T160356

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในการทำงานร่วมกันเพื่อย่อยสลายกลูโคสไปเป็นก๊าซมีเธนในสภาวะไม่ใช้อากาศ โดยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกและนำมาใช้ในการศึกษา คือ *B. licheniformis*, enriched ethanol utilizing bacteria (enriched EtUB) และ enriched methane producing bacteria (enriched MPB) เพื่อใช้เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ fermentative, acetogenic และ acetoclastic methanogenic bacteria ตามลำดับ ในการศึกษานี้ได้ตรวจสอบลักษณะของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในเบื้องต้น จากนั้นได้ติดตามความสัมพันธ์ในการใช้กลูโคสไปเป็นก๊าซมีเธนของจุลินทรีย์ที่นำมาศึกษาร่วมกันในลักษณะของ coculture และ triculture รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารตัวกลางไปเป็นผลิตภัณฑ์

จุลินทรีย์ *B. licheniformis* สามารถย่อยสลายกลูโคสและได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นเอทธานอลและกรดแลคติก และจุลินทรีย์นี้ยังสามารถย่อยสลายกรดแลคติกไปเป็นกรดอะซิติกได้ด้วย ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (5.55, 27.75 และ 55.55 มิลลิโมลาร์) มีผลต่อ *B. licheniformis* ในการใช้กลูโคส พบว่าเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นจะได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นเอทธานอลและกรดอะซิติก และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 55.55 มิลลิโมลาร์ พบระยะ lag phase นาน 12 ชั่วโมง โดยที่กลูโคสเข้มข้นต่ำกว่าไม่พบ และกลูโคสถูกใช้ไปเพียงร้อยละ 45 หลังทำการหมักผ่านไป 24 ชั่วโมง และเมื่อเวลาหมักผ่านไป 72 ชั่วโมง กลูโคสถูกย่อยสลายได้ร้อยละ 77 และการย่อยสลายไม่เพิ่มขึ้นหลังจากนั้นจนสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมง 144 เนื่องจากมีการสะสมของเอทธานอลและกรดอะซิติกในความเข้มข้นที่สูง ซึ่งมีผลต่อการย่อยสลายของกลูโคสที่เหลือ

ในขณะที่ enriched EtUB เป็นจุลินทรีย์ acetogenic bacteria ที่สามารถใช้เอทธานอลเป็นหลักเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก โดยมีจำนวนของจุลินทรีย์ acetogenic bacteria ที่สามารถใช้เอทธานอลและกรดแลคติกอยู่ร้อยละ 82 และ 1 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์ acetoclastic methanogen, fermentative bacteria และ sulfate reducing bacteria (SRB, *Desulfovibrio alcoholovorans*) ที่ใช้เอทธานอล อยู่ร้อยละ 15, 1.5 และ 0.5 ตามลำดับ ส่วน enriched MPB พบจุลินทรีย์ acetoclastic methanogen ที่ส่วนใหญ่เป็น *Methanosaeta* อยู่ร้อยละ 99.98 หรือ 6.1×10^9 MPN เซลล์/มิลลิลิตร ที่เหลือเป็น fermentative, acetogenic และ sulfate reducing bacteria ปนอยู่บ้าง นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาใช้ในการศึกษานี้ทั้งหมดไม่สามารถใช้กรดโพรพิออนิก และบิวทีริกได้

ในการศึกษาการย่อยสลายกลูโคสไปเป็นก๊าซมีเธนของ coculture ที่มี *B. licheniformis* ร่วมกับ enriched MPB หรือร่วมกับ enriched EtUB พบว่าสามารถย่อยสลายกลูโคสไปเป็นก๊าซมีเธนได้ดีกว่าใช้ enriched MPB หรือ enriched EtUB เพียงอย่างเดียว ในการศึกษา coculture ระหว่าง *B. licheniformis* ร่วมกับ enriched EtUB พบว่าสามารถใช้เอทธานอลที่เกิดจากการย่อยสลายกลูโคสหมดภายใน 72 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก แต่ความสามารถในการดึงกรดอะซิติกไปใช้เพื่อผลิตก๊าซมีเธนเป็นไปได้ช้า และเกิดการสะสมกรดอะซิติกภายในระบบ และได้ก๊าซมีเธนต่ำ โดยองค์ประกอบของก๊าซมีเธนมีเพียงร้อยละ 15 ในขณะที่การทำงานร่วมกันของ *B. licheniformis* กับ enriched MPB ถึงแม้สามารถย่อยสลายเอทธานอลได้ช้ากว่า โดยใช้เวลานานถึง 336 ชั่วโมง แต่การที่ปริมาณกรดอะซิติกค่อยๆเพิ่มขึ้น ทำให้จุลินทรีย์ methanogen สามารถนำไปใช้ได้ทัน และไม่เกิดการสะสมกรด ทำให้ได้ก๊าซมีเธนสูง และ มีองค์ประกอบของก๊าซมีเธนถึงร้อยละ 57 ทั้งนี้เนื่องจากใน enriched MPB มีจำนวนจุลินทรีย์ methanogen สูงกว่า แต่มีจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้เอทธานอลต่ำกว่าเมื่อเทียบกับ enriched EtUB โดยที่ enriched EtUB มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มเท่ากับ 1.50×10^5 และ 2.80×10^4 MPN เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่ enriched MPB มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มเท่ากับ 3.77×10^4 และ 3.77×10^7 MPN เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่การทำ coculture ที่มี enriched MPB ร่วมอยู่ ถึงแม้จะได้ก๊าซมีเธนสูงแต่มีอัตราการย่อยสลายเอทธานอลไปเป็นกรดอะซิติกค่อนข้างช้า จึงส่งผลให้การเกิดก๊าซมีเธนช้าตามไปด้วย โดยเกิด methane yield สูงสุด (0.35 มิลลิลิตร/มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกใช้ไป) ที่ 600 ชั่วโมง

ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายกลูโคสไปเป็นก๊าซมีเธนให้ดีขึ้น จึงนำจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่มมาทำงานร่วมกัน (triculture) เพื่อทดสอบการใช้กลูโคสไปเป็นก๊าซมีเธน โดยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม methanogen ให้มากขึ้น โดยศึกษาอยู่ในช่วง 10^4 ถึง 10^9 MPN เซลล์/มิลลิลิตร และควบคุมปริมาณเริ่มต้นของ *B. licheniformis* และ enriched EtUB ให้เท่ากับ 2.64×10^4 และ 1.50×10^5 MPN เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับในทุกการทดลอง จากการศึกษาพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ acetoclastic methanogen ควรมีจำนวนเป็น 10^9 MPN เซลล์/มิลลิลิตร โดยสัดส่วนที่เหมาะสมของ fermentative, acetogenic และ methanogenic bacteria ในการย่อยสลายกลูโคสไปเป็นก๊าซมีเธนใน

T160356

การศึกษานี้อยู่ที่ 2.64 x 10^4 : 1.50 x 10^5 : 1.00 x 10^9 MPN เซลล์/มิลลิลิตร จะสามารถย่อยสลายกลูโคสไปเป็นก๊าซมีเธน และให้ methane yield ถึง 0.37 มิลลิลิตร/มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกใช้ไป ภายในระยะเวลา 276 ชั่วโมง โดยไม่มีการสะสมของกรดอินทรีย์ ในการที่ระบบมีจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเอทธานอลไปเป็นกรดอะซิติกได้เร็ว ประกอบกับมีการเพิ่มจำนวนของ methanogen เริ่มต้นในปริมาณที่สูง สามารถดึงกรดอะซิติกไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เร่งการใช้กรดอะซิติก ไม่มีการสะสมกรดอะซิติกอยู่สูงในระบบ ลดผลการยับยั้งของกรดอะซิติกต่อจุลินทรีย์ methanogen ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายกลูโคสไปเป็นก๊าซมีเธนเกิดได้ดียิ่งขึ้น

Abstract

TE 160356

This work aimed to study interaction among bacterias in anaerobic digestion of glucose for producing methane. *B. licheniformis*, enriched ethanol utilizing bacteria (enriched EtUB), and enriched methane producing bacteria (enriched MPB) were chosen to be representative for fermentative bacteria, acetogenic bacteria, and acetoclastic methanogenic bacteria, respectively. Those bacterias were characterized. Furthermore, their interactions in glucose digestion under anaerobic condition to produce methane in coculture and triculture systems were investigated.

B. licheniformis digested glucose and produced mainly ethanol, lactic acid which was subsequently turned into acetic acid. Initial glucose concentrations of 5.55, 27.75, and 55.55 mM were used in this work to evaluate the effect of initial glucose concentrations on digestion performance of *B. licheniformis*. Larger proportions of ethanol and acetic acid in product were obtained at higher initial glucose concentrations. The lag phase for glucose digestion was not found at initial glucose concentration of 5.55 and 27.75 mM. However, at the higher glucose concentration of 55.55 mM, lag phase of 12 hr was observed. In addition, 45% and 77% of glucose were digested after 24 hr and 72 hr, respectively. During 72 hr to 144 hr, the digestion of glucose was likely to be terminated because of extremely high concentrations of ethanol and acetic acid in product. This was due to the concentration of ethanol and acetic acid affected digesting capability of bacteria.

Enriched EtUB, as acetogenic bacteria mainly producing acetic acid from ethanol, comprised 82% of acetogenic ethanol-utilizing bacteria, 1% of acetogenic lactic acid-utilizing bacteria.

Additionally, acetoclastic methanogen, fermentative bacteria, and sulfate-reducing bacteria (SRB, *Desulfovibrio alcoholovorans*) as ethanol-utilizing bacteria were found at 15%, 1.5%, and 0.5%, respectively. In case of acetoclastic methanogen occupied major proportion in enriched MPB 99.98% of acetoclastic methanogen (6.1×10^9 MPN cells/ml) was *Methonosaeta*, and the rests were fermentative acetogenic and sulfate reducing bacteria. Moreover, those selected bacteria did not digest propionic acid and butyric acid.

Cocultures of *B. licheniformis* and enriched MPB or *B. licheniformis* and enriched EtUB for methane production from glucose provided better glucose digestion than single culture of enriched MPB or enriched EtUB. *B. licheniformis* – enriched EtUB coculture changed all ethanol from glucose digestion to acetic acid within 72 hr, but rate of methane production from acetic acid was relatively slow, and methane composition in gas phase was only 15%. On another hand, better methane production was found from *B. licheniformis* – enriched MPB coculture system. *B. licheniformis* – enriched MPB coculture spent 336 hr to change all ethanol to acetic acid, and gradual increase of acetic acid in the product offered a better chance for methanogen bacteria to change acetic acid to methane gas. The effluent gas containing 57% of methane was obtained from *B. licheniformis* – enriched MPB coculture. The reason for different methane productivity from both coculture systems was attributed to difference in numbers of ethanol-utilizing bacteria and methanogens, i.e. 1.5×10^5 and 2.8×10^4 MPN cells/ml for enriched EtUB, and 3.77×10^4 and 3.77×10^7 MPN cells/ml for enriched MPB. Although enriched MPB gave better methane productivity, the digestion rate of ethanol for producing acetic acid was relatively slow. Consequently, maximum methane yield of 0.35 ml/mg of glucose was obtained at considerably long fermentation time of 600 hr.

However, it can be noted that benefit of enriched EtUB provided higher digestion rate of ethanol producing acetic acid, meanwhile enriched MPB offered higher production rate of methane from acetic acid. Thus, high methane productivity together with high ethanol digestion rate could be obtained after all those bacteria were tricultured in fermentation. In order to determine optimum proportions of each bacterium, numbers of methanogens were ranging from 10^4 to 10^9 MPN cells/ml, whereas numbers of *B. licheniformis* and enriched EtUB were controlled at 2.64×10^4 and 1.5×10^5 MPN cells/ml, respectively. The experimental results showed that optimum numbers of acetoclastic methanogen bacteria was

10^9 MPN cells/ml, and optimum proportion of fermentative, acetogenic, and methanogenic bacteria for glucose digestion was $2.64 \times 10^4 : 1.5 \times 10^5 : 1.0 \times 10^9$. Optimum methane yield of 0.37 ml/mg of glucose used was obtained at 276 hr, which was considerably shorter than *B. licheniformis* - enriched EtUB coculture. Because accumulation of acetic acid was not observed from this optimum triculture, digestion rate of acetic acid to methane should depend on numbers of methanogen in the system. High numbers of ethanol-utilizing bacteria and high growing rates of methanogen accelerated consumption of acetic acid leading to low concentration of acetic acid in the system. Because methanogen was not inhibited by concentration of acetic acid in the triculture system, overall efficiency of glucose digestion to produce methane has been considerably improved.