	5.92	22.49	1.61	46.14	9.0*10 ⁴	2.4*10 ⁷
20	92.89	0.16	6.95	38.29	1.91	78.56	9.0*10 ³	4.3*10 ⁷
30	92.82	0.15	7.03	41.51	1.38	85.17	Nd	Nd
45	92.74	0.16	7.10	46.25	1.03	94.89	Nd	Nd
50	92.71	0.18	7.11	47.81	0.96	98.09	Nd	Nd

ตาราง 32 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

Incubation Time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	acetic acid utilization (%)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)
0	90.48	0.00	9.52	0.00	0.00	0.00	9.3*10 ⁶	9.3*10 ⁶
1	87.84	0.00	12.16	5.50	5.50	68.41	4.3*10 ⁶	9.3*10 ⁶
3	84.72	0.00	15.28	Nd	Nd	8.04	Nd	Nd
4	84.04	0.00	15.96	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
5	84.12	0.00	15.88	19.80	3.96	28.94	4.3*10 ⁴	9.3*10 ⁶
8	84.54	0.00	15.46	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
11	84.82	0.00	15.18	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
14	84.13	0.00	15.87	20.16	1.44	29.47	Nd	Nd
16	83.87	0.00	16.13	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
18	84.51	0.00	15.49	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
20	82.98	0.00	17.02	24.47	1.22	35.77	9.0*10 ³	2.1*10 ⁷
23	82.86	0.00	17.14	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
28	83.34	0.00	16.66	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
30	82.78	0.00	17.22	33.41	1.11	48.84	2.3*10 ³	2.1*10 ⁷
36	82.40	0.00	17.60	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
45	81.19	0.00	18.81	40.36	0.90	59.00	Nd	Nd
50	81.57	0.00	18.43	45.28	0.91	66.19	Nd	Nd
55	81.36	0.00	18.64	47.03	0.86	68.75	2.3*10 ³	2.3*10 ⁷
60	81.02	0.00	18.98	52.16	0.87	76.25	Nd	Nd
63	81.34	0.00	18.66	54.71	0.87	80.00	Nd	Nd

ตาราง 33 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

incubation time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	Acetic acid utilization (%)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)
0	91.32	0.00	8.68	0.00	0.00	0.00	9.3*10 ⁶	9.3*10 ⁶
1	90.56	0.00	9.44	3.45	3.45	3.96	2.3*10 ⁶	1.5*10 ⁷
3	86.86	0.00	13.14	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
4	86.08	0.00	13.92	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
5	84.76	0.00	15.24	9.80	1.96	11.24	4.3*10 ⁵	9.0*10 ⁵
8	84.05	0.00	15.95	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
11	86.06	0.00	13.94	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
14	83.64	0.00	16.36	14.86	1.06	17.05	Nd	Nd
16	83.49	0.00	16.51	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
18	84.44	0.00	15.56	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
20	83.14	0.00	16.86	17.05	0.85	19.56	9.3*10 ⁴	2.3*10 ⁶
23	83.02	0.00	16.98	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
28	85.64	0.00	14.36	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
30	83.33	0.00	16.67	24.77	0.83	28.42	1.5*10 ³	9.0*10 ⁶
36	83.11	0.00	16.89	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
45	82.62	0.00	17.38	37.84	0.84	43.42	Nd	Nd
50	82.55	0.00	17.45	41.68	0.83	47.82	Nd	Nd
55	82.53	0.00	17.47	45.23	0.82	51.90	Nd	Nd
60	82.19	0.00	17.81	50.02	0.83	57.39	2.3*10 ³	9.0*10 ⁶
63	82.42	0.00	17.58	52.19	0.83	59.88	Nd	Nd

ตาราง 34 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ โดยจุลินทรีย์ผสมที่ใส่สารยับยั้ง 2-BESA

Incubation Time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	acetic acid utilization (%)	MPB (MPN/ml)	SRB (MPN/ml)
0	90.96	0.00	9.04	0.00	0.00	0.00	9.3*10 ⁶	9.3*10 ⁶
1	90.10	0.00	9.90	2.25	2.25	1.94	2.3*10 ⁶	9.3*10 ⁶
3	86.89	0.00	13.11	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
4	86.07	0.00	13.93	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
5	86.30	0.00	13.70	9.44	1.89	8.12	9.0*10 ³	2.3*10 ⁵
8	86.50	0.00	13.50	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
11	86.83	0.00	13.17	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
14	85.66	0.00	14.34	12.13	0.87	10.44	Nd	Nd
16	85.44	0.00	14.56	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
18	86.61	0.00	13.39	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
20	85.62	0.00	14.38	14.26	0.71	12.27	4.3*10 ³	9.3*10 ⁵
23	85.50	0.00	14.50	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
28	85.68	0.00	14.32	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
30	85.31	0.00	14.69	21.17	0.71	18.21	2.3*10 ³	9.3*10 ⁵
36	85.15	0.00	14.85	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
45	84.65	0.00	15.35	31.87	0.71	27.42	Nd	Nd
50	84.39	0.00	15.61	Nd	Nd	Nd	9.3*10 ²	1.5*10 ⁶
55	83.9	0.00	16.1	37.24	0.68	32.04	Nd	Nd
60	83.57	0.00	16.43	41.53	0.69	35.73	Nd	Nd
63	83.85	0.00	16.15	43.21	0.69	37.18	Nd	Nd

ตาราง 35 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยแบคทีเรียในกลุ่ม enrichment SRB

Incubation time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	Acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	acetic acid utilization (%)	SRB (MPN/ml)
0	96.12	0.00	3.88	0.00	0.00	0.00	9.3x10 ⁶
1	95.91	0.00	4.09	1.44	1.44	19.73	1.1x10 ⁷
2	95.82	0.00	4.18	2.41	1.20	32.87	2.3x10 ⁶
3	95.36	0.00	4.64	2.50	0.83	34.18	Nd
6	95.35	0.00	4.65	2.72	0.45	37.20	Nd
7	95.20	0.00	4.80	2.84	0.41	38.75	1.1x10 ⁶
10	94.46	0.00	5.54	3.18	0.32	43.47	Nd
14	94.43	0.00	5.57	3.84	0.27	52.43	2.3x10 ⁸
16	94.47	0.00	5.53	4.047	0.25	55.30	Nd
20	94.37	0.00	5.63	4.90	0.25	66.99	1.1x10 ⁸
24	94.12	0.00	5.88	6.28	0.26	85.84	Nd
28	94.02	0.00	5.98	7.16	0.26	97.86	Nd

ตาราง 36 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยแบคทีเรียในกลุ่ม enrichment SRB

Incubation Time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	acetic acid utilization (%)	SRB (MPN/ml)
0	95.82	0.00	4.18	0.00	0.00	0.00	9.3x10 ⁶
1	95.20	0.00	4.80	2.53	2.53	8.80	9.0x10 ⁶
2	95.07	0.00	4.93	5.37	2.68	18.70	Nd
3	94.88	0.00	5.12	6.89	2.30	23.82	2.3x10 ⁷
6	94.63	0.00	5.37	12.37	2.06	43.08	Nd
7	94.45	0.00	5.55	13.05	1.87	49.85	Nd
10	94.54	0.00	5.46	15.67	1.57	54.57	Nd
14	94.37	0.00	5.63	19.07	1.36	66.41	2.4x10 ⁷
16	93.71	0.00	6.29	21.88	1.37	76.21	Nd
20	94.22	0.00	5.78	23.56	1.18	82.05	Nd
24	94.02	0.00	5.98	25.13	1.05	87.52	Nd
28	93.75	0.00	6.25	Nd	Nd	Nd	Nd
30	93.59	0.00	6.41	25.31	0.84	88.15	1.1x10 ⁸
35	94.01	0.00	5.98	26.36	0.75	91.78	Nd
40	93.85	0.00	6.15	Nd	Nd	Nd	Nd
45	93.62	0.00	6.38	26.44	0.59	92.08	2.3x10 ⁸
50	93.79	0.00	6.21	27.10	0.54	94.39	Nd

ตาราง 37 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยแบคทีเรียในกลุ่ม enrichment SRB

incubation time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	acetic acid utilization (mM)	Acetic acid Utilization rate (mM/day)	Acetic acid utilization (%)	SRB (MPN/ml)
0	95.73	0.00	4.27	0.00	0.00	0.00	9.3x10 ⁶
1	95.36	0.00	4.64	3.16	3.16	6.64	9.3x10 ⁶
2	95.27	0.00	4.73	7.25	3.63	15.24	Nd
3	95.05	0.00	4.95	8.21	2.74	17.24	Nd
4	94.76	0.00	5.24	8.54	2.13	17.93	Nd
5	94.67	0.00	5.33	13.42	2.68	28.19	1.1x10 ⁷
6	94.16	0.00	5.84	Nd	Nd	Nd	Nd
7	94.64	0.00	5.36	18.83	2.69	39.56	Nd
10	94.00	0.00	6.00	Nd	Nd	Nd	Nd
14	93.88	0.00	6.12	24.65	1.76	51.35	9.0x10 ⁷
16	94.05	0.00	5.95	26.03	1.63	54.69	Nd
20	93.91	0.00	6.09	33.71	1.69	70.82	Nd
24	93.85	0.00	6.15	35.68	1.49	75.00	Nd
28	93.64	0.00	6.36	36.41	1.30	76.50	Nd
30	94.00	0.00	6.00	38.42	1.28	80.71	1.5x10 ⁸
35	93.76	0.00	6.24	Nd	Nd	Nd	Nd
40	93.75	0.00	6.25	39.50	0.99	83.00	Nd
45	93.61	0.00	6.39	39.91	0.89	83.86	2.3x10 ⁸
50	93.91	0.00	6.09	43.56	0.87	91.52	Nd
55	93.86	0.00	6.14	46.35	0.84	97.38	Nd

ตาราง 38 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ โดยแบคทีเรียในกลุ่ม enrichment SRB

incubation time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	acetic acid utilization (%)	SRB (MPN/ml)
0	96.94	0.00	3.06	0.00	0.00	0.00	9.3x10 ⁶
1	96.45	0.00	3.55	4.36	4.36	6.52	2.3x10 ⁷
2	96.47	0.00	3.53	7.94	3.98	11.51	Nd
3	96.06	0.00	3.94	9.44	3.15	13.69	9.0x10 ⁶
4	96.05	0.00	3.95	13.99	3.50	20.29	Nd
5	95.98	0.00	4.02	15.44	3.09	22.38	Nd
6	95.92	0.00	4.08	19.68	3.28	28.52	Nd
7	95.68	0.00	4.32	20.37	2.91	29.53	9.3x10 ⁶
9	95.44	0.00	4.56	Nd	Nd	Nd	Nd
10	95.09	0.00	4.91	Nd	Nd	Nd	Nd
14	94.87	0.00	5.13	21.49	1.54	31.16	1.5x10 ⁷
16	94.39	0.00	5.61	23.48	1.47	34.03	Nd
20	94.27	0.00	5.73	32.20	1.60	46.68	Nd
24	94.28	0.00	5.72	Nd	Nd	Nd	Nd
30	94.21	0.00	5.79	33.07	1.10	47.94	1.1x10 ⁷
35	94.15	0.00	5.85	Nd	Nd	Nd	Nd
40	94.09	0.00	5.91	35.41	0.89	51.32	Nd
45	94.16	0.00	5.84	38.06	0.85	55.18	2.4x10 ⁷
50	94.18	0.00	5.82	Nd	Nd	Nd	Nd
55	94.16	0.00	5.84	44.16	0.80	64.02	Nd
60	95.23	0.00	4.77	Nd	Nd	Nd	Nd
65	94.87	0.00	5.13	49.66	0.76	72.00	Nd

ตาราง 39 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ โดยแบคทีเรียในกลุ่ม enrichment SRB

incubation time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	acetic acid utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	Acetic acid utilization (%)	SRB (MPN/ml)
0	96.30	0.00	3.70	0.00	0.00	0.00	9.3x10 ⁶
1	95.89	0.00	4.11	3.60	3.60	4.09	9.3x10 ⁶
2	95.76	0.00	4.24	6.91	3.46	7.86	Nd
3	95.58	0.00	4.42	7.30	2.43	8.29	Nd
4	94.91	0.00	5.09	9.45	2.36	10.73	Nd
5	94.79	0.00	5.21	16.19	3.24	18.40	4.3x10 ⁷
6	94.66	0.00	5.34	17.64	2.94	20.04	Nd
7	94.6	0.00	5.40	18.91	2.70	21.49	Nd
10	94.54	0.00	5.46	21.71	2.17	24.66	Nd
14	94.52	0.00	5.48	27.81	2.00	31.60	2.1x10 ⁷
16	94.46	0.00	5.54	30.32	1.89	34.45	Nd
20	94.45	0.00	5.55	31.46	1.57	35.75	Nd
24	94.24	0.00	5.76	32.52	1.36	36.95	Nd
28	94.06	0.00	5.94	33.29	1.19	37.82	Nd
30	94.08	0.00	5.92	34.10	1.14	38.74	4.3x10 ⁸
35	94.04	0.00	5.96	38.76	1.11	44.04	Nd
40	94.02	0.00	5.98	41.36	1.03	47.00	Nd
45	93.85	0.00	6.15	45.47	1.01	51.67	2.3x10 ⁸
50	93.79	0.00	6.21	51.49	1.03	58.50	Nd
55	94.22	0.00	5.78	54.76	1.00	62.23	Nd
60	93.79	0.00	6.21	58.39	0.97	66.35	Nd

ตาราง 40 การย่อยสลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ โดยแบคทีเรียในกลุ่ม enrichment SRB

incubation time (day)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	Acetic acid Utilization (mM)	acetic acid utilization rate (mM/day)	Acetic acid utilization (%)	SRB (MPN/ml)
0	97.81	0.00	2.19	0.00	0.00	0.00	9.3x10 ⁶
1	97.42	0.00	2.58	2.51	2.51	2.20	2.1x10 ⁷
2	97.20	0.00	2.80	4.49	2.57	4.49	Nd
3	97.20	0.00	2.80	7.16	2.73	7.16	Nd
4	97.20	0.00	2.80	11.15	2.87	10.05	Nd
5	97.18	0.00	2.82	16.88	3.38	14.76	1.1x10 ⁷
6	96.78	0.00	3.22	Nd	Nd	Nd	Nd
7	96.71	0.00	3.29	19.12	2.73	16.72	Nd
10	96.59	0.00	3.41	Nd	Nd	Nd	Nd
14	96.37	0.00	3.63	21.42	1.53	18.73	4.3x10 ⁷
16	95.83	0.00	4.17	Nd	Nd	Nd	Nd
20	95.00	0.00	4.99	27.43	1.37	24.00	Nd
24	94.49	0.00	5.51	40.52	1.69	35.44	Nd
28	94.22	0.00	5.78	Nd	Nd	Nd	Nd
30	94.39	0.00	5.61	44.82	1.49	39.20	2.3x10 ⁷
35	94.17	0.00	5.83	47.31	1.35	41.38	Nd
40	94.46	0.00	5.54	53.17	1.33	46.50	Nd
45	94.25	0.00	5.75	59.40	1.32	51.95	9.3x10 ⁷
50	94.11	0.00	5.89	Nd	Nd	Nd	Nd
55	94.45	0.00	5.55	60.39	1.10	52.81	Nd
60	94.44	0.00	5.56	64.04	1.07	56.01	Nd
70	95.02	0.00	4.98	68.70	0.98	60.08	Nd

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล

นางสาวอุบลวรรณ ไชโย

วัน เดือน ปี เกิด

17 พฤษภาคม 2517

สถานที่เกิด

156 บ้านโนง หมู่ที่ 5 ตำบลศรีสุข

กิ่งอำเภอศรีณรงค์ จังหวัดสุรินทร์

รหัสไปรษณีย์ 32150

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2535

มัธยมศึกษาปีที่ 6

โรงเรียนสิรินธร จังหวัดสุรินทร์

พ.ศ. 2539

กศ.บ.(ชีววิทยา)

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

พ.ศ. 2544

กศ.ม.(ชีววิทยา)

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร