

การศึกษาจำนวน และกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต
ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรด

ปริญญานิพนธ์
ของ
สุวิมล ฤทธิ์เดช

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
มีนาคม 2544
ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาจำนวน และกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต
ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรด

บทคัดย่อ
ของ
สุวิมล ฤทธิ์เดช

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
มีนาคม 2544

สุวิมล ฤทธิ์เดช. (2544). การศึกษาจำนวนและกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต

ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรด ปริญญาณิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา).

กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม :

อาจารย์ ดร. ยุวดี นาคะผดุงรัตน์, ศาสตราจารย์ ดร. มรกต ตันติเจริญ ,

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์

จุดประสงค์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เพื่อศึกษาจำนวนและกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรดซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) โดยศึกษาในขวดซีรั่มขนาด 10 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิค Most Probable Number (MPN) ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นสารประกอบโมเลกุลเล็ก คือ กลูโคส และไซโลส และแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ คือ แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน จากการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี MPN ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรดซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิปานกลาง โดยการตรวจวัดปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น ระดับน้ำตาลที่ลดลง และสภาพความเป็นกรด-ด่าง พบว่าจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิปานกลางมีปริมาณสูงกว่าในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูง โดยจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสและไซโลสจะมีปริมาณสูงกว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลนและแอลฟา-เซลลูโลส และจากการศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์โดยวิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาลเนสในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิปานกลาง พบว่าในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิสูงมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาลเนสสูงกว่าในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิปานกลาง

จากผลการศึกษาที่ได้ สามารถสรุปได้ว่าอินทรีย์สารในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูงสามารถย่อยสลายได้ดีกว่าอุณหภูมิปานกลางนั้นน่าจะเป็นไปได้ว่าแม้จำนวนของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูงจะมีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลาง แต่กิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่อย่าง แอลฟา-เซลลูโลส และไซแลน คือเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาลเนสในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูงนั้นมีกิจกรรมสูงกว่าที่พบในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลาง

ผลจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาลเนสของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลางเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท พบว่าในชุดการทดลองที่เติมกลูโคสร้อยละ 0.3 มีสัดส่วนของเชื้อที่ใช้กลูโคสและไซโลสเจริญเป็นกลุ่มหลัก ในชุดการทดลองที่เติมไซแลนร้อยละ 0.3 มีสัดส่วนของเชื้อที่ใช้กลูโคสและไซโลสเจริญเป็นกลุ่มหลัก และสัดส่วนของเชื้อที่ใช้ไซแลนเจริญเป็นกลุ่มรอง และในชุดการทดลองที่เติมแอลฟา-เซลลูโลสร้อยละ

0.3 มีสัดส่วนของเชื้อที่ใช้ไซเลนเจริญเป็นกลุ่มหลัก มีสัดส่วนของเชื้อที่ใช้กลูโคสและไซโลสเจริญเป็นกลุ่มรอง จะเห็นว่าในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิปานกลางมีทั้งเชื้อกลุ่มที่ใช้กลูโคสอย่างเดียว กลุ่มที่สามารถใช้ได้ทั้งกลูโคสและไซโลส และกลุ่มที่สามารถใช้กลูโคส ไซโลส และไซเลนได้ ในการศึกษาทั้งในช่วงก่อนและหลังจากมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรทพบว่า มีสัดส่วนของเชื้อที่ใช้แอลฟา-เซลลูโลสน้อยมากเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ทุกกลุ่มที่ศึกษา ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ใช้กลูโคสและไซโลสเป็นหลักและผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสพบเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในชุดการทดลองที่เติมแหล่งคาร์บอนเป็นไซเลนและแอลฟา-เซลลูโลสเท่านั้น ส่วนเอนไซม์ไซลานเนสไม่พบในชุดการทดลองใดๆ

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำ ซึ่งอาจเนื่องมาจากสภาวะของอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ หรืออาจเนื่องมาจากการใช้สับสเตรทที่ไม่เหมาะสมซึ่งไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์เหล่านี้ อย่างไรก็ตามการศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นเพียงการศึกษาเพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นเท่านั้นทำให้ข้อมูลที่ได้อาจไม่สมบูรณ์ทั้งหมด ดังนั้นควรได้มีการศึกษาผลของสับสเตรทที่มีต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนส รวมทั้งวิธีในการวิเคราะห์เอนไซม์ที่ซับซ้อนที่จะสามารถวิเคราะห์เอนไซม์ทั้งหมดได้ เนื่องจากอาจมีบางส่วนเกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าเอนไซม์ที่พบนั้นมีอยู่ในปริมาณเพียงเล็กน้อยจริงหรือไม่

STUDY ON THE MICROBIAL POPULATION AND ACTIVITY OF CARBOHYDRATE
UTILIZING BACTERIA IN BIOGAS REACTOR OF PINEAPPLE PEEL

AN ABSTRACT
BY
SUWIMOL RITDESH

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

Suwimol Ritdesh. (2001) *Study on the Microbial Population and Activity of Carbohydrate Utilizing Bacteria in Biogas Reactor of Pineapple Peel*. Master Thesis, M.Ed. (Biology). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Dr. Yuvadee Nakapadungrat, Prof. Morakot Tanticharoen, Asst. Prof. Pompan Lerstaveesin.

The aim of this thesis was to study the microbial population and activity of carbohydrate utilizing bacteria in the biogas reactor of pineapple peel which performed at the thermophilic (55 °C) and mesophilic (37 °C) temperatures. The microbial population was enumerated by using the Most Probable Number technique in 10 ml serum vial bottle. The C- sources used to enumerate microbial population were glucose, xylose, xylan and α -cellulose. The growth of bacteria was considered by an increase in the amount of carbondioxide gas, or a decrease in the amount of carbohydrate substrates or a decrease in pH. It was found that the microbial population in the mesophilic reactor was higher than that in the thermophilic one. The glucose and xylose-utilizing bacteria were higher than the xylan- and α -cellulose-utilizing bacteria. The activity of carbohydrate utilizing bacteria was determined by studying the activities of cellulase and xylanase. It was found that the activities of cellulase and xylanase in the thermophilic reactor were higher than those in the mesophilic one.

The results demonstrated that the digestion of organic substances in the thermophilic reactor which was higher than that in the mesophilic one may due to the higher activities of cellulase and xylanase in the thermophilic reactor whereas the microbial population in the thermophilic reactor was less than that in the mesophilic one.

The changes of the microbial population, xylanase and cellulase activities in the mesophilic reactor were investigated when other substrates such as glucose or xylan or α -cellulose were fed instead of pineapple peel. It was found that in the first reactor which was fed with 0.3 % glucose instead of pineapple peel, the proportion of glucose and xylose- utilizing bacteria were dominant. The proportion of glucose and xylose- utilizing bacteria were also dominant in the second reactor which was fed with 0.3 % xylan instead of pineapple peel and the proportion of xylan-utilizing bacteria was minor. In the third reactor which was fed with 0.3 % α -cellulose instead of pineapple peel, the proportion of xylan-utilizing bacteria was dominant whereas the proportion of glucose and

xylose- utilizing bacteria was minor. It was illustrated that there were several groups of carbohydrate-utilizing bacteria, e.g. bacteria that could consume only glucose or glucose and xylose or glucose, xylose and xylan as C-sources, in the mesophilic reactor. In the studies both before and after changing the substrates was shown that the numbers of α -cellulose-utilizing bacteria was rather limited compared with the other groups of studied bacteria. The activity of cellulase was found only in the reactors that fed with xylan and α -cellulose instead of pineapple peel. The activity of xylanase was not found in any reactors fed with other substrates instead of pineapple peel.

The obtained results of low activity of enzyme may due to the conditions of the optimal temperature of cell growth and enzyme activity or the utilization of suitable substrates to induce these enzyme production. However, a study in this step is the basic knowledge for further investigation to study the effects of other substrates on the production of cellulase and xylanase enzymes.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

การศึกษาจำนวน และกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต
ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรด

ของ
นางสาวสุวิมล ฤทธิ์เดช

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

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

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

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

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีจากความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจาก ดร. ยุวดี นาคะผดุงรัตน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประธานมิตร และศาสตราจารย์ ดร. มรกต ตันติเจริญ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่กรุณาให้คำปรึกษาและให้คำแนะนำ ตลอดจนได้สละเวลาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาวิณี ชัยประเสริฐ ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในระหว่างที่ผู้วิจัยได้ปฏิบัติการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ขอขอบคุณพี่ๆนักวิจัยและเพื่อนนิสิตทุกท่านที่ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการวิจัยมาโดยตลอด

ท้ายที่สุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาที่ได้สละแรงกายและใจเพื่อสนับสนุนการศึกษาและเป็นผู้ให้กำลังใจผลักดันที่สำคัญยิ่งต่อผู้วิจัย ตลอดจนพี่ๆที่คอยให้กำลังใจ และช่วยเหลือให้สามารถปฏิบัติหน้าที่ทุกอย่างได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเสมอมา

สุวิมล ฤทธิ์เดช

กุมภาพันธ์ 2544

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
หลักการและเหตุผล.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความของศัพท์ต่างๆที่ใช้ในการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ก๊าซชีวภาพ.....	5
การเกิดก๊าซชีวภาพ.....	5
จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารไปเป็นก๊าซมีเทน.....	8
การอยู่ร่วมกันระหว่าง Non-methanogenic bacteria และ Methanogenic Bacteria.....	12
การศึกษาการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในสภาวะไร้อากาศ.....	13
การศึกษาปฏิกิริยาการเกิดก๊าซมีเทนจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรต.....	17
ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ.....	21
สภาวะและสารที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย.....	27
ปัจจัยในการดำเนินระบบการหมักก๊าซชีวภาพ.....	29
สาเหตุที่ทำให้ระบบเกิดการล้มเหลว.....	30
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	30
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	38
อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	38
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	39
วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตก๊าซชีวภาพ.....	39
การเตรียมถังปฏิกรณ์.....	40
การหมักก๊าซชีวภาพ.....	40

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3(ต่อ) วิธีดำเนินการวิจัย.....	41
การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะ ไร้อากาศ.....	41
การศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ.....	41
การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไคลาเนสของจุลินทรีย์ ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรด.....	46
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวน และกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และไคลาเนสของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจาก เปลือกสับปะรด เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท.....	47
วิธีการวิเคราะห์.....	47
4 ผลการวิจัย.....	49
ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะ ไร้อากาศ.....	49
ผลการศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะ ไร้อากาศ.....	54
ผลการกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไคลาเนสของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรด.....	57
ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวน และกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และไคลาเนสของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือก สับปะรด เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท.....	57
5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	61
สรุปและอภิปราย.....	61
ข้อเสนอแนะ.....	68

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม.....	69
ภาคผนวก.....	77
ภาคผนวก ก.....	78
ภาคผนวก ข.....	84
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	110

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์บางชนิดที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์บางกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนในกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารในสภาวะไร้อากาศ.....	13
2 คุณสมบัติของเปลือกสับปะรด.....	14
3 ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม และปัจจัยในการปฏิบัติงาน.....	21
4 ระดับความเข้มข้นของสารต่างๆที่เป็นอันตรายต่อแบคทีเรียในกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารในสภาวะไร้อากาศ.....	25
5 ความเข้มข้นของไอออนของโลหะหนักที่เป็นพิษต่อระบบบำบัดโดยตรง.....	26
6 ตารางเปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยระหว่างวิธี Plate count และวิธี MPN.....	34
7 ตาราง MPN.....	45
8 แสดงส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ.....	50
9 เปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้ในอาหารสูตรต่างๆโดยใช้ตัวอย่าง.....	51
10 แสดงจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) โดยใช้อาหารสูตรที่ 4 ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ และใช้เทคนิค Plate count.....	52
11 แสดงผลของ Yeast extract ต่อการเจริญของจุลินทรีย์.....	53
12 เปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) โดยใช้อาหารสูตรที่ 4 ไม่เติม Yeast extract.....	54
13 แสดงจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) และ อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) โดยใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เปรียบเทียบระหว่างวิธี Plate count และวิธี MPN.....	55
14 แสดงจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) ด้วยเทคนิค MPN.....	56

บัญชีตาราง(ต่อ)

ตาราง	หน้า
15 แสดงผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาลเนสในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส).....	57
16 แสดงปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาลเนสจุลินทรีย์ก่อนและหลังเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ.....	59
17 แสดงจำนวนและสัดส่วนของจุลินทรีย์ก่อนและหลังเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ.....	60
18 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประดที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ไซโลส ไซแลน และแอลฟา-เซลลูโลส.....	85
19 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประดที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ไซโลส ไซแลน และแอลฟา-เซลลูโลส.....	89
20 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประดก่อนมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ไซโลส ไซแลน และแอลฟา-เซลลูโลส.....	93
21 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประดหลังมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสร้อยละ 0.3.....	98
22 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประดหลังมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นไซแลนร้อยละ 0.3.....	102
23 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประดหลังมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแอลฟา-เซลลูโลสร้อยละ 0.3.....	106

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ขั้นตอนการย่อยสลายอินทรีย์สารในสภาวะไร้อากาศ.....	6
2 การย่อยสลายอินทรีย์สารภายใต้สภาวะไร้อากาศในขั้นตอนไฮโดรไลซิส.....	7
3 การย่อยสลาย Cellulose material ในสภาวะไร้อากาศ.....	16
4 การย่อยสลายสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ให้ได้ก๊าซชีวภาพ.....	17
5 ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลส เพื่อให้ได้ก๊าซมีเทนโดยจุลินทรีย์ 3 ชนิด.....	18
6 ลักษณะของชุดผลิตก๊าซชีวภาพ.....	40
7 ขั้นตอนการเฝ้าระวังในการทำเทคนิค Plate count.....	42
8 ขั้นตอนการเฝ้าระวังในการทำเทคนิค MPN.....	44
9 ขั้นตอนการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดซีรัม.....	46

บทที่ 1

บทนำ

หลักการและเหตุผล

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งมีผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิดแต่มักประสบปัญหาราคาของผลผลิตตกต่ำ รัฐบาลจึงได้ส่งเสริมให้มีการพัฒนาอุตสาหกรรมทางการเกษตรมากขึ้น ได้แก่ อุตสาหกรรมการแปรรูปอาหารจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมเกษตรทำให้มีน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น กากหรือเปลือกเป็นจำนวนมาก บางส่วนถูกนำกลับไปใช้ประโยชน์เป็น อาหารสัตว์ ปุ๋ย เชื้อเพลิง หรือเป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมประเภทอื่น (Lane.1984; Mayer and Hillebrandt.1997) แต่บางส่วนถูกนำไปกองทิ้งไว้ให้ย่อยสลายไปเองตามธรรมชาติ เนื่องจากในกากเหลือทิ้งและเปลือกผลไม้จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมักจะมี เชลลูโลส เฮมิเชลลูโลส และลิกนิน เป็นองค์ประกอบการย่อยสลายจึงเป็นไปได้ช้า (Khan.1977) และหากปล่อยทิ้งไว้จากก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมต่อไป ดังนั้นปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาเพื่อกำจัดของเสียเหล่านี้ให้เหมาะสมและนำเอาวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้มาใช้ให้เป็นประโยชน์มากขึ้นโดยอาศัยเทคโนโลยีที่เหมาะสมซึ่งทางมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีได้มีการศึกษาการย่อยสลายเปลือกสับปะรดโดยกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ มาตั้งแต่ พ.ศ. 2521 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อบำบัดของเสียและผลิตพลังงาน ในระยะแรกพบว่าเปลือกสับปะรดถูกย่อยสลายโดยกระบวนการหมักแบบไร้อากาศและให้ก๊าซชีวภาพเกิดขึ้น การย่อยสลายเกิดช้าและมีการสะสมของกาก ต่อมาจึงมุ่งศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ในเรื่องอุณหภูมิและจำนวนจุลินทรีย์ พบว่าถึงปฏิกิริยาซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูงมีการย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิปานกลางโดยพบปริมาณอินทรีย์สารในน้ำหมักจากถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูงมากกว่าในน้ำหมักจากถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลางและก๊าซที่ได้จากถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลางมากกว่าจากถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง (ธนศ อุทิศธรรม. 2526) ขั้นตอนการย่อยสลายประกอบไปด้วยขั้นตอนไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ซึ่งในขั้นตอนนี้สารอินทรีย์เชิงซ้อน (Complex organic compound) ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันจะถูกย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์พวก Hydrolytic bacteria และ Fermentative bacteria โดยคาร์โบไฮเดรตจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Simple sugar) โปรตีนถูกเปลี่ยนเป็น เปปไทด์ และกรดอะมิโน ไขมันจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล นอกจากนั้นยังมีผลิตผลที่เกิดจากปฏิกิริยาของกลุ่มจุลินทรีย์พวก Fermentative bacteria ซึ่งเป็นสารประกอบพวกแอลกอฮอล์ ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์รวมอยู่ด้วย ผลิตผลที่ได้จากขั้นตอนการไฮโดรไลซิสจะถูกย่อยสลายต่อไปในขั้นตอน

การผลิตกรดอินทรีย์ (Acid fermentation) โดยจุลินทรีย์พวก Non-methanogenic bacteria ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทีริก และกรดแลคติก เป็นต้น แบคทีเรียบางชนิดยังสามารถสร้างก๊าซไฮโดรเจน และสารประกอบพวกแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล ซึ่งจะถูกใช้โดยแบคทีเรียกลุ่ม Methanogenic bacteria เพื่อเกิดเป็นก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในขั้นตอนการผลิตก๊าซมีเทน (Methane formation) ต่อไป ในแต่ละขั้นตอนมีการทำงานของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน อัตราเร็วของปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอาหารแต่ละชนิด นอกจากจะขึ้นอยู่กับปริมาณของตัวเร่งคือจุลินทรีย์ หรือเอนไซม์แล้วยังขึ้นอยู่กับสภาวะที่เหมาะสมที่เอนไซม์จะสามารถทำงานได้ เช่น อุณหภูมิ (Westermann.1996) เป็นต้น นพพร เจตนาชัย (2529) พบว่าการย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น แป้ง เซลลูโลสและไซลเลนที่อุณหภูมิสูง ดีกว่าที่อุณหภูมิปานกลาง และจุลินทรีย์กลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลสในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพ จากเปลือกสับประรดมีจำนวนค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ย่อยสลาย แป้ง และโปรตีน

จึงเป็นที่น่าสนใจว่าการย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น เซลลูโลส และไซลเลน ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูงเกิดขึ้นได้ดีกว่าในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลางนั้น เนื่องมาจากในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิต่างกันจะมีปริมาณของจุลินทรีย์ต่างกันหรือจุลินทรีย์ที่เจริญในอุณหภูมิที่ต่างกันสามารถผลิตหรือมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลเลนเนสต่างกัน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างจำนวนของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรต เช่น เซลลูโลสและไซลเลน และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลเลนของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรดซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิปานกลาง ผลจากการศึกษาจะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการทำงานของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดของเสียและสามารถนำไปใช้ในการปรับกระบวนการบำบัดของเสียและการผลิตพลังงานให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ
2. เพื่อศึกษาจำนวนของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรดซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เปรียบเทียบกับที่หมักที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส)
3. เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลสและไซลเลนเนส ของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรดซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เปรียบเทียบกับที่หมักที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส)

4. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลเนสในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท

ความสำคัญของการวิจัย

ทำให้รู้ความสัมพันธ์ของจำนวนและกิจกรรมของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดซึ่งหมักที่อุณหภูมิต่างกันและผลจากการศึกษาสามารถนำไปเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนากระบวนการให้มีประสิทธิภาพสูงสุดก่อนจะนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ
2. ศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศโดยวิธี

Plate count และวิธี Most Probable Number (MPN)

3. เพื่อศึกษาจำนวนของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เปรียบเทียบกับที่หมักที่อุณหภูมิต่ำ (37 องศาเซลเซียส)
4. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลสและไซลเนสของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) เปรียบเทียบกับที่หมักที่อุณหภูมิต่ำ (37 องศาเซลเซียส)
5. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท
6. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลสและไซลเนส ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท

คำจำกัดความของศัพท์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย (Khan, Miller and Murray. 1983)

1. ระยะเวลาเก็บกัก (Hydraulic Retention Time, HRT) คือระยะเวลาในการหมัก ซึ่งเป็นตัวแปรหลักในการออกแบบการกำจัดของเสีย ระยะเวลาเก็บกักเป็นระยะเวลาที่ของเสียอยู่ในถังปฏิกรณ์ และหาได้โดยการหารปริมาตรของถังปฏิกรณ์ด้วยปริมาตรของของเสียที่ไหลผ่านถังปฏิกรณ์ต่อหน่วยเวลา ถ้าของเสียที่เติมในถังปฏิกรณ์เป็นของแข็งจะเรียกว่า ระยะเวลาเก็บกาก (Solid Retention Time, SRT)

2. กรดอินทรีย์ระเหย (Volatile Acids) เป็นผลิตภัณฑ์ตัวกลางที่ได้ในการย่อยสลายอินทรีย์สารในสภาวะแบบไร้อากาศได้แก่ กรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 1 ถึง 5 อะตอมเป็นส่วนใหญ่

3. สภาพความเป็นด่างรวม (Total Alkalinity) เป็นพารามิเตอร์ที่บอกถึงความเป็นบัฟเฟอร์ของระบบเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของค่า pH ซึ่งเป็นอันตรายต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ในระบบ

4. ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD) คือค่าความต้องการออกซิเจนในการย่อยสลายอินทรีย์สารที่หาได้โดยวิธีการทางเคมี โดยค่าซีโอดีจะแสดงถึงปริมาณอินทรีย์สารทั้งหมดในน้ำเสียหรือน้ำทิ้ง ทั้งที่จุลินทรีย์ย่อยสลายได้และย่อยสลายไม่ได้

5. หน่วยสากล (International unit) ของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสับสเตรท 1 ไมโครโมล (μmole) เป็นผลิตภัณฑ์ในเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ก๊าซชีวภาพ

ก๊าซชีวภาพ หมายถึง ก๊าซที่ได้จากการย่อยสลายอินทรีย์สารที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตทั้งที่เป็นพืชและสัตว์ในสภาวะไร้อากาศ โดยมีจุลินทรีย์หลายชนิดเป็นตัวย่อยสลาย ก๊าซชีวภาพเป็นก๊าซผสมระหว่างก๊าซมีเทน (CH_4) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ อาจมี ก๊าซไนโตรเจน ก๊าซออกซิเจน ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ปนอยู่บ้างเล็กน้อย ก๊าซที่เกิดจากกระบวนการหมักจะมีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้และสภาวะของกระบวนการหมัก โดยทั่วไปองค์ประกอบของก๊าซชีวภาพมีดังต่อไปนี้

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

ก๊าซชีวภาพที่สามารถใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงได้ต้องมีก๊าซมีเทนเป็นองค์ประกอบไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 (Updated guidebook on biogas development. 1984)

การเกิดก๊าซชีวภาพ

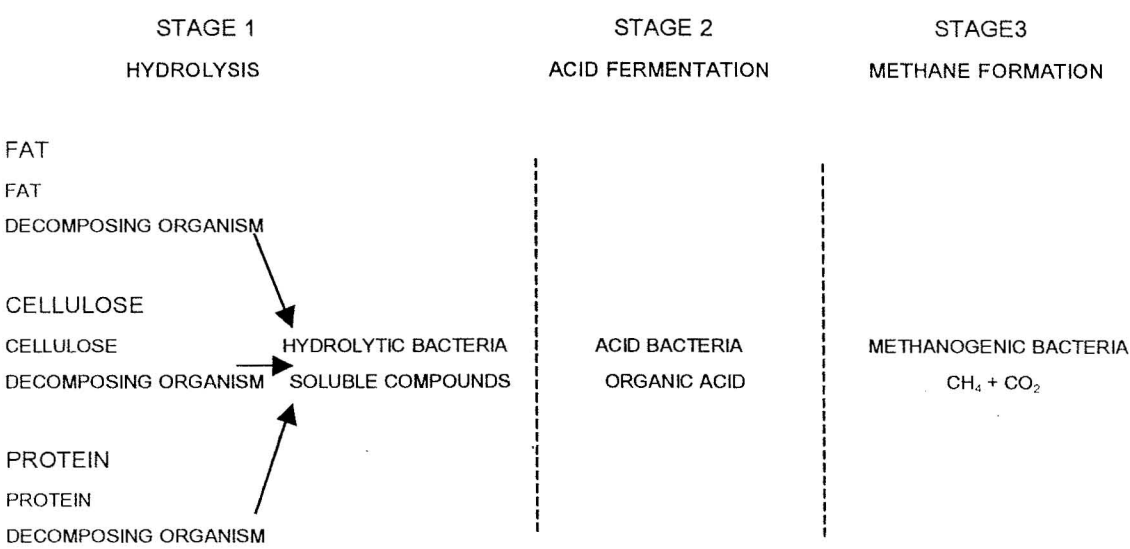
ก๊าซชีวภาพที่เกิดจากปฏิกิริยาทางชีวเคมี เกิดจากการย่อยสลายอินทรีย์สารของจุลินทรีย์หลายจำพวกในสภาวะไร้อากาศ อินทรีย์สารที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายและให้ก๊าซชีวภาพนั้นมาจากทั้งพืชและสัตว์ โดยอินทรีย์สารส่วนใหญ่ประกอบไปด้วย คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน นอกจากนี้ อาจมีพวกลิกนิน แทนนิน และไคตินรวมอยู่ด้วย สารประกอบดังกล่าวเป็นสารโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจึงต้องผ่านกระบวนการทางชีวเคมีหลายขั้นตอนโดยจุลินทรีย์หลายกลุ่ม (นพพร เจตนชัย. 2529)

ปฏิกิริยาชีวเคมีของกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารโดยแบคทีเรียสามารถแบ่งได้ 3 ขั้นตอนดังแสดงในภาพประกอบ 1 คือ ขั้นตอนไฮโดรไลซิส ขั้นตอนการผลิตกรดอินทรีย์ และขั้นตอนการผลิตก๊าซมีเทน

ขั้นตอนที่ 1 การไฮโดรไลซิส

ในขั้นตอนนี้สารอินทรีย์เชิงซ้อน (Complex organic compound) ที่มีขนาด

โมเลกุลใหญ่ไม่สามารถละลายน้ำได้ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน จะถูกย่อยสลายโดย เอนไซม์ที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนนี้เป็นพวก Hydrolytic bacteria และ Fermentative bacteria ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายในขั้นตอนนี้จะเป็นอะไรขึ้นอยู่กัชนิดสารตั้งต้น เช่น ถ้าสารตั้งต้นเป็นคาร์โบไฮเดรตจะย่อยสลายได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Simple sugar) โปรตีนเปลี่ยนไปเป็นเปปไทด์หรือกรดอะมิโน ไขมันจะเปลี่ยนเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล ดังแสดงในภาพประกอบ 2 นอกเหนือจากการย่อยสลายที่เกิดจาก Hydrolytic bacteria แล้วยังอาจมีปฏิกิริยาที่เกิดจากพวก Fermentative bacteria รวมอยู่ด้วย ซึ่งให้ผลผลิตเป็นพวกสารประกอบแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์รวมอยู่ด้วย



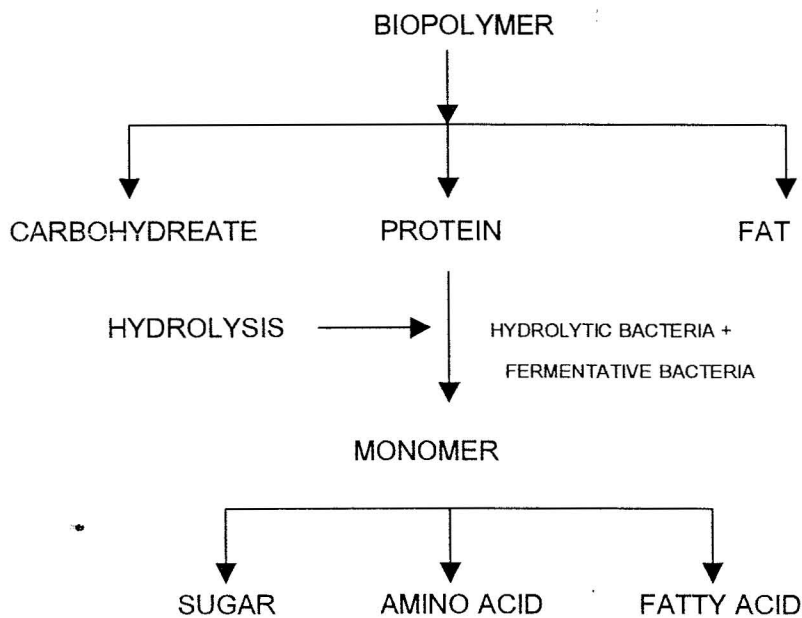
ภาพประกอบ 1 ขั้นตอนการย่อยสลายอินทรีย์สารในสภาวะไร้อากาศ (Anaerobic Fermentation of Organic Solids)

(นพพร เจตณชัย. 2529)

ขั้นที่ 2 การผลิตกรดอินทรีย์

ขั้นตอนนี้เป็นการย่อยสลายผลผลิตที่ได้จากขั้นตอนการไฮโดรไลซิสเพื่อนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ใหม่และใช้ในการสร้างพลังงาน โดยที่อินทรีย์สารโมเลกุลเล็กจะถูกแบคทีเรียพวก Facultative anaerobic bacteria ซึ่งเป็นพวกที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ดีทั้งในสภาวะที่มีและ

ไม่มีออกซิเจนและ Obligate anaerobic bacteria ซึ่งเป็นพวกที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น อินทรีย์สารในขั้นตอนไฮโดรไลซิสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile fatty acid) เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทีริก และกรดแวลริก และสารอื่นๆ เช่น ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยจุลินทรีย์พวก Acid bacteria เนื่องจากอินทรีย์สารที่ได้จากการย่อยสลายในขั้นตอนไฮโดรไลซิสมีหลายชนิดดังนั้นกรดอินทรีย์ในขั้นตอนนี้จึงมีหลายชนิดเช่นกันซึ่งกรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญมากที่สุดคือ กรดอะซิติก ที่เกิดจากการใช้กรดโพรพิโอนิก และกรดอินทรีย์อื่นๆของ Acetogenic bacteria



ภาพประกอบ 2 การย่อยสลายอินทรีย์สารภายใต้สภาวะไร้อากาศในขั้นตอนไฮโดรไลซิส

(Westermann, 1989)

ขั้นที่ 3 การผลิตก๊าซมีเทน

กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการผลิตกรดอินทรีย์นั้นเป็นสารประกอบอย่างง่ายส่วนใหญ่ได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทนโดยจุลินทรีย์กลุ่ม Methanogenic bacteria จัดอยู่ในพวก Obligate anaerobic bacteria สองในสามของก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นทั้งหมดมาจากการใช้อะซิเตท นอกเหนือ

จากนี้ยังเกิดจากปฏิกิริยา Reduction ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และบางส่วนอาจเกิดจากฟอร์เมท เมทานอล และเมทิลลามีน

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารไปเป็นก๊าซมีเทน

จากการศึกษาวิจัยกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารในสภาวะไร้อากาศภายในถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายประเภท เช่น แบคทีเรีย ฟังไจ และโปรโตซัว เป็นต้น พบว่าแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่หลักในปฏิกิริยาการย่อยสลายอินทรีย์สารไปเป็นก๊าซชีวภาพส่วนจุลินทรีย์อื่นอาจมีส่วนช่วยเหลือทางด้านระบบนิเวศของถังปฏิกรณ์ในการย่อยสลายอินทรีย์สารต่างๆที่มีโครงสร้างซับซ้อนจนได้ผลิตผลสุดท้ายในรูปของก๊าซชีวภาพตามขั้นตอนต่างๆจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของแบคทีเรียสองกลุ่มใหญ่ๆคือ Non-methanogenic bacteria และ Methanogenic bacteria

แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สร้างมีเทน (Non-methanogenic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้ที่พบส่วนใหญ่เป็น Facultative bacteria ซึ่งสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ โดยได้รับพลังงานที่นำไปใช้ในการเจริญจากการย่อยสลายอินทรีย์สารให้เป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย แอลกอฮอล์ CO_2/H_2 แอมโมเนีย และซัลไฟด์เป็นผลิตผลสุดท้าย สามารถเจริญได้ดีในช่วง pH 4.0-6.5 ทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมได้ดี มีอัตราการเจริญสูง แบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้เป็น 2 เท่าภายในเวลา 2 ชั่วโมง แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สร้างมีเทนนี้แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้

1. Hydrolytic /Fermentative bacteria แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำหน้าที่ในขั้นตอนแรกของการย่อยสลายอินทรีย์สารในสภาวะไร้อากาศโดยผลิตเอนไซม์ออกมาออก เซลล์เพื่อย่อยสลายอินทรีย์สารโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดเล็กลงส่งผ่านเข้าไปในเซลล์แล้วเปลี่ยนเป็นสารอื่นๆ เช่น แอลกอฮอล์ อะซิเตท โพรพิอเนต แลคเตท และบิวทีเรท จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่ จุลินทรีย์ที่อยู่ใน Family Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Lactobacillaceae, Streptococaceae (สุพรรณ ผ่องแผ้วไทย. 2539) ถ้าเป็น *Bacteroides fibrisolvens* จะย่อยอินทรีย์สารพวกเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้เป็น ฟอร์เมท แลคเตท และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แต่ถ้าย่อยอินทรีย์สารพวกเพคตินจะได้อะซิเตท บิวทีเรท และฟอร์เมท (Bryant and Small. 1965) และถ้าเป็นแบคทีเรียพวก *Bacteroides ruminicola* จะย่อยสลายอินทรีย์สารพวกเฮมิเซลลูโลสได้เป็น ฟอร์เมท อะซิเตท และโพรพิอเนต ถ้าย่อยสลายอินทรีย์สารพวกเพคตินจะได้ฟอร์เมท บิวทีเรท และแลคเตท (Dehority. 1969) ส่วนแบคทีเรียพวก *Bacteroides succinogenes* จะย่อยสลายเซลลูโลสได้เป็นฟอร์เมท อะซิเตท และซัคซินเนต ถ้าเป็นแบคทีเรียพวก *Acetivibrio cellulolyticus*

หรือ *Clostridium thermocellum* จะย่อยสลายเซลลูโลสได้เป็น อะซิเตท เอทานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน (Patel and others. 1980)

2. Acetogenic bacteria แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นพวกที่ย่อยสลายสารที่ได้จากการย่อยสลายอินทรีย์สารในขั้นตอนที่ 1 และ 2 แล้วให้กรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

2.1 Hydrogen producing acetogenic bacteria แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำหน้าที่ย่อยสลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายอินทรีย์สารในขั้นตอนไฮโดรไลซิสซึ่งได้แก่ แอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลายตัวได้ กรดอะซิติกและไฮโดรเจนหรือกรดอะซิติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย (Boone and Bryant. 1980) ดังแสดงในสมการต่อไปนี้

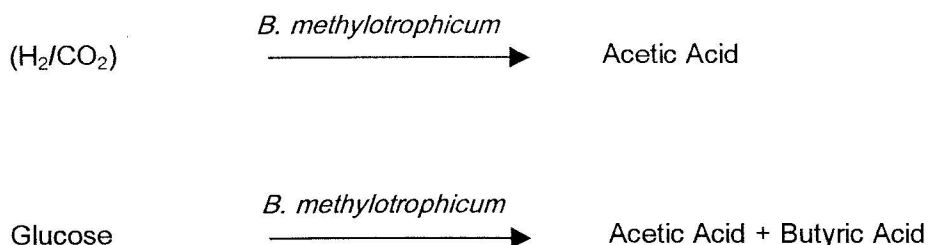


แบคทีเรียกลุ่มนี้โดยรวมแล้วเรียกว่า S-organism เป็นแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติกได้ดังสมการที่ 1 Desulfovibrio ก็จัดอยู่ในแบคทีเรียกลุ่มนี้ด้วย เมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนซัลเฟต แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถออกซิไดซ์ เอทานอลและแลคเตทไปเป็นอะซิเตทได้ดังสมการที่ 2 - 4 ในสภาวะปกติแบคทีเรียกลุ่มนี้มักอาศัยอยู่ร่วมกับ Hydrogen-consuming methanogenic bacteria แบบ Symbiosis ในระหว่างการย่อยสลาย แบคทีเรียกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ดึงออกซิเจนที่มีอยู่ในระบบไปใช้ทำให้ปริมาณออกซิเจนในระบบลดลงเกิดสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของ กลุ่มแบคทีเรียพวก Methanogenic bacteria ซึ่งทำหน้าที่ดึงไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นไปใช้ทำให้ระบบมีความดันย่อยของไฮโดรเจนต่ำเกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อเทอร์โมไดนามิกส์ของการเปลี่ยนกรดอินทรีย์ระเหยง่ายและ แอลกอฮอล์เป็นอะซิเตท ตัวอย่างเช่นในกรณีปฏิกิริยาการเปลี่ยนโปรพิอเนทเป็นอะซิเตทที่มักเกิดขึ้นในระบบที่มีความดัน

ย่อยของไฮโดรเจนต่ำ ถ้าค่าความดันย่อยของไฮโดรเจนสูงกว่า 10^{-4} atm พลังงานอิสระของการเกิดปฏิกิริยามีค่าเป็นบวก ปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดได้ยาก ทำให้การสะสมของกรดอินทรีย์ในระบบมากขึ้น ค่าพีเอชของระบบลดลงเกิดสภาวะที่ไม่เหมาะต่อการเจริญของ Methanogenic bacteria

2.2 Homoacetogenic bacteria แบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นทั้งพวก Autotroph และ Heterotroph ขึ้นอยู่กับการใช้สารอาหาร ในกรณีพวก Autotroph ได้แก่แบคทีเรียที่ใช้สารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอม (H_2/CO_2) ในการเจริญ ได้ผลิตผลสุดท้ายเป็นอะซิเตท ส่วนพวก Heterotroph ได้แก่ แบคทีเรียที่ใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนหลายอะตอม เช่น น้ำตาล กลูโคส กรดแลคติก และไพรูเวท ผลิตผลที่ได้มีทั้งบิวทีเรตและอะซิเตท ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการผลิตก๊าซมีเทน

แบคทีเรียในกลุ่มนี้ที่พบมากและมีคุณสมบัติเหมาะสมในกลุ่มแบคทีเรียนี้ เช่น *Acetobacterium woodii*, *Clostridium thermoaceticum* และ *Butyribacterium methylotrophicum*



แบคทีเรียที่สร้างมีเทน (Methanogenic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้ถูกจัดให้อยู่ในพวก Archaeobacteria เนื่องจากมีลักษณะที่แตกต่างจาก Eubacteria และ Eucaryote อย่างเด่นชัดคือ ผนังเซลล์ของ Archaeobacteria ไม่มี Murein เป็นองค์ประกอบ และใน rRNA พบว่ามี Pseudouridine หรือ 1-Methyl pseudouridine เป็นองค์ประกอบแทนที่ Ribothymidine นอกจากนี้ยังมีการเรียงลำดับของกรดนิวคลีโอไทด์ใน 5S 16S และ 23S rRNA ที่แตกต่างไปจาก Eubacteria และ Eucaryote แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซมีเทนส่วนใหญ่จัดอยู่ในพวก Obligate anaerobic bacteria เจริญได้ดีในสภาวะที่ขาดออกซิเจน ค่า pH อยู่ในช่วง 6.5 - 7.5 ถ้า pH สูงกว่า 8 จุลินทรีย์จะหยุดทำงาน (Sprott, Bird and McDonald. 1985) ซึ่งแบคทีเรียที่สร้างมีเทนมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมได้น้อยและมีอัตราการเจริญที่ช้ากว่าแบคทีเรียที่ไม่สร้างมีเทนโดยเฉลี่ย

ต้องใช้เวลาประมาณ 3-5 วัน ในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าเมื่อพิจารณาจากกระบวนการเมทาบอลิซึม พบว่าแบคทีเรียที่สร้างมีเทนนี้มีลักษณะที่แตกต่างไปจากแบคทีเรียอื่นๆหลายอย่าง เช่น Coenzyme M, F420, F430, Methanopterin และ Methanofuran นอกจากนี้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังประกอบด้วย Ether-linked isoprenoid เป็นหลักมากกว่า Ester-linked phospholipid

จากการศึกษาที่ผ่านมาโดยการศึกษาด้วยการย้อมสีแบบแกรม (Gram stain) พบว่าแบคทีเรียที่สร้างมีเทนใน order เดียวกันมีทั้งชนิดที่เป็นแกรมบวกและแกรมลบ ขึ้นอยู่กับชนิดของ Cell envelop ในแบคทีเรียชนิดแกรมบวกจะมี Pseudomurein, Methanochondroitin และ Heteropolysaccharide ในผนังเซลล์ ส่วนเซลล์แบคทีเรียชนิดแกรมลบนั้นมีชั้นผิวเป็น Glycoprotein สำหรับรูปร่างแบคทีเรียที่สร้างมีเทนนี้มีลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น Spherical, Lobed, Spiral, Plate หรือ Rod และอาจอยู่ในรูปเซลล์เดี่ยวๆหรือต่อกันเป็นสายยาวหรือมีการเกาะกลุ่มอาศัยอยู่รวมกัน เซลล์แบคทีเรียที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.1 - 15 ไมโครเมตร ความยาวของสายอาจยาวถึง 220 ไมโครเมตร การขยายพันธุ์อาจทำได้หลายวิธี เช่น Binary fission, Budding construction และ Fragmentation เป็นต้น การแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างมีเทนสามารถแบ่งโดยใช้หลักต่างๆ ดังนี้

1. แบ่งตามลักษณะรูปร่างของเซลล์ได้ 3 กลุ่ม

1.1 Met hanobacterium มีรูปร่างเป็นแท่ง

1.2 Met hanosarcina มีรูปร่างกลม และอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

1.3 Met hanococcus มีรูปร่างกลม

2. แบ่งตามชนิดของสารอาหารตั้งต้นที่ใช้ได้เป็น 2 กลุ่ม

2.1 Methylophilic ใช้อะซิเตท เมทานอล

2.2 Non-methylophilic ใช้ไฮโดรเจน / คาร์บอนไดออกไซด์ และบางครั้ง

สามารถใช้ฟอสเฟตได้ด้วย เนื่องจากแบคทีเรียที่สร้างมีเทนใช้สารอาหารได้เพียงไม่กี่ชนิดและไม่สามารถสร้างอะซิเตทหรือไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์หลักจึงต้องอาศัยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจากแบคทีเรียที่ไม่สร้างมีเทน ปฏิกริยาการย่อยสลายสารตั้งต้นต่างๆ ได้แก่ Hydrogen, Acetate, Formate, Methanol, Trimethylamine, Dimethylamine และ Monomethylamine โดยแบคทีเรียที่สร้างมีเทนแสดงดังสมการที่ 1-7 ตามลำดับต่อไปนี้





การดำรงชีวิตอยู่ของแบคทีเรียที่สร้างมีเทนนั้นขึ้นอยู่กับกรย่อยสลายสารอาหารต่างๆ โดยจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ผลผลิตที่ได้จะถูกนำมาใช้เป็นสารอาหารสำหรับแบคทีเรียที่สร้างมีเทน จากการย่อยสลายกรดไขมัน เช่น บิวทีเรทไปเป็นก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยอาศัยจุลินทรีย์พวก H_2 -producing acetogen ทำหน้าที่ย่อยสลายกรดไขมันสายยาวไปเป็น ไฮโดรเจน อะซิเตท และ โพรพิอเนท และไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นนี้จะมีผลยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสของ จุลินทรีย์เหล่านี้ แบคทีเรียที่สร้างมีเทนหรือจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศ ชนิดอื่น (Interspecies H_2 transfer)จะมีบทบาทเข้ามาช่วยกำจัดไฮโดรเจนแสดงให้เห็นถึงการที่ แบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทนจะอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น แบบพึ่งพาอาศัยกัน

การอยู่ร่วมกันระหว่าง Non-methanogenic และ Methanogenic bacteria

นอกเหนือจากการย่อยสลายอินทรีย์สารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลงและ อยู่ในรูปที่ Methanogenic bacteria สามารถนำไปใช้ในการเจริญและผลิตก๊าซมีเทนได้แล้ว Non-methanogenic bacteria ยังมีความสำคัญในการช่วยปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อ Methanogenic bacteria อีกด้วย (ทรัพย์ วิถีธรรม. 2528) โดยเฉพาะพวก Acid bacteria ซึ่งเป็นตัวช่วยลดปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในระบบเพราะในขณะที่มีการผลิตกรดอินทรีย์จากสาร ประกอบโมเลกุลเล็ก จุลินทรีย์จะดึงออกซิเจนที่มีอยู่ในระบบไปใช้ด้วยทำให้สภาวะในระบบการหมักเป็นสภาวะที่ไร้อากาศมากขึ้นเกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อ Methanogenic bacteria ซึ่งเป็น พวกที่ไม่ต้องการอากาศเช่นเดียวกันกับการมี Methanogenic bacteria อยู่ในระบบการหมักก็มีความสำคัญและจำเป็นมากสำหรับจุลินทรีย์กลุ่ม Non-methanogenic bacteria

(มรกด ตันติเจริญ. 2521) เพราะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นในช่วง Acid fermentation มีผลยับยั้งการทำงาน และการเจริญของ Acid forming bacteria ที่มีอยู่ในระบบการหมักจะทำหน้าที่เป็นตัวดึงไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นไปใช้ในการผลิตก๊าซมีเทนทำให้ปริมาณไฮโดรเจนในระบบการหมักลดต่ำลงอยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อ Non-methanogenic bacteria จุลินทรีย์ 2 กลุ่มที่เป็นทั้ง Facultative และ Obligate anaerobic bacteria ที่เกี่ยวข้องในแต่ละปฏิกิริยาของการย่อยสลายอินทรีย์สารเพื่อผลิตก๊าซมีเทน โดยแสดงคุณสมบัติของจุลินทรีย์บางชนิดที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์บางชนิดที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอน ในกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารในสภาวะไร้อากาศ

Group	Organism	Nutrition	Substrate	Product
Hydrolysis	<i>Clostridium thermocellum</i>	Heterotroph	Cellulose Cellobiose	H ₂ /CO ₂ , Ethanol Acetate, Lactate
H ₂ -producing organism	S-organism	Heterotroph	Pyruvate Ethanol	H ₂ /CO ₂ , Ethanol Acetate
Acid fermentation	<i>Acetobacterium woodii</i>	Mixotroph	Fructose, Lactate, CO ₂ /H ₂	Acetate
Methanogen	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Autotroph	CO ₂ /H ₂	CH ₄
Methanogen	<i>Methanosarcina barkeri</i>	Mixotroph	CO ₂ /H ₂ , HCOOH, CH ₃ NH ₂ , CH ₃ COOH	CH ₄

(Adams. 1981)

การศึกษาการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในสภาวะไร้อากาศ

จากการพิจารณาถึงองค์ประกอบของเปลือกสับปะรด (ตาราง 2) พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นพวกคาร์โบไฮเดรต โดยมีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ โดยมีเซลลูโลสประมาณร้อยละ 2 เฮมิเซลลูโลสประมาณร้อยละ 2.5 น้ำตาลซูโครสร้อยละ 2-5 น้ำตาลรีดิซาร์ร้อยละ 2.2-4 ซึ่งเป็นกลูโคสร้อยละ 1.5 และฟรุคโตสร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักเปียก (ชเนศ อุทิศธรรม. 2526) ดังนั้นการย่อยสลายเปลือกสับปะรดจึงน่าจะมีรูปแบบคล้ายคลึงกับการย่อยสลาย

คาร์โบไฮเดรต ซึ่งมีการศึกษากันมากในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตพวกเซลลูโลสและกลูโคสในสภาวะไร้อากาศ

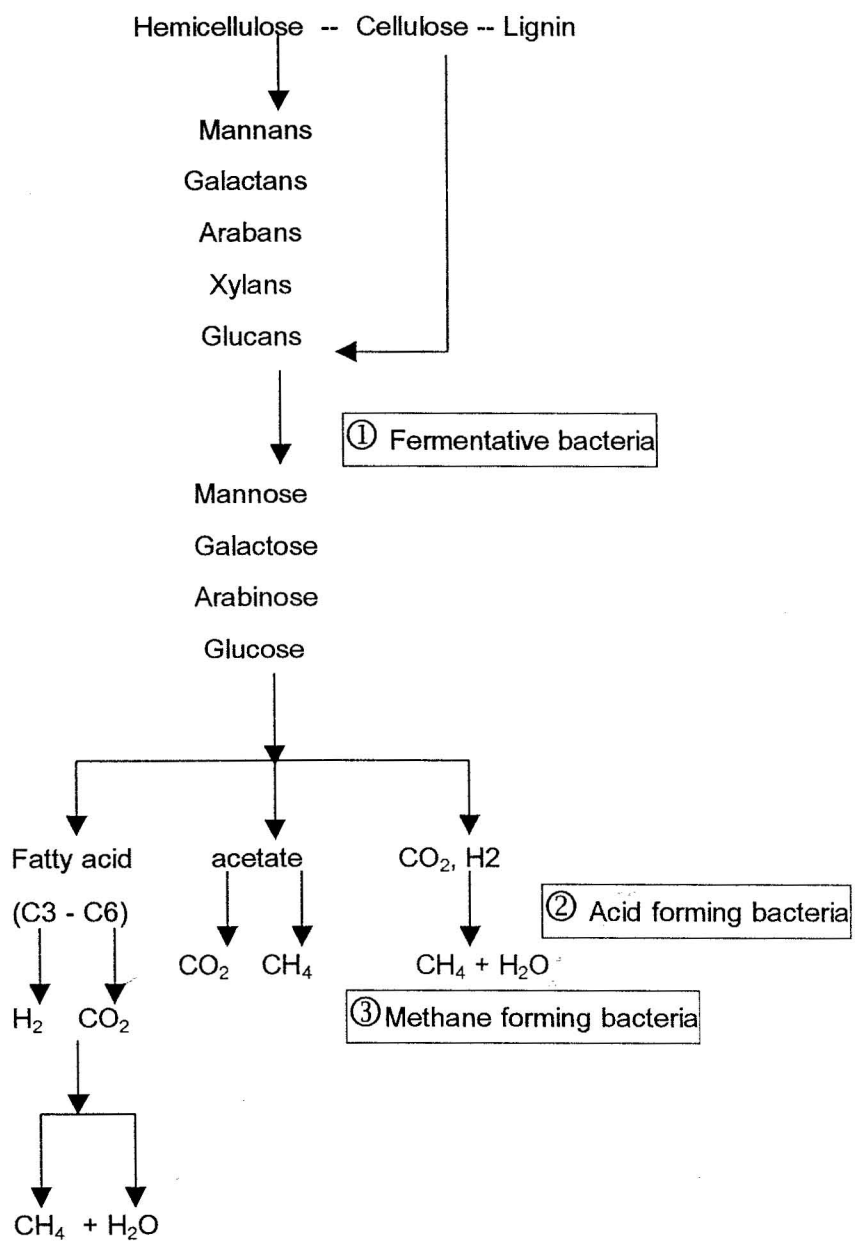
สปริงเกอร์ (Springer. 1973) พบว่าการย่อยสลายที่พันธะ $\alpha,1-4$ -glucosidic เช่นในเซลลูโลสเป็น Rate-limiting step ของการย่อยสลาย ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสมีข้อจำกัด และมีการย่อยสลายได้ยากกว่าสารคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆเนื่องจากเซลลูโลสเป็นสารที่พบมากในธรรมชาติทั้งในสภาพวัตถุดิบและของเหลือทิ้งที่มีปัญหาในการจัดการ เช่น เปลือกสับปะรดและเปลือกข้าวโพด เป็นต้น ทำให้มีการศึกษาถึงการย่อยสลายเซลลูโลสกันมาก ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในสภาวะไร้อากาศเพื่อให้ได้ก๊าซมีเทนนั้นแสดงดังภาพประกอบ 3 และ 4 โดยจะย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส Fermentative bacteria ได้น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5-6 อะตอม ต่อจากนั้น Acid forming bacteria จะย่อยสลายน้ำตาลให้ได้กรดอินทรีย์แล้ว Methanogenic bacteria ย่อยสลายกรดอินทรีย์ได้เป็นก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ตาราง 2 คุณสมบัติของเปลือกสับปะรด (ชเนศ อุทิศธรรม. 2526)

Composition of Pineapple Peel	Percent of Fresh Weight
A. Carbohydrate	
1. General	
a. Reducing sugar	2.47 - 4.13
b. Total sugar	5.6 - 8.66
2. Specific	
a. Cellulose	1.67 - 2.07
b. Fructose	0.5
c. Glucose	0.93 - 1.67
d. Hemicellulose	2.31 - 2.88
e. Hexose	0.42 - 0.50
f. Pentosans	1.89 - 2.38
g. Starch	Absent
h. Sucrose	1.09 - 5.07
B. Lipid	
1. Acetone extract	Trace to 0.35
C. Protein and related compound	
1. Bromelin	12.7 M.C.U./mg Prot.N.

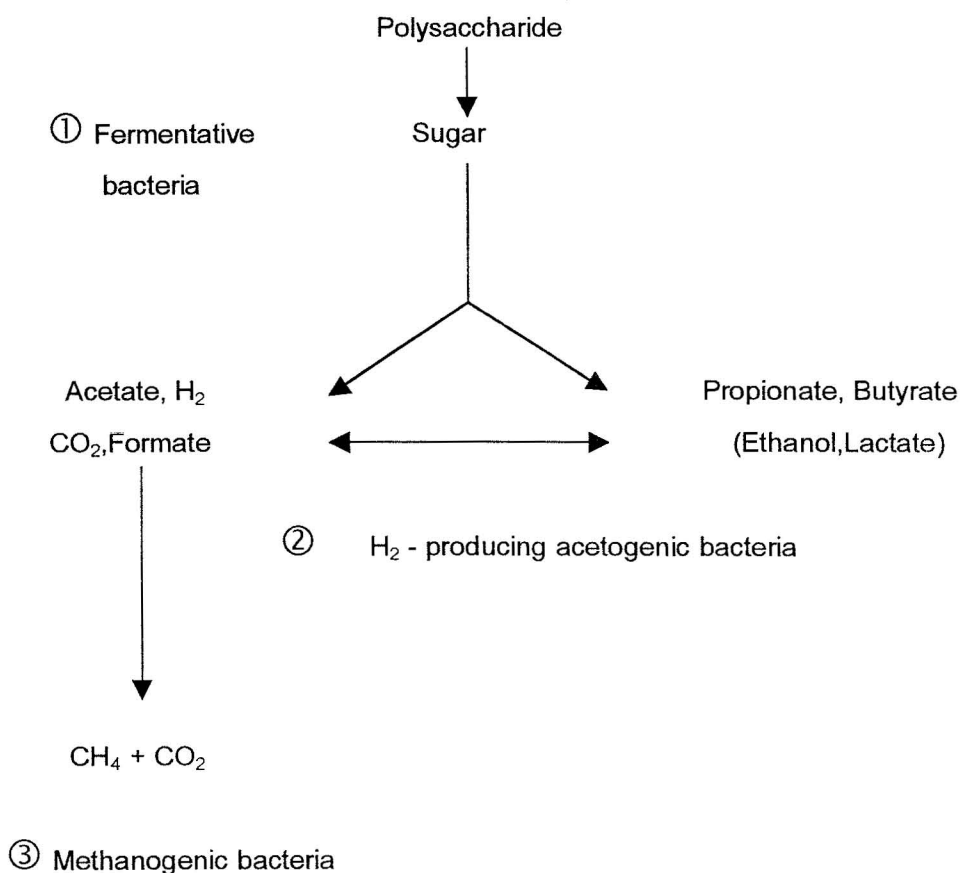
ตาราง 2 (ต่อ)

Composition of Pineapple Peel	Percent of Fresh Weight
2. Diastose	Present
3. Protein (N. 6.25)	0.44 - 0.60
D. Inorganic	
1. General	
a. Water	87.0 - 91.4
2. Specific	
a. Ammonia	0.07 - 0.17 mg /100 g
b. Calcium	0.01 - 0.03
c. Iron	0.02 - 0.05 mg /100 g
d. Magnesium	7 - 8 mg /100 g
e. Manganese	Trace to 4 g /100 g
f. Nitrate	0-8 mg /100 g
g. Phosphorus	0.008 - 0.01
h. Potassium	0.19 - 0.36
E. Miscellaneous	
1. Acids	
a. Ascorbic	0.032
b. Pectic	0.052 - 0.062
c. Total (as citric)	0.65 - 1.28
2. General	
a. Lignin	0.40 - 0.52
b. Total solid	82,287 mg /l
c. Volatile solid	70,430 mg /l



ภาพประกอบ 3 การย่อยสลาย cellulose material ในสภาวะไร้อากาศ

(Ghosh, Henry และ Christopher. 1985)



ภาพประกอบ 4 การย่อยสลายสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ให้ได้ก๊าซชีวภาพ

(เกษแก้ว ปะนะมณฑา. 2534)

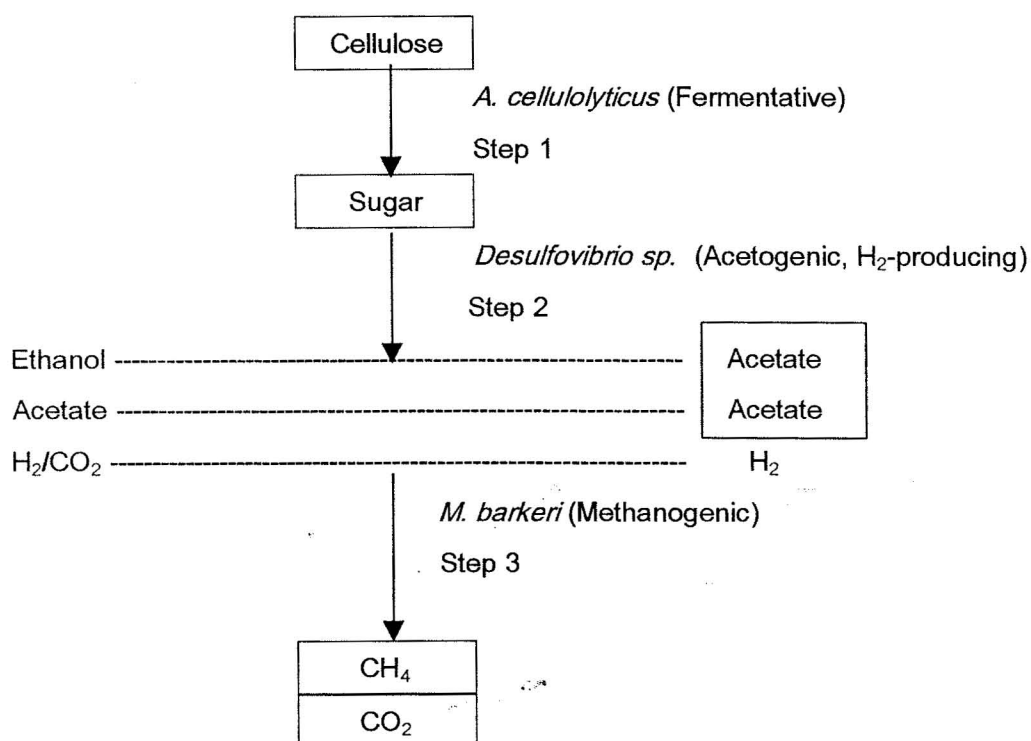
การศึกษาปฏิกิริยาการเกิดก๊าซมีเทนจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรต

1. การศึกษาปฏิกิริยาการเกิดก๊าซมีเทนจากสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน

เนื่องจาก Methanogenic bacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดก๊าซมีเทนใช้สารอาหารได้จำกัด และมักจะเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็ก เช่น กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ หรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน เนื่องจากของเสียส่วนใหญ่ เช่น มูลสัตว์ ของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารประกอบไปด้วยสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดก๊าซมีเทนจากสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนเหล่านี้

เซลลูโลส

การศึกษาการเกิดก๊าซมีเทนจากเซลลูโลสเป็นแบบที่ใช้เชื้อผสมหลายชนิด วิตตอเรีย และ สแตนเนีย (Victoria and Staniey. 1981) ได้ศึกษาโดยใช้เชื้อผสม 3 ชนิด เชื้อที่นำมาศึกษาประกอบด้วย *Acetivibrio cellulolyticus* , *Desulfovibrio sp.* และ *Methanosarcina barkeri* ขั้นตอนและสารอาหารตัวกลาง (Intermediate substrate) ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเชื้อทั้ง 3 ชนิด ดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อผลิตก๊าซมีเทนโดยจุลินทรีย์ 3 ชนิด
(เกษแก้ว ปะนะมณฑา. 2534)

ในขั้นแรก *A. cellulolyticus* จะย่อยสลายเซลลูโลสได้น้ำตาล จากนั้นน้ำตาลจะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารตัวกลาง ซึ่งประกอบด้วย อะซิเตท เอทานอล ก๊าซไฮโดรเจน และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในจำนวนเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการศึกษานั้น *Desulfovibrio* เป็นจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวที่สามารถใช้เอทานอลได้ โดยจะออกซิไดซ์เอทานอลให้กลายเป็นอะซิเตท และ

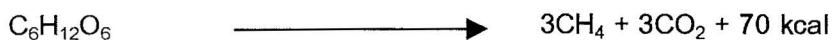
ก๊าซไฮโดรเจน สำหรับอัตราการเกิดก๊าซมีเทนโดย *M. barkeri* ที่อยู่ในเชื้อผสมจะเกิดใน 2 ระดับ คือ การเกิดก๊าซมีเทนในระยะแรกจะเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเกิดขึ้นในอัตราที่ช้า หลังจากนั้นอัตราการเกิดก๊าซมีเทนจะเร็วขึ้น ซึ่งคาดว่า การเกิดก๊าซมีเทนในช่วงนี้เนื่องมาจากการใช้อะซิเตท และยังพบว่าขณะเกิดกระบวนการเมทาบอลิซึมของอะซิเตท โดย *M. barkeri* จำเป็นต้องมีไฮโดรเจนปริมาณเล็กน้อยอยู่ด้วย เพื่อใช้เป็นตัวรีดิวส์ในปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่เมทิล

แคน และ แมรี่ (Khan and Mary. 1981) ได้ศึกษาการเกิดก๊าซมีเทนจากเซลล์ูโลส โดยใช้เชื้อผสมที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้วพบว่า ในการทดลองที่เป็นแบบครั้งคราว (Batch) ปริมาณเซลล์ูโลสที่มีอยู่ในสารอาหารถ้ามีไม่เกิน 5 กรัมต่อลิตรจะไม่มีผลต่อการทดลอง แต่ถ้า ปริมาณเซลล์ูโลสในสารอาหารมีมากเพิ่มขึ้นจนถึง 10 กรัมต่อลิตรหรือมากกว่านี้ จะมีผลทำให้เกิดการสะสมของกรดอะซิติกทำให้อัตราการย่อยสลายเซลล์ูโลสและการผลิตก๊าซมีเทนลดลง แคน และ แมรี่ยังพบอีกว่าอัตราการย่อยสลายเซลล์ูโลสยังขึ้นอยู่กับอัตราการใช้อะซิเตทและไฮโดรเจน เนื่องจากเชื้อที่ใช้ในการศึกษาเป็นเชื้อผสมทำให้มีสารตัวกลางที่เกิดจากการย่อยสลายเซลล์ูโลสหลายชนิด จากการศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์ในเชื้อผสมในการเปลี่ยนสารตัวกลางไปเป็นก๊าซมีเทนพบว่าก๊าซไฮโดรเจนแทบไม่มีผลต่ออัตราหรือประสิทธิภาพในการเปลี่ยนอะซิเตทไปเป็นก๊าซมีเทน นอกจากนั้นการเปลี่ยนโพรพิอเนทไปเป็นก๊าซมีเทนก็เกิดขึ้นได้ดีเช่นเดียวกัน แต่อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะช้ากว่าการเปลี่ยนอะซิเตทไปเป็นมีเทน บิวทีเรท ฟอร์เมท ไอโซบิวทีเรท และ วาสิเรทก็ถูกใช้และให้ก๊าซมีเทนเช่นเดียวกันแต่ปฏิกิริยาเกิดได้ช้ามาก นอกเหนือจากMethanogenic bacteria ที่ใช้ กรดอินทรีย์แล้ว ยังพบว่าในเชื้อผสมมี Methanogenic bacteria ที่สามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์ และอะซิเตทในการผลิตก๊าซมีเทนได้จำนวนมากพอๆกับจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถเปลี่ยนโพรพิอเนทไปเป็นกรดอะซิติกและไฮโดรเจน

2. การศึกษาปฏิกิริยาการเกิดก๊าซมีเทนจากสารประกอบอินทรีย์เชิงเดี่ยว

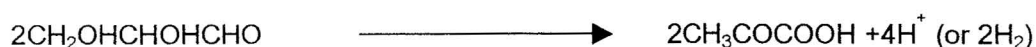
เนื่องจาก Methanogenic bacteria มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมได้น้อยและอัตราการเจริญค่อนข้างช้าเมื่อเปรียบเทียบกับ Non-methanogenic bacteria ดังนั้น Rate-limiting step ที่กำหนดอัตราเร็วของการผลิตก๊าซมีเทนจึงขึ้นอยู่กับกิจกรรมของ Methanogenic bacteria โดยศึกษาในสารประกอบน้ำตาลดังต่อไปนี้

สารประกอบน้ำตาล



การย่อยสลายน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้ได้ก๊าซมีเทนดังสมการข้างต้นนั้นในขั้นแรกน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม จะถูกย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 3 อะตอม ก่อน จากนั้นน้ำตาลดังกล่าวจึงถูกเปลี่ยนไปเป็นก๊าซมีเทนตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. น้ำตาลถูกเปลี่ยนไปเป็น อะซิเตท คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน ดังสมการต่อไปนี้



2. ไฮโดรเจนที่เกิดจากปฏิกิริยา จะทำปฏิกิริยากับคาร์บอนไดออกไซด์ต่อจนได้ก๊าซมีเทน



3. อะซิเตทจะแตกตัวต่อไปได้ก๊าซมีเทนดังสมการ



จะพบว่าหนึ่งในสามของก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นมาจากปฏิกิริยาระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนและ 2 ใน 3 มาจากปฏิกิริยาการแตกตัวของอะซิเตท

อย่างไรก็ดี การย่อยสลายน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม หลายชนิดอาจทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นได้ เช่น เอทานอล กรดไพรูวอิก กรดบิวทีริก และกรดอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ขึ้น ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทนต่อไป (Mah et. al. 1977)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ

เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารต้องอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์หลายชนิดที่เจริญร่วมกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเข้าใจถึงปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์เพื่อให้กระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารดำเนินไปได้อย่างดียิ่งขึ้นกระบวนการหมักแบบไร้อากาศมีปัจจัยต่างๆเข้ามาเกี่ยวข้องหลายอย่างที่จะทำให้ระบบมีประสิทธิภาพมากหรือน้อยได้แก่ อัตราการป้อนอินทรีย์สาร (Organic loading rate) องค์ประกอบของวัตถุดิบ ปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) อุณหภูมิ ระยะเวลาเก็บกัก (Hydraulic retention time, HRT) และปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) เป็นต้น (ปริดา แยมเจริญวงศ์. 2534) ปัจจัยต่างๆ สามารถจำแนกออกเป็นปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม และปัจจัยในการปฏิบัติงาน ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม และปัจจัยในการปฏิบัติงาน

ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม (Environmental factor)	ปัจจัยในการปฏิบัติงาน (Operational factor)
pH	ระยะเวลาเก็บกัก
ความเป็นด่าง (Alkalinity)	อัตราการป้อนอินทรีย์สาร
อุณหภูมิ (Temperature)	องค์ประกอบของวัตถุดิบ
ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile acid concentration)	การกวนผสม
สารพิษ (Toxic materials)	ปริมาณความร้อน (Heating)
อาหารเสริม (Nutrients)	

ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม

pH แบคทีเรียที่สร้างกรดสามารถทน pH ได้ต่ำถึง 4.5 โดยไม่เป็นอันตรายเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ย่อยสลายสารอาหารแล้วก่อให้เกิดกรดอินทรีย์ดังนั้นจึงคงทนต่อสภาพ pH ที่เป็นกรดได้ดี สำหรับการเปลี่ยนแปลง pH ภายในถังปฏิกรณ์นั้นเกิดเนื่องจากปริมาณอินทรีย์สารที่ป้อนเข้าสู่ระบบ ถ้ามีการป้อนอินทรีย์สารเข้าสู่ระบบมาก แบคทีเรียที่สร้างกรดจะย่อยสลายอินทรีย์สารเหล่านี้ให้เป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย จึงเกิดการสะสมของกรดทำให้ pH ของระบบลดลงจนแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทนไม่สามารถย่อยสลายได้ทันจึงเกิดการสะสมของกรด

อินทรีย์ระเหยง่ายในระบบ ส่วนแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทนมีค่า pH ที่เหมาะสมกับประสิทธิภาพการผลิตก๊าซมีเทนคือ 6.5-7.5 แต่ถ้า pH ลดต่ำลงจนถึง 5.0 จะเป็นอันตรายอย่างรุนแรงต่อแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทนเนื่องจากการทำงานของระบบล้มเหลวเพราะไฮโดรเจน อีออน (H^+) จะกลายเป็นพิษต่อแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทน การแก้ไขสาเหตุการยับยั้งที่เกิดจาก pH ลดลงอย่างมากคือการทำให้ H^+ เป็นกลางด้วยการเติมด่างเข้าไปควบคุมให้ pH อยู่ระหว่าง 7.0 - 7.5

ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) เป็นค่าที่แสดงความสามารถของน้ำในการรับอนุภาคโปรตอนมีหน่วยเป็นมิลลิกรัม/ลิตรของ $CaCO_3$ ค่าความเป็นด่างนี้เป็นตัวบ่งชี้ความมีเสถียรภาพของระบบ ถ้าระบบมีค่าความเป็นด่างสูงแสดงว่าระบบมี Buffering capacity สูงสามารถรักษาค่า pH ของระบบให้คงตัวอยู่ได้นานไม่เกิดการแปรปรวนของค่า pH ได้ง่ายเมื่อมีการเพิ่มปริมาณกรดในระบบ ในทางตรงกันข้ามถ้าระบบมีค่าความเป็นด่างต่ำ เมื่อเกิดการสะสมของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายภายในระบบค่อนข้างสูง pH ของระบบมีค่าลดลงอย่างมากดังนั้นในการควบคุมระบบให้ทำงานได้ปกติจำเป็นต้องรักษาค่าความเป็นด่างไม่ให้มีค่าต่ำจนเกินไป ค่าความเป็นด่างที่เหมาะสมกับระบบบำบัดน้ำเสียมีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 1,000 - 3,000 มิลลิกรัม/ลิตรของ $CaCO_3$

กรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile Fatty Acid; VFA) กรดอินทรีย์ระเหยง่าย หรือ VFA นี้เป็นผลิตผลสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารในสภาวะไร้อากาศ ในระบบที่มีการสะสมของ VFA จะทำให้ pH ของระบบลดต่ำลง และถ้า pH มีค่าลดลงต่ำกว่า 6.5 จะเป็นอันตรายต่อแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทนหากไม่แก้ไขจน pH มีค่าลดลงถึง 4.5 - 5.0 จะมีผลทำให้ระบบเสียสมดุลระหว่างขั้นตอนการผลิตกรดและขั้นตอนการผลิตก๊าซมีเทน ซึ่งสามารถสังเกตได้ คือมีกลิ่นเหม็นเปรี้ยวและมีก๊าซมีเทนเป็นองค์ประกอบต่ำมาก (ในสภาวะปกติก๊าซชีวภาพที่ได้มีก๊าซมีเทนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 70) ดังนั้นในการติดตามควบคุมการทำงานของระบบการหมักในถังปฏิกรณ์จำเป็นต้องวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายและวัดค่า pH ควบคุมกันไปด้วยเสมอ เมื่อตรวจพบว่าการทำงานของระบบมีแนวโน้มที่จะเสียสมดุล กล่าวคือมีความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายสูงมาก ค่าความเป็นด่างต่ำและค่า pH ต่ำกว่า 6.5 จำเป็นต้องมีการแก้ไขระบบให้คืนสู่สภาพสมดุล ดังนี้

1. ปรับ pH ให้เป็นกลางโดยการเติมสารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้แก่ระบบ วิธีนี้เป็นการแก้ไขที่ได้ผลอย่างรวดเร็วแต่เสียค่าใช้จ่ายสูงและมีข้อเสียที่สำคัญคือ ก่อให้เกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของระบบ เช่น กรณีการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ปรับ pH มักเกิดตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตในระบบ
2. ลดปริมาณการเติมอินทรีย์สารเข้าสู่ระบบให้น้อยลง เป็นวิธีการที่ให้ผลดีมากกว่าไม่เปลืองค่าใช้จ่ายและไม่เกิดผลแทรกซ้อนเกี่ยวกับตะกอนในภายหลัง โดยทั่วไปกรดอินทรีย์ที่พบในถังปฏิกรณ์ส่วนใหญ่ได้แก่ กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิก

(ส่วนมากเป็นกรดอะซิติก) ในสภาวะที่ pH เป็นกลาง กรดเหล่านี้อยู่ในรูป อะซิเตท บิวทีเรท และ โพรพิอเนท ที่มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียที่สร้างมีเทนต่ำกว่าที่อยู่ในรูป Free acid form ในสภาวะปกติ ปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายภายในถังปฏิกรณ์ไม่ควรเกิน 2,000 มิลลิกรัม/ลิตร ในบางกรณีอาจพบได้ถึง 5,000 มิลลิกรัม/ลิตร ในรูปของกรดอะซิติก

อุณหภูมิ (Temperature) อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายอินทรีย์สาร และการผลิตก๊าซชีวภาพของถังปฏิกรณ์ เนื่องจากการทำงานของถังปฏิกรณ์ต้องอาศัยจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่สามารถเจริญและเกิดเมทาบอลิซึมได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน โดยช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ดังกล่าวแบ่งออกได้เป็น 3 ช่วง คือ (Ingraham. 1962)

1. Psychrophilic range เป็นช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส
2. Mesophilic range เป็นช่วงอุณหภูมิระหว่าง 20 - 45 องศาเซลเซียส
3. Thermophilic range เป็นช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิที่แบคทีเรียเจริญอยู่นั้นมีผลต่อองค์ประกอบของเซลล์ สภาวะโภชนาการ (Brown.1957) และกิจกรรมของเอนไซม์ในเซลล์ (Buswell. 1957) อาจกล่าวได้ว่า อุณหภูมิที่แบคทีเรียเจริญอยู่ มีผลต่อชนิดและจำนวนของแบคทีเรียที่ปรากฏ ดังนั้นอุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญในการกำหนดชนิดของแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ มีรายงานว่า การย่อยสลายอินทรีย์สารในสภาวะไร้อากาศเป็นก๊าซมีเทนสามารถเกิดขึ้นได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 0 - 55 องศาเซลเซียส แต่เพื่อความเหมาะสมทางด้านเศรษฐศาสตร์ ถังปฏิกรณ์ควรใช้งานในช่วง Mesophilic และ Thermophilic เท่านั้น (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2534) ตัวอย่างเช่น ในกรณีของประเทศไทยซึ่งมีสภาพภูมิประเทศส่วนใหญ่อยู่ในเขตร้อน อุณหภูมิโดยเฉลี่ยประมาณ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นค่าใกล้เคียงกับช่วงอุณหภูมิ Mesophilic มาก และอุณหภูมิไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก โดยทั่วไปจึงไม่จำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิให้กับถังปฏิกรณ์ ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในส่วนของการควบคุมอุณหภูมิไปได้มาก

โดยทั่วไปการดำเนินระบบการย่อยสลายอินทรีย์สารที่อุณหภูมิสูงจะมีประสิทธิภาพดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ เช่นการย่อยสลายอินทรีย์สารที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพสูงกว่าการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ถึง 1.9 เท่า (Bryant. 1979) อย่างไรก็ตามการดำเนินระบบในช่วงอุณหภูมิสูงมีข้อเสียที่ Thermophilic bacteria ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ไม่ดีเท่ากับ Mesophilic bacteria จึงมีความเสี่ยงต่อการล้มเหลวของระบบสูงและยังสิ้นเปลืองพลังงานในการควบคุมอุณหภูมิของถังปฏิกรณ์ให้เท่ากับ 55 องศาเซลเซียส

อาหารเสริม (Nutrients) นอกจากอินทรีย์สารในระบบที่แบคทีเรียใช้เป็นสารอาหารโดยตรงแล้วแบคทีเรียยังต้องการธาตุอาหารอื่นในการสร้างเซลล์ใหม่ด้วย ธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) ธาตุอาหารที่จำ

เป็นดังกล่าวควรมีอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม คือควรมีอัตราส่วน COD : N : P เท่ากับ 100 : 22 : 0.4 หรือ BOD : N : P เท่ากับ 100 : 1.1 : 0.2 ถ้ามี ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสต่ำกว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมนี้ ประสิทธิภาพในการย่อยสลายอินทรีย์สารและการผลิตก๊าซชีวภาพจะต่ำลง ในทางตรงกันข้ามถ้ามีปริมาณไนโตรเจนมากเกินไปจะเป็นพิษต่อแบคทีเรีย หรือเปลี่ยนสภาพแบคทีเรียได้ เช่นทำให้ตะกอนของแบคทีเรียมีน้ำหนักเบา ดังนั้นโอกาสที่จะสูญเสียชีวมวลออกไปจากถังปฏิกรณ์จึงสูงขึ้น ส่วนธาตุอื่นๆที่มีความจำเป็นนอกเหนือไปจากสองธาตุดังกล่าวแล้วได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม โมลิบดีนัม โคบอลต์ และเหล็ก เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียต้องการธาตุเหล่านี้ในปริมาณน้อยมาก และโดยทั่วไปในน้ำทิ้งมีธาตุเหล่านี้ในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงคำนึงถึงเพียงธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเท่านั้น

สารพิษ (Toxic substances) ภายในถังปฏิกรณ์ถ้ามีสารบางอย่างสะสมอยู่ในปริมาณมากเกินไปจะเป็นพิษต่อแบคทีเรียได้ ซึ่งระดับความเป็นพิษจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสารนั้นๆ ส่วนมากแล้วธาตุที่มีน้ำหนักอะตอมและไอออนที่ Valency สูงกว่า จะมีพิษมากกว่าธาตุที่มีน้ำหนักอะตอมและไอออนที่ Valency ต่ำกว่า นอกจากนี้อินทรีย์สารที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นพวก Benzene ring แบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายได้ ถ้ามีอยู่ในระบบมากเกินไปจะเป็นพิษต่อแบคทีเรียด้วย ระดับความเข้มข้นของสารพิษที่เป็นอันตรายต่อแบคทีเรียในระบบการย่อยสลายอินทรีย์สารในสภาวะไร้อากาศ แสดงไว้ในตาราง 4 ส่วนระดับความเข้มข้นของไอออนและโลหะหนักที่เป็นพิษต่อระบบโดยตรงแสดงไว้ในตาราง 5 โดยทั่วไปในน้ำทิ้งมักมีสารพิษหลายชนิดปะปนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูง แต่กระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารในถังปฏิกรณ์ยังดำเนินต่อไปได้เนื่องจากสารพิษเหล่านั้นสามารถลดระดับความเป็นพิษของซึ่งกันและกันให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม (Antagonism) ตัวอย่างเช่น ในกรณีพิษที่เกิดจากการมี Na^+ สูงถึง 3,500 มิลลิกรัม/ลิตรสามารถทำให้หมดไปได้ ถ้าในระบบมี Ca^{2+} และ Mg^{2+} ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงระหว่าง 50 - 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ในทางตรงกันข้ามแคทไอออนบางตัวกลับไปเพิ่มความเข้มข้นของแคทไอออนหนึ่งเมื่ออยู่ร่วมกัน (Synergism) (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2525) สำหรับพิษที่เกิดจากโลหะหนักสามารถทำให้ลดลงได้ด้วยสารประกอบซัลไฟด์ที่เกิดขึ้นในระบบ หรือจากการเติมสารลงในระบบแล้วสลายตัวให้ซัลไฟด์ ทั้งนี้เนื่องจากซัลไฟด์ไปจับตัวกับโลหะหนักต่างๆ ให้อยู่ในรูปของโลหะซัลไฟด์ซึ่งตกตะกอนและไม่ละลายน้ำ จึงสามารถลดความเป็นพิษจากโลหะหนักได้

ตาราง 4 ระดับความเข้มข้นของสารต่างๆที่เป็นอันตรายต่อแบคทีเรียในกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารในสภาวะไร้อากาศ (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2525)

สารพิษ	ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นอันตรายต่อแบคทีเรีย (มิลลิกรัม/ลิตร)
Cu	1.0
Zn	5.0
Cr ⁶⁺	5.0
Cr ³⁺	2,000.0
Total Chromium	5.0
Ni	2.0
Cd	0.02
S ⁻	100.0
SO ₄ ²⁻	500.0
Ammonia	1,500.0
Na ⁺	3,500.0
K ⁺	2,500.0
Ca ²⁺	2,500.0
Mg ²⁺	1,000.0
Acetonitrite	5.0
Benzene	50.0
CCl ₄	10.0
Chloroform	0.1
Pentachlorophenol	0.4
Cyanide	1.0

ตาราง 5 ความเข้มข้นของไอออนและโลหะหนักที่เป็นพิษต่อระบบบำบัดโดยตรง
(ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2525)

ไอออนของ โลหะหนักที่ เป็นพิษ	ความเข้มข้น		ผลที่มีต่อระบบ
	โมล/ลบ.ดม.	มก./ลบ.ดม.	
Na ⁺	0.2	4,600	เริ่มมีผลยับยั้งการทำงาน
	0.4	9,200	หยุดการทำงาน
K ⁺	0.05-0.10	1,900 -3,900	ไม่มีผลยับยั้ง
	>0.1	>3,900	เริ่มมีผลยับยั้งการทำงาน
Mg ²⁺	0.35	13,650	หยุดการทำงาน
	>0.05	1,200	เริ่มมีผลยับยั้งการทำงาน
Ca ²⁺	0.2	4,800	หยุดการทำงาน
	0.075	3,000	เริ่มมีผลยับยั้งการทำงาน
S ²⁻	>0.2	>8,000	หยุดการทำงาน
	-	150 - 250	เริ่มมีผลยับยั้งการทำงาน
Cu	-	800	หยุดการทำงาน
	-	397	ก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นลดลงเหลือเพียงร้อยละ 24 ของเกณฑ์ที่ควบคุม
Zn	-	>500	หยุดการเกิดก๊าซ
	-	350 - 400	ก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นลดลงเหลือเพียงร้อยละ 5 ของเกณฑ์ที่ควบคุม
Ni	-	1,000	แบคทีเรียถูกทำลายจนหมด
	-	200	แบคทีเรียเริ่มถูกทำลาย
Cr	-	367	ก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นลดลงเหลือเพียงร้อยละ 23 ของเกณฑ์ที่ควบคุม
	-	500 - 1000	แบคทีเรียถูกทำลายอย่างรุนแรง
	-	>1,000	แบคทีเรียถูกทำลายจนหมด
	-	200	แบคทีเรียเริ่มถูกทำลาย
	-	2,000	แบคทีเรียถูกทำลาย

สภาวะและสารที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

เพื่อเป็นการป้องกันการล้มเหลวที่จะเกิดขึ้นกับระบบของถังปฏิกรณ์สำหรับบำบัดน้ำเสียและผลิตก๊าซชีวภาพ ในการดำเนินระบบจึงจำเป็นต้องให้ความสำคัญต่อบัจจัยที่มีผลยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ต่างๆในระบบ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทน ซึ่งมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมน้อยกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ โดยทั่วไปตัวแปรที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดการยับยั้งขึ้นในระบบ คือ การลดลงของผลผลิตก๊าซมีเทน การเพิ่มขึ้นของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย ความล้มเหลวในการกำจัดค่าซีโอดี ความล้มเหลวในการควบคุม pH ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม และมีความเสถียรภาพต่ำต่อการรับภาระอินทรีย์สารที่เพิ่มมากขึ้น (Overload) สาเหตุที่ทำให้เกิดการยับยั้งในกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารจนได้ก๊าซมีเทน สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 สาเหตุ คือการดำเนินการของระบบอย่างไม่มีประสิทธิภาพจนเกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของแบคทีเรียภายในระบบ และการปรากฏอยู่ของสารประกอบหรือธาตุที่เป็นพิษในของเหลวภายในระบบ (นพพร เจตนชัย, 2529 ; เกษแก้ว ปะนะมณฑา, 2534 และ สุพัฒน์ เผ่าพงษ์ไทย, 2539)

การดำเนินการของระบบอย่างไม่มีประสิทธิภาพเกิดจากตัวแปรหลัก 2 ประการ คือ pH และกรดอินทรีย์ระเหยง่าย โดยทั่วไปแล้วกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารในขั้นตอนการผลิตก๊าซมีเทนจะถูกยับยั้ง เมื่อระบบมีค่า pH ต่ำกว่า 6.5 หรือสูงกว่า 8.2 แต่การมี pH ต่ำนี้ไม่มีผลรุนแรงจนเกิดการทำลายแบคทีเรียได้ มีผลแต่ยับยั้งการสร้างก๊าซมีเทนเท่านั้น จากการศึกษาของ คีเฟอร์และเออเตส (Keefer and Urtes, 1962) พบว่าแบคทีเรียที่สร้างมีเทนสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ภายใต้สภาวะที่มี pH ต่ำกว่า 5 ได้นานถึง 5 เดือน และแบคทีเรียดังกล่าวนี้สามารถฟื้นสภาพได้ทันที เมื่อถึงการปรับ pH ให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม หลังจากอาศัยอยู่ในสภาวะที่มี pH ต่ำกว่า 6.5 หรือสูงกว่า 8.2 ไม่เกิน 12 ชั่วโมง แต่ถ้าอยู่ในสภาวะที่เกินไปกว่านี้ต้องใช้เวลาระยะหนึ่งสำหรับการปรับตัวก่อนคืนสภาพปกติในกรณีน้ำทิ้งดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องดื่มและอุตสาหกรรมการหมักดองที่มีสภาพความเป็นกรดสูงซึ่งโดยทั่วไปเกิดจากกรดอินทรีย์โมเลกุลสั้นๆที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำทิ้ง แต่เนื่องจากกรดอินทรีย์โมเลกุลสั้นถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นกรดอินทรีย์ดังกล่าวนี้จึงไม่ใช่สาเหตุทำให้เกิดสภาพ pH ในถังปฏิกรณ์ต่ำ และนอกจากนี้ในน้ำทิ้งดังกล่าวยังมีองค์ประกอบพวกไบคาร์บอเนต ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวบัฟเฟอร์ของระบบอีกด้วย แต่ถ้าในน้ำทิ้งดิบมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในปริมาณต่ำ ($\text{COD} : \text{N}$ น้อยกว่า 100 : 2) จะไม่สามารถให้แอมโมเนียมคาร์บอเนตที่ทำหน้าที่เป็นตัวบัฟเฟอร์หลักแก่ระบบอย่างเพียงพอ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดสภาพการขาดแคลนอาหารเสริมสำหรับแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทน ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการย่อยสลายกรดอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นก๊าซมีเทน เนื่องจากการใช้ไนโตรเจนที่มีอยู่จนหมดในระหว่างที่มีการสร้างกรดอินทรีย์ระเหยง่าย ผลที่ตามมาคือทำให้มีการ

สะสมของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นจำนวนมาก pH ของระบบลดลงอย่างรวดเร็ว สาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่งที่มีผลต่อการย่อยสลายอินทรีย์สารภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน คือ การมีสารประกอบหรือธาตุที่เป็นพิษในระบบซึ่งสามารถแยกพิจารณาได้ดังนี้

Alkali and Alkaline-Earth Inhibition

โดยทั่วไปน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมักมีธาตุกลุ่ม Alkali และ Alkaline-Earth อาทิเช่น โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม เป็นส่วนประกอบเสมอ ธาตุเหล่านี้เมื่อมีอยู่ในระบบที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ จะเป็นประโยชน์ต่อแบคทีเรีย แต่ถ้ามีความเข้มข้นสูงเกินระดับค่าที่กำหนดจะเป็นอันตรายต่อแบคทีเรีย จากการศึกษาของ กูเกลแมน และ แมคคาร์ที (Kugelman and McCarty, 1965) พบว่าธาตุกลุ่ม Alkali และ Alkaline-Earth เป็นสาเหตุให้เกิดการยับยั้งกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารเมื่อธาตุใดธาตุหนึ่งในสองกลุ่มนี้มีความเข้มข้นสูงเกินกว่าระดับค่าที่กำหนดจะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียและการยับยั้งดังกล่าวจะลดลงอย่างมากเมื่อธาตุตัวอื่นๆในสองกลุ่มนี้ที่มีความเข้มข้นในระดับที่กำหนด จะเกิดปฏิกิริยาร่วมกันและมีผลในการลดการยับยั้งจากความเข้มข้นที่สูงเกินกว่าระดับที่กำหนดของธาตุนั้นต่อแบคทีเรีย ค่าความเข้มข้นในระดับที่กำหนดของธาตุเหล่านี้คือ 0.01 โมลาร์ สำหรับ Na^+ และ K^+ และ 0.005 โมลาร์ สำหรับ Ca^{2+} และ Mg^{2+}

การยับยั้งเนื่องจากโลหะหนัก (Heavy Metal inhibition)

โลหะหนักถูกพิจารณาเป็นธาตุที่มีผลต่อการยับยั้งกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สาร ภายใต้สภาวะไร้อากาศเนื่องจากโลหะหนักมีคุณสมบัติในการตกตะกอนได้ ดังนั้นระดับที่ก่อให้เกิดการยับยั้งมีค่าเปลี่ยนแปลงไปตามการศึกษาของแต่ละบุคคล นอกจากนี้อาจเกิดจากการดำเนินระบบของถังปฏิกรณ์ในสภาวะที่แตกต่างกัน เช่น pH ช่วงอุณหภูมิที่ดำเนินการ ความเข้มข้นของน้ำทิ้งดิบ ลักษณะการป้อนสารอาหาร และระยะเวลาในการเก็บกักของเหลวภายในระบบ เป็นต้น ในบางกรณีค่าที่เปลี่ยนแปลงอาจเกิดจากการเสริมฤทธิ์ หรือลดฤทธิ์ซึ่งกันและกัน และการปรับตัวของระบบต่อปริมาณโลหะหนัก

จากการศึกษาความเป็นพิษของโลหะหนักต่อกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สารในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าความเป็นพิษของ $\text{Zn} = \text{Cu} = \text{Cd} > \text{Cr (VI)} = \text{Cr (III)} > \text{Fe}$ ส่วนการควบคุมไม่ให้โลหะหนักยับยั้งกระบวนการย่อยสลายทำได้โดยการเติมซัลไฟด์ หรือ sulfide precursors (Kugelman, 1965) จากผลการทดลองของ ลอว์เรนส์ และ แมคคาร์ที (Lawrence and McCarty, 1965) พบว่าโลหะหนักเช่น ทองแดง สังกะสี นิเกิล และเหล็ก ที่มีปริมาณสูงๆไม่ก่อให้เกิดสภาพที่เป็นพิษต่อระบบ ถ้าระบบนั้นมีความเข้มข้นของซัลไฟด์ที่สมดุลกับความเข้มข้นของโลหะหนัก ยกเว้นโครเมียมที่ยังมีความเป็นพิษได้เนื่องจากไม่สามารถรวมตัวกับซัลไฟด์เกิดเป็นเกลือของซัลไฟด์ที่ไม่ละลายน้ำได้ (Moscy Huges, 1975)

การยับยั้งเนื่องจากซัลไฟด์ (Sulphide inhibition)

ถึงแม้ว่าซัลไฟด์จะสามารถใช้เป็นตัวควบคุมโลหะหนักที่เป็นตัวยับยั้งในขั้นตอนการสร้างมีเทนได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ซัลไฟด์ที่อยู่ในรูปของไฮโดรเจนซัลไฟด์แม้จะมีส่วนช่วยในการสร้างมีเทนภายใต้สภาวะไร้อากาศ แต่ก็ยังมีขีดจำกัดในเรื่องของความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อระบบ จากการศึกษานี้ของแอนเดอร์สันและคณะ (Anderson and others, 1982) สรุปได้ว่าสารประกอบซัลไฟด์ที่ละลายน้ำจะมีผลยับยั้งการสร้างมีเทนเมื่อในถังปฏิกรณ์มีปริมาณซัลไฟด์มากกว่า 165 มิลลิกรัม/ลิตรขึ้นไป และเมื่อในระบบมีปริมาณซัลไฟด์เท่ากับ 300 มิลลิกรัม/ลิตร จะมีผลต่อการสร้างกรดอินทรีย์น้อยมาก แสดงให้เห็นว่าสารประกอบซัลไฟด์มีผลเสียต่อการสร้างก๊าซมีเทนมากกว่าการสร้างกรดอินทรีย์ เพราะว่าการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์มีผลกระทบต่อการสร้างก๊าซมีเทนถึง 2 ประการ คือ ประการแรกแบคทีเรียพวก Sulphate-reducing แย่งจับไฮโดรเจนซึ่งใช้ในการสร้างก๊าซมีเทน ไปสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ทำให้มีการยับยั้งการสร้างก๊าซมีเทนได้ ประการที่สองเมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงกว่า 200 มิลลิกรัม/ลิตร จะมีผลต่อการทำงานของแบคทีเรียที่สร้างมีเทน

ปัจจัยในการดำเนินระบบการหมักก๊าซชีวภาพ

ระยะเวลาเก็บกัก เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งในการควบคุมประสิทธิภาพของกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพ อัตราการย่อยสลายอินทรีย์สารในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเก็บกักจนถึงค่าสูงสุดค่าหนึ่งต่อจากนั้นจะลดลง แต่ถ้าระยะเวลาเก็บกักน้อยเกินไปจะมีผลทำให้ตะกอนแบคทีเรียหลุดออกจากระบบได้มาก จนกระทั่งทำให้แบคทีเรียถูกล้างออกจากระบบในอัตราที่เร็วกว่าที่แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนอันเป็นสาเหตุทำให้ระบบล้มเหลว นอกจากนี้ระยะเวลาเก็บกักจะเป็นปัจจัยหลักในการออกแบบระบบการหมัก

อัตราการป้อนอินทรีย์สาร เป็นปัจจัยหลักที่มีความสำคัญที่สุดที่กำหนดความสามารถในการบำบัดของเสียการปรับอัตราการป้อนอินทรีย์สารให้มีค่าแตกต่างกันทำได้โดยการเปลี่ยนอัตราการไหลของ ของเสียที่ไหลผ่านถังหมัก หรือเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของของแข็ง หรือความเข้มข้นของอินทรีย์สารที่ให้แก่ระบบ ซึ่งการเปลี่ยนอัตราการป้อนอินทรีย์สารจะมีผลต่อระยะเวลาเก็บกัก

การกวน การกวนเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบและป้องกันการเกิดการสะสมของอินทรีย์สารตามจุดต่างๆของถังปฏิกรณ์ เนื่องจากการกวนทำให้เกิดการสัมผัสระหว่างสารอาหารกับจุลินทรีย์และทำให้ของเหลวภายในมีสภาพเป็นเนื้อเดียวกัน (ชาญชัย คุณวานากิจ, 2529)

สาเหตุที่ทำให้ระบบเกิดการล้มเหลว

จากการศึกษาถึงปัจจัยของสิ่งแวดล้อม และปัจจัยในการทำงานเพื่อทำให้ระบบมีประสิทธิภาพนั้นสามารถสรุปสาเหตุของการล้มเหลวในการควบคุมระบบกำจัดของเสียโดยวิธีการย่อยสลายแบบไร้อากาศ ดังนี้ คือ

1. การให้ของเหลวเข้าสู่ระบบมากเกินไป (Hydraulic overloading) จะทำให้ระยะเวลาเก็บกักจุลินทรีย์ให้อยู่ในระบบ (Residence time) ลดลงจนถึงจุดที่จุลินทรีย์ไม่สามารถที่จะเพิ่มจำนวนได้ทันก่อนที่จะถูกล้างออกจากระบบ
2. การให้ปริมาณอินทรีย์สารเข้าสู่ระบบมากเกินไป (Organic overloading) จะทำให้เกิดการสะสมของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย ซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทน
3. การให้ปริมาณสารพิษเข้าสู่ระบบมากเกินไป (Toxic overloading) เมื่อสารพิษเช่น โลหะหนัก สารเคมี แอมโมเนีย และออลอนลบเข้าสู่ระบบมากเกินไปจะไปทำลายแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทน ซึ่งสาเหตุของการตายเกิดจากการสะสมของสารพิษที่มีความเข้มข้นสูง (สุพรรณเผ่าพงษ์ไทย, 2539)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การย่อยสลายเซลล์ในในระบบต่างๆ เช่น ระบบการย่อยสลายขยะหรือมูลสัตว์ด้วยวิธีการทางชีวภาพ ในถึงบ่าบัดน้ำเสียตะกอนก้นทะเลหรือแม่น้ำลำคลอง และในทางเดินอาหารของสัตว์กินพืช พบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถย่อยสลายเซลล์และไซแลน เช่นแบคทีเรียแกรมลบในสปีชีส์ *Fibrobacter (Bacteroides) succinogens* และ *Butyrivibrio fibrisolvens* แบคทีเรียแกรมบวกในสปีชีส์ *Ruminococcus albus* และ *Ruminococcus flaveciens* และ Anaerobic fungi พวก Chytridiomycetes โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Neocallimastix frontalis* และ *Neocallimastix particiarum* โปรโตซัวหลายชนิดที่อยู่ในจีนัส *Diplodinium* และ *Eudiplodinium* เนื่องจากโปรโตซัวนำเซลล์เข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี Phagocytosis จึงเป็นปัญหาว่า เซลล์ถูกย่อยโดย Cellulolytic bacteria ที่ถูกกินเข้าไปพร้อมกันหรือโปรโตซัว อย่างไรก็ตามก็ตีพบว่า *Eudiplodinium maggii* สร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลล์ได้ มีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถสร้างชุดของเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลล์ในธรรมชาติได้อย่างสมบูรณ์ด้วยตัวเอง จุลินทรีย์จำนวนมากมีระบบการย่อยสลายเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์รวมทั้งยังขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการทำงานของจุลินทรีย์ในระบบ ส่วนในระบบการย่อยสลายอินทรีย์สารนั้นอาจมีการทำงานประสานกันของ จุลินทรีย์ที่ย่อยเซลล์มากกว่า 1 ชนิด มีข้อสันนิษฐานว่าจุลินทรีย์ที่

สร้างระบบย่อยสลายเซลลูโลสที่ไม่สมบูรณ์เป็นส่วนหนึ่งของวิวัฒนาการโดยเมื่อได้รับยีนในบางชุดจะสามารถสร้างระบบย่อยสลายเซลลูโลสที่สมบูรณ์ได้ (Gilbert and Hazlewood. 1993)

จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสในระบบที่ไร้อากาศสามารถอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์อื่นทั้งที่เป็นจุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูโลสด้วยกัน เช่น *Clostridium thermocellum* และ *Trichoderma koningii* หรืออยู่ร่วมกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่น เช่น จุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทน การอยู่ร่วมกันนั้นมักจะมีการถ่ายทอดสารอาหารและ Growth factor ต่าง ๆ จุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทนจะช่วยลดความเป็นกรดที่เกิดจากการตะกอน และปริมาณไฮโดรเจนที่มากเกินไป เช่นการอยู่ร่วมกันของ *C. thermocellum* กับ *Methanobacterium thermoautotrophicum* หรือกรณีของ *N. frontalis* ซึ่งเป็น Anaerobic fungi กับ *Methanobrevibacter smithii* พบว่าการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์มักทำให้จุลินทรีย์ทุกชนิดในกลุ่มเจริญได้ดีขึ้น หรือทนต่อสภาพที่ไม่เหมาะสมได้มากขึ้น (Beguin and Aubert. 1994) อัตราเร็วของปฏิกิริยาการย่อยสลายอินทรีย์สารนอกจากจะขึ้นอยู่กับปริมาณตัวเร่งคือจุลินทรีย์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับสภาวะที่เหมาะสมที่เอนไซม์จะสามารถทำงานได้ เช่น อุณหภูมิ และ pH เป็นต้น อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อจำนวนและการทำงานของจุลินทรีย์ในระบบ มีการทดลองนับจำนวนจุลินทรีย์ในระบบที่จุดต่างๆของถังปฏิกรณ์ที่มีการย่อยสลายเปลือกสนในระบบเปิด (Hinch et.al. 1992) พบว่าไม่ว่าจะเป็นจุดที่มีอุณหภูมิสูงหรือต่ำของถังปฏิกรณ์ ต่างก็มีจุลินทรีย์ทั้งที่เป็น Mesophile และ Thermophile อาศัยอยู่ บริเวณที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากกว่าที่ตำแหน่งที่มีอุณหภูมิ 55 - 84 องศาเซลเซียส ประมาณ 100 เท่า แมคคินเลย์ และ เวสต์อล (McKinley and Vestal. 1984) พบว่าการทำงานของจุลินทรีย์ในระบบการย่อยสลายอินทรีย์สารดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 - 45 องศาเซลเซียส มีรายงานบางเรื่องเสนอว่า แม้จะมีจุลินทรีย์ที่ปรับตัวเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง แต่จุลินทรีย์เหล่านั้นก็ต้องเสียความสามารถของเมตาบอลิซึมบางอย่างไป และมักจะเจริญได้ไม่ดีเท่ากับจุลินทรีย์ที่ปรับตัวให้เข้ากับอุณหภูมิปานกลาง (Brock. 1967) อย่างไรก็ตามก็มีผลที่ขัดแย้งกันอยู่ในเรื่องของความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายอินทรีย์สาร เนื่องจากผลการวิจัยจำนวนมากพบว่าการย่อยสลายอินทรีย์สารเกิดที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ และพบว่าจำนวนของแบคทีเรียที่ย่อยสลายโพลีเมอร์ (Polymer Degrading Bacteria) และจำนวนของจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงเมื่ออุณหภูมิของถังปฏิกรณ์ Sewage sludge สูงกว่า 50 องศาเซลเซียส แต่ความสามารถในการย่อยสลายโพลีเมอร์โดยรวมไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิ

จากรายงานการวิจัยซึ่งศึกษาลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อราชนิดหนึ่งพบว่าเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญมากในการทำให้เกิดการหมุนเวียนของคาร์บอนในธรรมชาติเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ย่อยๆอีกหลายชนิดซึ่งมีผลในการย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ และพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในช่วง 4-6 (Sen, Abraham and Chakrabraty. 1982)

การย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น เซลลูโลสและไซลเลนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักที่พบในพืชทั่วไป โดยการย่อยสลายของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายประกอบเหล่านี้ได้ดีขึ้นเมื่อมีการใช้สับسترที่เหมาะสม (Sachlehner et.al. 1998) เช่น จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลเลนของ *Piromyces sp.* เมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ พบว่า Lactose, Starch, Cellobiose, Filter paper cellulose เป็นตัวชักนำที่ดีในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลเลน (Teunissen. 1992) และจากการศึกษาของ ซันนา (Sunna. 1996) พบว่าการใช้ไซลเลนหรือไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง *Thermotoga thermarum* สามารถชักนำให้เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลเลนได้ดี

จากการศึกษาของอารี ฤทธิบุรณ์ (2542) พบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากฟางข้าว โดยเชื้อราในสภาวะอาหารแข็ง พบว่าเชื้อราทั้ง 4 ชนิด คือ *Aspergillus niger* ATCC 6275 *Trichoderma reesi* ATCC 13631 *Myrothecium verrucaria* UPPC 3345 และ *Sporotrichum pulverulentum* นำเชื้อทั้ง 4 มาเลี้ยงที่สภาวะเดียวกัน โดยนำฟางข้าวที่ผ่านการบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.25 มิลลิเมตร เป็นแหล่งอาหารหลัก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 80 และปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์/ฟางข้าว 5 กรัม พบว่าภายใต้สภาวะดังกล่าวมีเพียง *S. pulverulentum* เท่านั้นที่เจริญและให้ค่ากิจกรรมไซลเลน (Xylanase activity) สูงสุดเท่ากับ 0.65 ยูนิต/กรัม และจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลเลนของ *S. pulverulentum* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง พบว่าชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดคือการใช้รำข้าวในอัตราส่วน ฟางข้าว : รำข้าว เท่ากับ 1 : 1 ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 80 และพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม เท่ากับ 6.0 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวเชื้อผลิตเอนไซม์ไซลเลน และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 57.11 ยูนิต/กรัม และพบว่าเมื่อนำ *S. pulverulentum* มาเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เชื้อ *S. pulverulentum* จะให้ค่ากิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลเลนสูงสุดเท่ากับ 1.27 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 1.68 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนทำให้ค่ากิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลเลนลดลงอาจเนื่องมาจากการถูกยับยั้งโดยแหล่งคาร์บอน หรือการถ่ายเทมวลสารได้น้อยลง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลเลนโดย *Streptomyces sp.* PC 22 พบว่าจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้ประมาณ 14 ยูนิต/มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซลเลน

เลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสที่ 45 องศาเซลเซียส และ 9 ตามลำดับ เอนไซม์นี้มีอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 60-70 องศาเซลเซียส และ 5.5-7.0 ตามลำดับ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 60 องศาเซลเซียส และต่อ pH ในช่วงกว้างตั้งแต่ 4.0-9.5 (Ungchaithum and Pinphanichakarn. 1998)

การวัดการเจริญของจุลินทรีย์ทำได้หลายวิธี ทั้งแบบที่นับจำนวนเซลล์ทั้งหมด หรือนับเฉพาะจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแบบนำเซลล์มาเจือจางและเลี้ยงให้เจริญบนอาหารแข็งหรือเหลว แล้วนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นการวัดปริมาตรของเซลล์อัดแน่น วัดความขุ่นของอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ซึ่งน้ำหนักแห้ง ตลอดจนวิธีทางชีวเคมีแบบอื่นๆ การที่จะเลือกใช้วิธีใดขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการทดลอง ชนิดของจุลินทรีย์ และปัจจัยทางปฏิบัติการอื่นการนับจำนวนเซลล์ที่ย่อยสลาย เซลล์โลสที่มีชีวิตในสภาวะไร้อากาศที่นิยมใช้กันอยู่มีทั้งแบบที่ใช้อาหารแข็งและใช้อาหารเหลว เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนจะเจริญช้ามาก การเลี้ยงค่อนข้างยุ่งยาก ต้องใช้เทคนิคและเครื่องมือที่ออกแบบมาโดยเฉพาะ (Rickwood. 1991) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ต้องเลือกให้เหมาะสมเพื่อที่จะนับจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ต้องการได้ทั้งหมดและไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์กลุ่มอื่น การเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้กันอยู่มี 2 แบบคือ Roll tube technique วิธีนี้ต้องใช้เทคนิคและเครื่องมือพิเศษเพื่อให้อาหารวิ่งเคลือบจับข้างหลอดทดลองเป็นฟิล์มบางอาศัยทักษะ ความชำนาญเป็นพิเศษเนื่องจากทำในระบบเปิด อาศัยการพ่นก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์อยู่ตลอดเวลาเพื่อไล่ก๊าซออกซิเจน แบบที่ 2 คือการเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อในระบบปิดที่สร้างขึ้นมาเป็นพิเศษ ขณะถ่ายเชื้อมักทำในตู้ Anaerobic chamber การเลี้ยงแบบนี้มีข้อดีที่ไม่ต้องอาศัยเทคนิคความชำนาญมากนัก เนื่องจากทำในระบบปิดอยู่แล้ว แต่เครื่องมือและการบำรุงรักษามีราคาแพง สำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่ใช้กันอยู่คือวิธี Most Probable Number (MPN) เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากการหาจำนวนจุลินทรีย์ในน้ำ (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2525 ; Peeler McClure. 1992) ปัจจุบันมีการดัดแปลงสูตรอาหารให้ใช้นับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้สารอาหารต่างๆ ได้หลายกลุ่ม เช่น Acetogen Homoacetogen Sulfate-reducing bacteria และ Hydrolytic bacteria ที่ใช้สารอาหารต่างๆ กัน (Zhang and Noike. 1991) และมีการดัดแปลงเพื่อใช้นับจำนวนเชื้อราได้อีกด้วย (Obispo and Dehority. 1992)

จากรายงานการวิจัยของ สวันสัน บัสตาและปีเตอร์สัน (Swanson, Busta and Peterson. 1992) พบว่าปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการนับจำนวนจุลินทรีย์คือ การเป็นเม็ดกระจายในอาหารของสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้เกิดข้อผิดพลาดในการหาตำแหน่งที่แน่นอนของโคโลนี ที่สำคัญคือการวิเคราะห์ผลด้วยสายตาเพียงอย่างเดียวอาจทำให้เกิดความลำซึ่งส่งผลต่อการนับและการคำนวณปริมาณจุลินทรีย์ที่นับได้ และทำให้การนับจำนวนด้วยวิธี Plate count ลดความน่าเชื่อถือลงไป ในขณะที่การนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี MPN หรือเรียกว่า A dilution method นั้นแม้จะให้ความเที่ยงตรงแม่นยำต่ำกว่าวิธีการนับโดยตรง (Cochran. 1950) อย่าง

เช่นวิธี Plate count แต่มีหลายปัจจัยที่สามารถเลือกได้ตามความต้องการที่จะศึกษา มีรายงานว่าจากการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพืชสมุนไพรในสภาวะไร้อากาศด้วยวิธี Roll tube และวิธี MPN ให้ผลไม่แตกต่างกัน (Shochy and Dehority. 1989) ขั้นตอนการทำการทดลองง่าย เสียเวลาน้อย ด้วยการเลี้ยงในอาหารเหลว การรักษาสภาวะแบบไร้อากาศง่ายและสะดวก (Dehority, Tirabasso and Grifo. 1989) และแม้จะเป็นเพียงการประมาณเชื้อที่พบในตัวอย่างที่ต้องการศึกษาเท่านั้น แต่ความเที่ยงตรงแม่นยำสามารถทำให้เกิดขึ้นได้จากความละเอียดรอบคอบในทุกกระบวนการในการทดลอง เช่น การทำอัตราการเจือจางที่เหมาะสมที่จะสามารถนับได้ การทำการทดลองแบบ 3 หรือ 5 หลอด หากจำนวนซ้ำของการทดลอง (หรือจำนวนหลอด) มากย่อมมีโอกาสในการผิดพลาดน้อยกว่าการใช้จำนวนซ้ำของการทดลองน้อยกว่า ประกอบกับความระมัดระวังในการเตรียมอาหาร การทำการเจือจาง การผสมหรือการเขย่าอาหารหรือเชื้อให้ผสมกลมกลืนกัน (Halverson and Ziegler. 1933c) นอกจากนั้นในการตรวจวัดผลการเจริญของจุลินทรีย์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น ความเป็นกรด-ด่าง ความขุ่น ปริมาณการใช้สับสเตรทที่ลดลง และวิธีอื่นๆ เช่น NO_3 reduction, Strach hydrolysis และ H_2S production จะใช้วิธีการวิเคราะห์ที่ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการศึกษา (Peeler et.al. 1992) โดยได้สรุปข้อดีและข้อเสียของเทคนิค Plate count และเทคนิค MPN ดังตาราง 6

ตาราง 6 เปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยระหว่างเทคนิค Plate count และเทคนิค MPN

เทคนิค	ข้อดี	ข้อด้อย
Plate count	1. สามารถใช้ในการศึกษาคัดแยกเชื้อได้ดี 2. เชื้อเจริญได้ง่าย 3. ใช้ระยะเวลาในการบ่มน้อย 4. ความแม่นยำสูง	1. ข้อผิดพลาดจากการนับเกิดขึ้นได้หลายสาเหตุ เช่น 1.1 สับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำกระจายเป็นชิ้นเล็ก ๆ ในวันทำให้เกิดความลำบากในการหาตำแหน่งที่แน่นอนของโคโลนี 1.2 ลักษณะของโคโลนีเล็กและใสสังเกตได้ยาก 2. การตรวจวัดการเจริญจากการประเมินด้วยสายตาเพียงอย่างเดียว 3. จำเป็นต้องใช้เทคนิคความ

ตาราง 6 (ต่อ)

เทคนิค	ข้อดี	ข้อด้อย
Plate count		ชำนาญสูง 4. การควบคุมให้เกิดสภาวะไร้อากาศค่อนข้างลำบาก 5. เสียค่าใช้จ่ายสูง
MPN	1. การรักษาสภาวะไร้อากาศสะดวก เสียเวลาน้อย 2. ไม่จำเป็นต้องใช้เทคนิคความชำนาญมากนัก 3. การตรวจวัดการเจริญมีหลายวิธี เช่น การวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น ความเป็นกรด-ด่าง ความขุ่น ปริมาณการใช้สับสเตรทที่ลดลง และวิธีอื่นๆ เช่น NO_3 reduction, Strach hydrolysis และ H_2S production	1. ไม่สามารถใช้ในการศึกษาการแยกเชื้อ และจัดจำแนกเชื้อได้ 2. ระยะเวลาในการบ่มเชื้อนาน 3. เชื้อเจริญค่อนข้างช้า 4. ความแม่นยำต่ำ

(Swanson, Busta and Peterson. 1992 ; Cochran. 1950 ; Dehority, Tirabasso and Grifo. 1989 ; Halverson and Ziegler. 1933c ; Peeler et.al. 1992)

ธเนศ อุทิศธรรม (2526) ศึกษาการผลิตก๊าซชีวภาพจากของเสียจากโรงงานสับประรดกระป๋อง ซึ่งได้แก่ เปลือกและแกนสับประรดซึ่งได้มีการศึกษาครั้งแรกที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดยได้มีการศึกษาทั้งในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้ถังปฏิกรณ์หมักขนาด 5 ลิตร ได้ศึกษาการหมักเปลือกและแกนสับประรดที่ช่วงอุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) พบว่าอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการย่อยสลายอินทรีย์สารและการเกิดก๊าซชีวภาพ โดยประสิทธิภาพในการย่อยสลายอินทรีย์สารที่อุณหภูมิสูงจะสูงกว่าที่อุณหภูมิปานกลาง จากการวัดปริมาณกากที่เหลืออยู่ในถังปฏิกรณ์พบว่า การหมักที่อุณหภูมิสูงมีกากเหลือน้อยกว่าที่อุณหภูมิปานกลาง เมื่อตรวจวัดปริมาณอินทรีย์สารในรูป Chemical Oxygen Demand (COD) ในของเหลว (Effluent) จากถังปฏิกรณ์พบว่า การหมักที่อุณหภูมิสูงมีค่า COD สูงกว่าที่อุณหภูมิปานกลาง จากผลการศึกษาทำให้คาดว่า การย่อยสลายอินทรีย์สารไปเป็นก๊าซชีวภาพในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะผลิตก๊าซมีเทนได้ดีที่ 37

องศาเซลเซียส และจุลินทรีย์ที่มาจากถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จะผลิตก๊าซมีเทนได้ดีที่ 55 องศาเซลเซียส แต่การผลิตก๊าซมีเทนที่ 37 องศาเซลเซียสจะเกิดขึ้นได้ในปริมาณที่สูงกว่าที่ 55 องศาเซลเซียส ส่วนการย่อยสลายเซลลูโลสไม่ว่าจะโดยจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ใดจะย่อยสลายได้ดีในช่วงอุณหภูมิสูง

นพพร เจตนชัย (2529) ศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) โดยศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์เหล่านี้ในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการหมักทั้งที่อุณหภูมิสูง และอุณหภูมิปานกลางส่วนใหญ่มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันได้แตกต่างกันโดยเฉพาะการใช้กรดอินทรีย์ระเหยง่าย เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก กรดโพรพิโอนิก และกรดฟอร์มิกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิสูง สามารถใช้แหล่งคาร์บอนดังกล่าวไปใช้ในการผลิตก๊าซชีวภาพได้ต่ำจากรายงานต่างๆ พบว่ากรดอินทรีย์ที่เป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการเกิดก๊าซชีวภาพและปริมาณกรดอินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ อินทรีย์สารโมเลกุลใหญ่ที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น เซลลูโลสและไซลเลน มักถูกย่อยสลายที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่าที่อุณหภูมิปานกลาง ส่วน Methanogenic bacteria ที่ย่อยสลายกรดอินทรีย์ระเหยง่ายและแอลกอฮอล์บางชนิดพบได้ทั้งจากกลุ่ม Mesophile และ Thermophile แต่กลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวมีกิจกรรมได้ดีในช่วงอุณหภูมิปานกลาง ระหว่าง 37 - 40 องศาเซลเซียส

หัตยา ทิพย์วัฒน์ (2531) ได้ศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) ในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ เพื่อการเจริญและการผลิตก๊าซมีเทน พบว่าจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ทั้งสองอุณหภูมิ มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้ใกล้เคียงกัน แต่จุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิสูงไม่สามารถใช้กรดโพรพิโอนิก และโพรพานอลได้ นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ ยังมีผลต่อความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้สารเหล่านี้และผลิตผลที่ได้ เช่น เมื่อเติมเซลลูโลส หรือกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งคาร์บอนลงในถังปฏิกรณ์ จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตผลเท่านั้น ทั้งที่ในถังปฏิกรณ์จะมีทั้ง Non - methanogenic bacteria และ Methanogenic bacteria อยู่ เมื่อเติมเซลลูโลสหรือกลูโคสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ผลิตผลที่ได้จะมีทั้งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซมีเทนสำหรับกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์นั้น เมื่อความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 0.1 จะยับยั้งกิจกรรมของ Methanogenic bacteria

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการเกิดก๊าซชีวภาพ โดยจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ย่อยสลายสารอาหารต่างๆ ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่าจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 55

องศาเซลเซียส โดยจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะผลิตก๊าซมีเทนได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสจะผลิตก๊าซมีเทนได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แต่การเกิดก๊าซมีเทนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะเกิดได้ในปริมาณที่สูงกว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ส่วนการย่อยสลายเซลลูโลสนั้น ไม่ว่าจะโดยจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ใดจะย่อยสลายได้ดีในช่วงอุณหภูมิสูง

จากการหาปริมาณของสารที่อยู่ใน Effluent ในช่วงเวลาต่างๆหลังจากการเติมเปลือกสับปะรด และจากการใช้อุณหภูมิที่ไม่ใช่อุณหภูมิที่เหมาะสม รวมทั้งการใช้สารยับยั้งการเกิดมีเทน เช่น คลอโรฟอร์ม (294 มิลลิกรัม/ลิตร) ฟีนอล (3,000 มิลลิกรัม/ลิตร) และ Bromoethanesulphonate (20 มิลลิโมลาร์) พบว่าสารตัวกลางที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเปลือกสับปะรดในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีกรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทีริก และเอทานอล ส่วนในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สารตัวกลางที่สำคัญคือกรดอะซิติก และกรดบิวทีริก

เกษแก้ว ปะนะมณฑา (2534) ศึกษาการย่อยสลายสับปะรดต่างๆโดยจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพ พบว่าการย่อยสลายเปลือกสับปะรด ในระยะแรกเป็นการย่อยสลายน้ำตาลและสารประกอบที่ละลายน้ำได้มากกว่าเป็นการย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น เซลลูโลสที่มีในเปลือกสับปะรด และผลจากการศึกษาการย่อยสลายสับปะรดเปรียบเทียบกับกรดย่อยสลายเปลือกสับปะรด พบว่ามีวิธีการย่อยสลายที่นำไปสู่การเกิดก๊าซชีวภาพคล้ายคลึงกัน กล่าวคือจะได้ผลิตผลสารตัวกลางเป็นกรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก อัตราการเกิดและชนิดของผลิตผลสุดท้ายจะขึ้นกับความเข้มข้นของสับปะรดเริ่มต้น ซึ่งมีผลทั้งต่อชนิดและปริมาณของสารตัวกลาง

จากรายงานการวิจัยต่างๆจึงเป็นที่น่าสนใจว่าการย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น เซลลูโลสและไซแทนในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง เกิดขึ้นได้ดีกว่าที่หมักที่อุณหภูมิปานกลางนั้น เนื่องมาจากในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิต่างกัน จะมีปริมาณของจุลินทรีย์ต่างกันหรือจุลินทรีย์ที่เจริญในอุณหภูมิที่ต่างกันสามารถผลิตหรือมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแทนเนสต่างกัน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างชนิดและจำนวนของ Cellulolytic bacteria ที่อยู่ในถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดเปรียบเทียบระหว่างถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง และอุณหภูมิปานกลาง และผลที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงชนิดของสับปะรดนั้นมีความสัมพันธ์กันอย่างไร อันจะนำไปสู่การปรับปรุงระบบให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการหมักเปลือกสับปะรดแบบไร้อากาศชั้นตอนเดียว คือ มีขั้นตอนการผลิตกรดอินทรีย์ และขั้นตอนการผลิตก๊าซชีวภาพรวมอยู่ในถังปฏิกรณ์เดียวกัน ซึ่งได้พัฒนามาจากงานของ ธเนศ อุทิศธรรม ที่ได้ศึกษาการผลิตก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส โดยในงานวิจัยนี้จะศึกษาจำนวนและ กิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต เช่น เซลลูโลสและไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเปลือกสับปะรด เปรียบเทียบกันระหว่างถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส โดยศึกษาวิจัยที่ห้องปฏิบัติการวิจัยคณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. จานเพาะเชื้อ
2. ปีเปิด
3. ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเตรียมอาหาร
4. หลอดทดลอง
5. แท่งแก้วรูปตัวแอล (Spreader)
6. หม้อนึ่งอัดความดัน (Autoclave)
7. ขวดซีรัมขนาด 10 มิลลิลิตร
8. บิวเรตขนาด 25 และ 50 มิลลิลิตร
9. ปีกเกอร์ขนาดต่างๆ
10. ขวดรูปชมพู่
11. ชุดเข็มฉีดยา
12. เตาไฟฟ้า (Hot plate)
13. Volumetric flask
14. Anaerobic jar
15. Mixer (Vortex)
16. ตู้ Anaerobic chamber
17. ตู้บ่ม (Incubator)
18. เครื่อง Spectrophotometer

19. เครื่อง Colony counter
20. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
21. เครื่อง Gas Chromatograph
22. เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH-meter)
23. เครื่องกวนโดยใช้แท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)
24. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

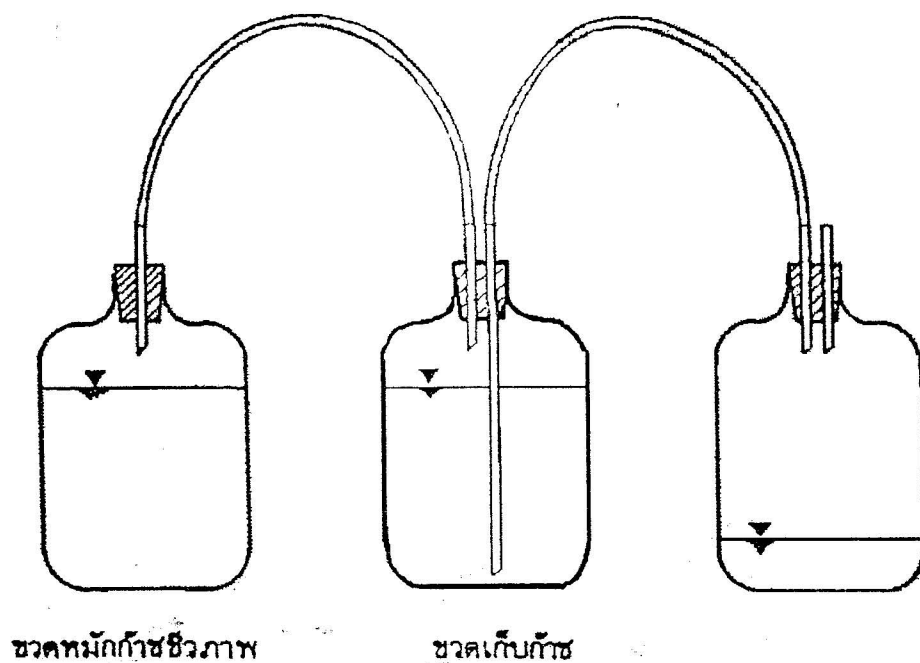
1. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก เข้มข้น 0.1 N
2. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N
3. Carboxymethylcellulose (CMC sodium salt, low viscosity, Sigma C8758 ; Sigma St.Louis, MO., USA)
4. Xylan from oat spelt, Sigma Chemical Co.
5. Cellulose from Sigma Chemical Co.
6. D - (+) Xylose from Merck Chemical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

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตก๊าซชีวภาพ

วัตถุดิบที่ใช้เป็นเปลือกสับปะรดที่นำมาจากโรงงานสับปะรดกระป๋องมาลีจังหวัดนครปฐม นำมาบดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดน้ำผลไม้ขนาดประมาณ 5 นาที และเก็บแช่แข็งไว้จนกว่าจะนำมาใช้

ถังปฏิกรณ์

ถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในการผลิตก๊าซชีวภาพเป็นขวดแก้วสีชาขนาด 1 แกลลอน มีความจุประมาณ 5 ลิตร ปริมาตรของเหลวที่ใช้ในการหมักเท่ากับ 4 ลิตร การผลิตก๊าซชีวภาพทำที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส การควบคุมอุณหภูมิของถังปฏิกรณ์ทำได้ โดยการแช่ถังปฏิกรณ์ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เก็บก๊าซที่เกิดขึ้นและวัดปริมาตรโดยการแทนที่น้ำ (ภาพประกอบ 6)



ภาพประกอบ 6 ลักษณะของชุดผลิตก๊าซชีวภาพ

(นพพร เจตนาชัย. 2529)

การหมักก๊าซชีวภาพ

นำเปลือกสับปะรดที่เตรียมตามวิธีดังกล่าวข้างต้นมาหมักในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส โดยการแช่ถังปฏิกรณ์ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ในการหมักต้องรักษาระบบให้มีสภาวะคงที่ตลอดการทดลอง จึงต้องมีการควบคุมปัจจัยต่างๆ โดยมีการเติมเปลือกสับปะรดลงในถังปฏิกรณ์ปริมาณ 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 267 มิลลิลิตร ทุก 3 วัน

มีระยะเวลาเก็บกัก 45 วัน ตรวจวัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นโดยการแทนที่น้ำ วิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซที่เกิดขึ้น ความเป็นกรด - ด่าง ค่าอัลคาไลน์ตี และปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนำมาจากถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปรดก่อนจะมีการเติมเปลือกสับปรดครั้งต่อไป

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ

เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ศึกษาเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไร้อากาศ ดังนั้นในการดูแลรักษาจุลินทรีย์ให้เจริญได้ดีที่สุดย่อมเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องคำนึงมากกว่าปกติ นอกเหนือไปจากการทำให้ระบบที่เลี้ยงจุลินทรีย์ไร้อากาศซึ่งสำคัญที่สุดและส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญเช่นเดียวกัน ดังนั้นสูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษาจึงต้องมีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษาด้วยเช่นกัน

สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษาในขั้นตอนนี้มี 4 สูตรดังแสดงในตาราง 8 โดยนำจุลินทรีย์จากน้ำหมักตัวอย่างในถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปรดมาทดลองเลี้ยงในอาหารทั้ง 4 สูตร ด้วยเทคนิค Plate count (การเจือจางเชื้อและ เทคนิค Plate count อธิบายไว้ในข้อ 2.1) บ่มเชื้อไว้ใน Anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส นานประมาณ 15-20 วัน จึงนำมาตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนจานเพาะเชื้อในอาหารแต่ละสูตรมาเปรียบเทียบกันว่าอาหารสูตรใดที่จุลินทรีย์สามารถใช้และเจริญได้ดีที่สุด

2. ศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ

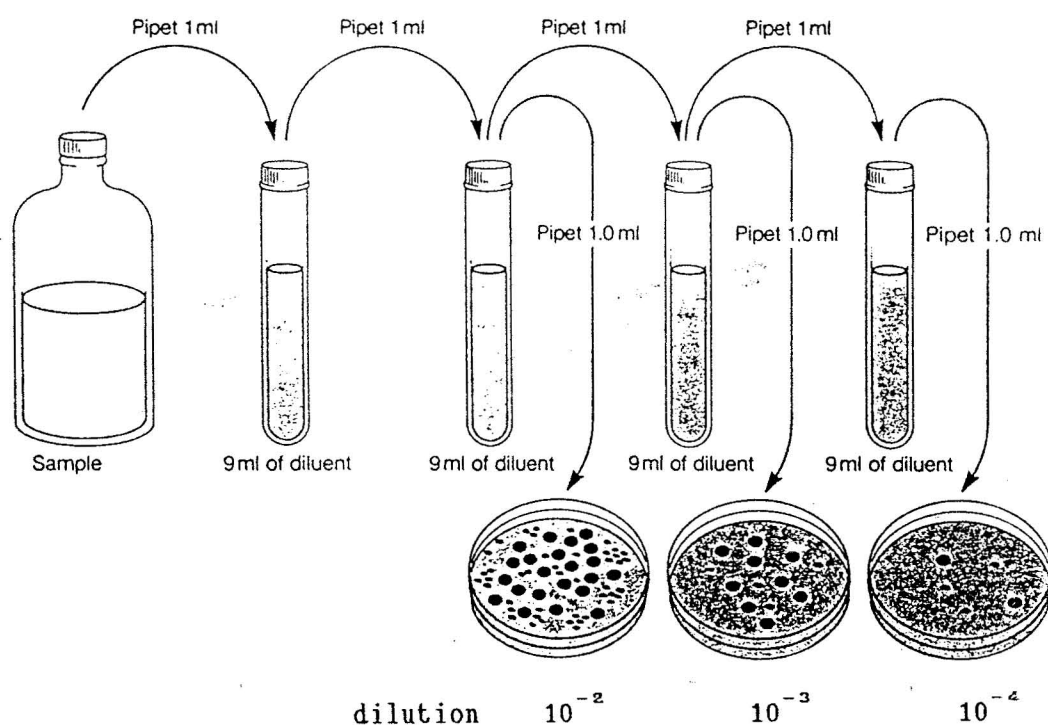
ได้มีการศึกษาถึงจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการเกิดก๊าซชีวภาพอยู่มาก แต่ก็ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ โดยเฉพาะการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไร้อากาศ ซึ่งจะต้องคำนึงถึงสภาวะที่ศึกษาต้องเป็นสภาวะที่ไร้อากาศ เนื่องจากจุลินทรีย์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม ดังนั้นการดูแลรักษา รวมไปถึงการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจะมีความยุ่งยากกว่าปกติ ซึ่งวิธีการศึกษาจำนวนของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดก๊าซชีวภาพในห้องทดลองมีหลายวิธี ซึ่งในการวิจัยนี้ใช้วิธี Plate count และวิธี MPN โดยนำสูตรอาหารที่เลือกได้จากข้อ 1 มาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดสอบเทคนิควิธีที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์

2.1 การนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี Plate count (Lane. 1981)

การเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไร้อากาศในอาหารที่เป็นวันแข็งบนจานเพาะเชื้อสามารถทำได้โดยเตรียมอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเพาะเชื้อซึ่งทำใน

ตู้ Anaerobic chamber ทิ้งจนเลี้ยงเชื้อไว้ในตู้อย่างน้อยที่สุด 12 ชั่วโมง เพื่อให้อากาศถูกดึงออกจากอาหารวันแข็งให้หมด หลังจากนั้นจึงนำอาหารไปใช้เลี้ยงเชื้อได้

วิธีการเจือจางเชื้อทำได้โดย นำตัวอย่างน้ำหมักจากถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประตมาเจือจางแบบ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ไป Spread บนอาหารวันแข็งที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคส ร้อยละ 0.5 หรือ โซโลสร้อยละ 0.5 หรือ โซแลนร้อยละ 0.2 หรือ แอลฟา-เซลลูโลสร้อยละ 0.2 แล้วนำไปบ่มไว้ใน Anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 - 20 วัน การติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ทำได้โดยการนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญบนจานเพาะเชื้อโดยอาศัยเครื่อง colony counter ช่วยในการนับ วิธีการเจือจางเชื้อและการทำ Plate count แสดงดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 ขั้นตอนการเจือจางเชื้อในการทำเทคนิค Plate count

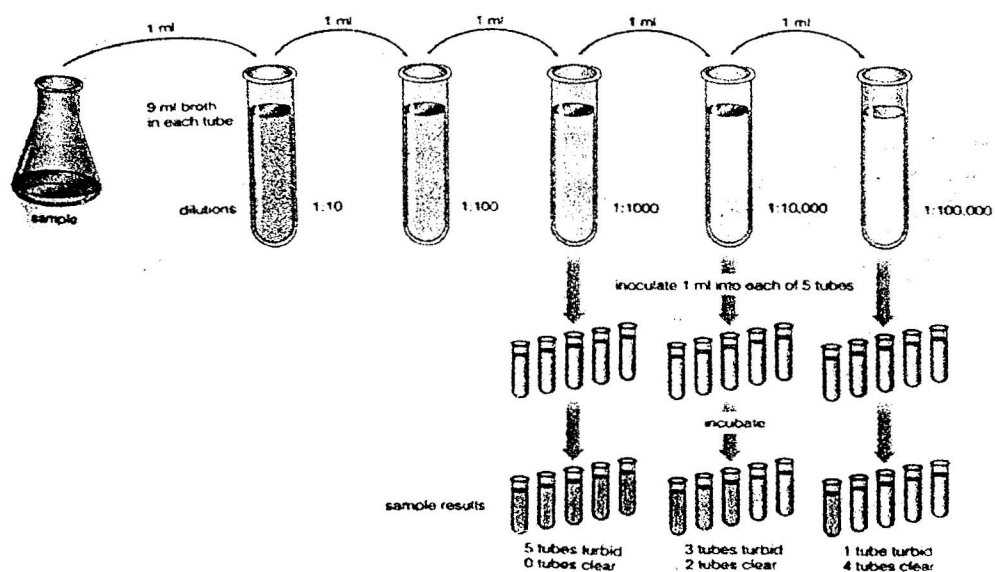
(Columé et al. 1986)

2.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี MPN (Peeler and Mccluer. 1992 ; Zinder et.al. 1984)

วิธี MPN หรือ Most Probable Number เป็นวิธีที่นิยมในการหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำ หลักการของวิธีนี้จะเป็นการใส่เชื้อลงไปในอาหารเหลว และตรวจดูการเจริญของเชื้อ และหรือการเกิดก๊าซในอาหารนั้น โดยทำการเจือจางตัวอย่างเชื้อหลายความเจือจาง ใส่เชื้อลงในอาหารเหลว ตรวจดูการเจริญของเชื้อ และจะทราบจำนวนของเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างที่ทำการทดสอบได้โดยถือว่าที่ความเจือจางที่อยู่ถัดขึ้นไปจากความเจือจางที่ไม่มี การเจริญของเชื้ออยู่จะมีเชื้ออยู่อย่างน้อย 1 ตัว วิธีการเจือจางเชื้อแสดงในภาพประกอบ 8 เพื่อให้เกิดความแม่นยำมากขึ้นในแต่ละความเจือจางของเชื้อจะเลี้ยงเชื้อในหลอดเป็นจำนวน 3 - 5 หลอด และตรวจดูจำนวนของหลอดที่มีเชื้อเจริญอยู่ในแต่ละความเจือจาง จากค่านี้นำไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN ที่จะบอกปริมาณของเชื้อตั้งต้นที่มีอยู่ได้ดังตัวอย่างในภาพประกอบ 8 และ ตาราง 7 ในการนำวิธี MPN มาประยุกต์ใช้กับการศึกษาจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพ ส่วนใหญ่มักใช้กับเชื้อผสมและศึกษาเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ โดยดูจากความสามารถของจุลินทรีย์ ในการใช้สารอาหารต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยการเปลี่ยนชนิดของสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน และดูการเจริญของเชื้อผสมในสารอาหารดังกล่าวเปรียบเทียบกับ ตาราง MPN ดังแสดงในตาราง 7 ก็จะทราบปริมาณจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มได้ (นพพร เจตนะชัย. 2529) การศึกษาด้วยวิธี MPN นี้จะนำเชื้อมาเลี้ยงในขวดซีรัม ขวดซีรัมที่ใช้เป็นขวดแก้วที่มีหลายขนาด (Lane. 1981 ; Terry et.al. 1974) ฝาปิดประกอบด้วยจุกยาง เพื่อป้องกันอากาศ ซึมเข้าและใช้เป็นจุดที่ตึงสารตัวอย่าง เนื่องจากในระหว่างที่มีการทดลองจะมีก๊าซเกิดขึ้นและจะทำให้มีความดันเกิดขึ้นภายในขวดจึงต้องมีฟาลูมิเนียมสำหรับครอบทับจุกยางเพื่อป้องกันการ กระเด็นของจุกยาง ขวดซีรัมมีลักษณะดังแสดงในภาพประกอบ 9 ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายที่ใช้เป็น Basal media และสารละลายอื่นๆ เช่น Reducing agent คือ L-cysteine HCl มีผลช่วยทำให้อาหารมีสภาวะไร้อากาศ หรือช่วยลดปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในอาหาร และ Resazurin ซึ่งทำหน้าที่เป็นอินดิเคเตอร์ในการบอกให้ทราบสภาพที่ไร้ออกซิเจนภายในขวดหาก มีออกซิเจนเข้าไปปะปนกับอาหารในขวด อาหารในขวดจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู ส่วนประกอบเหล่านี้จะต้มหรือทำให้ร้อนเพื่อไล่ก๊าซออกซิเจนออกไป และก่อนนำอาหารไปผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน จะนำอาหารไปพ่นไล่ก๊าซออกซิเจนอีกครั้งด้วยการใช้ก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์ หรือ ก๊าซอื่นๆที่ต้องการ (เช่น ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ นานประมาณ 10-15 วินาที สำหรับ ขวดที่มีขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายอยู่ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นปิดฝาขวดแล้วจึงนำอาหารไป ผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน ในสภาวะเช่นนี้จะทำให้ออกซิเจนที่เหลืออยู่ในสารละลาย ถูกรีดิวซ์ ซึ่งดูได้จากสีของ Reducing agent เช่นสีของ Resazurin ภายหลังจากนำอาหารออก

มาจากหม้อมัน เมื่อสารละลายเย็นแล้วจึงเติมสารอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไป จากนั้นจึงเติมเชื้อที่ต้องการศึกษาซึ่งได้จากวิธีการทำเจือจางเช่นเดียวกับวิธี Plate count แล้วนำเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดที่มีอาหารอยู่ 7 มิลลิลิตร จากนั้นปิดด้วยจุกยางแล้วครอบฝาอลูมิเนียม แล้วใช้เข็มฉีดยาดูดอากาศในช่องว่างเหนือของเหลวภายในขวดออกเพื่อให้ภายในขวดมีสภาวะไร้อากาศ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียสจนประมาณ 15-30 วัน การติดตามการเจริญของเชื้อตรวจวัดจากค่าการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรต่างๆ คือ ความเป็นกรด-ด่าง ความขุ่น ปริมาณน้ำตาลที่ลดลง และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นตามวิธีการวิเคราะห์ในภาคผนวก ก

ข้อดีของการใช้ขวดซีรัมคือสามารถวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นในระหว่างการบ่มได้ โดยใช้เข็มฉีดยาเสียบทะลุจุกยางไว้ การนำก๊าซที่เกิดขึ้นไปวิเคราะห์ทำได้โดยใช้ก๊าซในหลอดนี้ ส่วนการวิเคราะห์สารตัวกลางที่เกิดขึ้นในสารละลายทำได้โดยใช้เข็มฉีดยาดูดสารละลายออกมาโดยที่อากาศไม่สามารถซึมเข้าในขวดซีรัมได้ ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้หลายช่วง สำหรับการใส่ก๊าซที่ละลายอยู่ในสารละลายทำได้โดยใช้วิธีเขย่าขวดซีรัม



Calculation dilution factor (1^{st} used) x MPN (from table 3.1) = number of cells/ml of sample

$$1,000 \times 11.0 = 11,000 \text{ cells/ml}$$

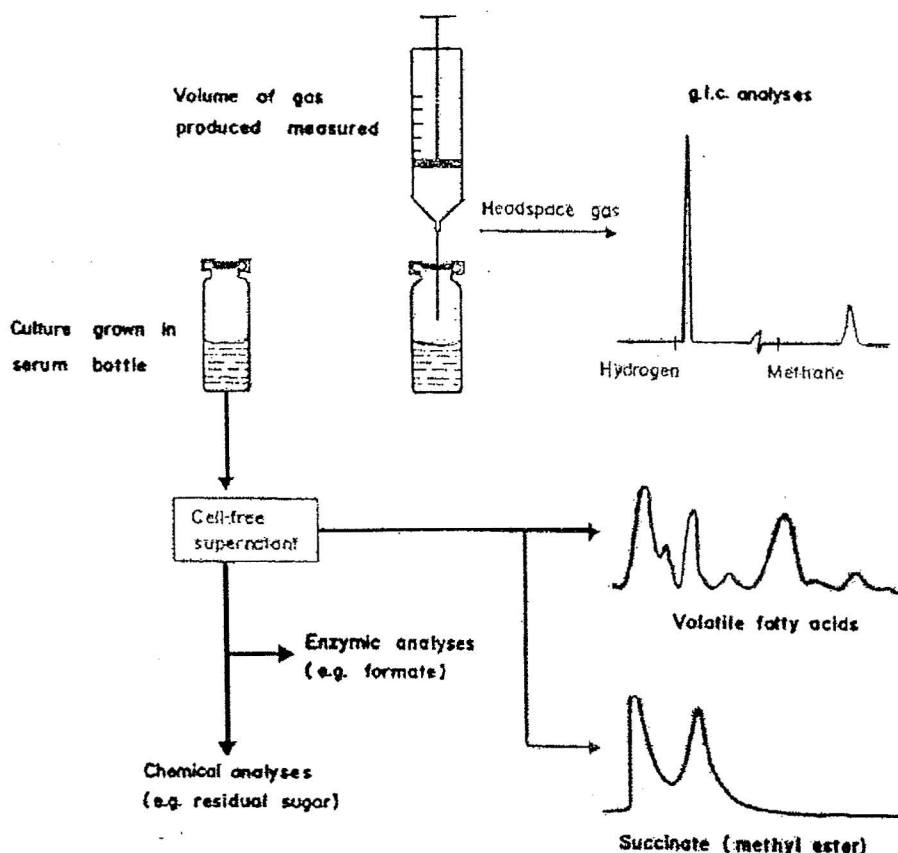
ภาพประกอบ 8 ขั้นตอนการเจือจางเชื้อในการทำเทคนิค MPN

(Ingraham and Ingraham. 1995)

ตาราง 7 ตาราง MPN

Number of Turbidity Tubes Inoculated			MPN	Number of Turbidity Tubes Inoculated			MPN
0	1	0	0.18	5	0	0	2.3
1	0	0	0.20	5	0	1	3.1
1	1	0	0.40	5	1	0	3.3
2	0	0	0.45	5	1	1	4.6
2	0	1	0.68	5	2	1	4.9
2	2	0	0.93	5	2	2	7.0
3	0	0	0.78	5	3	0	9.5
3	0	1	1.1	5	3	1	11.0
3	1	0	1.1	5	3	2	14.0
3	2	0	1.4	5	4	0	13.0
4	0	0	1.3	5	4	1	17.0
4	0	1	1.7	5	4	2	22.0
4	1	0	1.7	5	4	3	28.0
4	1	1	2.1	5	5	0	24.0
4	2	0	2.2	5	5	1	35.0
4	2	1	2.6	5	5	2	54.0
4	3	0	2.7	5	5	3	92.0
				5	5	4	160.0

(Ingraham and Ingraham. 1995)



ภาพประกอบ 9 ขั้นตอนการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดซีรัม

(นพพร เจตนชัย. 2529)

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสในถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรด (Teunissen et.al. 1991 ; Chen and Yusaku. 1994)

ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวนั้นส่วนใหญ่จะมีขั้นตอนและวิธีในการวิเคราะห์ที่คล้ายคลึงกัน คือการนำอาหารเหลวไปหมนเหวี่ยงที่ความเร็วสูงและนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับในงานวิจัยนี้ซึ่งเป็นน้ำหมักที่มีส่วนประกอบของเปลือกสับปะรดเป็นหลัก ดังนั้นก่อนจะนำสารละลายไปหมนเหวี่ยงที่ความเร็วสูงจึงต้องตั้งทิ้งไว้ให้กากหรือเศษเปลือกสับปะรดที่มีขนาดใหญ่ตกตะกอนก่อนแล้วจึงนำสารละลายส่วนบนไปหมนเหวี่ยง ซึ่งใช้ความเร็วที่ $10,000 \times g$ นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ตามขั้นตอนการวิเคราะห์เอนไซม์ในภาคผนวก ก ข้อ 5 และ ภาพประกอบ 9

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์และกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรต ในถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรด เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท

การศึกษาในขั้นตอนนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนที่ให้แก่อุณหภูมิจากเดิมที่เคยป้อนเปลือกสับปะรดมาเป็นสับสเตรทต่างๆที่สนใจจะศึกษา โดยใช้สารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก คือ กลูโคส และสารประกอบโมเลกุลใหญ่ คือ ไชเลนและแอลฟา-เซลลูโลส และแบ่งการทดลองเป็น 3 ชุดซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. แบ่งน้ำหมักจากถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดเดิม มาใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร มีปริมาตรการหมัก 250 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยจุกยางซึ่งด้านบนเจาะช่องเพื่อปล่อยก๊าซที่เกิดขึ้นออกไปสู่อีกขวดหนึ่ง วัดปริมาตรก๊าซโดยการแทนที่น้ำ เนื่องจากการศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีในถังปฏิกรณ์เดิม ดังนั้นจึงต้องปรับสภาพต่างๆให้มีความสมดุลคงที่เช่นเดียวกับถังปฏิกรณ์เดิมทั้ง 3 ชุด

2. ก่อนจะมีการป้อนสับสเตรท ในขั้นตอนนี้จะเก็บตัวอย่างน้ำไว้เพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไชลานเนสที่มีในเบื้องต้น

3. ป้อนสับสเตรททุก 3 วัน โดยป้อนสับสเตรท 0.05 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 16.66 มิลลิลิตร กำหนดระยะเวลาเก็บกักเท่ากับถังปฏิกรณ์เดิม คือ 45 วันและควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง อัลคาไลน์ตี ปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย เพื่อให้ระบบอยู่ในสภาวะที่คงที่ตลอดระยะเวลา 1 เดือน จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ตามวิธีการวิเคราะห์เพื่อนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกันว่าในช่วงก่อนเติมสับสเตรทและหลังเติมสับสเตรทเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างไรกับจำนวนจุลินทรีย์แต่ละชนิดและกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดด้วยขั้นตอนและวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1

วิธีการวิเคราะห์

สภาวะต่างๆตลอดจนการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก

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

การติดตามการใช้สารอาหารของเชื้อสามารถตรวจวัดได้จากองค์ประกอบของก๊าซที่เกิดขึ้นในช่องว่างเหนือของเหลวในขวดซีรัม โดยนำเข็มฉีดยาคูดักก๊าซในช่องว่างเหนือของเหลวภายในขวดซีรัมไปวิเคราะห์ และจะวิเคราะห์ภายหลังการบ่มเชื้อตามที่กำหนด ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟแบบ Thermal Conductivity Detector (TCD) เนื่องจากในการเตรียมสารอาหารไม่ได้มีการพ่นก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์แต่เติม Reducing agent แล้วดักก๊าซที่มีในช่องว่างเหนือของเหลวออก ดังนั้นอากาศที่เหลืออยู่ในช่องว่างจึงค่อนข้างเจือจาง ในการวิเคราะห์ก๊าซจะตรวจพบอากาศด้วยเสมอ และอากาศเป็นตัวที่แสดงให้เห็นถึงความเปลี่ยนแปลงของ

องค์ประกอบของก๊าซผสมที่เกิดขึ้น แต่ภายในอากาศจะมีไนโตรเจนประกอบอยู่ประมาณ ร้อยละ 72 ดังนั้นจึงอาจถือได้ว่าอากาศที่ตรวจพบนั้นคือไนโตรเจน (นพพร เจตนาชัย. 2529) ดังแสดงในภาพประกอบ 9 (สภาวะของเครื่องที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก ข้อ 1)

2. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของ Somogyi - Nelson

หลักการ : กลูโคสหรือไซโลสในสารละลายตัวอย่างจะรีดิวซ์ Copper ในสารละลายต่าง ให้ Cuprous copper ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารละลาย Arseno molybdate ทำให้เกิดสีเขียวแกมน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (แสดงวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ก ข้อ 2)

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

หลักการ : สารตัวอย่างที่เป็นน้ำตาล Oligosaccharide polysaccharide และอนุพันธ์เมื่อทำปฏิกิริยากับฟีนอลและกรดซัลฟูริกจะให้สีส้ม (แสดงวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ก ข้อ 3)

4. การวิเคราะห์หาค่าอัลคาไลน์ตี (Alkalinity) และปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Total volatile acid)

ในการศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์โดยวิธีไตเตรท ซึ่งเป็นวิธีการแบบหยาบๆ สามารถนำไปใช้ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียที่ทำงานภายใต้สภาวะไร้อากาศได้ เพื่อจะได้ทราบถึงการทำงานของจุลินทรีย์ภายในระบบ เนื่องจากใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นกว่าวิธีอื่นๆ โดยวิธีนี้สามารถหาได้ทั้งค่าอัลคาไลน์ตี และปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (แสดงวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ก ข้อ 4)

5. วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาลเนสของจุลินทรีย์ผสมในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประตั้นเนื่องจากเอนไซม์ที่ศึกษาจัดเป็น Extracellular enzyme ซึ่งละลายอยู่ในน้ำหมัก ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์จึงทำได้โดยนำน้ำหมักมาเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว $10,000 \times g$ ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์หา กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และ ไซลาลเนส (แสดงวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ก ข้อ 5)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ

1. ผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ

ส่วนประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารสังเคราะห์ เนื่องจากมีส่วนประกอบที่แน่นอนและสามารถทำการทดลองซ้ำได้โดยไม่เปลี่ยนแปลงซึ่ง ส่วนประกอบของสูตรอาหารที่ 1-4 แสดงดังตาราง 8 จะเห็นได้ว่าในสูตรอาหารทั้ง 4 สูตรนั้นมี แหล่งคาร์บอนเหมือนกันคือ กลูโคส ในอาหารสูตรที่ 1 และ สูตรที่ 2 มีส่วนประกอบต่างๆ เหมือนกันแต่ต่างกันในอาหารสูตรที่ 2 ไม่เติมส่วนประกอบของ Digestion fluid ในทำนองเดียวกัน อาหารสูตรที่ 3 และสูตรที่ 4 จะมีส่วนประกอบเหมือนกันแต่ต่างกันในอาหารสูตรที่ 4 ไม่เติม ส่วนประกอบของ Digestion fluid

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานำมาจากตัวอย่างน้ำหมักจากถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรดที่ดำเนินระบบให้อยู่ในสภาวะที่คงที่ตลอดการทดลอง โดยมีการป้อนเปลือกสับประรด 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 267 มิลลิลิตร ทุก 3 วัน มีระยะเวลาเก็บกัก 45 วันและ นำตัวอย่างน้ำหมักออกมาใช้ในการทดลองในช่วงก่อนที่มีการเติมเปลือกสับประรดในครั้งต่อไป เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาคือเทคนิค Plate count บ่มเชื้อนาน 10-20 วันใน Anaerobic jar นับเชื้อโดยใช้เครื่อง colony counter ช่วยนับ ผลการทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารทั้ง 4 สูตรแสดงดัง ตาราง 9

จากข้อมูลในตาราง 9 พบว่า อาหารสูตรที่ 1 และ 2 มีปริมาณจุลินทรีย์ที่นับได้เป็น 4.3×10^6 - 2.7×10^7 และ 8.8×10^6 - 1.9×10^7 CFU / ml และในอาหารสูตรที่ 3 และ 4 มีปริมาณจุลินทรีย์ที่นับได้เป็น 1.6×10^8 และ 2.2×10^8 CFU / ml ตามลำดับ จากผลการทดลอง การเจริญของจุลินทรีย์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 และ 2 แม้สูตรที่ 2 ไม่เติม Digestion fluid แต่สามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ได้ในช่วงเดียวกัน และในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 และ 4 นั้นต่างกันว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ไม่เติม Digestion fluid แต่สามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ได้ใกล้เคียงกัน จะเห็นได้ว่าการเติมหรือไม่เติม Digestion fluid ไม่ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่นับได้ และเมื่อนำอาหารสูตรที่ 1 และ 2 มาเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 และ 4 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 และ 4 มีความสมบูรณ์ของสารอาหารมากกว่าในสูตรที่ 1 และ 2 จึงนำสูตรที่ 3 และ 4 มาพิจารณา จะพบว่าแม้ในอาหารสูตรทั้งสองสูตรมีส่วนผสมของ Vitamin และ Mineral salts ต่างๆ

อยู่ด้วย อีกทั้ง Digestion fluid ไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และเพื่อให้อาหารที่ใช้เป็น Minimal media มากจึงเลือกอาหารสูตรที่ 4 เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 8 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ (Zhang and Noike. 1991)

ส่วนประกอบ	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4
Glucose	2 g	2 g	10 g	10 g
KH ₂ PO ₄			0.4 g	0.4 g
K ₂ HPO ₄			0.4 g	0.4 g
MgCl ₂			1 g	1 g
NH ₄ Cl			0.1 g	0.1 g
Mineral solution ^a			10 ml	10 ml
Vitamin solution ^b			10 ml	10 ml
Yeast extract			2 g	2 g
Ammonium sulfate	5 g	5 g		
Digestion fluid ^c	50 ml		50 ml	
NaHCO ₃			5 g	5 g
L-cysteine HCl.H ₂ O	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
Na ₂ S.H ₂ O			0.5 g	0.5 g
Resazurin	0.002 g	0.002 g	0.002 g	0.002 g
Agar	15 g	15 g	15 g	15 g
pH	7 - 7.2	7 - 7.2	7 - 7.2	7 - 7.2

a (g/l) : nitrilotriacetic acid 4.5, FeCl₂.4H₂O 0.4, CoCl₂.6H₂O 0.12, AlK(SO₄)₂ 0.01, NaCl 1, NaMoO₄ 0.01, CaCl₂ 0.02, MnCl₂.4H₂O 0.1, ZnCl₂ 0.1, H₃BO₃ 0.01, CuSO₄.5H₂O 0.01, NiCl₂.6H₂O 0.02

b (g/l) : biotin 2, folic 2, pyridoxine HCl 10, thiamine HCl 5, riboflavin 5, nicotinic acid 5, DL-calcium pantothenate 5, vitamin B₁₂ 0.1, lipoic acid 5, p-aminobenzoic acid 5

ตาราง 8 (ต่อ)

c : นำน้ำแบ่งมันสำปะหลังมาบ่มที่อุณหภูมิสูง 50-55 องศาเซลเซียส เพื่อให้มีการใช้แหล่งคาร์บอนที่เหลืออยู่ให้หมดและเหลือเพียงส่วนที่เป็น Mineral salts ละลายอยู่ โดยก่อนใช้จะนำมากรองเอาส่วนใสมาผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1

ตาราง 9 เปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆโดยใช้ตัวอย่างจากถังปฏิกรณ์ ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เทคนิค Plate count

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU / ml)
1	$4.3 \times 10^6 - 2.7 \times 10^7$
2	$8.8 \times 10^6 - 1.9 \times 10^7$
3	1.6×10^8
4	2.2×10^8

2. ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ด้วยเทคนิค Plate count

ทดลองนำตัวอย่างจุลินทรีย์จากน้ำหมักมาเลี้ยงในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 โดยมีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ กลูโคสร้อยละ 0.2 ไซโลสร้อยละ 0.2 ไซแลนร้อยละ 0.2 และแอลฟา-เซลลูโลสร้อยละ 0.2 ด้วยเทคนิค Plate count บ่มเขื่อนาน 10 - 15 วัน ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ผลการทดลองพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคส ไซโลส ไซแลน และแอลฟา-เซลลูโลส เท่ากับ $4.3 \times 10^6 - 2.7 \times 10^7$, 3.5×10^7 , $2.6 \times 10^6 - 8.3 \times 10^7$ และ $3.3 \times 10^5 - 8.7 \times 10^7$ CFU / ml ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 แสดงจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆและใช้เทคนิค Plate count

แหล่งคาร์บอน (ร้อยละ 0.2)	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU / ml)
กลูโคส	$4.3 \times 10^6 - 2.7 \times 10^7$
ไซโลส	3.5×10^7
ไซแลน	$2.6 \times 10^6 - 8.3 \times 10^7$
แอลฟา-เซลลูโลส	$3.3 \times 10^5 - 8.7 \times 10^7$

3. การศึกษาผลของ Yeast extract ต่อการเจริญของจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรด

ผลการศึกษาในขั้นตอนนี้เกี่ยวเนื่องมาจากการทดลองในตาราง 10 ซึ่งพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้ในแหล่งคาร์บอนไซแลนและแอลฟา-เซลลูโลสสามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ได้ในจำนวนที่ใกล้เคียงกับอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและไซโลสซึ่งเป็นสับปะรดที่จุลินทรีย์ย่อยสลายได้ง่ายกว่า และจากรายงานการวิจัยของ นพพร เจตนาชัย (2529) พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายอินทรีย์สารโมเลกุลใหญ่อย่าง เซลลูโลสและไซแลนในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดมีจำนวนค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ย่อยสลายแป้ง และโปรตีน โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะใช้อินทรีย์สารโมเลกุลเล็กที่ย่อยได้ง่ายก่อนและเมื่อเกิดสภาวะแวดล้อมขาดแคลนอาหารเหล่านั้นจึงจะผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายอินทรีย์สารโมเลกุลใหญ่นั้นจึงน่าสนใจว่าจุลินทรีย์สามารถนำเอาสารหรือธาตุอาหารอื่นนอกเหนือจากแหล่งคาร์บอนที่กำหนดให้ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักแทนหรือไม่ เมื่อพิจารณาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษาพบว่ามีส่วนประกอบของ Yeast extract ซึ่งประกอบไปด้วย Growth factor และวิตามินบีต่างๆอยู่ด้วย ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญและสร้าง Product ต่างๆได้ ดังนั้นเพื่อพิสูจน์สมมติฐานที่ว่า Yeast extract อาจมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และอาจใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้จึงได้ศึกษาผลของ Yeast extract ที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์นี้โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 มีแหล่งคาร์บอนเป็น ไซแลนร้อยละ 0.2 โดยใช้ Yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากผลการทดลองที่แสดงในตาราง 11 พบว่าในการทดลองชุดที่ 1 และ 2 ซึ่งไม่เติมแหล่งคาร์บอน มีเพียง Yeast extract ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.02 และ 0.2 มีจำนวนจุลินทรีย์เป็น 5.13×10^7 และ 2.69×10^7 CFU / ml ตามลำดับ และในการทดลอง

ชุดที่ 4 และ 5 ซึ่งเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 0.2 เท่ากัน และเติม Yeast extract ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 และ 0.2 มีจำนวนจุลินทรีย์เป็น 1.24×10^7 และ 5.56×10^7 CFU / ml ตามลำดับ ส่วนในการทดลองชุดที่ 3 มีการเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนร้อยละ 0.2 แต่ไม่มีการเติม Yeast extract พบว่ามีปริมาณจุลินทรีย์เป็น 3.67×10^6 CFU / ml จะเห็นได้ว่าผลการทดลองในชุดที่ 1 และ 2 มีปริมาณจุลินทรีย์ใกล้เคียงกับผลการทดลองในชุดที่ 4 และ 5 ส่วนผลการทดลองในชุดที่ 3 มีปริมาณจุลินทรีย์ต่ำกว่าการทดลองในชุดอื่นๆ แสดงว่าจุลินทรีย์สามารถใช้ Yeast extract เป็นแหล่งของอาหารได้ดี โดยเฉพาะเป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยไม่ต้องเติมแหล่งคาร์บอนอื่น ดังนั้นในการทดลองต่อไปในการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ จะใช้สูตรอาหารที่ 4 ที่ไม่เติม Yeast extract

ตาราง 11 แสดงผลของ Yeast extract ต่อการเจริญของจุลินทรีย์

การทดลองชุดที่	ปริมาณร้อยละของแหล่งคาร์บอน	ปริมาณร้อยละของ Yeast extract	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU / ml)
1	-	0.02	5.13×10^7
2	-	0.2	2.69×10^7
3	0.2	-	3.67×10^6
4	0.2	0.02	1.24×10^7
5	0.2	0.2	5.56×10^7

4. ผลการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ซึ่งไม่เติม Yeast extract

การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิปานกลางและอุณหภูมิสูง โดยนำตัวอย่างน้ำหมักมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ที่ไม่ได้เติม Yeast extract และมีแหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคสร้อยละ 1 หรือไซโลสร้อยละ 1 หรือไซแลนร้อยละ 0.2 หรือแอลฟา - เซลลูโลสร้อยละ 0.2 นับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี Plate count พบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลางเป็น 4.9×10^7 , 4.15×10^6 , 7.9×10^6 และ 6.9×10^6 CFU / ml ตามลำดับ ส่วนในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง มีปริมาณจุลินทรีย์ที่นับได้เป็น 6.9×10^6 , 4.8×10^6 , 1×10^6 และ 1.72×10^5 CFU / ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลาง

ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคส และแอลฟา-เซลลูโลสมีจำนวนสูงกว่าจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลนในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิปานกลาง มีจำนวนสูงกว่าจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิสูงเล็กน้อย และจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลสในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิปานกลางมีจำนวนใกล้เคียงกับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลสในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิสูง

ตาราง 12 เปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ไม่เติม Yeast extract

แหล่งคาร์บอน (ร้อยละ)	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU / ml)	
	ถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	ถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส
กลูโคส 1	4.9×10^7	6.9×10^6
ไซโลส 1	4.15×10^6	4.8×10^6
ไซแลน 0.2	7.9×10^6	1.0×10^6
แอลฟา-เซลลูโลส 0.2	6.9×10^6	1.72×10^5

ผลการศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ

1. ผลการเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้จากการใช้เทคนิค Plate count และเทคนิค Most Probable Number

นำสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลือก คืออาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ไม่เติม Yeast Extract มาใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ ระหว่างวิธี Plate count และวิธี MPN โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคสร้อยละ 0.5 หรือไซโลสร้อยละ 0.5 หรือไซแลนร้อยละ 0.2 หรือแอลฟา-เซลลูโลสร้อยละ 0.2 ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตาราง 13

จากข้อมูลที่แสดงในตาราง 13 พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส และไซโลส ในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งนับด้วยเทคนิค Plate count ได้จำนวนจุลินทรีย์ใกล้เคียงกับที่นับด้วยวิธี MPN และจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลน และแอลฟา-เซลลูโลส ซึ่งนับด้วยเทคนิค Plate count มีปริมาณสูงกว่าที่นับด้วยวิธี MPN และสูงกว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส และไซโลส ส่วนในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูงนั้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค

Plate count กับเทคนิค MPN แล้วพบว่าเทคนิค Plate count ใช้นับปริมาณจุลินทรีย์ได้สูงกว่าเทคนิค MPN แต่เนื่องจากวิธี MPN มีขั้นตอนการทำการทดลองที่ง่ายและสะดวก และยังมีตัวแปรที่ใช้ในการตรวจวัดผลการเจริญของเชื้อได้หลายวิธีเช่น การวัดความเป็นกรด-ด่าง องค์ประกอบของก๊าซ ปริมาณน้ำตาลที่ลดลง เป็นต้น ซึ่งน่าเชื่อถือมากกว่าการวัดด้วยสายตาเพียงอย่างเดียว เช่นในวิธี Plate count ซึ่งจากรายงานการวิจัยของ Swanson, Busta และ Peterson (1992) พบว่าข้อผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้ในการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธีนับโดยตรงนั้นเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ความชัดเจนและรูปร่างของโคโลนีที่เจริญในอาหารวุ้นแข็ง และความไม่แน่ใจของการกระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือมาจากการแยกตัวออกมาจากกลุ่มโคโลนีกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง และการใช้สับสเตอร์ทที่ไม่ละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเห็นเป็นเม็ดกระจายทั่วจานทำให้ยากต่อการหาตำแหน่งที่แน่นอนของโคโลนี รวมทั้งการวิเคราะห์ผลด้วยสายตาเพียงอย่างเดียวอาจทำให้เกิดความล้า และส่งผลต่อการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ได้ ดังนั้นจึงทำให้วิธี Plate count ลดความน่าเชื่อถือลงไป ในขณะที่วิธี MPN แม้จะมีข้อด้อยที่เป็นเพียงการประมาณเชื้อในสารตัวอย่าง (Cochran. 1950) แต่มีความสะดวกและง่ายต่อการรักษาสภาวะไร้อากาศ (Dehority, Tirabasso and Grifo. 1989) และการตรวจวัดการเจริญของเชื้อสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณการใช้สับสเตอร์ทที่ลดลง และวิธีอื่นๆ เช่น NO_3 reduction, Starch hydrolysis, และ H_2S production ซึ่งจะใช้วิธีการวิเคราะห์ได้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษา (Peeler et.al. 1992) ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงเลือกวิธี MPN ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 13 แสดงจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆเปรียบเทียบระหว่างวิธี Plate count และวิธี Most Probable Number

แหล่งคาร์บอน	จำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส		จำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	
	Plate count	MPN	Plate count	MPN
	(CFU / ml)	(MPN / ml)	(CFU / ml)	(MPN / ml)
กลูโคส	2.60×10^6	2.3×10^6	2.63×10^6	1.8×10^5
ไซโลส	5.54×10^6	4.6×10^6	7.35×10^6	4.37×10^5
ไซแลน	4.26×10^7	2.25×10^4	9.73×10^6	1.89×10^4
แอลฟา-เซลลูโลส	1.73×10^7	3.3×10^3	3.0×10^6	2.4×10^3

2. ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Most Probable Number

นำเทคนิค MPN ที่เลือกได้จากข้อ 1 มาใช้ในการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ในชั้นต่อไป โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองมาจากน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) ผลการทดลองแสดงดังตาราง 14

จากข้อมูลที่แสดงในตาราง 14 พบว่าในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลาง มีจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถใช้กลูโคส ไชโลส ไชแลน และแอลฟา-เซลลูโลส เท่ากับ $3.9 \times 10^5 - 2.4 \times 10^6$, $1.5 \times 10^5 - 4.0 \times 10^6$, $2.2 \times 10^4 - 4.9 \times 10^5$ และ $2.2 \times 10^2 - 2.3 \times 10^3$ ตามลำดับ ส่วนจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส ไชแลน และแอลฟา-เซลลูโลส ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูงเท่ากับ $2.75 \times 10^3 - 2.2 \times 10^4$, $2.75 \times 10^4 - 2.4 \times 10^5$, $2.3 \times 10^2 - 3.0 \times 10^3$ และ $1.5 \times 10^2 - 4.6 \times 10^2$ ตามลำดับ จะเห็นว่าในภาพรวมจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส จะสูงกว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ไชแลน และแอลฟา-เซลลูโลส และจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิปานกลางจะสูงกว่าในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิสูง และในขณะเดียวกันได้มีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไชลาเนสควบคู่ไปด้วย ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตาราง 16

ตาราง 14 แสดงผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส ด้วยเทคนิค MPN

แหล่งคาร์บอน	จำนวนจุลินทรีย์ (MPN / ml)	
	ถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	ถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส
กลูโคส	$3.9 \times 10^5 - 2.4 \times 10^6$	$2.75 \times 10^3 - 2.2 \times 10^4$
ไชโลส	$1.5 \times 10^5 - 4.0 \times 10^6$	$2.75 \times 10^4 - 2.4 \times 10^5$
ไชแลน	$2.2 \times 10^4 - 4.9 \times 10^5$	$2.3 \times 10^2 - 3.0 \times 10^3$
แอลฟา-เซลลูโลส	$2.0 \times 10^2 - 2.3 \times 10^3$	$1.5 \times 10^2 - 4.6 \times 10^2$

ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซ

ชีวภาพจากเปลือกสับปะรด

ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และไซลานเนสที่เกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิปานกลางซึ่งมีอุณหภูมิละ 2 ถึงโดยนำน้ำหมักจากถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดทั้ง 4 ถังมาเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว $10,000 \times g$ นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาคิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และไซลานเนสตามวิธีการวิเคราะห์ในภาคผนวก ก ข้อ 5 ผลจากการทดลองแสดงดังตาราง 15

จากข้อมูลที่ได้ในตาราง 15 พบว่าในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง (55/1) และอุณหภูมิปานกลาง (37/1) ซึ่งเป็นถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาจำนวนของจุลินทรีย์นั้น มีปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเป็น 0.027 และ 0.024 unit / ml และเอนไซม์ไซลานเนสเป็น 0.024 และ 0.018 unit / ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าไม่ว่าจะเป็นถังปฏิกรณ์ชุดที่หนึ่งหรือสองก็พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลส หรือไซลานเนส ที่อุณหภูมิสูงในปริมาณที่สูงกว่าในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิปานกลางเล็กน้อย ในขณะที่ผลการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิปานกลาง มีปริมาณมากกว่าในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิสูง (ตาราง 14)

ตาราง 15 แสดงผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิของถังปฏิกรณ์ (องศาเซลเซียส) / ถังปฏิกรณ์ที่	Enzyme activity (unit / ml)	
	Cellulase	Xylanase
37/1	0.024	0.018
37/2	0.033	0.027
55/1	0.027	0.024
55/2	0.046	0.031

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนและกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิปานกลาง เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนและกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิปานกลาง เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท จากการป้อนเปลือกสับปะรดเป็นกลูโคส ไชแลน และแอลฟา-เซลลูโลส ได้ทำการ

ทดลองตามวิธีการดำเนินการทดลองในการศึกษาจำนวนและกิจกรรมของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดในเบื้องต้นทั้งวิธีการนับปริมาณจุลินทรีย์ซึ่งใช้วิธี MPN และการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส และแบ่งเป็น 3 ชุดคือ ชุดที่เติมสับปะรดที่เป็นกลูโคสร้อยละ 0.3 ชุดที่ 2 เติมไซแลนร้อยละ 0.3 และการทดลองชุดที่ 3 เติมแอลฟา-เซลลูโลสร้อยละ 0.3 เพื่อให้ระบบอยู่ในสภาวะเช่นเดียวกับระบบการหมักในถังปฏิกรณ์เดิมซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่กำหนดในปริมาณเท่ากันคือ 0.05 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 16.66 มิลลิลิตร (คิดเป็นร้อยละ 0.3) ทุก 3 วันและมีการตรวจวัดสภาวะต่างๆ ของระบบ เช่น pH อัลคาไลน์ตี และปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายให้อยู่ในสภาวะที่คงที่ตลอดการทดลองในระยะเวลา 1 เดือนแล้วจึงนำตัวอย่าง Effluent มาศึกษาได้ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 17

จากข้อมูลในตาราง 17 เป็นจำนวนจุลินทรีย์ในช่วงก่อนและหลังจากที่มีการเติมสับปะรดอื่นแทนเปลือกสับปะรดก่อนเติมสับปะรดชนิดต่างๆลงในชุดการทดลองทั้งสามชุดพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากกลูโคส ไซโลส ไซแลน และแอลฟา-เซลลูโลสจะเป็น 1×10^9 , 1×10^9 , 1×10^5 และ 9×10^2 MPN / ml ตามลำดับ และผลจากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสในช่วงก่อนเติมสับปะรดดังแสดงในตาราง 16 พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสเป็น 0.01 และ 0.004 unit / ml ตามลำดับ และหลังจากมีการเติมสับปะรดชนิดต่างๆดังกล่าวข้างต้นเป็นระยะเวลานานประมาณ 1 เดือนจึงนำตัวอย่างน้ำหมักในแต่ละชุดการทดลองไปวิเคราะห์จำนวนของจุลินทรีย์และกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าในการทดลองชุดที่เติมกลูโคสมีสัดส่วนของเชื้อที่ใช้กลูโคสและไซโลสเจริญเป็นกลุ่มหลัก โดยมีกลุ่มที่ใช้ไซแลนเจริญเป็นกลุ่มรอง แสดงว่าน่าจะมีจุลินทรีย์อยู่จำนวนหนึ่งที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้งกลูโคสและไซโลส หรือสามารถใช้ทั้งกลูโคส ไซโลสและไซแลน และในการทดลองที่เติมไซแลนพบว่ามีสัดส่วนของเชื้อที่ใช้กลูโคสและไซโลสเจริญเป็นกลุ่มหลัก โดยมีกลุ่มที่ใช้ไซแลนเจริญเป็นกลุ่มรอง ในการทดลองชุดสุดท้ายเติมแอลฟา-เซลลูโลสพบว่าสัดส่วนของเชื้อที่ใช้ไซแลนเจริญเป็นกลุ่มหลัก โดยมีกลุ่มที่ใช้กลูโคสและไซโลสเจริญเป็นกลุ่มรอง ส่วนในสัดส่วนของเชื้อที่ใช้แอลฟา-เซลลูโลสนั้นพบว่ามีจำนวนและสัดส่วนที่น้อยทั้งในช่วงก่อนและหลังเติมแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองนี้แสดงว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถใช้กลูโคสได้อย่างเดียว จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ได้ทั้งกลูโคสและไซโลส จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ได้ทั้งไซแลนและไซโลส และจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ได้ทั้งกลูโคส ไซโลสและไซแลนอยู่ในถังปฏิกรณ์ และจากจำนวนจุลินทรีย์รวมจะเห็นว่าจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสจะเจริญเร็วที่สุด

และจากการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์หลังการเติมสับปะรดชนิดต่างๆพบเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ในชุดการทดลองที่เติมไซแลนและแอลฟา-เซลลูโลสเท่านั้นโดยวัดได้ 0.005 และ 0.02 unit / ml ตามลำดับ

ตาราง 16 ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และไซลานเนสในถังปฏิกรณ์ที่หมักที่อุณหภูมิปานกลางก่อนและหลังเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

เอนไซม์ที่ศึกษา	Enzyme activityก่อนเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (unit / ml)	Enzyme activity หลังเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (unit / ml)		
		กลูโคสร้อยละ 0.3	ไซแลนร้อยละ 0.3	เซลลูโลสร้อยละ 0.3
Cellulase	0.01	0.00	0.005	0.02
Xylanase	0.004	0.00	0.00	0.00

ตาราง 17 แสดงจำนวนและสัดส่วนของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิปานกลางก่อนและหลังเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ับจำนวนจุลินทรีย์	จำนวนและสัดส่วนของจุลินทรีย์ก่อนเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ		จำนวนและสัดส่วนของจุลินทรีย์ที่หลังเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ							
			กลุ่มโคสตร้อยละ 0.3		ไซแลนร้อยละ 0.3		เชลลูโลสร้อยละ 0.3			
			จำนวน MPN/ml	สัดส่วน %	จำนวน MPN/ml	สัดส่วน %	จำนวน MPN/ml	สัดส่วน %		
กลุ่มโคสตร้อยละ 0.5		1x10 ⁹	49.99		2x10 ⁸	95.65	7x10 ⁶	37.84	9x10 ⁵	27.03
ไซโลสตร้อยละ 0.5		1x10 ⁹	50.00		8x10 ⁶	3.82	7x10 ⁶	37.84	9.3x10 ⁵	27.93
ไซแลนร้อยละ 0.2		1x10 ⁵	0.01		1.1x10 ⁶	0.53	4.5x10 ⁶	24.32	1.5x10 ⁶	45.04
เชลลูโลสร้อยละ 0.2		9x10 ²	0.00		93	0.00	120	0.00	90	0.00
รวม		200,100,900	100.00		209,100,093	100.00	18,500,120	100.00	3,330,090	100.00

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสูตรอาหาร เทคนิคที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ และศึกษาจำนวนและกิจกรรมของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากเปลือกสับปะรด และศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์และกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาลเนสของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานำมาจากถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดในสภาวะไร้อากาศแบบขั้นตอนเดียว ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) มีปริมาตรการผลิต 4 ลิตร ระยะเวลาเก็บกัก 45 วัน ป้อนเปลือกสับปะรด 10 กรัมผสมน้ำกลั่น 267 มิลลิลิตร ทุก 3 วัน ดำเนินระบบให้อยู่ในสภาวะที่คงที่ได้โดยการตรวจวัดองค์ประกอบของก๊าซ วัดปริมาตรของก๊าซโดยการแทนที่น้ำ ความเป็นกรด-ด่าง อัลคาไลน์ตี และปริมาณของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย ค่าต่างๆเหล่านี้จะช่วยให้ทราบถึงสภาวะของระบบการหมักในถังปฏิกรณ์ และช่วยในการปรับปรุงระบบมีประสิทธิภาพและคงที่ตลอดการทดลอง จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาจะนำออกมาจากถังปฏิกรณ์ก่อนจะมีการเติมเปลือกสับปะรดในครั้งต่อไป งานวิจัยนี้ได้ศึกษาทดลองในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรและเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ซึ่งผลสรุปที่ได้จากการทดลองมีดังต่อไปนี้

เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไร้อากาศ ดังนั้นการที่จะนำจุลินทรีย์เหล่านี้มาศึกษาจึงต้องเพิ่มความระมัดระวังมากขึ้น ทั้งในเรื่องของเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาอันเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศ เพื่อทำให้เกิดความเหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงซึ่งเป็นส่วนสำคัญและจำเป็นต่อการเจริญ และการเกิดผลิตภัณฑ์ต่างๆ (Peeler et.al. 1992) ดังนั้นการศึกษสูตรอาหารที่เหมาะสมกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษา โดยเฉพาะกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต จึงมีความสำคัญในเบื้องต้นที่จำเป็นต้องศึกษา โดยการนำจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำหมักจากถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆทั้งหมด 4 สูตร และตรวจวัดผลโดยการนับจำนวนของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเปรียบเทียบกับระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สูตร ผลจากการทดลองพบว่าจำนวนของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 และ 2 จะมีปริมาณใกล้เคียงกัน และในทำนองเดียวกันจำนวนของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 และ 4 ก็มีปริมาณใกล้เคียงกัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเติม Digestion fluid ไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 และสูตรที่ 4 กับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่

1 และ 2 จะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 และ 4 นับปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญบนจานเพาะเชื้อได้มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 และ 2 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 และสูตรที่ 4 มีส่วนประกอบต่างๆเหมือนกันยกเว้นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 Digestion fluid ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ไม่มี Digestion fluid แสดงว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 และ 4 มีส่วนประกอบของเกลือแร่และวิตามินอยู่อย่างสมบูรณ์เหมาะสมสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ และที่สำคัญคือพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 นับปริมาณจุลินทรีย์ได้มากกว่าประกอบกับจากผลการทดลองซึ่งพบว่าการเติมหรือไม่เติม Digestion fluid ไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และการเตรียม Digestion fluid ค่อนข้างเสียเวลามากจึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 เป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลาง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค Plate count โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ กลูโคส หรือไซโลส หรือไซแลน หรือแอลฟา-เซลลูโลส มาเลี้ยงจุลินทรีย์และนับปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่นับได้ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ มีปริมาณใกล้เคียงกัน ทั้งในแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ คือ ไซแลนและแอลฟา-เซลลูโลส และแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารประกอบโมเลกุลเล็ก คือ กลูโคสและไซโลส โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะใช้อินทรีย์สารโมเลกุลเล็กที่ย่อยสลายได้ง่ายก่อนและเมื่อใดที่สภาวะแวดล้อมขาดแคลนอาหารที่ย่อยสลายได้ง่ายดังกล่าวแล้ว จุลินทรีย์ก็จะผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายอินทรีย์สารโมเลกุลใหญ่ จึงเป็นที่น่าสนใจว่าจุลินทรีย์นำเอาธาตุหรือสารอาหารอื่นนอกเหนือจากแหล่งคาร์บอนที่กำหนดให้ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักหรือไม่ ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ว่าส่วนประกอบใดในอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้แทนแหล่งคาร์บอนที่กำหนดให้ได้ จะพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 มีส่วนประกอบของ Yeast extract ซึ่งจัดเป็น Growth factor และมีส่วนประกอบของวิตามินบีต่างๆ ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญและการสร้างผลผลิต (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534) แต่เนื่องจากในการวิจัยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษากลุ่มจุลินทรีย์จำเพาะที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่กำหนดให้เท่านั้นโดยไม่นำเอาสารหรือธาตุอื่นนอกเหนือจากแหล่งคาร์บอนที่กำหนดไปเป็นแหล่งคาร์บอนหลักแทน ดังนั้นจึงนำไปสู่การศึกษาถึงผลของ Yeast extract ที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษา

การศึกษาผลของ Yeast extract ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้ทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 โดยมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ Yeast extract ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน ในอาหารที่มีและไม่มีแหล่งคาร์บอนที่กำหนด ผลจากการศึกษาพบว่าเมื่อนำการทดลองชุดที่ 1 และ 2 ซึ่งไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน แต่เติม Yeast extract ในระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.02 และ 0.2 ตามลำดับ มาเปรียบเทียบกับผลการทดลองชุดที่ 3 ที่เติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนที่

กำหนดให้โดยไม่เติม Yeast extract จะพบว่าในอาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนที่กำหนดแต่มี Yeast extract ร้อยละ 0.02 และ 0.2 จะมีปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญบนจานเพาะเชื้อมากกว่าในอาหารที่มีเฉพาะแหล่งคาร์บอนแต่ไม่มี Yeast extract และประกอบกับการทดลองชุดที่ 4 และ 5 ซึ่งเติมแหล่งคาร์บอนร้อยละ 0.2 เท่ากัน และเติม Yeast extract ร้อยละ 0.02 และ 0.2 ตามลำดับ จะพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในการทดลองชุดที่ 5 ซึ่งมี Yeast extract ร้อยละ 0.2 มีปริมาณจุลินทรีย์สูงกว่าในการทดลองชุดที่ 4 ที่มี Yeast extract ร้อยละ 0.02

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่า Yeast extract มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ หรือจุลินทรีย์สามารถนำ Yeast extract ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนแหล่งคาร์บอนที่กำหนดให้ได้ และเพื่อให้ได้กลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นตัวแทนในการใช้สารอาหารที่กำหนดให้เป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้น ดังนั้นในการศึกษาในขั้นตอนต่อไปจึงไม่เติม Yeast extract

ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิปานกลาง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ไม่เติม Yeast extract ด้วยเทคนิค Plate count พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆโดยรวมในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลางสูงกว่าในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง โดยพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคส ไชโลส ไชเลน และแอลฟา-เซลลูโลสในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลางสูงกว่าในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง ส่วนปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้ไชโลสมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

ผลการศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการนับจำนวนจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ โดยนำสูตรอาหารที่เลือกได้มาใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อศึกษาเทคนิคในการนับจำนวนจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธี Plate count และวิธี Most Probable Number (MPN) พบว่าการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี Plate count ในถังปฏิกรณ์ทั้งสองอุณหภูมิสามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันในแหล่งคาร์บอนต่างๆที่กำหนดให้ ส่วนการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี MPN ในถังปฏิกรณ์ทั้งสองอุณหภูมิพบว่าสามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิปานกลางได้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงกว่าในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูงเมื่อใช้กลูโคส ไชโลส ไชเลน และแอลฟา-เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณจำนวนจุลินทรีย์ที่ได้จากการนับด้วยวิธี Plate count ในแหล่งคาร์บอนที่มีโมเลกุลซับซ้อน คือ ไชเลนและแอลฟา-เซลลูโลส ซึ่งจุลินทรีย์จะย่อยสลายได้ยากกว่า (Sunna and Antranikian, 1997 ; Beguin and Aubert, 1994) มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสและไชโลส จากการทดลองจะเห็นได้ว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้จากวิธี Plate count นั้นมีความผันแปรสูงกว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่นับด้วยวิธี MPN และขณะทำการทดลองพบว่าการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี Plate count มีอุปสรรคหลายประการ คือ ประการแรก ลักษณะและความไม่ชัดเจนของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีลักษณะใสและขนาดของโคโลนีเล็กมากยากต่อการสังเกต ประการที่สอง คือ ความไม่ชัดเจนของโคโลนีและเม็ดของสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำกระจาย

หัวอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้การหาตำแหน่งที่แน่นอนของโคโลนีเป็นไปได้ยาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยต่างๆ ที่พบข้อดีและข้อด้อยในการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Plate count และ MPN คือจากรายงานผลการวิจัยของ Swanson Busta และ Peterson. (1992) พบว่าปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี Plate count นี้ก็คือ ความสามารถในการวิเคราะห์ ผลที่ได้จากความชัดเจนและรูปร่างของโคโลนีที่เจริญในอาหารวุ้นแข็ง รวมถึงความไม่แน่ใจของการกระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ของแบคทีเรียซึ่งอาจเจริญจากการแยกตัวออกมาจากกลุ่มโคโลนีกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง นอกจากนี้ส่วนประกอบของอาหารก็มีผลต่อการนับจำนวนจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น การใช้เซลล์ูโลสเป็นสับสเตรทจะพบว่าเซลล์ูโลสเป็น Particles เล็กๆ ไม่ละลายน้ำเมื่อผสมในอาหารวุ้นแข็งทดลอง ในจานหลังจากอาหารเย็นจะเห็นเซลล์ูโลสเป็นเม็ดๆ กระจายอยู่ทั่วจาน ทำให้เกิดข้อผิดพลาดได้ง่ายในการสังเกตโคโลนีและหาตำแหน่งที่แน่นอนของโคโลนี ที่สำคัญคือการวิเคราะห์ผลด้วยสายตาเพียงอย่างเดียวอาจทำให้เกิดความล้าซึ่งส่งผลต่อการนับและการคำนวณปริมาณจุลินทรีย์ที่นับได้และทำให้วิธี Plate count ลดความน่าเชื่อถือลงไป ในขณะที่การนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี MPN หรือเรียกว่า A dilution method นั้นแม้จะให้ความเที่ยงตรงแม่นยำต่ำกว่าวิธีการนับโดยตรง (Cochran. 1950) อย่างเช่นวิธี Plate count แต่มีหลายปัจจัยที่สามารถเลือกได้ตามความต้องการที่จะศึกษา มีรายงานว่าจากการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพืชสมุนไพรในสภาวะไร้อากาศด้วยการใช้วิธี Roll tube และวิธี MPN ให้ผลไม่แตกต่างกัน (Shockey and Dehority. 1989) ขั้นตอนการนับจุลินทรีย์ด้วยวิธี MPN ค่อนข้างง่ายและเสียเวลาน้อย ด้วยการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว การรักษาสภาพแบบไร้อากาศง่ายและสะดวก (Dehority, Tirabasso and Grifo. 1989) และแม้จะเป็นเพียงการประมาณจำนวนของจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างที่ต้องการศึกษาเท่านั้น แต่ความเที่ยงตรงแม่นยำสามารถทำให้เกิดขึ้นได้จากความละเอียดรอบคอบในทุกกระบวนการในการทดลอง เช่นการเจือจางตัวอย่างให้มีอัตราการเจือจางที่เหมาะสมที่จะสามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ได้ การทำการทดลองแบบ 3 หรือ 5 หลอด หากจำนวนซ้ำของหลอดทดลองมากย่อมมีโอกาสในการผิดพลาดน้อยกว่าการใช้จำนวนซ้ำของหลอดทดลองน้อยกว่า ประกอบกับความระมัดระวังในการเตรียมอาหาร การทำเจือจาง การผสมหรือการเขย่าอาหารและเชื้อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (Halverson and Ziegler. 1933c) นอกจากนั้นในการตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณการใช้สับสเตรทที่ลดลง และวิธีอื่นๆ เช่น NO_3 reduction, Starch hydrolysis, และ H_2S production ซึ่งจะใช้วิธีการวิเคราะห์ได้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษา (Peeler et.al. 1992) ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงเลือกวิธี MPN ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

จากการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค MPN พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้จากการใช้แหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคสร้อยละ 0.5 หรือไซโลสร้อยละ 0.5 หรือไซแลนร้อยละ 0.2 หรือแอลฟา-เซลล์ูโลสร้อยละ 0.2 โดยรวม ในถึงปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดซึ่งหมักที่

อุณหภูมิปานกลางมากกว่าปริมาณจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรดซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูง แต่ปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสและไซโลสสูงกว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลนและแอลฟา-เซลลูโลสในขณะเดียวกันได้มีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสโดยการนำน้ำหมักตัวอย่างในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรดที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิปานกลางมาเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว $10,000 \times g$ นาน 10 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์ตามวิธีการวิเคราะห์เอนไซม์ที่แสดงในภาคผนวก ก ข้อ 6 ซึ่งผลการศึกษาพบว่าปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสที่พบในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรดที่อุณหภูมิสูงมีกิจกรรมดีกว่าที่อุณหภูมิปานกลาง ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานการวิจัยต่างๆที่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ในระบบการย่อยสลายอินทรีย์สารเชิงซ้อนในเบื้องต้นที่ว่าพบการย่อยสลายอินทรีย์สารโมเลกุลใหญ่ เช่น เซลลูโลสและไซแลนที่อุณหภูมิสูงดีกว่าที่อุณหภูมิปานกลาง อันแสดงว่าอุณหภูมิที่ทำการหมักมีผลต่อการย่อยสลายอินทรีย์สารของจุลินทรีย์ในระบบการหมัก (ธเนศ อุทิศธรรม. 2526 ; นพพร เจตณชัย. 2529 ; เกษแก้ว ปะนะมณฑา. 2534 ; Chen. 1983 ; Westermann. 1996) และจากผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และไซลานเนสข้างต้นทำให้สามารถตอบคำถามที่ว่าเหตุใดจากรายงานการวิจัยต่างๆจึงพบว่าสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น เซลลูโลสและไซแลนในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรดสามารถย่อยสลายที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่าที่อุณหภูมipานกลาง ซึ่งเป็นเหตุผลอันเนื่องมาจากสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงดีกว่าที่อุณหภูมipานกลางแม้ว่าจำนวนจุลินทรีย์จะมีปริมาณน้อยกว่าก็ตาม จากรายงานการวิจัยต่างๆพบว่าเอนไซม์เหล่านี้สามารถแสดงกิจกรรม หรือจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์และทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิสูง เช่นการศึกษาการย่อยสลายไซแลนของ *Talaromyces emersonii* สายพันธุ์ CBS814.70 และสายพันธุ์ UCG208 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสออกมาย่อยสลายไซแลนได้ดีในช่วงอุณหภูมิสูงคือ 80 องศาเซลเซียส (Tuohy and Coughlan. 1992) หรือเชื้อ *Thermomonospora curvata* สามารถเจริญเป็นกลุ่มเด่นในระบบและสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสออกมาย่อยสลายไซแลนในช่วงอุณหภูมิสูง (Stutzenberger and Bodine. 1992 ; Stentiford and Dodds. 1992 ; Short Communication. 1997)

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าการเกิดการย่อยสลายอินทรีย์สารโมเลกุลใหญ่ได้ดีที่อุณหภูมิสูงเป็นผลอันเนื่องมาจากความเหมาะสมของสภาวะต่อการทำงานของเอนไซม์ กล่าวคือแม้ปริมาณจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูงจะมีปริมาณน้อยกว่าในถังปฏิกรณ์ซึ่งหมักที่อุณหภูมipานกลางแต่สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสได้ดีกว่าที่อุณหภูมipานกลาง

ต่อมาจึงได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และ ไชลานเนสที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนจากที่เคยบ่อนเปลือกสับปะรดในการ ทดลองที่ผ่านมาเป็นแหล่งคาร์บอนที่กำหนดให้ คือ กลูโคส หรือไซแลน หรือแอลฟา-เซลลูโลส

ผลจากการศึกษาพบว่า ในชุดการทดลองที่เติมกลูโคสร้อยละ 0.3 แทนเปลือกสับปะรด และศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ กลูโคส หรือไซโลส หรือไซแลน หรือแอลฟา-เซลลูโลส เป็นแหล่ง คาร์บอนเปรียบเทียบในช่วงก่อนและหลังเติมกลูโคส พบว่าหลังจากเติมกลูโคสแล้วจำนวน จุลินทรีย์ทุกกลุ่มลดลงจากช่วงก่อนเติมกลูโคส แต่พบว่าสัดส่วนของเชื้อที่ใช้กลูโคสและไซโลส เจริญเป็นกลุ่มหลัก และในชุดการทดลองที่เติมไซแลนร้อยละ 0.3 พบว่ากลุ่มที่ใช้กลูโคส ไซโลส และแอลฟา-เซลลูโลส มีแนวโน้มลดลงแต่กลุ่มที่ใช้ไซแลนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และพบว่าสัดส่วน ของเชื้อที่ใช้กลูโคสและไซโลสเจริญเป็นกลุ่มหลัก ส่วนจุลินทรีย์ที่ใช้ไซแลนเจริญเป็นกลุ่มรอง แสดงว่าน่าจะมีจุลินทรีย์อยู่จำนวนหนึ่งที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้งกลูโคสและไซโลส หรือ สามารถใช้ทั้งกลูโคส ไซโลสและไซแลน และในการทดลองที่เติมไซแลนพบว่ามีสัดส่วนของเชื้อที่ ใช้กลูโคสและไซโลสเจริญเป็นกลุ่มหลัก โดยมีกลุ่มที่ใช้ไซแลนเจริญเป็นกลุ่มรอง ในการทดลอง ชุดสุดท้ายเติมแอลฟา-เซลลูโลสพบว่าสัดส่วนของเชื้อที่ใช้ไซแลนเจริญเป็นกลุ่มหลัก โดยมีกลุ่มที่ ใช้กลูโคสและไซโลสเจริญเป็นกลุ่มรอง ส่วนในสัดส่วนของเชื้อที่ใช้แอลฟา-เซลลูโลสนั้นพบว่ามี จำนวนและสัดส่วนที่น้อยทั้งในช่วงก่อนและหลังเติมแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองนี้แสดงว่ามี จุลินทรีย์ที่สามารถใช้กลูโคสได้อย่างเดียว จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ได้ทั้งกลูโคสและไซโลส จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ได้ทั้งไซแลนและไซโลส และจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ได้ทั้งกลูโคส ไซโลสและ ไซแลนอยู่ในถังปฏิกรณ์ และจากจำนวนจุลินทรีย์รวมจะเห็นว่าจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสจะเจริญเร็วที่ สุดจึงทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก เมื่อนำผลของจำนวนจุลินทรีย์มาประกอบกับผลจาก การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไชลานเนสพบว่าก่อนเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆพบ ปริมาณเอนไซม์ทั้งสองชนิดในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น คือเป็นเอนไซม์เซลลูเลส 0.01 unit/ml และเป็นเอนไซม์ไชลานเนสเพียง 0.004 (unit/ml) หลังจากเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่าในชุดการทดลองที่เติมไซแลนและแอลฟา-เซลลูโลสเท่านั้นที่พบกิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลสที่ 0.005 และ 0.02 unit/ml ตามลำดับ

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของทั้งจำนวนของจุลินทรีย์และ กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไชลานเนสนั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องและเป็นสาเหตุ เช่น อุณหภูมิ จากรายงานผลการวิจัยต่างๆและจากการศึกษาที่ผ่านมาล้วนพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการย่อย สลายอินทรีย์สารโมเลกุลใหญ่ เช่นไซแลนและเซลลูโลส (Westermann. 1996) นอกจากนั้นแล้ว การแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไชลานเนสยังสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิสูง ด้วย (ชเนศ อุทิศธรรม. 2526 ; นพพร เจตนาชัย. 2529 ; เกษแก้ว ปะนะมณฑา. 2534 ; Chen. 1983 ; Tuohy and Coughlan. 1992 ; Stutzenberger and Bodine. 1992 ; Stentiford and

Dodds. 1992 ; Short Communication. 1997) จากรายงานการวิจัยพบว่าในการย่อยสลายอินทรีย์สารจะเกิดได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ดังนั้นจึงมีการนำจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในกองปุ๋ยหมักมาศึกษาพบว่า จุลินทรีย์จากกองปุ๋ยหมักสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงซึ่งเป็นข้อได้เปรียบกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำปานกลาง คือจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิสูงมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่า และจะย่อยสลายสารอาหารให้ได้ผลิตภัณฑ์ในอัตราที่ใกล้เคียงกับอัตราการเจริญ เอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีความคงตัวและทำงานได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำปานกลาง ยิ่งไปกว่านั้นการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูงยังเป็นการป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำปานกลางอีกด้วย (Sukhumarasi and others. 1988)

นอกจากปัจจัยดังกล่าวมาแล้วยังมีปัจจัยอื่นๆที่สำคัญคือการใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Sachlehner et.al. 1998) เพื่อช่วยในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ เช่น การเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียผลิตเอนโดกลูคาเนสออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่ง การใช้สารตั้งต้นที่ย่อยยากเป็นตัวเริ่มต้นในการผลิตเอนไซม์จะทำให้อัตราการผลิตเอนไซม์เป็นไปได้อ่อนช้าและได้ปริมาณเอนไซม์น้อย โดยทั่วไปพฤติกรรมการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์มักจะใช้สารอาหารที่ย่อยง่ายสะดวกแก่การดูดซึมหรือนำไปใช้ ได้ทันที เช่น กลูโคส เซลโลไบโอส แต่เมื่อใดที่สภาวะแวดล้อมนั้นขาดแคลนสารอาหารที่ย่อยง่าย จุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสารอาหารที่ย่อยยาก ซึ่งจะพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญในอาหารที่มีเซลลูโลสได้ช้ากว่าในอาหารที่มีเซลโลไบโอส (Line and Wilson. 1987) จากรายงานการวิจัยของ เบกวินและออบีร์ส (Beguin and Aubert. 1994) ได้ศึกษาชีววิทยาการย่อยสลายเซลลูโลสโดยการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์นั้น พบว่าการผลิตเอนไซม์จะถูกควบคุมโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก Metabolites ของเซลลูโลส เช่น Cellobiose และผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำได้ เช่น Carboxymethylcellulose ทั้ง Cellobiose และ Carboxymethylcellulose จะเป็นตัวที่เหนี่ยวนำที่ดีในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส หรือในรายงานการวิจัยของ ฮาลทริช และ สเตนเนอร์ (Halttrich and Steiner. 1994) ที่ได้ศึกษาส่วนประกอบของอาหารที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ไซลาลเนสของ *Schizophyllum commune* พบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาลเนส และแมนนาเนสจะเกิดขึ้นได้ดีหากใช้ตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่ดีซึ่งไม่ใช่ไซแลนและเซลลูโลสแต่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายของเซลลูโลสและไซแลน คือ กลูโคส และไซโลส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ซันนา (Sunna.1996) ซึ่งพบว่าการใช้ไซโลสเลี้ยง *Thermotoga thermarum* สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้ดี แต่ในขณะเดียวกันเขายังพบว่า การใช้ไซแลนสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการผลิตเอนไซม์เหล่านี้ไม่ได้ถูกควบคุมโดยสับสเตรทที่เป็นกลูโคส เช่นในการเลี้ยง *Thermomonospora curvata* ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงพบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสของเชื้อไม่ได้ถูกควบคุมจากกลูโคสที่เป็นส่วนประกอบในอาหาร (Short communication. 1997)

ความเป็นกรด-ด่างนับเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบต่อกระบวนการย่อยสลายเซลล์โลสอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียจะเป็นไปได้ดีต้องมีความเป็นกรด-ด่างที่พอเหมาะต่อการเจริญไม่เช่นนั้นอาจทำให้มีการเจริญลดลงหรือหยุดชะงักทันที นอกจากนี้ความเป็นกรด-ด่างยังมีผลกระทบต่อเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาอีกด้วย เพราะความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรทและการเร่งปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับประจุของเอนไซม์หรือของสับสเตรทที่มีความเป็นกรด-ด่างต่ำหรือสูงเกินไปมักทำให้ประจุของเอนไซม์เปลี่ยนไปจนไม่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรทหรืออาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไปด้วย

(Hagerdal and others. 1978)

จากรายงานการวิจัยต่างๆ จะเห็นว่าปัจจัยหนึ่งอาจจำเป็นและมีอิทธิพลต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งแต่ในขณะเดียวกันปัจจัยเดียวกันนั้นอาจไม่ความจำเป็นหรืออาจไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่ง จึงเป็นสาเหตุของการพบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนและกิจกรรมของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับประรดซึ่งหมักที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิปานกลางเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองในส่วนของการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนและกิจกรรมของจุลินทรีย์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรทนั้นเป็นเพียงการศึกษาเพื่อหาข้อมูลในเบื้องต้นเท่านั้น ประกอบกับการทดลองในระยะเวลาอันสั้นจึงทำให้ข้อมูลที่ได้ยังไม่สมบูรณ์ทั้งหมด ดังนั้นจึงควรได้มีการศึกษาอย่างต่อเนื่องในเรื่องการใช้สับสเตรทที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลันเนส รวมทั้งหาวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธีที่ซับซ้อน ที่จะสามารถวิเคราะห์เอนไซม์ทั้งหมดได้ เนื่องจากอาจมีบางส่วนที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ และเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้นั้นแท้จริงมีอยู่ในปริมาณเพียงเล็กน้อยจริงหรือไม่

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- เกษแก้ว ปะนะมณฑา. (2534). การศึกษาการย่อยสลายสับสเตรทต่างๆโดยจุลินทรีย์จากถัง
ปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพ. ปรินูญานิพนธ์ วท.ม. (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ) กรุงเทพฯ.
: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- ชาญชัย คุณวานากิจ. (2529). การผลิตก๊าซชีวภาพจากผักตบชวาภายใต้การย่อยสลายแบบไร้ออกซิเจน. ปรินูญานิพนธ์ วศ.ม. (สาขาวิศวกรรมเคมี) กรุงเทพฯ. : บัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- ทรัพย์ วิถีธรรม. (2528). การผลิตก๊าซชีวภาพอย่างต่อเนื่องโดยตรึงกลุ่มเซลล์ของแบคทีเรียไว้ในเครื่องปฏิกรณ์แบบชั้นกรอง. ปรินูญานิพนธ์ วศ.ม. (สาขาวิศวกรรมเคมี). กรุงเทพฯ.
: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- ธเนศ อุทิศธรรม. (2526). การผลิตก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิต่างๆจากของเสียจากโรงงานสับประรด
กระป๋อง. ปรินูญานิพนธ์ วศ.ม. (สาขาเทคโนโลยีพลังงาน). กรุงเทพฯ. :
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- ธงชัย พรธนะสวัสดิ์. (2525). คู่มือวิเคราะห์น้ำทิ้ง. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นพพร เจตนาชัย. (2529). การศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ผลิตก๊าซชีวภาพอุณหภูมิสูงและ
อุณหภูมิต่ำปานกลาง. ปรินูญานิพนธ์ วท.ม. (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ. :
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. (2534). จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- ปรีดา แย้มเจริญวงศ์. (2534). เทคโนโลยีและน้ำเสีย. ขอนแก่น : ภาควิชาสุขาภิบาล
คณะสาธารณสุข มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. (2534). แนวทางการกำจัดกากน้ำเสีย
จากโรงงานสุรา. กรุงเทพฯ : กรมสรรพสามิต ตอนที่ 2 สรุป.
- สุพัฒน์ เผ่าพงษ์ไทย. (2535). การผลิตก๊าซชีวภาพจากกากมะเขือเทศโดยจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ
ปานกลาง และอุณหภูมิสูง. ปรินูญานิพนธ์ วท.ม. (วิชาเอกเคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ. :
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร. ถ่ายเอกสาร.
- สมเกียรติ ไกรกาบแก้ว และ วุฒินันท์ ตะดิชดิพันธ์. (2523). การหมักก๊าซชีวภาพจากเปลือก
สับประรด. ปรินูญานิพนธ์ วศ.ม. (สาขาวิศวกรรมเคมี). กรุงเทพฯ. : บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.

- หัตยา ทิพย์วัฒน์. (2531). การศึกษากลุ่มจุลินทรีย์และสารตัวกลางในกระบวนการย่อยสลายเปลือกสับปะรดในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิปานกลาง. ปรินุณยานิพนธ์ วท.ม. (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ) กรุงเทพฯ. : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ถ่ายเอกสาร.
- อารี ฤทธิบุรณ์. (2541,ตุลาคม-ธันวาคม). “การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Sporotrichum pulverulentum* ในสภาวะอาหารเหลว,” วารสารวิทยาศาสตร์ขอนแก่น. 26(4) : 273-280.
- (2542,กุมภาพันธ์). “การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากฟางข้าวโดยเชื้อราในสภาวะอาหารแข็ง,” วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. 9(1) : 58-65.
- Adam,K.H. (1981). “Organic to Biogas : Microbiology of Anaerobic Methane Production,” First Asian Seminar-Workshop on Biogas Technology. Philippines.
- APHA, AWWA, WPCF. (1985). “Standard Method for the Examination of Water and Wastewater,” 16th ed. New York: : West Publishing Company.
- Anderson,G.K., Donnelly,T. and McKeown,K.J. (1982). “Identification and Control of Inhibition in the Anaerobic Treatment of Industrial Wastewater,” *Process Biochemistry*. 35 : 334-343.
- Beguin,P. and Aubert,J.P. (1994). “The Biological Degradation of Cellulose,” *Federation of European Microbiological Societies Microbiology review*. 13 : 25-58.
- Boone,D.R. and Bryant,M.P. (1980) “Propionate Degradation Bacterium *Syntrophobacter wolinii* nov. gen. nov. from Methanogenic Ecosystem ,” *Applied and Environmental Microbiology*. 40 : 626-632.
- Brock,T.D. (1967). “Microorganism Adapted to High Temperature,” *Nature*. 214 : 882-885.
- Brown,D.K., Militzer,W. and Geogi,C.E. (1957). “The Effect of Growth Temperature on the Heat Stability of a Bacteria Pyrophosphatase,” *Archive Biochemical*. 70 : 248-256.
- Bryant,M.P. (1979). . “ Microbial Methane Production-Theoretical Aspect,” *Journal of Animal Sciences*. 48 : 193-201.
- Bryant,M.P. and Small,N. (1965). “ The Anaerobic Monotrichous Butyric acid- Producing Curved Rod-Shaped Bacteria of the Rumen, “ *Journal of Bacteriology*. 72 : 16-21.

- Buswell,A.M. (1957). "Fundamentals of Anaerobic Treatment of Organic Wastes," *Sewage Industrial Wastes*. 29 : 717-721.
- Chen,X. and Yusaku,F. (1994). *Annual Reports of JC Biotechnology*. International Center of Cooperative Research in Biotechnology, Faculty of Engineering: Osaka University.
- Cochran,W.G. (1950). "Estimation Bacterial Densities by Means the Most Probable Number," *Biometrics*. 6 : 105-116.
- Colome,J. and et.al. (1986). *Laboratory Exercises in Microbiology*. New York. : West Publishing Company.
- Dehority,B.A. (1969). "Pectin Fermenting Bacteria Isolated from the Bovine Rumen.," *Journal Bacteriology*. 72 : 16-21.
- Dehority,B.A.,Tirabasso,P.A. and A.P.Grifo,J.R.. (1989). "Most Probable Number Procedures for Enumerating Bacteria, Including the Simultaneous Estimation of Total and Cellulolytic Numbers in One Medium," *Applied and Environmental Microbiology*. 55 : 2789-2792.
- Dobois,M. and et.al. (1956). *Analytical Chemistry*. 28-350.
- Grubb,J.A. and Dehority,B.A. (1976). "Variation in Colony Counts of Total Viable Anaerobic Rumen Bacteria as Influenced by Media and Cultural Methods. " *Applied and Environmental Microbiology*. 31 : 262-267.
- Gilbert,H.J. and Hazlewood,G.P. (1993). "Bacterial Cellulase and Xylanase," *Journal of General Microbiology*. 139 : 187-194.
- Hagerdel,B.G.R.,Ferchak,L.D. and Pye,E.K. (1978). "Cellulolytic Enzyme System of *Thermoactinomyces sp.* Grown on Microcystalline Cellulose," *Applied and Environmental Microbiology*. 36 : 606-612.
- Haltrich,D. and Steiner,W. (1994). "Formation of Xylanase by *Shizophyllum commune* : Effect of Medium Components," *Enzyme Microbiology Technology*. 16 : 229-235.
- Halvorson,H.O. and Ziegler,N.R. (1933c). "Application of Statistics to Problems in Bacteriology," *Journal of Bacteriology*. 25 : 101-121.
- Hinch,S.A.,Donkin,C.J. and Germishulizen. (1992). "Changes in Microbial Population Number During the Composting of Pine Bark," *Bioresource*. 39 : 85-92.

- Ingraham, J.T. (1962). *Temperature Relationships*. New York : The Bacterial Academy Press.
- Ingraham, J.T. and Ingraham, C.A. (1995). *Introduction to Microbiology*. California: Wadsworth Publishing Company.
- Keefer, C.E. and Urtes, H.C. (1992). "Digestion of Volatile Acids," *Journal of Water Pollution Control Federal*. 35 : 331-343.
- Khan, A.W. (1977). "Anaerobic Digestion of Cellulose by Mixed Culture," *Canadian Journal of Microbiology*. 23 : 1700-1705.
- Khan, A.W. and Mary, M.H. (1981). "Metabolism of Acetate and Hydrogen by Mixed Population of Aerobes Capable of Converting Cellulose to Methane," *Journal of Applied Bacteriology*. 50 : 283-288.
- Khan, A.W., Miller, S. and Murray, D. (1983). "Development of a Two-Phase Combination Fermenter for the Conversion of Cellulose to Methane," *Biotechnology and Bioengineering*. 25 : 1571-1579.
- Klugelman, I.J. and McCarty, P.L. (1965). "Cation Toxicity and Stimulation Anaerobic Water Treatment," *Journal of Water Pollution Control Federal*. 37 : 97-116.
- Lane, A.G. (1981). *Laboratory Cultivation of Total Anaerobes and Methanogens*. First Asian Seminar-Workshop on Biogas Technology. Philippines.
- Lane, A.G. (1984). "Laboratory Scale Anaerobic Digestion of Fruit and Vegetable Solid Waste," *Biomass*. 5 : 245-259.
- Lawrance, A.W. and McCarty, P.L. (1965). "Kinetic of Methane Fermentation in Anaerobic Treatment," *Journal of Water Pollution Control Federal*. 41 : 205-211.
- Lin, E. and Wilson, D.B. (1987). "Regulation of 1,4-Endoglucanase Synthesis in *Thermomonospora fusca*," *Applied and Environmental Microbiology*. 53 : 1352-1357.
- Mah, R.A., Hungate, R.E. and Ohwaki, K. (1987). *A Key Intermediate in Methanogenesis in Microbial Energy Conversion*. Pergamon Press.
- Mayer, F. and Hillerbrant, L. (1997). "Potato Pulp : Microbiological Characterization, Physical Modification and Application of this Agricultural Waste Product," *Applied Microbiology Biotechnology*. 48 : 435-440.
- McCarty, P.L. (1964). "Anaerobic Wastewater Treatment Fundamentals Part 1,2 and 3. *Public Works*. 107-122.

- McKinley,V.L. and Vestal,J.R. (1984). "Biokinetic Analysis Adaptation and Succession ; Microbial Activity in Composting Municipal Sewage Sludge," *Applied and Environmental Microbiology*. 47 : 933-941.
- Moscy,F.E. and Huges,D.A. (1975). "The toxicity of the Heavy Metal Ion to Anaerobic Digestion," *Journal of the Institute of Water Pollution Control Federal*. 74 : 18-40.
- Nelson,N. (1944). "A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose," *Journal Biological Chemistry*. 153 : 375-380.
- Obispe,N.E. and Dehority,B.A. (1992). "A Most Probable Number Method for Enumeration of Rumen Fungi of Studies on Factors Effecting their Concentration in the Rumen," *Journal Microbiological Method*. 16 : 259-270.
- Patel,G.B. and others. (1980). "Isolation and Characterization of the Anaerobic Cellulolytic Microorganism, *Activibrio cellulolyticus* gen.nov.sp.," *Int Journal Systematic Bacteriology*. 30 : 85-179.
- Peerler,J.T. and McClure,F.D. (1992). "A Most Probable Number Determination," *Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual*. 7th ed. New York: : West Publishing Company.
- Ricwood,D. (1991). *Anaerobic Microbiology*. 1-11.
- Sachlehner,A. and et.al. (1998). "Induction of Mannanase Xylanase and Endoglucanase Activities in *Sclerotium rolfsii*," *Applied and Environmental Microbiology*. 64 : 549-600.
- Shocky,W.L. and Dehority,B.A. (1989). "Comparison of Two Methods for Enumeration of Anaerobe Numbers on Forages and Evaluation of Ethylene Oxide Treatment for Forage Sterilization," *Applied and Environmental Microbiology*. 55 : 1766-1768.
- Short Communication. (1997). "Xylanase Biosynthesis in *Thermomonospora curvata* is not Repressed by Glucose," *Bioresource Technology*. 60 : 81-85.
- Sen,S.,Abraham,T.K. and Chakrabraty,S.L. (1952). "Characteristic of the Cellulase Produced by *Miceliophthera thermophila* D-14," *Canadian Journal ofMicrobiology*. 28 : 271-277.
- Springer,A.M. (1973). "The Environmental Factors with Effect the Anaerobic Decomposition Fibrous Sludges Beds on Stream Bottoms," *Dissertation Abs*. 32 : 4307-4338.

- Sprott, G.D., Bird, S.E. and McDonald, I.J. (1985). "Proton Motive Force as a Function of the pH at which *Methanobacterium bryantii* is Grown," *Canadian Journal of Microbiology*. 31 : 1031-1034.
- Stentiford, E.I. AND Dodds, C.M. (1992). *Composting in Solid Substrate Cultivation*. London : Elsevier Press.
- Stutzenberger, F.J. and Bodine, A.B. (1992). "Xylanase Production by *Thermomonospora curvata*," *Journal Applied Bacteriology*. 72 : 504-511.
- Sukhumarasi, J. and others. (1988). "*Clostridium josui* sp.nov., a Cellulolytic Moderate Thermophilic Species from Thai Compost," *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1 : 179-182.
- Sunna, A. and Antranikian, G. (1996). "Growth and Production of Xylanolytic Enzymes by the Extreme Thermophilic Anaerobic Bacterium *Thermotoga thermarum*," *Applied Microbiology Biotechnology*. 45 : 671-676.
- Sunna, A. and Antranikian, G. (1997). "Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria," *Critical Review Biotechnology*. 17(1) : 39-67.
- Swanson, K.M.J. and et.al. (1992). "Colony Counts Method," *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food 3th*. New York : American Public Health Association. 75-95.
- Tanticharoen, M. (1981). "General Microbiological Principals," *First Asian Seminar-Workshop on Biogas Technology*. Philippines.
- Terry, L.M. and Wolin, M.J. (1974). "A Serum Bottle Modification of Hungate Technique for Cultivation Obligate Anaerobes," *Applied Microbiology*. 27(5) : 985-987.
- Teunissen, M.J. and et.al. (1992). "Production of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes During Growth of Anaerobic Fungus *Piromyces* sp. on Different Substrate," *Journal of General Microbiology*. 138 : 1657-1664.
- Teunissen, M.J. and et.al. (1991). "Fermentation of Cellulose and Production of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes by Anaerobic Fungi from Ruminant and Non-Ruminant Herbivores," *Journal Archive Microbiology*. 156 : 20-296.
- Tuohy, M.G. and Coughlan, M.P. (1992). "Production of Thermostable Xylan Degradation Enzymes by *Talalomyces emersonii*," *Bioresource Technology*. 39 : 131-137.

- Ungchaithum,S. and Pinphanichakarn,P. (1998). "Optimization of Xylanase Production by *Streptomyces* sp. PC 22 Growing on Agricultural Residues," *Journal Science Research Chulalongkorn University*. 23 : 45-50.
- Update Guide Book on Biogas Development. (1984). *Energy Resource Development* Series 27. United Nation : New York.
- Victoria,M.L. and Staniey,M.M. (1981). "Conversion of Cellulose to Methane and Carbodioxide by Triculture of *Acetivibrio cellulolyticus*, *Desulfovibrio* sp. and *Methanosarcinar barkeri*," *Applied and Environmental Microbiology*. 42(3) : 413-420.
- Westermann,P. (1996). "Temperature Regulation of Anaerobic Degradation of Organic Matter," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 12 : 497-503.
- Westermann,P.,Ahring,B.K. and Mah,R.A. (1989). "Kinetic of Two Subgroup of Propionate in Using Organism in Anaerobic Digestion," *Applied and Environmental Microbiology*. 55(3) : 710-715.
- Zinder,S.H. and et.al. (1984). "Methanogenesis in a Thermophilic (58 °C) Anaerobic Digester : *Methanotherix* sp. an Important Acetoclastic Methanogen," *Applied and Environmental Microbiology*. 47(4) : 796-807.
- Zhang,T.C. and Noike,T. (1991). "Comparison of One-Phase and Two- Phase Anaerobic Digestion Processes in Characteristics of Substrate Degradation and Bacterial Population Levels," *Water Science Technology*. 23 : 1157-1166.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

ภาคผนวก ก

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซ : โดยใช้ Gas Chromatograph (Shimudzu model GC 9A)

สภาวะที่ใช้ (Condition)

1. คอลัมน์ : Porapak - N 80/100 ยาว 2 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1/8 นิ้ว
2. เครื่องตรวจวัดแบบ Thermal Conductivity Detector (TCD)
3. อุณหภูมิช่องฉีดตัวอย่าง (Temperature of Injection) 120 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิคอลัมน์ 70 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ TCD 120 องศาเซลเซียส Current bridges 100 mA

4. Carrier gas คือ ฮีเลียม มีอัตราการไหล 50 มิลลิลิตร/นาที

วิธีวิเคราะห์

ใช้โซริงจ์แบบ Gas type ขนาด 100 ไมโครลิตร ดูดก๊าซจากช่องว่างเหนือของเหลวในขวดซีรัมมา 50 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ ร้อยละของส่วนประกอบของก๊าซจะแสดงออกมาโดย Integrator ของ Shimudzu model C-R3A

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi - Nelson (Nelson. 1944)

หลักการ : กลูโคสหรือไซโลสในสารละลายตัวอย่างจะรีดิวซ์ Copper ในสารละลายต่างให้ Cuprous copper ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารละลาย Arseno molybdate ทำให้เกิดสีเขียวแกมน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

การเตรียมสารเคมี

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

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

ผสม Somogyi : 1 และ 2 ในอัตราส่วน 4 : 1 โดยปริมาตรก่อนใช้แต่ละครั้ง

Nelson : ละลาย Ammonium molybdate 100 กรัม ในน้ำกลั่น 1800 มิลลิลิตร เติม H_2SO_4 เข้มข้นลงไป 84 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายของ (12 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) เก็บสารละลายไว้ในขวดแก้วสีชา

วิธีการวิเคราะห์

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

ทำ Standard graph ของกลูโคสและไซโลสเพื่อใช้เทียบหาค่าน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่างกราฟมาตรฐาน

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (Total sugar) โดยวิธี Phenol sulfuric total sugar (Dubois. 1956)

หลักการ : สารตัวอย่างที่เป็นน้ำตาล Oligosaccharide Polysaccharide และทำปฏิกิริยากับฟีนอล และกรดซัลฟริก จะให้สีส้ม

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (Glucose Analytical Reagent) ชั่งกลูโคสมา 0.35 กรัม อย่างละเอียดใส่ใน Volumetric flask เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปต 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้เต็ม ผสมให้เข้ากันซึ่งจะใช้เป็น Stock solution ปิเปต Stock solution มา 1 5 5 และ 2 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 6 5 2 และ 0 มิลลิลิตร ตามลำดับซึ่งจะได้สารละลายที่มีกลูโคส 10 35 50 และ 75 ไมโครกรัม / 2 มิลลิลิตร

2. กรดซัลฟริกเข้มข้น

3. สารละลายฟีนอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยละลายฟีนอล 5 กรัมลงในน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์จะต้องเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มี กลูโคส 10 35 50 และ 75 ไมโครกรัม / 2 มิลลิลิตร มาหาน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีเดียวกับสารละลายตัวอย่าง ตามวิธีดังต่อไปนี้

2. เติมสารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่แช่อยู่ในน้ำแข็ง

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

4. เติมกรดซัลฟริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ไม่เกิน 20 นาที

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปเขียนเป็นกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล เพื่อใช้เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลในสารละลายตัวอย่าง

4. การวิเคราะห์หาค่าอัลคาไลน์ตี (Alkalinity) และปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Total volatile acid) (ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2525)

ในการศึกษานี้เป็นวิธีการวิเคราะห์โดยวิธีไตเตรท ซึ่งเป็นวิธีการแบบหยาบๆสามารถนำไปใช้ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียที่ทำงานภายใต้สภาวะไร้อากาศ เพื่อจะได้ทราบถึงการทำงานของจุลินทรีย์ภายในระบบ เนื่องจากสั้นกว่าวิธีอื่นๆ โดยวิธีนี้สามารถหาได้ทั้งค่าอัลคาไลน์ตี และปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย

วิธีการวิเคราะห์

ตัวอย่างน้ำเสียที่นำมาวิเคราะห์ควรทิ้งไว้ให้ตกตะกอนแล้วรินเอาส่วนใส (Supernatant) หรือนำน้ำเสียไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ประมาณ 5 นาที ไม่ควรใช้วิธีการกรองหรือเติมสารช่วยในการตกตะกอนเพราะจะทำให้ผลที่วิเคราะห์ได้คลาดเคลื่อน เลือกปริมาตรตัวอย่างน้ำเสียที่จะวิเคราะห์ให้เหมาะสม เพื่อที่จะได้ใช้สารละลายมาตรฐานในการไตเตรทไม่เกิน 25 มิลลิลิตร โดยทั่วไปใช้ตัวอย่างน้ำเสียประมาณ 50 หรือ 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. ใช้ตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 50 มิลลิลิตร
2. วัด pH ของตัวอย่างน้ำเสียด้วยเครื่อง pH meter ที่ผ่านการปรับมาตรฐานกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ทราบ pH ที่แน่นอนมาแล้ว
3. ไตเตรทตัวอย่างน้ำเสียด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 N ผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic stirrer จนกระทั่ง pH เป็น 4 จดปริมาตรกรดที่ใช้เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาค่าอัลคาไลน์ตีของตัวอย่างน้ำเสีย หลังจากนั้นไตเตรทต่อจนตัวอย่างน้ำเสียมีค่า pH อยู่ในช่วง 3.3-3.5
4. ต้มตัวอย่างน้ำเสียจากข้อ 3 ให้เดือดเบาๆประมาณ 3 นาทีแล้วทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิเท่าเดิม
5. ไตเตรทตัวอย่างน้ำเสียด้วยสารละลายมาตรฐานด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N จน pH เป็น 4 แล้วไตเตรทต่อจน pH มีค่าเพิ่มขึ้นถึง 7 จดปริมาตรด่างที่ใช้ไตเตรทจาก pH 4 เป็น 7 เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย

การคำนวณ

1. การคำนวณหาค่าอัลคาไลน์ิตีของตัวอย่างน้ำเสีย

$$\frac{\text{ค่าอัลคาไลน์ิตี (มิลลิกรัมของแคลเซียมคาร์บอเนต / ลิตร)} \times 50 \times 1,000}{\text{ปริมาตรกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการปรับ pH เป็น 4) (N ของ H}_2\text{SO}_4) \times 50 \times 1,000} =$$

ปริมาตรตัวอย่างน้ำเสีย

2. การคำนวณหาปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายของตัวอย่างน้ำเสีย

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

ปริมาตรตัวอย่างน้ำเสีย

5. วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (Teunissen. et.al. 1991)

วิธีเตรียมเอนไซม์

นำน้ำหมักจากถังปฏิกรณ์มาตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้วนำส่วนใสไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g นาน 10 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียมสับสเตรท

1. วิธีเตรียมสับสเตรทในการหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส :

1.1 เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (Citrate - phosphate buffer)

ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0

1.2 เตรียม 1 % CMC (Carboxymethylcellulose) (w/v) ในสาร

ละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมจากข้อ 1.1

2. วิธีเตรียมสับสเตรทในการหากิจกรรมของเอนไซม์ไคลาเนส :

2.1 นำ 2 % Xylan (w/v) ใน deionised water ไปปั่นที่ความเร็ว

5,000 x g นาน 10 นาที (2 ครั้ง) เพื่อล้างน้ำตาลที่ติดอยู่ออกไป จากนั้นนำไปทำ freeze dried

2.2 เตรียม 1 % Xylan (w/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมจาก

ข้อ 1.1

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส :

1. เติม 0.975 มิลลิลิตร ของสับสเตรทที่เตรียมจากข้อ 1.2

2. เติม 0.025 มิลลิลิตร ของสารตัวอย่าง

3. บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

4. หยุดปฏิกิริยาในน้ำเดือด 5 นาที
5. นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 5 นาที แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยวิธี Somogyi-Nelson

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส :

วิธีวิเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสมีขั้นตอนและวิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้สับสเตรทที่เตรียมได้จากข้อ 2.2

วิธีคำนวณ Enzyme activity

$$\text{Enzyme activity} = \frac{A \times 0.5 \times 10^3}{\text{Slope} \times \text{MW} \times V \times T}$$

- A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลอง
- S = ความชันจากกราฟมาตรฐานกลูโคสหรือไซโลส
- MW = มวลโมเลกุลของกลูโคสหรือไซโลส
- V = ปริมาตรของเอนไซม์
- T = ระยะเวลาในการบ่ม

ภาคผนวก ข
ข้อมูลดิบจากการทดลอง

ภาคผนวก ข

การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิสูง
(55 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส)

ตาราง 18 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจาก
เปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิปานกลาง (37 องศาเซลเซียส) โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็น
กลูโคส ไซโลส ไซแลน และแอลฟา-เซลลูโลส

Glucose	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Reducing sugar ($\mu\text{g / ml}$)	pH	% CO ₂	Reducing sugar ($\mu\text{g / ml}$)
0.5 %						
Control media	7.63	12.96	4664.29	7.37	16.45	4530.36
Control seed						
10^{-5}	8.21	9.37	97.39	7.22	10.21	105.79
10^{-6}	8.21	9.95	95.66	7.45	11.81	109.36
10^{-7}	8.16	6.33	95.07	7.45	6.97	111.14
10^{-8}	8.12	7.18	98.64	7.59	6.50	67.04
Sample						
$10^{-5}/1$	7.76	7.10	4464.29	5.99	89.16	Air 100%
2				6.29	81.71	1717.86
3				5.78	84.47	Air 100%
$10^{-6}/1$	7.68	6.98	4351.79	7.29	9.41	4664.29
2				7.44	10.94	4378.57
3				7.66	10.47	4530.36
$10^{-7}/1$	7.73	7.01	4083.93	7.60	10.10	4575.00
2				6.63	73.34	2726.79
3				7.75	10.48	4530.36
$10^{-8}/1$	7.78	6.37	4575.00	7.53	9.00	4691.07

ตาราง 18 (ต่อ)

Glucose	Day 0			Day 15		
0.5 %	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μg /ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μg /ml)
Sample						
2				7.60	9.52	4664.29
3				7.61	9.49	4664.29
Xylose	Day 0			Day 15		
0.5 %	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μg /ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μg /ml)
Control media	7.24	10.01	5071.55	7.34	18.11	4885.34
Control seed						
10^{-5}	8.21	9.37	100.22	7.22	10.21	108.33
10^{-6}	8.21	9.95	98.84	7.45	10.81	110.78
10^{-7}	8.16	6.33	97.98	7.45	6.97	113.50
10^{-8}	8.12	7.18	101.43	7.59	6.50	70.91
Sample						
10^{-5} /1	7.40	7.87	5071.55	7.72	12.54	4942.24
2				7.27	19.17	4812.93
3				6.75	72.77	2700.86
10^{-6} /1	7.63	6.73	4709.48	7.14	43.54	3752.59
2				7.39	19.32	4769.83
3				7.22	23.02	4149.14
10^{-7} /1	7.53	6.95	4381.90	7.45	12.34	5011.21
2				7.72	11.14	4640.52
3				7.72	11.01	4899.14
10^{-8} /1	7.72	6.06	5071.55	7.56	12.00	4881.90
2				7.83	8.30	5011.21
3				7.88	9.12	5071.55

ตาราง 18 (ต่อ)

Xylan	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Total sugar (µg / 2 ml)	pH	% CO ₂ / CH ₄	Total sugar (µg / 2 ml)
Control media	7.86	10.67	1350.83	7.31	11.98	1834.12
Control seed						
10 ⁻⁴	7.97	7.47	4.79	7.58	8.18	4.79
10 ⁻⁵	8.21	9.37	5.20	7.22	10.21	5.20
10 ⁻⁶	8.21	9.95	4.70	7.45	11.81	4.70
10 ⁻⁷	8.16	6.33	4.45	7.45	6.97	4.45
Sample						
10 ⁻⁴ /1	7.84	7.68	1516.12	7.10	36.11/0.12	2951.76
2				7.05	32.50	963.53
3				7.06	32.37	851.76
10 ⁻⁵ /1	7.94	8.04	1309.50	7.13	23.44	1004.71
2				7.07	36.62	887.06
3				7.11	36.04	834.12
10 ⁻⁶ /1	8.04	3.48	1350.83	7.58	5.18	1992.94
2				7.87	0.13	1992.94
3				7.94	2.10	1992.94
10 ⁻⁷ /1	7.94	2.89	1350.83	7.13	29.03	1151.76
2				7.77	4.20	1922.35
3				7.14	27.05/0.03	1263.53
α-Cellulose	Day 0			Day 15		
0.2 %	pH	% CO ₂	Total sugar (µg / 2 ml)	pH	% CO ₂ / CH ₄	Total sugar (µg / 2 ml)
Control media	7.84	15.78	2748.59	7.19	16.00	2877.25
Control seed						
10 ⁻¹	7.82	9.41	12.29	7.60	10.25	10.16
10 ⁻²	7.78	9.57	9.90	7.45	11.57	12.30

ตาราง 18 (ต่อ)

α-Cellulose 0.2 %	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Total sugar (µg / 2 ml)	pH	% CO ₂ / CH ₄	Total sugar (µg / 2 ml)
Control seed						
10 ⁻³	7.90	6.33	9.67	7.60	6.57	12.79
10 ⁻⁴	7.97	7.47	8.63	7.58	8.61	11.80
Sample						
10 ⁻¹ /1	8.09	12.93	2607.75	7.24	26.48	2713.11
2				7.07	24.42	2811.48
3				7.08	16.71	2795.08
10-2/1	7.87	11.95	2748.59	7.43	15.86	2901.64
2				7.01	15.59	2852.46
3				7.30	17.87	3163.93
10-3/1	7.73	8.50	2748.59	7.45	11.33	3098.36
2				7.22	11.12	3098.36
3				7.30	10.96	3016.39
10-4/1	7.56	7.50	2678.17	7.41	12.05	3073.77
2				7.37	11.13	3016.39
3				7.43	10.57	2836.07

ตาราง 19 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจาก
เปลือกสับปะรดที่อุณหภูมิปานกลาง (55 องศาเซลเซียส) โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็น
กลูโคส ไชโลส ไชแลน และแอลฟา-เซลลูโลส

Glucose	Day 0			Day 15		
0.5 %	pH	% CO ₂	Reducing sugar (µg/ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (µg/ml)
Control media	7.63	12.96	4664.29	7.37	23.13	4947.41
Control seed						
10 ⁻⁴	7.93	7.53	97.36	7.72	6.85	71.36
10 ⁻⁵	7.91	7.61	103.26	7.63	7.44	82.57
10 ⁻⁶	7.99	7.96	102.91	7.72	9.76	82.22
10 ⁻⁷	8.02	8.69	97.22	7.87	9.79	39.98
sample						
10 ⁻⁴ /1	7.37	22.78	4516.38	6.94	34.02	4516.38
2				7.15	18.48	4602.59
3				6.98	33.00	4688.79
10 ⁻⁵ /1	7.10	22.99	4214.66	7.14	36.28	4494.83
2				6.99	36.61	4473.28
3				6.98	36.88	4343.97
10 ⁻⁶ /1	7.40	10.63	4602.59	7.11	25.48	4542.24
2				7.21	20.72	4559.48
3				7.09	24.66	4602.59
10 ⁻⁷ /1	7.49	11.69	4688.79	7.18	23.98	4412.93
2				7.22	26.53	4602.59
3				7.10	25.79	4775.00

ตาราง 19 (ต่อ)

Xylose	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g/ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g/ml)
0.5 %						
Control media	7.63	12.96	4664.29	7.37	23.13	4947.41
Control seed						
10^{-4}	7.93	7.53	90.98	7.72	6.85	66.79
10^{-5}	7.91	7.61	96.63	7.63	7.44	77.27
10^{-6}	7.99	7.96	96.31	7.72	9.76	76.95
10^{-7}	8.02	8.69	90.98	7.87	9.79	37.44
Sample						
10^{-4} /1	7.40	14.61	44.52	6.62	87.18	Air100%
2				6.11	89.09/ 0.77	Air100%
3				6.22	90.34	Air100%
10^{-5} /1	7.34	20.44	3379.84	6.01	86.31	Air100%
2				6.11	91.52	Air100%
3				6.69	38.77	4266.94
10^{-6} /1	7.40	13.04	4533.06	7.16	28.08	4226.61
2				7.15	32.54	4186.29
3				7.25	28.72	4226.61
10^{-7} /1	7.52	19.23	4573.39	7.03	30.48	4210.48
2				7.04	30.45	4468.55
3				7.20	29.60	4210.48
Xylan	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Total sugar (μ g / 2 ml)	pH	% CO ₂ / CH ₄	Total sugar (μ g / 2 ml)
0.2 %						
Control media	7.86	10.67	1350.83	7.26	16.68	2416.47
Control seed						
10^{-2}	8.01	7.62	7.18	7.47	9.48	39.04
10^{-3}	7.80	7.81	7.18	7.60	8.45	43.39

ตาราง 19 (ต่อ)

Xylan 0.2 %	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Total sugar (µg / 2 ml)	pH	% CO ₂ / CH ₄	Total sugar (µg / 2 ml)
Control seed						
10 ⁻⁴	7.93	7.53	6.69	7.72	6.85	24.33
10 ⁻⁵	7.91	7.61	5.53	7.63	7.44	15.74
Sample						
10 ⁻² /1	7.67	22.14	1309.50	7.21	28.50	2569.41
2				7.23	28.06	2498.82
3				7.29	24.54	2145.88
10 ⁻³ /1	7.68	11.37	1350.38	7.31	15.66	2422.35
2				7.37	15.26	2481.18
3				7.25	16.80	2481.18
10 ⁻⁴ /1	7.60	10.54	1350.38	7.20	16.86	2424.71
2				7.38	17.00	2394.07
3				7.14	15.67	2387.06
10 ⁻⁵ /1	8.06	17.25	1379.75	7.22	16.21	2598.82
2				7.29	13.56	2363.53
3				7.16	11.95	2510.59
α-Cellulose	Day 0			Day 15		
0.2 %	pH	% CO ₂	Total sugar (µg / 2 ml)	pH	% CO ₂ / CH ₄	Total sugar (µg / 2 ml)
Control media	7.84	15.78	2748.59	7.12	20.42	3918.03
Control seed						
10 ⁻¹	7.76	9.77	12.72	7.52	10.61	66.89
10 ⁻²	8.01	7.62	12.72	7.47	9.48	53.77
10 ⁻³	7.80	7.81	12.72	7.60	8.45	59.84
10 ⁻⁴	7.93	7.53	11.87	7.72	6.85	33.28

ตาราง 19 (ต่อ)

α -Cellulose	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Total sugar (μ g / 2 ml)	pH	% CO ₂ / CH ₄	Total sugar (μ g / 2 ml)
0.2 %						
Sample						
10 ⁻¹ /1	7.87	22.22	2396.48	7.00	24.06	4614.75
2				7.00	25.23	4040.98
3				7.14	23.15	3959.02
10-2/1	7.68	13.14	2396.48	7.11	17.16	4024.59
2				7.18	18.55	4024.59
3				7.07	17.56	4368.85
10-3/1	7.72	18.52	2678.17	7.02	20.78	4352.46
2				7.14	19.22	4245.90
3				7.19	14.58	4204.92
10-4/1	7.70	21.84	2664.08	7.19	17.23	4147.54
2				7.00	18.63	4409.84
3				7.03	22.41	4573.77

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนของจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท

ตาราง 20 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดก่อนมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคส ไซโลส ไซแลน และแอลฟา-เซลลูโลส

Glucose 0.5 %	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Reducing sugar (µg /ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (µg /ml)
Control media	7.14	0.16	5051.56	7.32	0.25	5051.56
Control seed						
10 ⁻⁴	7.67	Air 100 %	123.56	7.50	0.25	105.59
10 ⁻⁵	7.38	0.12	121.22	7.27	0.25	106.06
10 ⁻⁶	7.37	0.11	116.53	7.34	0.28	102.47
10 ⁻⁷	7.63	0.12	120.44	7.59	0.20	105.59
10 ⁻⁸	7.55	Air 100 %	110.28	7.32	0.33	100.59
10 ⁻⁹	7.70	0.11	114.19	7.65	0.18	101.38
Sample						
10 ⁻⁴ /1	7.37	Air 100 %	4489.06	4.75	5.39	4754.69
2				5.20	4.10	5168.75
3				4.99	4.68	4899.31
10 ⁻⁵ /1	7.64	Air 100 %	5121.88	5.32	4.27	4811.19
2				5.12	3.41	4739.06
3				5.23	5.16	4767.19
10 ⁻⁶ /1	7.55	Air 100 %	4973.44	5.10	5.89	4554.69
2				5.13	1.85	4723.44
3				5.00	6.36	4582.81
10 ⁻⁷ /1	7.42	0.12	4856.25	5.18	4.20	4700.00
2				5.14	2.15	4309.38
3				5.12	1.78	4387.50

ตาราง 20 (ต่อ)

Glucose 0.5 %	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g /ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g /ml)
sample						
10^{-8} /1	7.72	0.16	5051.56	5.38	1.42	4387.50
2				5.22	1.46	4348.44
3				5.48	1.55	4418.75
10^{-9} /1	7.37	0.15	5051.56	4.90	6.27	4457.81
2				5.37	1.62	4817.19
3				5.47	1.56	4762.50
Xylose 0.5 %	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g /ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g /ml)
Control media	6.90	0.14	5059.92	7.06	0.33	5075.41
Control seed						
10^{-4}	7.67	Air 100 %	127.87	7.50	0.25	109.02
10^{-5}	7.38	0.12	125.41	7.27	0.25	109.51
10^{-6}	7.37	0.11	120.49	7.34	0.28	105.74
10^{-7}	7.63	0.12	124.59	7.59	0.20	109.02
10^{-8}	7.55	Air 100 %	113.93	7.32	0.33	103.77
10^{-9}	7.70	0.11	118.03	7.65	0.18	104.59
Sample						
10^{-4} /1	7.14	Air 100 %	4706.51	5.53	8.05	4329.51
2				5.25	11.96	4583.61
3				5.21	7.98	4485.25
10^{-5} /1	7.14	0.12	5018.03	5.25	6.81	4952.46
2				5.20	6.64	5239.34
3				4.96	7.75	5132.79

ตาราง 20 (ต่อ)

Xylose 0.5 %	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Reducing sugar (µg /ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (µg /ml)
Sample						
10 ⁻⁶ /1	7.14	Air 100 %	5059.02	5.19	8.91	4772.13
2				5.24	6.64	4657.38
3				4.89	5.18	4698.36
10 ⁻⁷ /1	7.14	0.10	4911.48	4.93	8.45	4485.25
2				4.94	7.79	4419.67
3				4.93	5.31	4952.46
10 ⁻⁸ /1	7.32	Air 100 %	5075.41	5.16	6.67	5386.89
2				4.96	5.83	5567.21
3				4.93	5.20	5075.41
10 ⁻⁹ /1	7.18	Air 100 %	4706.56	4.98	6.58	5018.03
2				5.02	5.85	5321.31
3				5.06	14.41	4895.08
Xylan 0.2 %	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Total sugar (µg / 2 ml)	pH	% CO ₂ / CH ₄	Total sugar (µg / 2 ml)
Control media	7.31	0.16	2806.71	7.26	0.29	2727.44
Control seed						
10 ⁻¹	7.36	Air 100 %	19.23	6.90	3.27	11.87
10 ⁻²	7.32	Air 100 %	9.91	6.90	2.70	13.45
10 ⁻³	7.38	Air 100 %	9.79	7.20	0.25	7.48
10 ⁻⁴	7.67	Air 100 %	9.18	7.50	0.25	9.91
10 ⁻⁵	7.38	0.12	13.70	7.27	0.28	10.04
Sample						
10 ⁻¹ /1	7.22	0.13	2776.22	5.63	21.08/ 1.22	1294.51
2				5.66	25.39/ 0.44	1349.39

ตาราง 20 (ต่อ)

Xylan 0.2 %	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Total sugar (μ g / 2 ml)	pH	% CO ₂ / CH ₄	Total sugar (μ g / 2 ml)
sample						
3				6.06	23.43/ 1.02	1349.39
10 ⁻² /1	7.22	0.13	2879.88	5.28	16.73	1358.98
2				5.32	15.41/ 0.08	1404.27
3				5.36	14.49	1446.95
10 ⁻³ /1	7.36	Air 100 %	2684.76	5.19	12.81	1495.73
2				5.21	15.02	1562.80
3				5.24	13.72	1520.12
10 ⁻⁴ /1	7.65	0.14	2837.20	5.43	14.64	1355.49
2				5.68	15.78	1367.68
3				5.68	14.73	1459.15
10 ⁻⁵ /1	7.56	0.14	2800.61	5.18	11.98	1575.00
2				5.43	12.77	1526.22
3				5.26	13.39	1404.27
α -Cellulose 0.2 %	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Total sugar (μ g / 2 ml)	pH	% CO ₂ / CH ₄	Total sugar (μ g / 2 ml)
Control media	7.28	0.13	4047.76	7.43	0.20	3913.43
Control seed						
10 ⁻¹	7.36	Air 100 %	24.83	6.90	3.27	15.58
10 ⁻²	7.32	Air 100 %	13.19	6.90	2.70	17.52
10 ⁻³	7.38	Air 100 %	13.04	7.20	0.25	10.21
10 ⁻⁴	7.67	Air 100 %	12.30	7.50	0.25	13.19
10 ⁻⁵	7.38	0.12	17.82	7.27	0.28	13.34
Sample						
10 ⁻¹ /1	7.69	Air 100 %	3488.06	6.94	4.57/ 2.51	3898.51
2				6.82	4.61/ 3.38	3502.99

ตาราง 20 (ต่อ)

α-Cellulose 0.2 %	Day 0			Day 15		
	pH	% CO ₂	Total sugar (μg / 2 ml)	pH	% CO ₂ / CH ₄	Total sugar (μg / 2 ml)
Sample						
3				6.73	4.76/ 4.89	3689.55
10-2/1	7.52	Air 100 %	3301.49	6.88	4.33/ 0.02	3032.84
2				6.77	4.16	3532.84
3				7.00	4.44/ 0.17	3741.79
10-3/1	7.42	Air 100 %	3525.37	6.80	3.56	3413.43
2				7.04	3.80	3600.00
3				7.00	0.86	4361.19
10-4/1	7.46	Air 100 %	3465.67	7.13	1.12	4420.90
2				7.19	0.53	4197.01
3				6.77	1.59	4286.57
10-5/1	7.44	0.10	3428.36	6.86	0.98	4174.63
2				6.98	0.52	4010.45
3				6.92	0.51	4361.19

ตาราง 21 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจาก
เปลือกสับปะรดหลังจากมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคส
ร้อยละ 0.3

Glucose 0.5 %	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g/ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g/ml)
Control media	7.18	0.15	5073.33	7.13	0.24	5027.05
Control seed						
10^{-5}	6.92	0.22	107.67	6.73	0.51	107.34
10^{-6}	6.91	0.17	115.05	6.92	0.30	106.85
10^{-7}	6.96	0.09	102.75	6.75	Air 100 %	121.61
10^{-8}	6.92	0.18	112.10	7.00	Air 100 %	106.80
10^{-9}	6.92	0.15	111.77	6.61	0.57	97.83
10^{-10}	6.97	0.14	114.72	6.57	0.33	95.87
Sample						
10^{-5} /1	7.13	0.14	5058.97	5.18	2.26	4795.08
2				4.79	4.41	4655.74
3				5.12	1.32	4636.07
10^{-6} /1	6.97	0.16	4918.03	5.70	3.40	4811.48
2				5.82	0.82	4860.66
3				5.23	0.42	4819.67
10^{-7} /1	6.86	0.14	5024.59	5.40	1.98	4819.67
2				5.34	0.82	4795.08
3				5.27	2.07	4590.16
10^{-8} /1	7.35	0.15	5065.57	6.52	0.43	5040.98
2				6.88	1.72	5065.57
3				6.19	0.27	4688.52
10^{-9} /1	6.86	0.17	5073.33	6.28	1.91	4754.10
2				6.49	0.21	5040.98
3				6.58	Air 100 %	5106.56

ตาราง 21 (ต่อ)

Glucose 0.5 %	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g/ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g/ml)
Sample						
10 ⁻¹⁰ /1	7.01	0.12	5163.93	6.87	Air 100 %	5040.98
2				6.86	2.29	5122.95
3				7.00	0.14	5065.57
Xylose 0.5 %	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g/ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g/ml)
Control media	6.78	0.16	5080.51	6.49	0.18	5080.51
Control seed						
10 ⁻⁵	6.92	0.22	122.90	6.73	0.51	122.90
10 ⁻⁶	6.91	0.17	127.14	6.92	0.30	102.56
10 ⁻⁷	6.96	0.09	120.36	6.75	Air 100 %	134.42
10 ⁻⁸	6.92	0.18	133.07	7.00	Air 100 %	112.73
10 ⁻⁹	6.92	0.15	129.68	6.61	0.57	105.10
Sample						
10 ⁻⁵ /1	6.82	0.18	5063.56	4.71	3.85	4639.83
2				4.60	3.32	4139.83
3				4.98	2.98	4299.15
10 ⁻⁶ /1	6.70	0.13	5038.14	4.97	38.07	4317.80
2				5.21	1.90	4724.58
3				6.30	2.23	4978.81
10 ⁻⁷ /1	7.00	0.18	5080.51	6.05	0.26	4902.54
2				5.85	2.06	4724.58
3				5.78	0.61	4444.92
10 ⁻⁸ /1	6.70	0.13	4953.39	6.20	Air 100 %	5122.88
2				6.25	1.24	5038.14

ตาราง 21 (ต่อ)

Xylose	Day 0			Day 30		
0.5 %	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g/ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g/ml)
Sample						
3				6.39	0.76	4868.64
$10^{-9}/1$	6.68	0.20	5266.95	6.33	0.41	5207.63
2				6.35	Air 100 %	5317.80
3				6.43	0.34	5334.75
Xylan	Day 0			Day 30		
0.2 %	pH	% CO ₂	Total sugar (μ g / 2 ml)	pH	% CO ₂	Total sugar (μ g / 2 ml)
Control media	6.98	0.17	2764.80	7.01	0.25	2652.55
Control seed						
10^{-3}	6.95	0.12	13.97	6.75	0.38	5.50
10^{-4}	7.18	0.16	9.89	6.72	Air 100 %	5.50
10^{-5}	6.92	0.22	10.91	6.73	0.51	5.70
10^{-6}	6.91	0.17	10.09	6.92	0.31	6.11
10^{-7}	6.96	0.09	14.48	6.75	Air 100 %	7.64
Sample						
$10^{-3}/1$	6.89	0.20	2678.06	5.68	9.42	1509.70
2				5.20	9.13	1382.14
3				5.06	8.34	1550.51
$10^{-4}/1$	7.00	0.19	2815.82	5.05	0.55	1769.90
2				5.10	3.28	1744.39
3				5.48	7.92	1586.22
$10^{-5}/1$	6.89	0.26	2856.63	5.08	5.92	1616.84
2				5.36	4.28	1718.88
3				5.02	3.38	1836.22
$10^{-6}/1$	6.86	0.18	2780.10	5.21	0.54	1632.14

ตาราง 21 (ต่อ)

Xylan 0.2 %	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Total sugar (μg / 2 ml)	pH	% CO ₂	Total sugar (μg / 2 ml)
Sample						
2				5.48	4.99	1958.67
3				5.24	11.99	1693.37
10^{-7} /1	6.86	0.25	2703.57	6.25	Air 100 %	2688.27
2				6.85	Air 100 %	2703.57
3				5.97	2.71	2356.63
α -Cellulose 0.2 %	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Total sugar (μg / 2 ml)	pH	% CO ₂	Total sugar (μg / 2 ml)
Control media	6.95	0.11	3925.37	7.14	0.21	3891.79
Control seed						
10^{-2}	6.94	0.16	108.81	6.62	Air 100 %	13.13
10^{-3}	6.95	0.12	13.97	6.75	0.38	5.50
10^{-4}	7.18	0.16	9.89	6.72	Air 100 %	5.50
Sample						
10^{-2} /1	6.94	0.22	3820.90	6.73	2.40	3417.91
2				7.00	1.04	3462.9
3				6.94	1.66	3611.94
10^{-3} /1	6.94	0.19	3985.07	7.00	1.09	3611.94
2				6.62	Air 100 %	3761.19
3				6.67	0.25	3671.64
10^{-4} /1	6.94	0.16	3910.45	6.74	1.95	3350.75
2				6.60	0.93	3335.82
3				6.52	0.20	3746.27

ตาราง 22 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจาก
เปลือกสับปะรดหลังจากมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็น
ไซแลนร้อยละ 0.3

Glucose	Day 0			Day 30		
0.5 %	pH	% CO ₂	Reducing sugar ($\mu\text{g /ml}$)	pH	% CO ₂	Reducing sugar ($\mu\text{g /ml}$)
Control media	6.49	0.15	5194.74	6.82	Air 100 %	5094.74
Control seed						
10^{-5}	6.62	0.17	113.96	7.00	0.10	85.19
10^{-6}	6.62	0.10	114.49	7.09	Air 100 %	85.02
10^{-7}	6.63	0.08	115.72	7.01	Air 100 %	82.39
10^{-8}	6.67	Air 100 %	114.84	7.04	Air 100 %	99.93
10^{-9}	6.67	0.06	111.86	7.09	Air 100 %	98.18
Sample						
10^{-5} /1	6.59	0.15	5194.74	6.14	6.03	4821.93
2				5.55	0.21	5260.53
3				5.56	8.34	4449.12
10^{-6} /1	6.58	0.15	5221.05	5.62	9.00	4580.70
2				5.59	0.19	5256.14
3				6.37	Air 100 %	5221.05
10^{-7} /1	6.56	0.11	5194.74	6.70	1.92	4914.04
2				6.71	0.91	5164.04
3				6.88	0.17	5216.67
10^{-8} /1	6.58	0.10	5247.37	6.91	Air 100 %	5133.33
2				6.76	1.43	5150.88
3				6.79	Air 100 %	5229.82
10^{-9} /1	6.55	0.15	5194.74	6.50	Air 100 %	5107.02
2				6.81	0.11	5221.05
3				6.86	Air 100 %	5273.68

ตาราง 22 (ต่อ)

Xylose	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μg /ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μg /ml)
Control media	6.48	0.11	5151.79	6.65	Air 100 %	5017.86
Control seed						
10^{-5}	6.6	0.17	115.93	7.00	0.10	86.64
10^{-6}	6.62	0.10	116.46	7.09	Air 100 %	86.64
10^{-7}	6.63	0.08	117.71	7.01	Air 100 %	83.79
10^{-8}	6.67	Air 100 %	116.82	7.04	Air 100 %	101.64
Sample						
10^{-5} /1	6.44	0.13	5133.93	5.45	8.94	4383.93
2				5.47	2.33	4553.57
3				5.41	3.33	4419.64
10^{-6} /1	6.47	0.15	5080.36	6.72	2.35	4473.21
2				5.44	1.26	4571.43
3				6.89	Air 100 %	5017.86
10^{-7} /1	6.48	0.13	5187.50	6.54	0.13	4973.21
2				5.98	2.14	4750.00
3				6.46	0.11	4955.36
10^{-8} /1	6.47	0.12	5107.14	6.71	Air 100 %	5017.86
2				5.70	0.75	4821.43
3				6.40	0.16	5107.14
Xylan	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Total sugar (μg / 2 ml)	pH	% CO ₂	Total sugar (μg / 2 ml)
Control media	6.87	0.17	2799.12	6.87	0.17	3066.96
Control seed						
10^{-6}	6.62	0.10	15.93	7.09	Air 100 %	16.34
10^{-7}	6.63	0.08	19.81	7.01	Air 100 %	18.48

ตาราง 22 (ต่อ)

Xylan 0.2 %	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Total sugar (μg / 2 ml)	pH	% CO ₂	Total sugar (μg / 2 ml)
Control media	6.87	0.17	2799.12	6.87	0.17	3066.96
Control seed						
10^{-8}	6.67	Air 100 %	20.25	7.04	Air 100 %	18.48
10^{-9}	6.67	0.06	20.40	7.09	Air 100 %	16.70
10^{-10}	6.65	0.12	17.27	7.09	Air 100 %	16.69
Sample						
10^{-6} /1	6.75	0.11	2620.50	6.48	0.22	2888.39
2				5.42	15.78	1299.01
3				6.53	0.49	2825.89
10^{-7} /1	7.16	0.09	2638.00	6.58	0.24	3022.32
2				5.57	10.78	1522.32
3				6.53	0.25	2941.96
10^{-8} /1	6.76	0.13	2710.00	5.56	8.12	1897.32
2				6.62	0.24	2933.04
3				6.58	0.22	3022.32
10^{-9} /1			2888.50	6.29	0.52	3147.32
2				5.66	9.86	1763.39
3				6.64	0.23	3084.82
10^{-10} /1	6.77	0.09	2745.54	6.56	0.89	3156.25
2				6.67	0.27	3022.32
3				6.72	0.24	3111.61

ตาราง 22 (ต่อ)

α -Cellulose 0.2 %	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Total sugar (μ g / 2 ml)	pH	% CO ₂	Total sugar (μ g / 2 ml)
Control media	6.81	0.12	3258.96	6.88	0.14	3333.58
Control seed						
10 ⁻¹	6.72	0.25	32.41	6.81	0.11	24.73
10 ⁻²	6.78	0.13	23.13	6.93	Air 100 %	21.90
10 ⁻³	6.96	0.10	18.48	6.98	Air 100 %	21.45
10 ⁻⁴	7.05	0.10	21.88	7.01	Air 100 %	20.40
Sample						
10 ⁻¹ /1	6.83	0.18	3135.82	6.34	1.95	3072.39
2				6.45	1.40	3087.31
3				6.45	1.58	3210.45
10 ⁻² /1	6.85	0.11	3117.16	6.45	1.62	3128.36
2				6.48	0.83	3314.93
3				6.35	0.65	3314.93
10 ⁻³ /1	6.82	0.14	3147.01	6.44	0.57	3195.52
2				6.43	1.02	3128.36
3				6.38	0.61	3285.07
10 ⁻⁴ /1	6.81	Air 100 %	3300.00	6.20	2.24	2755.22
2				6.49	0.65	3184.33
3				6.77	0.87	3445.52

ตาราง 23 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตในถังปฏิกรณ์หมักก๊าซชีวภาพจากเปลือกสับปะรดหลังจากมีการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็น แอลฟา-เซลลูโลสร้อยละ 0.3

Glucose	Day 0			Day 30		
0.5 %	pH	% CO ₂	Reducing sugar (µg /ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (µg /ml)
Control media	6.73	0.09	5069.30	6.78	0.44	4987.72
Control seed						
10 ⁻⁵	6.71	0.10	108.35	6.94	0.23	98.18
10 ⁻⁶	6.68	0.08	107.82	6.93	0.27	96.42
10 ⁻⁷	6.71	0.10	108.70	6.93	0.27	85.89
Sample						
10 ⁻⁵ /1	6.71	0.13	5069.31	6.82	0.39	5095.61
2				5.49	7.68	4630.70
3				5.37	6.77	4569.29
10 ⁻⁶ /1	6.71	0.09	5095.61	6.73	1.07	5121.93
2				7.13	0.35	5157.02
3				6.29	5.07	4893.86
10 ⁻⁷ /1	6.69	0.10	5183.33	6.95	0.26	5227.19
2				6.92	0.29	5183.33
3				6.92	0.28	5007.89
Xylose	Day 0			Day 30		
0.5 %	pH	% CO ₂	Reducing sugar (µg /ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (µg /ml)
Control media	6.60	0.18	5141.00	6.56	0.88	5157.14
Control seed						
10 ⁻⁵	6.71	0.10	110.21	6.94	0.23	99.86
10 ⁻⁶	6.68	0.08	109.68	6.93	0.27	98.07
10 ⁻⁷	6.71	0.10	110.57	6.93	0.27	87.36

ตาราง 23 (ต่อ)

Xylose	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g /ml)	pH	% CO ₂	Reducing sugar (μ g /ml)
Control media	6.60	0.18	5141.00	6.56	0.88	5157.14
Control seed						
Sample						
10^{-5} /1	6.54	0.13	4391.07	5.67	6.60	5067.86
2				5.61	0.20	5514.29
3				5.88	0.24	4933.93
10^{-6} /1	6.54	Air 100%	4389.29	5.62	6.79	5023.21
2				5.62	5.26	5067.86
3				6.36	0.70	5023.21
10^{-7} /1	6.55	0.10	5150.00	6.40	0.23	5157.14
2				6.42	6.53	5067.86
3				6.31	0.20	5023.21
Xylan	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Total sugar (μ g / 2 ml)	pH	% CO ₂	Total sugar (μ g / 2 ml)
Control media	6.62	0.12	2486.61	7.14	0.25	3674.11
Control seed						
10^{-3}	6.67	Air 100%	22.95	7.13	0.63	30.45
10^{-4}	6.68	Air 100%	30.63	7.30	0.34	29.20
10^{-5}	6.71	0.10	28.13	6.94	0.23	26.88
10^{-6}	6.68	0.08	30.09	6.93	0.27	29.02
10^{-7}	6.71	0.10	32.41	6.93	0.27	48.84
10^{-8}	6.69	0.09	33.30	6.96	0.21	55.98
Sample						
10^{-3} /1	6.67	0.10	2736.61	6.00	7.09	2424.11
2				5.71	16.14	1861.61

ตาราง 23 (ต่อ)

Xylan 0.2 %	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Total sugar (µg / 2 ml)	pH	% CO ₂	Total sugar (µg / 2 ml)
Sample						
3				5.31	18.97	1549.11
10 ⁻⁴ /1	7.00	0.13	2620.54	6.48	5.64	2299.11
2				6.10	4.81	2531.25
3				6.82	0.39	3156.25
10 ⁻⁵ /1	6.64	0.10	2656.25	5.93	6.60	2575.89
2				6.85	0.20	3290.18
3				6.90	0.24	3004.46
10 ⁻⁶ /1	7.15	0.09	2691.96	5.94	6.79	2575.89
2				5.97	5.29	2843.75
3				6.76	0.70	3674.11
10 ⁻⁷ /1	6.63	0.09	2549.11	6.96	0.23	3674.11
2				5.94	6.53	2531.25
3				7.14	0.20	3602.68
10 ⁻⁸ /1	6.91	Air 100%	2433.04	1.06	0.51	3629.46
2				6.91	0.39	3691.96
3				7.00	0.20	3424.11
α-Cellulose 0.2 %	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Total sugar (µg / 2 ml)	pH	% CO ₂	Total sugar (µg / 2 ml)
Control media	6.76	0.09	3706.72	6.95	0.37	3199.25
Control seed						
10 ⁻¹	6.61	0.16	47.37	6.84	0.71	30.10
10 ⁻²	6.63	0.07	20.85	7.15	0.33	27.42
10 ⁻³	6.67	Air 100%	21.15	7.13	0.63	8.46
Sample						
10 ⁻¹ /1	6.76	Air 100%	3385.82	6.83	1.01	3035.07

ตาราง 23 (ต่อ)

α -Cellulose 0.2 %	Day 0			Day 30		
	pH	% CO ₂	Total sugar (μ g / 2 ml)	pH	% CO ₂	Total sugar (μ g / 2 ml)
Sample						
2				6.85	0.87	2885.82
3				6.85	1.02	2960.45
$10^{-2}/1$	6.76	0.10	3632.09	6.84	1.01	3035.07
Sample						
2				6.72	1.34	2960.45
3				6.95	0.48	3035.07
$10^{-3}/1$	6.76	0.12	3542.54	7.06	0.33	3147.01
2				6.86	0.39	3147.01
3				6.93	0.37	3169.40

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาว สุวิมล ฤทธิ์เดช
วันเดือนปีเกิด	27 ตุลาคม 2516
สถานที่เกิด	อำเภออุทุมพรพิสัย จังหวัดศรีสะเกษ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 17 หมู่ที่ 1 ตำบลสำโรง อำเภออุทุมพรพิสัย จังหวัดศรีสะเกษ รหัสไปรษณีย์ 33120
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2535	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนกำแพง
พ.ศ. 2539	กศ.บ. วิชาเอกชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
พ.ศ. 2543	กศ. ม. วิชาเอกชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร