



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)

ปริญญญา

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตเมทานอลจากก๊าซชีวภาพด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟบนตัวกลางลอยในถังปฏิกริยาชีวภาพชนิดกึ่งต่อเนื่อง

Biological Methanol Production from Biogas by Methanotroph Attached on Floating Media in Semi Continuous Bioreactor

นามผู้วิจัย นางสาวกนกวรรณ หนูช่วย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ไฉ่ เจียมไชยศรี, D.Tech.Sc.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ชาติ เจียมไชยศรี, D.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณ มาลาพันธุ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มงคล ดำรงค์ศรี, Dr.Ing.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตเมทานอลจากก๊าซชีวภาพด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟ
บนตัวกลางลอยในถังปฏิกริยาชีวภาพชนิดกึ่งต่อเนื่อง

Biological Methanol Production from Biogas by Methanotroph Attached on Floating Media in
Semi Continuous Bioreactor

โดย

นางสาวกนกวรรณ หนูช่วย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)
พ.ศ. 2552

กนกวรรณ หนูช่วย 2552: การผลิตเมทานอลจากก๊าซชีวภาพด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟบน
ตัวกลางลอยในถังปฏิกริยาชีวภาพชนิดกึ่งต่อเนื่อง ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
(วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม) สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่
ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ไฉ่ เจริญไชยศรี, D.Tech.Sc. 107 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองเพื่อหาชนิดของตัวกลาง ระยะเวลาเก็บสารละลายและอัตราการ
หมุนเวียนสารละลายที่เหมาะสมในการผลิตเมทานอลจากก๊าซชีวภาพในถังปฏิกริยาชนิดกึ่งต่อเนื่องที่มี
เชื้อเมทาโนโทรฟเกาะอยู่บนตัวกลางลอยในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ผสมเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์
โดยทำการศึกษานิคของตัวกลางลอย 2 แบบ คือ เม็ดพลาสติกทรงกลมและฟองน้ำรูปลูกบาศก์ศึกษา
ระยะเวลาเก็บสารละลายในถังปฏิกริยาได้แก่ 1, 3 และ 5 วันและศึกษาอัตราการหมุนเวียนสารละลาย
ได้แก่ 2 20 และ 200 มิลลิลิตรต่อนาที

ผลการทดลองเมื่อกำหนดระยะเวลาเก็บที่ 5 วันพบว่า ปริมาณเมทานอลที่ผลิตได้มีแนวโน้ม
เพิ่มสูงขึ้นทั้งสองชนิดของตัวกลางโดยสูงสุดในวันที่ 14 ของการเดินระบบ ปริมาณเมทานอลสะสม
ตลอดระยะเวลาการเดินระบบ 30 วันมีค่าเท่ากับ 5,699 และ 5,032 ไมโครโมลาร์สำหรับตัวกลางชนิด
ฟองน้ำและเม็ดพลาสติกตามลำดับ แต่อัตราการผลิตเมทานอลของระบบที่ใช้ฟองน้ำมีค่าสูงกว่าที่ใช้เม็ด
พลาสติกเป็นตัวกลาง (39.68 และ 27.63 ไมโครโมลาร์ต่อวัน ตามลำดับ) เมื่อใช้ระบบที่ใช้ตัวกลางชนิด
ฟองน้ำและลดระยะเวลาเก็บเป็น 1 และ 3 วัน พบว่าเมทานอลผลิตได้สูงสุดในวันที่ 11 และ 15 วัน
ของการเดินระบบ โดยปริมาณเมทานอลสะสมมีค่าเท่ากับ 1,575 และ 1,641 ไมโครโมลาร์ เมื่อแปรผัน
อัตราเร็วในการหมุนเวียนสารละลายพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราเร็ว ปริมาณเมทานอลที่ผลิตได้มีแนวโน้ม
เพิ่มขึ้น ปริมาณเมทานอลสะสมตลอดระยะเวลาเดินระบบ 30 วันที่ระยะเวลาเก็บ 5 วัน มีค่าเท่ากับ
8,648 5,699 และ 5,297 ไมโครโมลาร์ที่อัตราเร็ว 200 20 และ 2 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับและจาก
เทคนิคพีชตรวจพบปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II สูงกว่า Type I โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 26.87 และ
12.67 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด ตลอดระยะเวลาการศึกษาทั้งสองชนิดตัวกลาง นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วน
ของเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II ที่มากกว่าร้อยละ 20 จะพบการผลิตเมทานอลในทุกระยะเวลาเก็บ แต่
เมื่อเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II ลดลงจนถึงร้อยละ 10 จะไม่พบการผลิตเมทานอลในระบบและจะพบการ
ผลิตเมทานอลในความเข้มข้นคงที่ตั้งแต่วันที่ 20 เป็นต้นไปในทุกอัตราการหมุนเวียนสารละลายโดยพบ
สัดส่วนของเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II ร้อยละ 20 เช่นกัน

Kanokwan Noochouy 2009: Biological Methanol Production from Biogas by Methanotroph Attached on Floating Media in Semi Continuous Bioreactor. Master of Engineering (Environmental Engineering), Major Field: Environmental Engineering, Department of Environmental Engineering. Thesis Advisor: Associate Professor Wilai Chiemchaisri, D.Tech.Sc. 107 pages.

The objective of this study is to find optimal type of media, hydraulic retention time (HRT) and liquid recirculation rate (LRR) for methanol production by the semi-continuous bioreactor consisting of methanotrophs attached on floating media in phosphate buffer solution containing magnesium chloride. Types of floating media were plastic beads and sponge cubes. The hydraulic retention time was varied at 1, 3 and 5 days and the liquid recirculation rate was varied at 2, 20 and 200 mL/min.

The results showed that methanol production was increasing at the HRT of 5 days and gave maximum concentration at day 14th, and then it was decreasing. The methanotroph attached on both floating media gave slight differences in methanol production (5,699 and 5,032 μM , respectively) during 30 days operation. But sponge media gave higher methanol concentration than beads media (39.68 and 27.63 $\mu\text{M/day}$, respectively). The methanotroph attached on sponge at the HRT of 1 and 3 days gave maximum methanol concentration at day 11st and 15th. Methanol production at the HRT of 1 and 3 days were 1,575 and 1,641 μM , respectively. The methanotroph attached on sponge at the LRR of 200, 20 and 2 mL/min gave methanol production of 8,648 5,699 and 5,297 μM , respectively. These results indicated that increasing liquid recirculation rate yielded higher methanol concentration. Besides, types and quantities of methanotroph was studied by FISH technique, Type II was found more than Type I and was 26.87% and 12.67% in average for microbial population of all operation. When Type II was found more than 20%, methanol was produced at all HRTs. While Type II was found less than 10%, methanol was not produced. Methanol gave stable concentration trend after day 20th every liquid recirculation rate of which Type II was found to be 20%.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รศ.ดร.วิไล เจียมไชยศรี ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ให้ความช่วยเหลือในการวางแผนการวิจัยและให้คำปรึกษาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วง และขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ชาติ เจียมไชยศรี และ ผศ.ดร.วรรณมาลาพันธุ์ กรรมการที่ปรึกษาที่ให้คำปรึกษาแนะนำเพิ่มเติมในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KURDI) และศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตรายที่ให้การสนับสนุนเงินทุนบางส่วนสำหรับการวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมทุกท่านที่ให้คำแนะนำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ในการทำวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณคุณพ่อวีระและคุณแม่ศิริพร หนูช่วย ที่ให้กำลังใจจนสำเร็จการศึกษา และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ช่วยเหลือและเป็นที่กำลังใจตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ โรงเรียนสุราษฎร์ธานี รวมทั้งอาจารย์เจ้าหน้าที่และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ รุ่น 9 คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลทุกคนที่เป็นกำลังใจให้ตลอดมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งใจเป็นอย่างยิ่ง จึงขอขอบพระคุณอย่างสูง ไว้ ณ โอกาสนี้

กนกวรรณ หนูช่วย

พฤษภาคม 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	34
อุปกรณ์	34
วิธีการ	36
ผลและวิจารณ์	41
สรุปและข้อเสนอแนะ	67
สรุป	67
ข้อเสนอแนะ	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	70
ภาคผนวก	78
ภาคผนวก ก สารเคมี วัสดุและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลอง	79
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการศึกษาเชื่อมต่อเมทาโมโทรฟด้วยเทคนิคพีช	
และการเตรียมตัวอย่างก่อนส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	83
ภาคผนวก ค การคำนวณและผลการทดลอง	87
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	107

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทั่วไปของก๊าซชีวภาพ	5
2	แหล่งกำเนิดและปริมาณก๊าซมีเทนที่ปลดปล่อยในแต่ละปี	7
3	การผลิตเมทานอลแต่ละภูมิภาคของโลก	11
4	การจำแนกลักษณะเชื้อเมทาโนโทรฟแต่ละชนิด	14
5	โพรปที่ใช้ในการศึกษาเมทาโนโทรฟชนิด Type I และ Type II	33
6	ปริมาณเมทาโนโทรฟแต่ละชนิดก่อนเดินระบบในสภาวะต่างๆ	42
7	ลักษณะของตัวกลางแต่ละชนิดที่ศึกษา	43
8	เกณฑ์การออกแบบเบื้องต้น	68

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	85
ค1 องค์ประกอบของก๊าซในถังปฏิกิริยา	90
ค2 ความเข้มข้นเมทานอลเฉลี่ยโดยตัวกลางแต่ละชนิด	93
ค3 ความเข้มข้นเมทานอลเฉลี่ยแต่ละระยะเวลากักเก็บ	94
ค4 ความเข้มข้นเมทานอลแต่ละค่าอัตราการหมุนเวียนสารละลาย	95
ค5 ความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิโดยตัวกลางแต่ละชนิด	96
ค6 ความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิแต่ละระยะเวลากักเก็บ	96
ค7 ความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิแต่ละอัตราการหมุนเวียนสารละลาย	97
ค8 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำโดยตัวกลางแต่ละชนิด	97
ค9 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำแต่ละระยะเวลากักเก็บโดยใช้โพรป	98
ค10 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำแต่ละอัตราการหมุนเวียน	98
ค11 ปริมาณมีเทนละลายน้ำโดยตัวกลางแต่ละชนิด	99
ค12 ปริมาณมีเทนละลายน้ำแต่ละระยะเวลากักเก็บ	99
ค13 ปริมาณมีเทนละลายน้ำแต่ละอัตราการหมุนเวียน	100
ค14 ปริมาณเชื้อเฉลี่ยที่หลุดจากระบบโดยตัวกลางแต่ละชนิด	100
ค15 ปริมาณเชื้อเฉลี่ยที่หลุดจากระบบแต่ละระยะเวลากักเก็บ	101
ค16 ปริมาณเชื้อเฉลี่ยที่หลุดจากระบบแต่ละอัตราการหมุนเวียน	101
ค17 ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟโดยตัวกลางแต่ละชนิด	102
ค18 ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแต่ละระยะเวลากักเก็บ	103
ค19 ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแต่ละอัตราการหมุนเวียน	104
ค20 องค์ประกอบของก๊าซภายในระบบจากการศึกษาชนิดตัวกลาง	105
ค21 องค์ประกอบของก๊าซภายในระบบจากการแปรผันระยะเวลากักเก็บ	105
ค22 องค์ประกอบของก๊าซภายในระบบจากการแปรผันอัตราการหมุนเวียน	106

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การสังเคราะห์เมทานอลจากสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ	10
2 โครงสร้างของเอสเอ็มเอ็มไอ	18
3 โครงสร้างของพีเอ็มเอ็มไอ	19
4 การย่อยสลายมีเทนเป็นเมทานอลด้วย pMMO และ sMMO	20
5 โครงสร้างหน่วยย่อยของเอ็มดีเอช	21
6 ตัวกลางชนิดฟองน้ำ	29
7 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบบแขวนลอยและเกาะติด	30
8 ขั้นตอนการทำฟิช	32
9 ตัวกลางสองชนิดที่ใช้ในการศึกษา	37
10 ส่วนประกอบของถังปฏิกริยาชีวภาพชนิดกึ่งต่อเนื่อง	38
11 ชนิดและปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟเฉลี่ยที่แยกได้จากดินหลุมฝังกลบ	41
12 เซลล์จุลินทรีย์ที่ย้อมด้วยโปรบชนิดต่างๆ ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟิช	42
13 ค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิตามระยะเวลาโดยตัวกลางสองชนิด	44
14 ออกซิเจนละลายเฉลี่ยตามระดับความลึกโดยตัวกลางสองชนิด	44
15 ปริมาณมีเทนเหนือสารละลายและปริมาณมีเทนในสารละลายโดยตัวกลางสองชนิด	45
16 ปริมาณเมทานอลที่ผลิตแต่ละวันโดยตัวกลางสองชนิด (ระดับผิวน้ำ)	46
17 ปริมาณเมทานอลสะสมตามระยะเวลาที่ HRT 5 วันโดยตัวกลางสองชนิด	46
18 การผลิตเมทานอลต่อมวลมีเทนและการผลิตเมทานอลต่อมวลเชื้อโดยตัวกลางสองชนิด	47
19 ปริมาณเชื้อที่หลุดออกจากระบบโดยตัวกลางสองชนิด	48
20 องค์ประกอบของก๊าซในระบบโดยตัวกลางสองชนิด	49
21 ปริมาณเมทานอลเฉลี่ยโดยตัวกลางสองชนิดตามระดับความลึก	49
22 เปรียบเทียบปริมาณและชนิดของเชื้อเมทาโนโทรฟในสารละลายทั้งสองระบบ	50
23 ลักษณะของเชือบนตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติก	51
24 ลักษณะรูพรุนของตัวกลางชนิดฟองน้ำก่อนเดินระบบ	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	ลักษณะของเชื่อบนตัวกลางชนิดฟองน้ำหลังจากเดินระบบ	52
26	ความเข้มข้นเมทานอลที่ระยะเวลากักเก็บแตกต่างกันในตัวกลางชนิดฟองน้ำ	53
27	ปริมาณเมทานอลสะสมจากการแปรผันระยะเวลากักเก็บ	54
28	ปริมาณเชื้อแขวนลอยในระบบเปรียบเทียบกับที่ระยะเวลากักเก็บแตกต่างกัน	55
29	เมทานอลต่อมวลมีเทนและเมทานอลต่อมวลเชื้อที่ระยะเวลากักเก็บต่างๆ	56
30	ชนิดและปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟในสารละลายจากการแปรผันระยะเวลากักเก็บตามระดับความลึก	57
31	ค่าเฉลี่ยชนิดของเชื้อเมทาโนโทรฟตามระยะเวลาที่ระยะเวลากักเก็บต่างๆ	58
32	ความเข้มข้นของเมทานอลตามระดับความลึกที่ระยะเวลากักเก็บต่างๆ	58
33	ปริมาณเชื้อในสารละลายตามระดับความลึก ณ วันที่ความเข้มข้นเมทานอลสูงสุดในแต่ละระยะเวลากักเก็บ	59
34	ความเข้มข้นเมทานอลที่อัตราการหมุนเวียนสารละลายต่างๆที่ระยะเวลากักเก็บ 5 วัน ในตัวกลางชนิดฟองน้ำ	60
35	ปริมาณเมทานอลสะสมจากการแปรผันอัตราการหมุนเวียนสารละลาย	61
36	ปริมาณมีเทนละลายน้ำที่อัตราเร็วต่างๆ ตามระยะเวลา	62
37	ออกซิเจนละลายเฉลี่ยตามระดับความลึกที่อัตราเร็วค่าต่างๆ	62
38	เมทานอลต่อมวลมีเทนและเมทานอลต่อมวลเชื้อเมื่อแปรผันอัตราการหมุนเวียนสารละลาย	63
39	ปริมาณเชื้อที่หลุดจากระบบจากการแปรผันอัตราการหมุนเวียนสารละลาย	64
40	ค่าเฉลี่ยชนิดของเชื้อเมทาโนโทรฟจากการแปรผันอัตราการหมุนเวียนสารละลาย	64
41	สมดุลมวลสารที่เข้าและออกจากระบบการผลิตเมทานอล	65
42	องค์ประกอบของก๊าซเหนือสารละลายภายในระบบการผลิตเมทานอลที่สภาวะเหมาะสม	66
43	ร้อยละของมีเทนที่ถูกใช้ไป	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก1	ชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซ
ก2	อุปกรณ์ต่อเข้าถึงปฏิกิริยา
ก3	อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง
ค1	กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นเมทานอลกับพื้นที่ใต้กราฟโครมาโตกราฟ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

μM	= ไมโครโมลาร์ (micro molar)
CH_4	= มีเทน (methane)
cm	= เซนติเมตร (centimetre)
d	= วัน (day)
FAD	= ฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (flavin adenine dinucleotide)
FADH	= ฟอर्मัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (formaldehyde dehydrogenase)
FISH	= ฟลูออเรสเซนส์อินซิทูไฮบริไดเซชัน (fluoresence in situ hybridization)
g	= กรัม (gram)
HRT	= ระยะเวลาที่เก็บสารละลาย (hydraulic retention time)
kDa	= กิโลดาลตัน (kilo dalton)
LRR	= อัตราการหมุนเวียนสารละลาย (liquid recirculation rate)
MDH	= เมทานอลดีไฮโดรจีเนส (methanol dehydrogenase)
MeOH	= เมทานอล (methanol)
mg/L	= มิลลิกรัมต่อลิตร (milligram per litre)
MgCl_2	= แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride)
mL/min	= มิลลิลิตรต่อนาที (millilitres per minute)
mM	= มิลลิโมลาร์ (milli molar)
MMO	= มีเทนโมโนออกซิจีเนส (methane monooxygenase)
NADH	= นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (nicotinamide adenine dinucleotide)
NMS	= ไนเตรทมินเนอรอลซอลต์ (nitrate mineral salt)
pH	= ค่าความเป็นกรดด่าง
PL	= เม็ดพลาสติก (plastic bead)
SP	= ฟองน้ำ (sponge)
Tmp	= อุณหภูมิ (temperature)
$^{\circ}\text{C}$	= องศาเซลเซียส (degree celsius)
m	= เมตร (metre)

การผลิตเมทานอลจากก๊าซชีวภาพด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟบนตัวกลางลอยในถัง ปฏิกิริยาชีวภาพชนิดกึ่งต่อเนื่อง

Biological Methanol Production from Biogas by Methanotroph Attached on Floating Media in Semi Continuous Bioreactor

คำนำ

ปัจจุบันสภาวะโลกร้อน (global warming) นับเป็นประเด็นหนึ่งที่ประชากรโลกและนักวิจัยหรือนักวิชาการจากหลายสาขากำลังให้ความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากการใช้พลังงานที่เพิ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะในภาคอุตสาหกรรมที่กำลังเติบโตในหลายพื้นที่ ส่งผลให้อัตราการปลดปล่อยมลพิษเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ ทั้งมลพิษอากาศ มลพิษทางน้ำ ขยะและกากของเสียอันตราย ทำให้มนุษย์ต้องพยายามคิดค้นหาวิธีกำจัดหรือนำของเสียที่เกิดขึ้นกลับมาใช้ใหม่ เพื่อให้เกิดประโยชน์ เช่น การนำกลับมาใช้ซ้ำ (reuse) การนำไปผ่านกระบวนการรีไซเคิล (recycle) ซึ่งจะช่วยลดมลสารที่ปนเปื้อนออกจากสิ่งแวดล้อมลงได้บ้าง ในขณะที่เศรษฐกิจทั่วโลกกำลังเติบโตนั้น ทรัพยากรธรรมชาติที่เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตพลังงานเพื่อขยายตลาดโลกนั้นก็กำลังถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วเช่นกัน โดยทรัพยากรเหล่านี้ก็ล้วนแล้วแต่เป็นทรัพยากรที่ใช้แล้วหมดไปหรือทรัพยากรสิ้นเปลืองนั่นเอง ทำให้ปัจจุบันราคาเชื้อเพลิงสูงขึ้น ดังนั้นสิ่งที่เราควรให้ความสำคัญคือ ลดการใช้พลังงานและพยายามคิดค้นหาแหล่งเชื้อเพลิงหรือแหล่งพลังงานทดแทนอื่นๆ ที่สามารถลดปริมาณมลพิษที่เพิ่มขึ้นอีกทางหนึ่ง

ก๊าซมีเทนมีคุณสมบัติของก๊าซเรือนกระจก ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดสภาวะโลกร้อน ในปัจจุบันมีก๊าซมีเทนสะสมอยู่ในบรรยากาศถึง 1.7 พีพีเอ็มโดยปริมาตร (IPCC, 2001) และความเข้มข้นของก๊าซมีเทนก็เพิ่มขึ้นมากกว่าสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลา 300 ปีที่ผ่านมา (Khalil and Rasmussen, 1985) และปัจจุบันก๊าซมีเทนก็ค่อยๆ เพิ่มขึ้นในอัตราร้อยละ 0.8-1.0 ต่อปี (WDCGG, 1997) เนื่องจากการทำนาข้าว ปศุสัตว์และก๊าซธรรมชาติ (LESA, 2003) นอกจากนี้ก๊าซชีวภาพซึ่งเป็นก๊าซที่ได้จากกระบวนการบำบัดของเสียแบบไร้อากาศ ยังมีสัดส่วนของมีเทนถึงร้อยละ 40-60 จึงนิยมใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ อัตราการผลิตมีเทนมีความแปรปรวนและมีค่าใช้จ่ายในการทำให้ก๊าซมีเทนมีความบริสุทธิ์ การเปลี่ยนรูปก๊าซมีเทนให้เป็นเมทานอลจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นิยมแต่การใช้กระบวนการทางเคมีนั้นต้อง

ใช้พลังงานสูง ซึ่งตรงกันข้ามกับการใช้วิธีทางชีวภาพที่ใช้พลังงานต่ำ (Ghisalpa and Heinzer, 1982) โดยมีแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่เรียกว่า เมทาโนโทรฟ ซึ่งจะพบเชื้อชนิดนี้ตามพื้นดินที่มีแหล่งของมีเทน เช่น ในนาข้าวหรือหน้าดินของหลุมฝังกลบ (Whalen *et al.*, 1990) เมทานอลที่เกิดจากการย่อยสลายก๊าซมีเทนโดยจุลินทรีย์เมทาโนโทรฟมีข้อดีคือ แบคทีเรียชนิดนี้สามารถนำไปใช้ต่อได้อีก โดยใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียวสำหรับการเลี้ยงสัตว์และสามารถนำเมทานอลไปใช้ในรูปแบบต่างๆ ได้อย่างกว้างขวางมากขึ้น ทั้งที่เป็นพลังงานโดยตรงทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงหรือใช้ในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตสี การล้างอุปกรณ์ต่างๆ การใช้เป็นตัวทำละลาย เป็นต้น อีกทั้งยังสามารถนำเมทานอลไปใช้ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซึ่งจัดเป็นเชื้อเพลิงก๊าซสะอาดและให้ความร้อนสูงซึ่งมีการผลิตสารมลพิษต่ำจากการใช้งาน นอกจากนี้เมทานอลยังสามารถเก็บรักษาได้ง่ายและขนส่งได้สะดวกกว่าก๊าซมีเทน (Okubo *et al.*, 2000) รวมทั้งมีการนำเมทานอลไปผลิตเป็นสารด้านความเย็นในหม้อน้ำของรถยนต์และนำไปเป็นส่วนผสมของสารประกอบตัวอื่นๆ อีกด้วย (Marchionna *et al.*, 1998) และที่สำคัญคือช่วยลดการผลิตก๊าซเรือนกระจกลงได้ โดยเชื้อเมทาโนโทรฟสามารถออกซิไดส์ก๊าซมีเทนให้กลายเป็นเมทานอลในสภาวะที่มีอากาศได้โดยมีปฏิกิริยาเคมีดังต่อไปนี้



หมายเหตุ MMO: Methane monooxygenase; MDH: Methanol dehydrogenase;

FADH: Formaldehyde dehydrogenase; FAD: Formate dehydrogenase

จากสมการ ที่ (1) จะเห็นว่าเอนไซม์ MMO จากเชื้อเมทาโนโทรฟสามารถย่อยสลายมีเทนในสภาวะที่มีอากาศได้ จากนั้น เอนไซม์ MDH FADH และ FAD จะย่อยสลายเมทานอลต่อจนได้ CO_2 ดังนั้นในการผลิตเมทานอลด้วยกระบวนการนี้จึงต้องทำการยับยั้งเอนไซม์ MDH ไม่ให้ทำการเปลี่ยนรูปเมทานอลไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ ซึ่งมีรายงานว่า กลีโกลแมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นสารที่มีแรงไอออนิกสูงสามารถขัดขวางการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน ทำให้เอนไซม์ MDH ไม่สามารถทำงานได้ (Cox *et al.*, 1992; Anthony and Williams, 2003) ดังนั้นในการศึกษาจึงใช้กลีโกลแมกนีเซียม คลอไรด์ในระบบผลิตเมทานอล นอกจากนี้การใช้เชื้อแบบเกาะติด (Attached Growth) ปริมาณเชื้อค่อนข้างคงที่เมื่อเทียบกับเชื้อแบบแขวนลอย (Chae *et al.*, 2008) และในการศึกษาที่ผ่านมา มักใช้การผลิตเมทานอลจากมีเทนในระบบแบบกะ (สยาสมล, 2551) ซึ่งมีข้อเสียคือ การผลิตเมทานอลไม่ต่อเนื่องและผลผลิตต่ำ ในการวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหา

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเมทานอลจากก๊าซชีวภาพ โดยเชื้อเมทาโนโทรฟผสมที่เกาะบนตัวกลางลอยในถังปฏิกริยาชีวภาพชนิดกึ่งต่อเนื่อง ซึ่งสามารถลดปัญหาจากระบบแบบกะที่ต้องเดินระบบใหม่บ่อยๆ (Hocking, 1998)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาชนิดของตัวกลางลอยที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อเมทาโนโทรฟสามารถผลิตเมทานอลได้สูงสุด
2. ศึกษาระยะเวลากักเก็บ (hydraulics retention time: HRT) ที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อเมทาโนโทรฟสามารถผลิตเมทานอลได้สูงสุด
3. ศึกษาอัตราเร็วในการหมุนเวียนของเหลว (liquid recirculation rate: LRR) ที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อเมทาโนโทรฟสามารถผลิตเมทานอลได้สูงสุด

ขอบเขตการวิจัย

1. การทดลองใช้ระบบการผลิตเมทานอลแบบกึ่งต่อเนื่องในถังปฏิกริยาชีวภาพในห้องปฏิบัติการทั้งหมด โดยเชื้อเมทาโนโทรฟที่ใช้เป็นเชื้อเมทาโนโทรฟแบบผสมซึ่งคัดแยกจากดินหลุมฝังกลบจำลองในห้องปฏิบัติการ
2. ก๊าซชีวภาพสังเคราะห์ที่ใช้มีอัตราส่วนระหว่างก๊าซมีเทนต่อก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 60 ต่อ 40
3. การตรวจหาชนิดของเชื้อเมทาโนโทรฟ Type I และ Type II ด้วยเทคนิคพีช

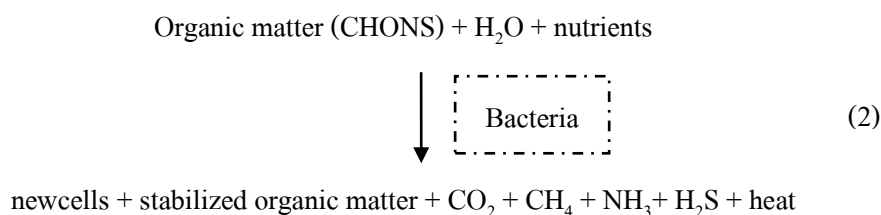
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. แนวทางและข้อมูลพื้นฐานของการออกแบบระบบผลิตเมทานอลจากก๊าซชีวภาพได้โดยวิธีการทางชีวภาพในระบบการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่อง
2. สามารถนำของเสียกลับมาใช้ประโยชน์ในรูปของพลังงานทางเลือกชนิดหนึ่ง

การตรวจเอกสาร

1. ก๊าซชีวภาพ (Biogas)

ก๊าซชีวภาพเป็นผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไร้อากาศเป็นวิธีการที่แบคทีเรียไปย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง จนกลายเป็นก๊าซในที่สุด เช่น การหมักของขยะในหลุมฝังกลบมูลฝอยแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic composting) ซึ่งระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศมักเกิดกับพื้นที่ซึ่งมีสภาพอากาศร้อน เช่น ประเทศไทย เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง (เสริมพลและไชยยุทธ, 2527) มีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังนี้ (สมการที่ 2)



จากปฏิกิริยาดังกล่าวพบว่ามีก๊าซมีเทนเกิดขึ้นร้อยละ 50-70 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับถังหมักที่ใช้หมักขยะกับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียพบว่ามีก๊าซมีเทนเกิดขึ้นร้อยละ 50-60 เช่นกัน โดยแสดงองค์ประกอบทั่วไปของก๊าซชีวภาพได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทั่วไปของก๊าซชีวภาพ

องค์ประกอบ	ร้อยละโดยปริมาตร
มีเทน	50-70
คาร์บอนไดออกไซด์	25-40
ไนโตรเจน	0.5-3.0
ไฮโดรเจน	0.5-1.5
คาร์บอนมอนอกไซด์	0.5-1.5
ไฮโดรเจนซัลไฟด์	0.01-0.5
ก๊าซอื่นๆ	0.01-0.5

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ (2538)

2. ก๊าซมีเทน (Methane)

2.1 คุณสมบัติของก๊าซมีเทน

มีเทนมีสูตรโมเลกุลคือ CH_4 มีน้ำหนักโมเลกุล 16.043 กรัมต่อโมล มีความสามารถในการละลายน้ำที่ความดัน 1.013 บาร์และอุณหภูมิ 35.6 °ฟาเรนไฮต์ เท่ากับ 0.054 โดยปริมาตร เป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น เป็นไฮโดรคาร์บอนที่สามารถเผาไหม้ได้แล้วให้เป็นเชื้อเพลิงที่พลังงานสูง (Metcalf and Eddy Inc, 2004)

2.2 แหล่งกำเนิดของก๊าซมีเทน

ในธรรมชาติจะพบก๊าซมีเทนในก๊าซชีวภาพที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียที่เรียกว่า เมทาโนเจน (methanogens) ในสภาวะที่ไร้อากาศ (anaerobic condition) ซึ่งก๊าซชีวภาพดังกล่าวมักประกอบไปด้วยก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 ดังนั้นเราสามารถพบก๊าซชีวภาพดังกล่าวได้จากระบบบำบัดของเสียชนิดไร้อากาศ (anaerobic waste treatment) เช่น โรงบำบัดมูลสุกร โรงบำบัดตะกอนจากน้ำเสียชุมชนหรืออุตสาหกรรมการผลิตอาหาร นอกจากนี้ หลุมฝังกลบมูลฝอยชุมชนยังเป็นแหล่งผลิตก๊าซชีวภาพขนาดใหญ่ (Tchobanoglous *et al.*, 1993)

2.3 อิทธิพลของก๊าซมีเทนต่อสภาวะโลกร้อน

ก๊าซมีเทนเป็นก๊าซเรือนกระจกที่สามารถอยู่ในบรรยากาศได้นานถึง 11 ปี มีคุณสมบัติของก๊าซเรือนกระจกสูงกว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยปริมาณที่เท่ากันและสามารถดูดกลืนรังสีอินฟราเรดได้ดีกว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งก๊าซทั้งสองชนิดก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดสภาวะโลกร้อน โดยก๊าซมีเทนมีปริมาณเพิ่มขึ้นเนื่องจากการทำนาข้าว ปศุสัตว์และก๊าซธรรมชาติ การเพิ่มขึ้นของก๊าซมีเทนส่งผลกระทบต่อภาวะเรือนกระจกมากเป็นอันดับสอง รองจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ พลังงานรวมที่เกิดขึ้นโดยเฉลี่ย 0.47 วัตต์

ต่อตารางเมตร (LESA, 2003) นอกจากนี้ก๊าซมีเทนยังเกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศและพบในบริเวณหลุมฝังกลบขยะมูลฝอยอีกด้วย

จากข้อมูลของกรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน การปล่อยก๊าซเรือนกระจกสู่บรรยากาศของประเทศไทยในปี 2546 จากประมาณ 344 ล้านตันคาร์บอนไดออกไซด์เทียบเท่า คิดเป็นการปล่อยจากการใช้พลังงานถึงร้อยละ 56 ของการปล่อยก๊าซเรือนกระจกในประเทศ รองลงมาภาคเกษตรกรรมร้อยละ 24 จากขยะมูลฝอยและของเสียร้อยละ 8 จากป่าไม้และการใช้ที่ดินร้อยละ 7 และจากกระบวนการอุตสาหกรรมร้อยละ 5 และจากการคาดการณ์ในปี ค.ศ. 2050 พบว่าความเข้มข้นของก๊าซมีเทนในบรรยากาศอาจจะเพิ่มขึ้นจาก 2.1 พีพีเอ็ม เป็น 4.0 พีพีเอ็ม (Ramanathan *et al.*, 1985) สามารถสรุปแหล่งกำเนิดและปริมาณก๊าซมีเทนที่ปลดปล่อยในแต่ละปีได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แหล่งกำเนิดและปริมาณก๊าซมีเทนที่ปลดปล่อยในแต่ละปี

แหล่งกำเนิด	ปริมาณการปลดปล่อยก๊าซมีเทน (ตัน/ปี)		
	1970	1990	2050
นาข้าวที่ข่มน้ำ	53	59	52
พื้นที่ข่มน้ำตามธรรมชาติ	111	111	111
หลุมฝังกลบมูลฝอย	24	36	81
การบำบัดของเสียชุมชน	17	25	47
สัตว์เคี้ยวเอื้อง	66	79	161
มูลสัตว์	12	14	28
ปลวก	20	20	20
แหล่งน้ำ	15	15	15
การเผาไหม้มวลชีวภาพ			
- การตัดไม้ทำลายป่า	16	14	12
- การเผาทุ่งหญ้า	17	16	6
- การเผาของเสียจากการเกษตร	7	8	9

ที่มา: Kreileman and Bouwman (1994)

2.4 การใช้ประโยชน์จากก๊าซมีเทน

การนำก๊าซมีเทนไปใช้ประโยชน์ เช่น การเปลี่ยนมีเทนให้เป็นเมทานอลโดย จูลินทรีย์ เมทาโนโทรฟ ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถนำไปใช้ต่อได้อีกโดยใช้เป็นโปรตีน เซลล์เดียวสำหรับการเลี้ยงสัตว์ (Anthony, 1982) ผลิตก๊าซสังเคราะห์ เช่น ก๊าซ คาร์บอนมอนอกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจนโดยก๊าซไฮโดรเจนอาจนำไปผลิตต่อไปให้กลายเป็น แอมโมเนียก็ได้ (Hatch and Matar, 1977) หรือแม้แต่ในฟาร์มเลี้ยงสุกรที่มีการผลิตก๊าซมีเทนใน ปริมาณสูง เกษตรกรที่มีฟาร์มขนาดใหญ่ก็สามารถทำระบบเก็บกักก๊าซมีเทนเพื่อนำไปใช้เป็น เชื้อเพลิงในการผลิตกระแสไฟฟ้า เตาหุงต้มอาหาร หม้อต้มไอน้ำ (สมพงษ์, 2549) และเนื่องจาก ก๊าซชีวภาพมีระดับของก๊าซมีเทนค่อนข้างสูงจึงมีการนำมีเทนจากหลุมฝังกลบมูลฝอยมาใช้เป็น เชื้อเพลิง (EMCON, 1980) อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดคืออัตราการผลิตมีเทนมีความแปรปรวน ค่อนข้างมากซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารอินทรีย์และสภาพภูมิอากาศ และมีค่าใช้จ่ายในการทำ ก๊าซมีเทนมีความบริสุทธิ์ การเก็บและขนส่งก๊าซมีเทนยังมีราคาแพงและอาจก่อให้เกิดอันตราย ได้ เนื่องจากการเก็บก๊าซมีเทนจะเก็บในรูปแบบที่ทำให้กลายเป็นของเหลวและเก็บที่อุณหภูมิ -162°C ภายใต้สภาวะความดันบรรยากาศ แล้วส่งไปตามเส้นทางท่อเพื่อไปเก็บยังถังที่มีความเย็นจัด และ จะง่ายต่อการเก็บถ้าถังมีขนาดใหญ่ (Davis, 1980)

3. เมทานอล (Methanol)

3.1 คุณสมบัติของเมทานอล

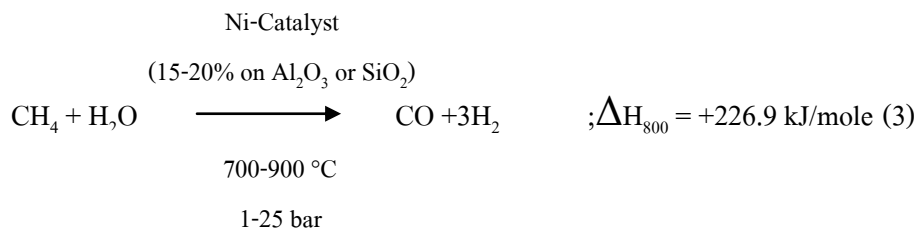
เมทานอลเรียกอีกอย่างว่าเมทิลแอลกอฮอล์ เป็นแอลกอฮอล์ที่มีสูตร โครงสร้างสั้น ที่สุดในบรรดาแอลกอฮอล์ทุกชนิด คือ CH_3OH มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 32.04 และความหนาแน่น 0.7915 กรัมต่อมิลลิกรัม มีสถานะเป็นของเหลวใส ละลายน้ำได้ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและไม่มีรสชาติ ของแอลกอฮอล์ มีจุดเดือดและจุดเยือกแข็งเท่ากับ 64.7°C และ -97.8°C ตามลำดับ

3.2 กระบวนการสังเคราะห์เมทานอล

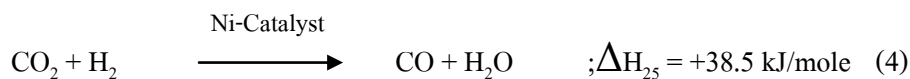
กระบวนการสังเคราะห์เมทานอลมีทั้งการผลิตด้วยวิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ โดยกระบวนการสังเคราะห์เมทานอลด้วยวิธีทางเคมีต้องการพลังงานสูงและต้องอาศัยความ

ระมัดระวังในการผลิตซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยกระบวนการผลิตเมทานอลต้องอาศัยสมการพื้นฐานในการสังเคราะห์เมทานอลทางเคมีตามขั้นตอนดังต่อไปนี้ (Rowell and Hokanson, 1979)

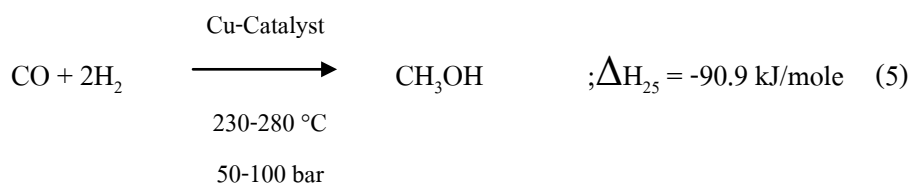
- กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (steam reforming)



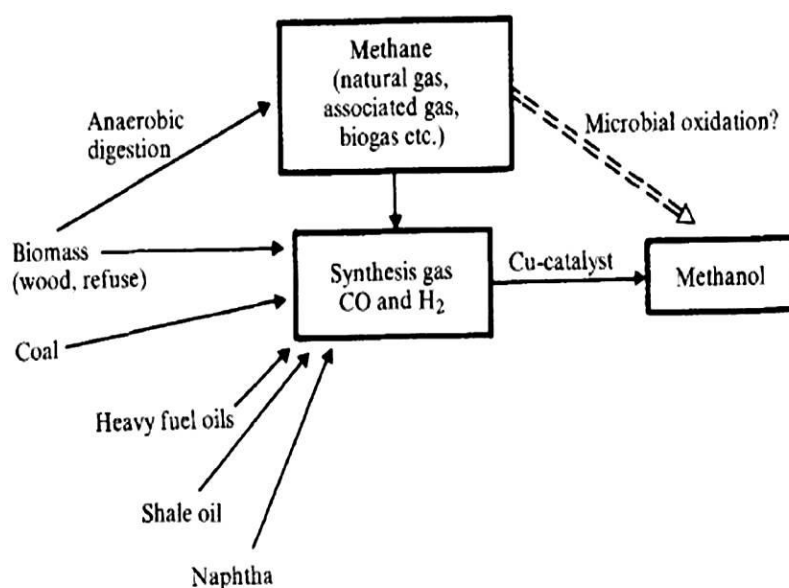
- กระบวนการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นคาร์บอนมอนอกไซด์(shift reaction)



- กระบวนการสังเคราะห์เมทานอลด้วยความดันต่ำ (low pressure methanol analysis)



กระบวนการผลิตเมทานอลทางชีวภาพสามารถทำได้เช่นเดียวกันและมีข้อดีกว่าทางเคมี คือใช้พลังงานต่ำ ซึ่งเป็นการหมักสารอินทรีย์ในธรรมชาติโดยอาศัยจุลินทรีย์เป็นตัวย่อยสลายหรือเป็นการใช้แบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีเอนไซม์มีเทนโมโนออกซิเจเนส (MMO) ซึ่งสามารถย่อยสลายก๊าซมีเทนให้กลายเป็นเมทานอลได้ ซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อต่อไป ดังนั้นวิธีการผลิตเมทานอลโดยกระบวนการทางชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเพราะเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถลดก๊าซเรือนกระจกอย่างเช่นมีเทนลงได้ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การสังเคราะห์เมทานอลจากสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ

ที่มา: Ghisalba and Heinzer (1982)

3.3 การใช้ประโยชน์จากเมทานอล

การใช้ประโยชน์เมทานอลมีการใช้อย่างกว้างขวาง ทั้งที่เป็นพลังงานโดยตรง ทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงหรือใช้ในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตสี การล้างอุปกรณ์ต่างๆ การใช้เป็นตัวทำละลาย เป็นต้น และยังสามารถนำเมทานอลไปใช้ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งจัดเป็นเชื้อเพลิงก๊าซสะอาดและให้ความร้อนสูงซึ่งมีการผลิตสารมลพิษต่ำจากการใช้งาน นอกจากนี้เมทานอลยังสามารถเก็บรักษาได้ง่ายและการขนส่งสะดวกกว่าก๊าซมีเทน (Okubo *et al.*, 2000)

ปัจจุบันเมทานอลถูกนำมาใช้ในเทคโนโลยีด้านยานยนต์ซึ่งมีทั้งข้อดีและข้อเสีย ข้อดีก็คือ เมทานอลช่วยเพิ่มค่าออกเทนในเครื่องยนต์ได้สูงกว่าน้ำมันเชื้อเพลิง ช่วยลดการน็อกของเครื่องยนต์ซึ่งเป็นผลให้การเผาไหม้เชื้อเพลิงเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพเพราะช่วยปรับสัดส่วนของแรงดันในเครื่องยนต์ให้พอเหมาะและเมทานอลยังมีความร้อนในการกลายเป็น

ไอสูง ดังนั้นอุณหภูมิที่ใช้ในการจุดติดไฟจึงต่ำกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงและปลดปล่อยก๊าซไนโตรเจนออกไซด์ออกมาในปริมาณที่น้อยกว่าอีกด้วย แต่ในขณะเดียวกันข้อเสียของเมทานอลก็คือ ความหนาแน่นของพลังงานของเมทานอลน้อยกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงเป็นครึ่งหนึ่ง ทำให้ระยะการเดินทางน้อยลงถ้าใช้เมทานอลเป็นเชื้อเพลิงแทนน้ำมันเชื้อเพลิงเมื่อเปรียบเทียบจากปริมาณเชื้อเพลิงที่ใช้เท่ากัน รวมทั้งขนส่งและเก็บได้ง่ายกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงและอาจมีราคาถูกกว่าก๊าซธรรมชาติ ซึ่งอาจทำนายได้ว่าในอนาคตเมทานอลจะมีบทบาทสำคัญมากในการนำไปผลิตอุตสาหกรรมด้านปิโตรเคมีและกระแสไฟฟ้า (Hatch and Matar, 1977) ซึ่งอาจแสดงแนวโน้มความต้องการเมทานอลในปี 2006 ที่ผ่านมามีได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การผลิตเมทานอลแต่ละภูมิภาคของโลก

ภูมิภาค	ปริมาณเมทานอล (พันล้านแกลลอนต่อปี)
ยุโรป	2,616
สหรัฐอเมริกา	1,805
ออสเตรเลีย/เอเชีย	900
แคนาดา/เม็กซิโก	837
เอเชียตะวันออกเฉียงใต้	733
อเมริกาใต้	713
ตะวันออกกลาง	628
แอฟริกา	266

ที่มา: <http://www.ethanol-gec.org>

4. เมทาโนโทรฟ (Methanotroph)

4.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อเมทาโนโทรฟ

เมทาโนโทรฟหรือเมทาโนโทรฟิเคแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่เรียกว่าเมทิลโอโทรฟ (Methylophs) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้อากาศและสามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอมเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน เช่น มีเทน เมทานอล

เมทิลเอไมด์ ฮาโลมีเทน ฟอร์เมท เป็นต้น (Anthony, 1982) โดยในปี ค.ศ. 1906 Sohgen *et al.* ได้แยกแบคทีเรียตัวแรกที่สามารถออกซิไดส์มีเทนในสภาวะที่มีอากาศ คือ *Bacillus methanicus*

4.2 การจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟ

ในปี 1970 Writternbury *et al.* ได้จำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟ ได้กว่า 100 ชนิด โดยอาศัยเกณฑ์การแบ่งหลายอย่าง ได้แก่ ลักษณะรูปร่างของเซลล์ (cell morphology) รูปแบบของระยะพัก (resting stages formed) ลักษณะโครงสร้างของเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมหรือการเรียงตัวของเมมเบรนชั้นใน (fine structure intracytoplasmic membrane) และลักษณะภายนอกทั่วไปของเซลล์ โดยสามารถแบ่งเชื้อเมทาโนโทรฟออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ เมทาโนโทรฟชนิด Type I ซึ่งมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งสั้นหรือเป็นทรงกลม ไม่สามารถเจริญได้ในที่ที่อุณหภูมิสูงถึง 45 °ซ เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมมีลักษณะการเรียงเป็นแผ่นซ้อนกันคล้ายจานหรือซ้อนตามแนวขวางของเซลล์ ระยะพักของเซลล์อยู่ในรูปซิสต์ (cyst) ได้แก่สายพันธุ์ *Methylomonas* spp. และ *Methylobacter* spp. ในขณะที่เมทาโนโทรฟชนิด Type II มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งคล้ายพระจันทร์เสี้ยวและมีบางเซลล์มีรูปร่างเป็นวงรี ไม่สามารถเจริญได้ในที่ที่อุณหภูมิสูงถึง 45 °ซ เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมมีลักษณะเป็นเยื่อหุ้ม 2 ชั้นขนานไปกับผนังเซลล์ ระยะพักของเซลล์อยู่ในรูปซิสต์ (cyst) และสปอร์ (spore) ได้แก่สายพันธุ์ *Methylosinus* spp. และ *Methylocystis* spp. และต่อมายังพบเมทาโนโทรฟสายพันธุ์ใหม่ คือ เมทาโนโทรฟ Type X เนื่องจากมีลักษณะบางประการคล้ายเมทาโนโทรฟ Type I มีลักษณะรูปร่างส่วนใหญ่เป็นทรงกลมและมักพบเป็นคู่ สามารถเจริญได้ในที่ที่อุณหภูมิสูงถึง 45 °ซ เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมมีลักษณะการเรียงเป็นแผ่นซ้อนกันคล้ายจานหรือซ้อนตามแนวขวางของเซลล์ ระยะพักของเซลล์อยู่ในรูปซิสต์ (cyst) อาศัยกระบวนการวิธียูเอ็มพีและวิธชีรินในการดูดซึมฟอสฟอรัสเข้าไปในเซลล์ ซึ่งสามารถสรุปการจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟได้ดังตารางที่ 4 ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตเอนไซม์ที่เรียกว่า มีเทนโมโนออกซิจีเนส (methane monooxygenase) หรือเอ็มเอ็มโอ (MMO) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการออกซิเดชันก๊าซมีเทนให้เปลี่ยนรูปเป็นเมทานอลและฟอสฟอรัสได้ตามลำดับ ซึ่งจะกล่าวในเป็นหัวข้อต่อไป

4.3 การตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟในสิ่งแวดล้อม

ในงานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับเชื้อเมทาโนโทรฟพบว่า สามารถตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟ ในธรรมชาติที่มีการปลดปล่อยก๊าซมีเทน ดังนั้นจึงสามารถพบเชื้อชนิดนี้ได้在地 เช่น แหล่งก๊าซธรรมชาติ ในนาข้าว พื้นที่ชุ่มน้ำ และน้ำดินของหลุมฝังกลบ (Whalen *et al.*, 1990) หรือแม้แต่ชั้นตะกอนในทะเลสาบ โดยในงานวิจัยที่ศึกษาแบคทีเรียเมทาโนโทรฟในน้ำดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยจริง เช่น Nozhevnikova *et al.* (1993) พบว่าในรัสเซียมีแบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟทั้ง 2 ไทป์ โดยเมทาโนโทรฟชนิด Type II มักพบในสภาพอากาศหนาวเย็น ส่วนงานวิจัยที่ศึกษาแบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟในน้ำดินกลบทับจำลอง เช่น เชื้อเมทาโนโทรฟ Type I สามารถเจริญได้ดีในบริเวณด้านบนของคอลัมน์ดิน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนต่ำในขณะที่เชื้อเมทาโนโทรฟ Type II นั้นสามารถเจริญได้ดีในบริเวณด้านล่างของคอลัมน์ดิน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนสูงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ แต่อย่างไรก็ตามการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยนั้นจะมีค่าลดลงตามระดับความลึกเนื่องด้วยข้อจำกัดทางด้านปริมาณออกซิเจน (Hanson and Hanson, 1996)

ตารางที่ 4 การจำแนกลักษณะเชื้อเมทาโนโทรฟแต่ละชนิด

Characteristics	Type I	Type II	Type X
Cell morphology	Short rod, usually occur singly; some cocci or ellipsoids	Crescent-shape rods, pear-shaped cells, sometimes occur in rosettes	Cocci, often found as pairs
Growth at 45°C	No	No	Yes
Membrane arrangement			
- Bundles of vesicular disks	Yes	No	Yes
-Paired membranes aligned	No	Yes	No
Nitrogen fixation	No	Yes	Yes
Resting Stages formed			
-Exospore	No	Some strains	No
-Cysts	Some strains	Some strains	Some strains
RuMP Pathway	Yes	No	Yes
Serine Pathway	No	Yes	Yes
Phylogenetic signature probe	1) 1041(5'-CTCCGCTATCTCTAACAGATT-3') 2) 1035(5'-GATTCTCTGGATGTCAAGGG-3') 3) MM650(5'-CCTCTACTCAACTCTAGT-3') 4) MM850(5'-TACGTTAGCTCCACCACTAA-3')	1034(5'-CCATACCGGACATGTCAAAGC-3')	Sometimes No specific probe has been testes

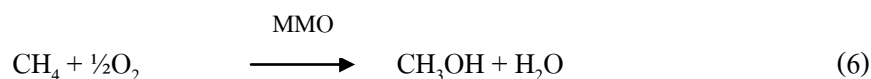
ที่มา: Bowman *et al.* (1993)

สำหรับความยากในการใช้เทคนิคพื้นฐานที่สืบทอดมาในการศึกษาระบบนิเวศของเชื้อเมทาโนโทรฟก็เคยได้รับการศึกษากันมาแล้วเนื่องจากเชื้อเมทาโนโทรฟเป็นเชื้อที่มีการเจริญเติบโตช้า (Murrell *et al.*, 1998) และมีแหล่งอาหารหรือแหล่งพลังงานที่จำกัด Malashenko *et al.* (2000) รายงานว่า สารจำพวกไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ ที่นอกเหนือจากมีเทนและพวกที่มีองค์ประกอบของธาตุหมู่ 7 หรือฮาโลเจนที่คล้ายๆกัน ก็จะไม่ถูกดูดซึม (เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน) โดยเมทาโนโทรฟ แต่อย่างไรก็ตามสารพวกนี้อาจถูกออกซิไดส์ได้ในสภาวะที่มีโคเมแทบอลิซึม (co-metabolism) เพราะ โคเมแทบอลิซึมซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ไม่ได้ให้พลังงานในการเจริญเติบโต ขณะเดียวกันเชื้อเมทาโนโทรฟเองก็สามารถเจริญเติบโตในเมทานอลได้เช่นกัน ได้แก่ สายพันธุ์ *Methylobomonas rubra* 15sh ส่วน *Methylococcus thermophilus* 111p เป็นสายพันธุ์ที่ไม่เจริญเติบโตบนเมทานอล ซึ่งทำให้ไม่เกิดการสูญเสียเมทานอลไปเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนแก่เซลล์ในภายหลังจากการผลิต (Malashenko *et al.*, 2000)

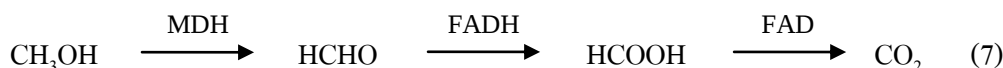
4.4 การผลิตเมทานอลจากมีเทนโดยเมทาโนโทรฟ

สำหรับกระบวนการเปลี่ยนมีเทนเป็นเมทานอลที่ใช้โดยตรงสำหรับการบำบัดก๊าซชีวภาพ ยังมีการศึกษาน้อย อย่างไรก็ตามการนำก๊าซชีวภาพจากกระบวนการบำบัดของเสียมาเป็นเมทานอลโดยแบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟมีความเป็นไปได้สูง ทั้งนี้เนื่องจากก๊าซชีวภาพยังมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นองค์ประกอบซึ่งจัดเป็นสารที่ยับยั้งตัวหนึ่งในสมการที่ 7 นอกจากนี้สภาพภูมิอากาศของประเทศไทยยังเอื้ออำนวยให้เชื้อชนิดนี้เจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากเชื้อเมทาโนโทรฟสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส (Hanson and Hanson, 1996) อีกทั้งได้มีการรายงานว่า เชื้อชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในหน้าดินหลุมฝังกลบจำลองในประเทศไทย (Visvanathan *et al.*, 1999; Chiemchaisri *et al.*, 2001) โดย Chiemchaisri *et al.* (2001) รายงานว่า *Methylobomonas methanica* (Type I) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในหน้าดินของหลุมฝังกลบมูลฝอยจำลองในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย

เนื่องจากในระหว่างการใช้มีเทนเป็นแหล่งพลังงานของเชื้อเมทาโนโทรฟ มีการเปลี่ยนรูปของมีเทนเป็นเมทานอลก่อน โดยเชื้อเมทาโนโทรฟจะใช้มีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในสภาวะที่มีออกซิเจนแล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นเมทานอลโดยอาศัยเอนไซม์มีเทนโมโนออกซิจิเนสหรือเอ็มเอ็มโอ (MMO) โดยแสดงสมการได้ดังนี้



อย่างไรก็ตามโดยธรรมชาติแล้วเมทานอลจะถูกใช้ต่อในเซลล์เมทาโนโทรฟโดยเปลี่ยนเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ ฟอร์มเมทและคาร์บอนไดออกไซด์ตามลำดับ



(หมายเหตุ MDH: methanol dehydrogenase; FADH: formaldehyde dehydrogenase; FAD: formate dehydrogenase)

จะเห็นว่าเอนไซม์ที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับเมทานอลคือ เอนไซม์มีเทนโมโนออกซิจิเนสและเมทานอลดีไฮโดรจิเนส (Anthony, 1986) โดยมีมีเทนโมโนออกซิจิเนสเป็นเอนไซม์ที่ออกซิไดส์มีเทนให้เป็นเมทานอลและเมทานอลดีไฮโดรจิเนสจะเปลี่ยนเมทานอลเป็นฟอร์มัลดีไฮด์

4.5 การใช้ประโยชน์อื่นๆ จากเชื้อเมทาโนโทรฟ

ในอดีตมีการศึกษาการผลิตเชื้อเมทาโนโทรฟจากก๊าซมีเทนเพื่อใช้ประโยชน์ในการเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากให้คุณค่าทางโปรตีนสูงและให้สารประกอบอื่นๆ ที่สำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เช่น กรดอะมิโน (L-gutamate, L-varine, L-alanine, L-serine, L-lysine) กรดอินทรีย์ (citric acid, fumaric acid, ketoglutanic acid) (Anthony, 1982; Higgins *et al.*, 1981; Kune *et al.*, 1976) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้ประโยชน์ของเชื้อเมทาโนโทรฟในการกำจัดสารพิษ เนื่องจากเอนไซม์เอ็มเอ็มไอสามารถออกซิไดส์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ได้ (Fogel *et al.*, 1986; Wilson and Wilson, 1987; Dolan and McCarty, 1995) นอกจากนี้ด้วยลักษณะสมบัติที่มีความสำคัญของเอนไซม์ MMO จึงมีศักยภาพที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านอุตสาหกรรม อีกทั้ง sMMO และ pMMO ยังสามารถย่อยสลายสารประกอบจำพวกฮาโลจิเนท (halogenated compound) ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในน้ำใต้ดินและในดินได้อีกด้วย (Dispirito *et al.*, 1992; Oldenhuis *et al.*, 1991)

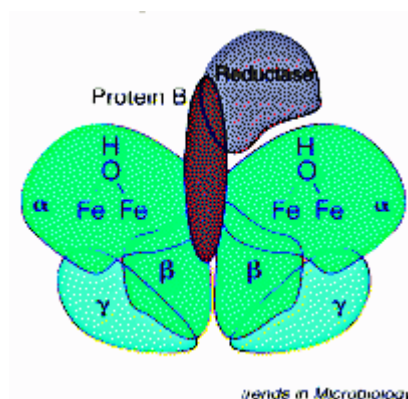
4.6 เอนไซม์ในการออกซิเดชันมีเทนในเมทาโนโทรฟ

เอนไซม์ที่สำคัญในการออกซิเดชันมีเทนในเมทาโนโทรฟมี 2 ชนิดคือ มีเทนโมโนออกซิจิเนสหรือเอ็มเอ็มโอ (MMO) และเมทานอลดีไฮโดรจีเนส (MDH)

เราสามารถแบ่งเอนไซม์มีเทนโมโนออกซิจิเนสหรือเอ็มเอ็มโอ MMO ออกเป็น 2 ชนิดด้วยกันคือ เอสเอ็มเอ็มโอ (soluble monooxygenase: sMMO) และพีเอ็มเอ็มโอ (particulate monooxygenase: pMMO) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

4.6.1 เอสเอ็มเอ็มโอ

เอสเอ็มเอ็มโอเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเมทาโนโทรฟบางสายพันธุ์เท่านั้น โดยจะพบในกลุ่มเมทาโนโทรฟชนิด Type II ได้แก่ *Methylosinus*, *Methylocystis* และเมทาโนโทรฟชนิด Type I ได้แก่ *Methylococcus* ในทุกสายพันธุ์และพบในบางสายพันธุ์ของเมทาโนโทรฟชนิด Type I ได้แก่ *Methylomonas*, *Methylomicrobium* (Murrell *et al.*, 2000) โดยโครงสร้างของเอสเอ็มเอ็มโอที่พบในสายพันธุ์เหล่านี้จะมีลักษณะคล้ายคลึงกันและเป็นเอนไซม์ที่ละลายอยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic enzyme complex) โดยมีส่วนประกอบหลัก 3 ส่วนคือ ส่วนไฮดรอกซีเลส (hydroxylase) ส่วนโปรตีน B และส่วนรีดักเตส (reductase) (ภาพที่ 2) โดยส่วนไฮดรอกซีเลสมีนี้น้ำหนักประมาณ 245 kDa. ประกอบไปด้วยเหล็กที่ไม่มีฮีม (nonheme iron) สามารถแบ่งออกเป็น 3 หน่วย คือ อัลฟา (α) เบต้า (β) และแกมมา (γ) ซึ่งส่วนไฮดรอกซีเลสเป็นส่วนเร่งของเอนไซม์ (active site) สำหรับส่วนโปรตีน B เป็นโปรตีนที่ไม่มีสีจับกับส่วนไฮดรอกซีเลส มีน้ำหนัก 15 kDa. ซึ่งส่วนนี้จะไม่เกิดปฏิกิริยาโมโนออกซิจิเนส และในส่วนรีดักเตส มีน้ำหนัก 38.4 kDa. ประกอบด้วยฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (flavin adenine dinucleotide: FAD) และนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (dinicotinamind adenine dinucleotide: NADH) โดย FAD จะประกอบด้วยรีดักเตส ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจาก NADH_2 และส่งผ่านไปยังบริเวณ di-iron ของไฮดรอกซีเลสซึ่งเป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์ (Murrell *et al.*, 2000)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของเอสเอ็มเอ็มโอ

ที่มา: Murrell *et al.* (2000)

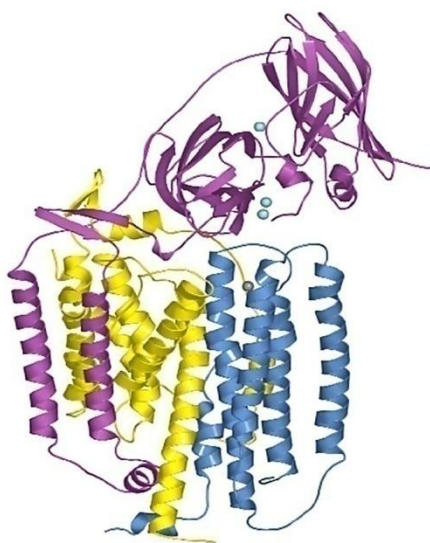
โดยการแสดงออกของเอสเอ็มเอ็มโอจะเกิดขึ้นเมื่อมีอัตราส่วนคอปเปอร์ต่อชีวมวลในอาหาร (Copper-to-biomass ratio) ในระดับต่ำ (low copper growth condition) คือมีคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) น้อยกว่า 0.89 ไมโครโมลาร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม ดังนั้นถ้าระดับของคอปเปอร์ต่อชีวมวลในอาหารสูงจะสามารถยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้ได้ (Hanson and Hanson, 1996)

เอสเอ็มเอ็มโอมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่หลากหลาย โดยในเมทาโนโทรฟบางชนิดที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคอปเปอร์ในระดับต่ำและมีการเติมแนฟทาลิน เอสเอ็มเอ็มโอจะสามารถเปลี่ยนแนฟทาลินเป็น 1,2-แนฟทาลินได้ (Hanson and Hanson, 1996; Murrell *et al.*, 2000)

4.6.2 พิเอ็มเอ็มโอ

พิเอ็มเอ็มโอเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเมทาโนโทรฟทุกสายพันธุ์ โดยพิเอ็มเอ็มโอจะเกาะติดที่ภายในเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (Murrell *et al.*, 2000) และจะแสดงออกเมื่ออัตราส่วนคอปเปอร์ต่อชีวมวลในอาหารสูง คือมากกว่า 0.85-1 ไมโครโมลาร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม แต่ไม่เกิน 20 ไมโครโมลาร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม (Hanson and Hanson, 1996) ซึ่งอาจชี้ให้เห็นว่าปริมาณ คอปเปอร์สามารถกำหนดหรือคัดเลือกสายพันธุ์ได้ Fox *et al.* (1990)

รายงานว่ *Methylosinus trichosporium* OB3b เป็นเมทาโนโทรฟสายพันธุ์ที่มีเอ็มเอ็มโอทั้ง 2 รูป เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเอ็นเอ็มเอส (nitrate mineral salt: NMS) โดยมีการเติมคอปเปอร์ ไอออนในอาหาร 5 ไมโครโมลาร์ จะมีการผลิตพีเอ็มเอ็มโอเพียงชนิดเดียว และเนื่องจากพีเอ็มเอ็มโอเป็นเอนไซม์ที่เกาะติดกับเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมทำให้ในปัจจุบันยังไม่สามารถสกัดให้บริสุทธิ์ได้เหมือนเอสเอ็มเอ็มโอ (Hanson and Hanson, 1996) ส่วนประกอบและโครงสร้างของพีเอ็มเอ็มโอยังไม่ทราบชัดเจน แต่จากการศึกษาพีเอ็มเอ็มโอจาก *M.capsulatus* (Bath) พบว่า พีเอ็มเอ็มโอประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีน 3 หน่วย (ภาพที่ 3) มีน้ำหนัก 45, 27 และ 23 kDa. ซึ่งบริเวณที่จับกันระหว่างหน่วยย่อยที่มีน้ำหนัก 45 และ 27 kDa. คาดว่าจะเป็นบริเวณเร่งพีเอ็มเอ็มโอมีความจำเพาะต่อสับสเตรตบางชนิดเท่านั้นและไม่สามารถออกซิไดส์เนฟทาลินได้

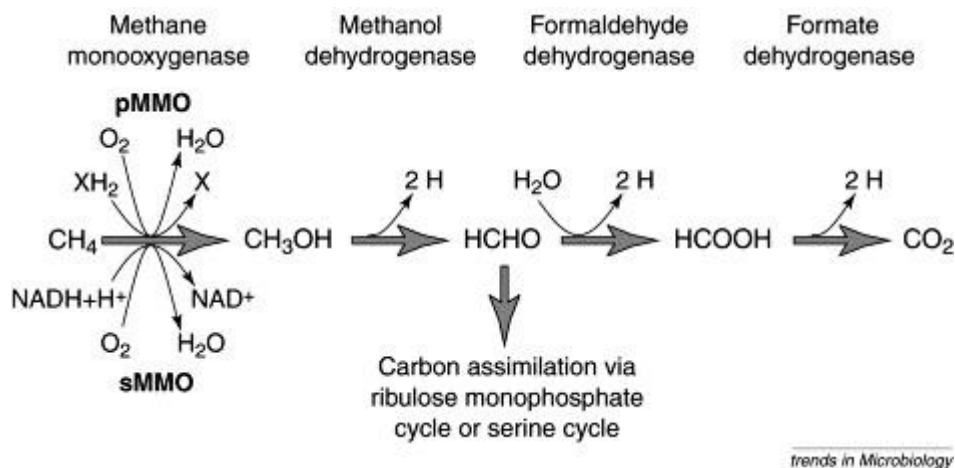


ภาพที่ 3 โครงสร้างของพีเอ็มเอ็มโอ

ที่มา: Murrell *et al.* (2000)

เมทาโนโทรฟที่มีการใช้พีเอ็มเอ็มโอออกซิไดส์มีเทนเป็นเมทานอลจะมีการเจริญที่สูงกว่าเมทาโนโทรฟที่มีการใช้เอสเอ็มเอ็มโอเนื่องจากปฏิกิริยาคะตะไลต์ของเอสเอ็มเอ็มโอต้องใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (ภาพที่ 4) การที่เอสเอ็มเอ็มโอใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้ส่วนมากจะพบว่า NAD^+ ซึ่งมีอยู่อย่างจำกัดเป็นตัวกำหนดการเจริญเติบโต

(Limiting growth) ของเมทาโนโทรฟ ในขณะที่พีเอ็มเอ็มไอใช้สารซึ่งมีศักย์ไฟฟ้าสูงเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Murrell *et al.*, 2000)

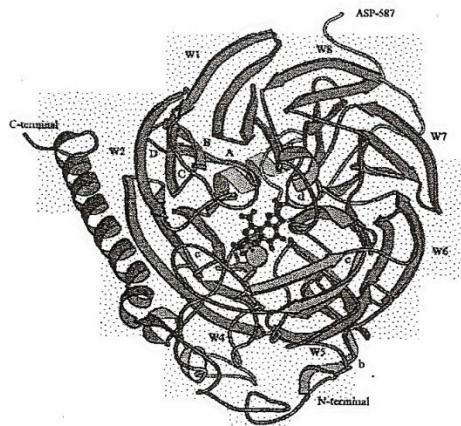


ภาพที่ 4 การย่อยสลายมีเทนเป็นเมทานอลด้วย pMMO และ sMMO

ที่มา: Murrell *et al.* (2000)

4.6.3 เมทานอลดีไฮโดรจิเนส

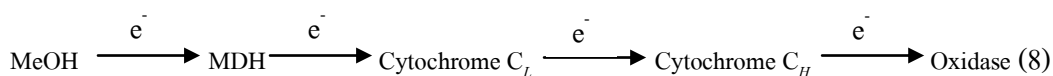
ในแบคทีเรียเมทิลโอโทรฟจะออกซิไดส์เมทานอลเป็นฟอร์มัลดีไฮด์โดยเอนไซม์ที่มีชื่อว่าเมทานอลดีไฮโดรจิเนสหรือเอ็มดีเอช (methanol dehydrogenase: MDH) โครงสร้างของเอ็มดีเอชประกอบด้วย $\gamma_2\beta_2$ น้ำหนักรวมประมาณ 150 kDa. (Reddy and Bruice, 2004) โดยมีหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (α) มีน้ำหนักประมาณ 60-67 kDa. (ภาพที่ 5) โดยหน่วยใหญ่แต่ละหน่วยประกอบด้วยโคเอ็นไซม์ไพโรโลควิโนลีนควินินหรือพีคิวควิ (pyrroloquinoline quinone: PQQ) 1 โมเลกุล และแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ส่วนหน่วยย่อยขนาดเล็ก (β) มีขนาด 8.5 kDa. บริเวณเร่งของเอนไซม์คือบริเวณที่ Ca^{2+} จับกับโคเอ็นไซม์พีคิวควิ (Anthony and Williams, 2003)



ภาพที่ 5 โครงสร้างหน่วยย่อยของเอ็มดีเอส

ที่มา: Anthony and Williams (2003)

การเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนจากเมทานอลจะเริ่มจากการส่งผ่านไปยังเอ็มดีเอส และไซโตโครม C_L (Cytochrome C_L) หลังจากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านไปยังไซโตโครม C_H (Cytochrome C_H) และสิ้นสุดที่ออกซิเดส (Oxydase) ดังแสดงในสมการที่ 8 (Dales and Anthony, 1995)



4.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟ

4.7.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ของ จุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมีความสำคัญต่อจุลินทรีย์แต่ละชนิด อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิสูงมักมีผลต่อจุลินทรีย์มากกว่าอุณหภูมิต่ำ มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาผลของอุณหภูมิในดิน ต่อแบคทีเรียเมทาโนโทรฟ Boeckx and Cleemput (1996) ได้รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับการเกิดมีเทนออกซิเดชัน คือ 25-30 °ซ Visvanathan *et al.* (1999) ได้รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเกิดมีเทนออกซิเดชัน คือ 30-36 °ซ ในขณะที่ทีมวิจัยของบริษัท Osaka gas

รายงานถึงการผลิตเมทานอลจากจุลินทรีย์สามารถทำได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลด้วยเมทาโนโทรฟเป็นอุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเมทาโนโทรฟนั้น

4.7.2 ชนิดและปริมาณของเมทาโนโทรฟ

ได้มีรายงานการใช้เมทาโนโทรฟสายพันธุ์ต่างๆ หลากหลายชนิดในการผลิตสารอินทรีย์และกำจัดสารปนเปื้อนต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม เช่น การผลิตเมทิลโลคีโตน (Methylokete) จาก *Methylococcus capsulatus* (Texas strain) *Methylosinus* sp. (CRL-15) และ *Methylobacterium* sp. (CRL-26) (Patel *et al.*, 1980) การย่อยสลายสารคลอรีนเตทธีเทน ด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟผสม (Fogel *et al.*, 1986) การบำบัดสารไตรคลอโรเอทิลีนในดิน (Wilson and Wilson, 1987) เป็นต้น แต่สำหรับการผลิตเมทานอลจากเมทาโนโทรฟในปัจจุบันยังมีรายงานการใช้เชื้อบริสุทธิ์ *Methylosinus trichosporium* เป็นส่วนใหญ่ (Furuto *et al.*, 1999; Sugimori *et al.*, 1995) มีการศึกษาเล็กน้อยที่ใช้เชื้อเมทาโนโทรฟผสมในการผลิตเมทานอล (สยามมล, 2551)

การผลิตสารด้วยเชื้อบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว (pure culture) สามารถควบคุมกระบวนการ เมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ได้ง่าย ผลผลิตที่ได้ออกมา (yield) จึงมีความแปรปรวนต่ำ แต่ต้องควบคุมให้อยู่ในสถานะที่ไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น เนื่องจากเมื่อมีการปนเปื้อนเชื้อบริสุทธิ์อาจไม่สามารถแข่งขันกับเชื้อชนิดอื่นได้ ในขณะที่การใช้เชื้อแบบผสมไม่ต้องการควบคุมเรื่องการปนเปื้อนมากนัก โดยเชื้อผสมสามารถอยู่ในระบบการผลิตแบบต่อเนื่องได้ยาวนานกว่า (คุชฎี, 2546)

4.7.3 องค์ประกอบของก๊าซในบรรยากาศ

ยังไม่มีรายงานอัตราส่วนมีเทนบริสุทธิ์ต่อก๊าซในบรรยากาศที่เหมาะสม แต่นิยมใช้ปริมาณมีเทนเริ่มต้นในการผลิตเมทานอลแบบเป็นครั้งอยู่ระหว่างร้อยละ 10-30 (Yu *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของก๊าซในบรรยากาศมีความสำคัญต่อการผลิตเมทานอลของ เมทาโนโทรฟ Xin *et al.* (2004) ได้รายงานปริมาณอัตราส่วนของก๊าซแต่ละชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลโดยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b ที่อยู่ใน

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 โดยไม่มีสารยับยั้งเมทานอล ดีไฮโดรจีเนส คือ มีเทนร้อยละ 20 ออกซิเจนร้อยละ 20 ไนโตรเจนร้อยละ 20 และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 40 ในระบบการผลิตแบบต่อเนื่อง โดยคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการเมแทบอลิซึมของ เมทาโนโทรฟนั้นยับยั้งการออกซิเดชันของเมทานอลได้

นอกจากนี้ Amaral and Knowles (1994) ได้ทำการศึกษาเชื้อเมทาโนโทรฟ โดยใช้ diffusion column พบว่า ปริมาณมีเทนที่เติมเข้าไปในคอลัมน์ส่งผลให้บริเวณด้านบนของคอลัมน์หรือบริเวณผิวของเหลวที่มีปริมาณก๊าซมีเทนต่ำกว่า มีเชื้อเมทาโนโทรฟ Type I เจริญเติบโตให้เห็นเด่นชัดเป็นส่วนใหญ่ ส่วนบริเวณด้านล่างของคอลัมน์จะมีปริมาณมีเทนสูงกว่า จึงมีเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II เจริญเติบโตให้เห็นเด่นชัดมากกว่า อีกทั้งยังเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน (denitrification) ในส่วนล่างของคอลัมน์ด้วยเนื่องจากการเติมเอ็นเอ็มเอสโดยที่ปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอ จึงเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเกิดขึ้น

4.7.4 ความเป็นกรดค้างหรือค่าพีเอช (pH)

ความเป็นกรดค้างมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเมทาโนโทรฟ โดยปกติเมทาโนโทรฟสามารถเจริญได้ดีที่สภาพพีเอชเป็นกลาง แต่เมทาโนโทรฟบางสายพันธุ์ เช่น *Methylocella palustris* และ *Methylocapsa acidiphila* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในพื้นที่ที่มีความเป็นกรด โดยสามารถเจริญได้ที่ค่าพีเอชระหว่าง 5.5-6.7 (Dedysh *et al.*, 2003) สำหรับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทานอลของเมทาโนโทรฟควรเป็นกลาง (Yu *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2004)

4.7.5 สารกระตุ้นมีเทนโมโนออกซิจิเนสหรือเอ็มเอ็มโอ (MMO)

เนื่องจากเอ็มเอ็มโอแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ เอ็มเอ็มโอและพีเอ็มเอ็มโอ ซึ่งการแสดงออกของทั้ง 2 ชนิด ขึ้นอยู่กับปริมาณของคอปเปอร์ไอออนและชนิดของเมทาโนโทรฟ โดยถ้าต้องการให้เอ็มเอ็มโอชนิดใดทำงานหรือแสดงออกจะต้องควบคุมปริมาณของคอปเปอร์ไอออนในอาหารให้เหมาะสม อย่างไรก็ตามการผลิตเมทานอลโดยเซลล์ของ *Methylosinus*

trichosporium OB3b จะเติมคอปเปอร์ไอออนในระดับที่มากเพียงพอเพื่อกระตุ้นการทำงานของพีเอ็มเอ็มโอ (5 ไมโครโมลาร์) (Furuto *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004) แต่ในการผลิตเอ็มเอ็มโอเพื่อสกัดออกมาใช้ภายนอกเซลล์จะไม่เติมคอปเปอร์ไอออนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Park *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2004)

4.7.6 สารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสหรือเอ็มดีเอช (MDH)

การผลิตเมทานอลจากมีเทนโดยใช้เซลล์เมทาโนโทรฟมีความจำเป็นที่ต้องยับยั้งการทำงานของเอ็มดีเอช มีรายงานการใช้สารยับยั้งเอ็มดีเอชหลายชนิด ได้แก่ ไดไทโอไตรอิทอล (dithiotriothietol) ฟีนิวไฮดราซีน (phenylhydrazine) สารจับโลหะ (metal chelating agent) ไอโอไอโคอะซิเตท (iodoacetate) ไซโคลโพรเพน (cyclopropane) และสารละลายที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟตสูง (Anthony, 1986; Carver *et al.*, 1984; Frank *et al.*, 1989; Shimoda and Okura, 1991) จากการหาสารยับยั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต่อเนื่องในการย่อยสลายเมทานอลเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ ฟอร์มเมทและคาร์บอนไดออกไซด์ โดย Noriyuki *et al.* (2002) พบว่าการใช้แลคเตท (lactate) และอะซิเตท (acetate) ช่วยยับยั้งปฏิกิริยาต่อเนื่องดังกล่าวในการผลิตเมทานอลของเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b และจากงานวิจัยของ Furuto *et al.* (1999) และ Sugimori *et al.* (1995) ยังพบอีกด้วยว่าสารไฮโดรโพรพานอลเองก็สามารถยับยั้งปฏิกิริยาดังกล่าวได้เช่นกันโดยการผลิตเมทานอลจากเชื้อชนิดเดียวกัน ทำให้เอนไซม์เมทานอลดีไฮโดรจีเนส (MDH) ไม่สามารถคืนสภาพได้ เมทานอลที่ถูกผลิตขึ้นจึงไม่เกิดการย่อยสลายต่อไปเป็นสารอื่น แต่จะสะสมอยู่ภายนอกเซลล์นั่นเอง ขณะเดียวกันเมทานอลที่สะสมตัวอยู่ภายนอกเซลล์เมื่อมีความเข้มข้นถึงระดับหนึ่ง (4×10^{-5} - 5×10^{-5} mol/L) ก็จะไปยับยั้งการผลิตเมทานอลของเซลล์เมทาโนโทรฟในภายหลัง ทำให้อัตราการผลิตเมทานอลเมื่อเวลาผ่านไปมีค่าลดลงในที่สุด

นอกจากนี้ Furuto *et al.* (1999) ได้รายงานการใช้ไซโคลโพรพานอล (cyclopropanol) เป็นสารยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส พบว่าไซโคลโพรพานอลจะเข้าไปจับกับฟิควิวซึ่งเป็นโคเอนไซม์ของเมทานอลดีไฮโดรจีเนสทำให้เมทานอลดีไฮโดรจีเนสไม่สามารถทำงานได้ และในการผลิตเมทานอลในระบบกึ่งต่อเนื่อง (semicontinuous) ด้วยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 12.9 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ซึ่งมีไฮเดียมฟอร์มเมทไซโคลโพรพานอล 14.3 มิลลิโมลาร์ โดยทำการผลิตเมทานอล 5 ครั้งในระยะเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าอัตราการผลิตเท่ากับ 3.17 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมงต่อน้ำหนัก

แห้งของเซลล์ อย่างไรก็ตามไซโคลโพรพานอลเป็นสารที่ยากต่อการสังเคราะห์และการรักษาความเสถียรในสภาวะที่มีอากาศและเนื่องจากกรดอะมิโนไลซีน (lysyl residues) ซึ่งอยู่บนผิวของเมทานอลดีไฮโดรจีเนสกับหมู่คาร์บอกซิเลต (carboxylate) บนผิวของ cytochrome C_L เชื่อมต่อกันด้วยแรงไอออนิก (ionic interactions) Cox *et al.* (1992) พบว่าสารที่มีแรงไอออนิกสูง (high ionic strength) ได้แก่ สารละลายเกลือซึ่งสามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนระหว่างเมทานอลดีไฮโดรจีเนสและ cytochrome C_L ทำให้เมทานอลดีไฮโดรจีเนสไม่สามารถทำงานได้ Lee *et al.* (2004) ได้รายงานการใช้ไซเคียมคลอไรด์ในการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนส พบว่าไซเคียมคลอไรด์สามารถยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสมที่จะนำมาใช้มากกว่าไซโคลโพรพานอล (cyclopropanol) เนื่องจากรักษาได้ง่าย มีความเสถียรและราคาถูกกว่ามาก สภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตเมทานอลโดยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b คือความเข้มข้นของไซเคียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.6 มิลลิกรัมของเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตรใน 12.9 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 7 โดยมีไซเคียมฟอสเฟตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 °C อัตราส่วนมีเทนต่ออากาศเริ่มต้นเท่ากับ 1:4 นอกจากนี้มีการรายงานถึงการใช้เกลือชนิดอื่นๆ ในการยับยั้งเมทานอลดีไฮโดรจีเนสในการผลิตเมทานอล ได้แก่ แมกนีเซียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์และโพแทสเซียมคลอไรด์ (สยามมล, 2551)

4.7.7 สารส่งเสริมการเจริญชนิดอื่นๆ

Xing *et al.* (2006) ได้รายงานการใช้สารอินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ ไบโอฟลาวิน กรดฟอลิก เตตราไฮโดรฟูราน ไกลซีน ไทโรซีน ซิสเทอีน มาเลท ซัคซินเนท มาลีเอท ซิเตรทและไพรูเวท ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอสเพื่อเลี้ยงเซลล์ *Methylosinus trichosporium* OB3b พบว่าสารอินทรีย์เหล่านี้จะช่วยเพิ่มเมแทบอลิซึมในวัฏจักรเครป ทำให้เซลล์มีจำนวนสูงขึ้นในสภาวะที่มีมีเทนและในสภาวะที่ไม่มีมีเทนนั้นเมทาโนโทรฟจะไม่สามารถใช้สารอินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยซิเตรทเป็นสารที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมคือ 0.015 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร การใส่สารส่งเสริมการเจริญเหล่านี้ในอาหารมีผลทำให้ปริมาณเมทานอลที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์สูงขึ้น

5. ถังปฏิริยาชีวภาพ (Bioreactor)

ถังปฏิริยาทางชีวภาพ อาจหมายถึง วิธีการต่างๆ หรือระบบที่สามารถรองรับการดำเนินไปทางชีวภาพที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ โดยถังปฏิริยาอาจมีลักษณะเป็นถังที่สามารถทำให้เกิดกระบวนการทางเคมีซึ่งรวมทั้งสิ่งมีชีวิตหรือสารที่ทำให้เกิดปฏิริยาชีวเคมีซึ่งได้มาจากสิ่งมีชีวิต กระบวนการเหล่านี้อาจเป็นแบบมีอากาศหรือแบบไร้อากาศอย่างใดอย่างหนึ่งก็ได้ โดยทั่วไปแล้วถังปฏิริยาทางชีวภาพมักจะมีลักษณะเป็นทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาดเป็นลิตรจนถึงขนาดเป็นหลายลูกบาศก์เมตร และส่วนใหญ่มักทำจากสแตนเลสสตีล หรืออาจหมายถึงวิธีการหรือระบบที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อภายในสภาพแวดล้อมของเซลล์นั้นเจริญเติบโต โดยวิธีการนี้กำลังได้รับการพัฒนาไปใช้ในวิศวกรรมสาขาด้านเนื้อเยื่อ แต่ถ้ามองบนพื้นฐานของการเดินระบบ ถังปฏิริยาทางชีวภาพสามารถแยกออกเป็นแบบที่ละเท (batch) และแบบต่อเนื่อง (fed batch หรือ continuous เช่น แบบ continuous stirred tank reactor: CSTR) (Wikipedia, 2007)

โดยปกติถังปฏิริยาที่ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียอาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือถังปฏิริยาแบบที่ละเท (batch) ซึ่งจะไม่มีการไหลของน้ำเข้าและออกจากถังปฏิริยาอย่างต่อเนื่อง โดยทั่วไปจะมีการกวนผสม และถังปฏิริยาแบบต่อเนื่อง (continuous flow) จะมีการไหลของน้ำเข้าและออกจากถังปฏิริยาอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีโอกาสที่จะดำเนินระบบจนสามารถเข้าสู่สภาวะคงตัว (steady state) ได้ ถังปฏิริยาประเภทหลังนี้ ในการเดินระบบเมื่อทำการเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ลงไปแล้ว จะทำการเติมน้ำเสีย เติมหาตุอาหารเสริมและเติมอากาศลงไปในถังปฏิริยาอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา ทำให้ระบบสามารถทำงานได้ตลอดเวลาไม่ขาดตอน และไม่ต้องทำการ start up ระบบบ่อยๆ จึงร่นระยะเวลาในช่วง lag phase ของจุลินทรีย์ลงไปได้ (สุเทพ, 2549)

เพราะฉะนั้น โดยทั่วไปค่าแรงงานคนที่ใช้ในการเดินระบบแบบต่อเนื่องที่มีขนาดใหญ่จะมีค่าต่ำกว่าแบบที่ละเท โรงงานขนาดใหญ่จึงนิยมเลือกแบบต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามความยุ่งยากในการควบคุมระบบที่ต้องการของกระบวนการแบบต่อเนื่องจึงทำให้ต้นทุนของโรงงานสูงกว่าการดำเนินงานแบบที่ละเทด้วยขนาดที่เท่ากัน ดังนั้นตัวเลือกสุดท้ายที่ใช้ในการเลือกรูปแบบของการดำเนินงานก็คือ ต้นทุนต่อค่าแรงงาน มีโรงงานหลายประเภทที่ใช้การทำงานร่วมกันทั้งแบบที่ละเท และแบบต่อเนื่อง เช่น ถังปฏิริยาแบบกึ่งที่ละเท เป็นรูปแบบหนึ่งของถัง

ปฏิกิริยาแบบที่ละเท จะถูกนำมาใช้ในเฉพาะสำหรับกระบวนการที่วัตถุดิบตอนเริ่มต้นทำปฏิกิริยากันมากๆ สารตั้งต้นเพียงชนิดเดียวรวมกับตัวทำละลายถ้าต้องการ ซึ่งจะเกิดขึ้นในตอนเริ่มต้นในถึงปฏิกิริยา ณ จุดเริ่มต้นที่เกิดปฏิกิริยา สารตั้งต้นตัวอื่นๆจะค่อยๆถูกเติม ขณะที่การกวนและการควบคุมอุณหภูมิจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยการควบคุมอัตราการเติมสารตั้งต้นตัวหนึ่งในที่นี้ โดยอุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยาของสารที่ผสมจะเท่ากันตลอดที่เกิดปฏิกิริยา (Hocking, 1998)

ในการออกแบบถึงปฏิกิริยาแบบชีวภาพเป็นงานด้านวิศวกรรมที่ยุ่งยากและสลับซับซ้อน ภายใต้อาหารที่เหมาะสม จุลินทรีย์หรือเซลล์จะต้องสามารถดำรงชีวิตและทำหน้าที่ให้ได้เต็ม 100 % สภาพแวดล้อมของถึงปฏิกิริยาแบบชีวภาพอย่างเช่นก๊าซ (อากาศ ออกซิเจน ไนโตรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์) อัตราการไหล อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดค่าระดับออกซิเจนที่ละลายน้ำและอัตราในการหมุนเวียนจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องได้รับการตรวจสอบและควบคุมอย่างใกล้ชิด ผู้ผลิตถึงปฏิกิริยาแบบชีวภาพในงานด้านอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จึงใช้ท่อ เซนเซอร์และระบบควบคุมเชื่อมต่อเข้าด้วยกัน การอุดตัน (fouling) ซึ่งเกิดจากเกาะของคราบหรือเมือกจุลินทรีย์ สามารถส่งผลเสียต่อการหยุดชะงักและประสิทธิภาพของถึงปฏิกิริยาแบบชีวภาพได้ โดยเฉพาะเมื่อกล่าวถึงอุปกรณ์แลกเปลี่ยนความร้อน เพื่อหลีกเลี่ยงสถานะเช่นนี้ ถึงปฏิกิริยาแบบชีวภาพควรถูกออกแบบให้ง่ายต่อการทำความสะอาดและระบายน้ำเท่าที่จะเป็นไปได้ (ดังนั้นจึงนิยมออกแบบเป็นรูปทรงกลม) อุปกรณ์แลกเปลี่ยนความร้อนเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อรักษากระบวนการทางชีวภาพในขณะที่อุณหภูมิคงที่ ซึ่งกระบวนการหมักทางชีวภาพเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดความร้อน ดังนั้นในถึงปฏิกิริยาแบบชีวภาพโดยส่วนใหญ่จึงมีอุปกรณ์ทำความเย็นอยู่ด้วย ซึ่งทำให้เปลือกที่หุ้มอยู่ด้านนอกเย็นหรือท่อที่มีขนาดใหญ่หลายๆเย็นด้วยคอยล์ที่อยู่ภายใน (Hocking, 1998)

ในกระบวนการทางชีวภาพแบบมีอากาศ การถ่ายเทออกซิเจนที่เหมาะสมส่วนใหญ่จะเป็นไปได้ยากที่จะสำเร็จดูแล้ว เพราะออกซิเจนมีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อยมาก แม้แต่ในถึงปฏิกิริยาแบบชีวภาพที่มีอาหารและแม้แต่ในอากาศ ออกซิเจนก็ยังละลายได้แค่ 20.8% อัตราการละลายของออกซิเจนจะเพิ่มมากขึ้นถ้าเราเพิ่มความปั่นป่วนในการสัมผัสซึ่งจำเป็นที่จะต้องทำการกวนผสมธาตุอาหารต่างๆและเก็บให้อยู่ในรูปการหมักที่เป็นเนื้อเดียวกันสม่ำเสมอ อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดของความเร็วในการปั่นป่วนเนื่องจากต้องใช้พลังงานสูงและอาจเกิดความอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตได้ ถึงปฏิกิริยาแบบชีวภาพในด้านอุตสาหกรรมจะถูกใช้

ในการเลี้ยงแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตต่างๆชนิดอื่นซึ่งสามารถทนต่อแรงความดันป่วนได้ และง่ายต่อการดำรงชีพ ต้องการเพียงสารละลายที่มีธาตุอาหารง่ายๆและสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว (Wikipedia, 2007)

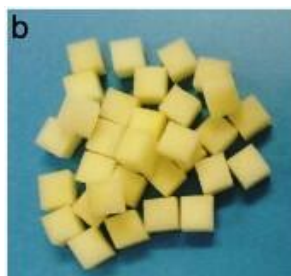
6. การเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย

การเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตในถังปฏิกรณ์ทางชีวภาพอาจเป็นแบบแขวนลอยหรือถูกตรึงไว้ก็ได้ โดยเซลล์ที่ถูกตรึงไว้แบบง่ายที่สุดคือการตรึงเซลล์บนจานเพาะเชื้อด้วยอาหารแข็ง ส่วนการตรึงเซลล์บนสเกลที่ใหญ่ขึ้นได้แก่ แบบตัวกลางเคลื่อนที่ (moving media) แบบบรรจุเป็นชั้นตัวกลาง (packed bed) แบบชั้นตัวกลางที่เป็นเส้นใย (fibrous bed) และแบบเยื่อกรองเมมเบรน (membrane) (Wikipedia, 2007)

อาจแบ่งการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่บรรจุอยู่ในถังปฏิกรณ์ได้ 2 แบบคือ การเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญเติบโตแบบแขวนลอย (suspended growth) โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ ไม่ถูกจำกัด และไม่ได้เกาะติดอยู่กับตัวกลางภายในถังปฏิกรณ์และการเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญเติบโตแบบเกาะติด (attached growth) โดยจุลินทรีย์สามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบได้ โดยจับยึดอยู่กับตัวกลางที่เติมเข้าไปในถังปฏิกรณ์ ตัวกลางที่ใช้มีหลายชนิด เช่น เม็ดพลาสติก ฟองน้ำ หิน เป็นต้น ส่วนใหญ่จะเป็นตัวกลางขนาดเล็กๆ หลายอันบรรจุอยู่ภายใน ซึ่งช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสให้จุลินทรีย์มาเกาะได้มากกว่าที่จะเป็นตัวกลางขนาดใหญ่เพียงอันเดียว ระบบบำบัดน้ำเสียแบบชีวภาพที่มีการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเกาะติด เช่น ระบบโปรยกรอง (tricking filter: TF) หรือระบบจานหมุนชีวภาพ (rotating biological contactors: RBC) Xin *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาการผลิตเมทานอลจากการกักขังแก๊สและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอาศัยการสังเคราะห์เมทานอลโดยใช้เชื้อเมทาโนโทรฟ พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่ทำการศึกษาเมื่อเทียบกับต่อกระบวนการผลิตเมทานอล ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อแบบเกาะติดจึงเป็นการควบคุมความเข้มข้นของเชื้ออีกทางหนึ่ง ที่จะทำให้เซลล์เริ่มต้นในถังปฏิกรณ์มีค่าใกล้เคียงกัน ทำให้สามารถเปรียบเทียบปริมาณเมทานอลที่ถูกผลิตขึ้นมาได้ แต่ทั้งนี้การเพิ่มปริมาณเชื้อในระบบให้มากไม่ได้หมายความว่าอัตราการผลิตเมทานอลจะสูงขึ้นเสมอไป เพราะปัจจัยอื่นที่เป็นข้อจำกัดก็มีคือ ความสามารถในการละลายน้ำที่ต่ำของแก๊สมีเทน

7. ตัวกลาง (Media)

ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญเติบโตแบบเกาะติดภายในถังปฏิกริยาหรือระบบบำบัดน้ำเสีย จำเป็นต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของตัวกลางด้วย เพราะระบบบำบัดน้ำเสียแบบชีวภาพแต่ละประเภทที่มีการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเกาะติด ก็ใช้ตัวกลางที่ไม่เหมือนกัน ไม่ว่าจะเป็นระบบโปรยกรองหรือระบบจานหมุนชีวภาพ เพราะฉะนั้นคุณสมบัติที่ดีของตัวกลางที่ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพให้จุลินทรีย์สามารถทำงานได้อย่างเต็มที่คือ ตัวกลางควรมีพื้นที่ผิวสัมผัสมาก เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถเกาะได้มากที่สุด ตัวกลางไม่ควรมีความลื่นเพราะจุลินทรีย์จะเกาะได้ยาก ทนทานต่อการย่อยสลายตามธรรมชาติ ไม่มีองค์ประกอบที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ในระบบที่ทำการศึกษา ตัวกลางที่นิยมใช้ เช่น เม็ดพลาสติกทรงกลมขนาดเล็กทำจากปัด ฟองน้ำ เส้นใย เป็นต้น จากการศึกษาของ Chae *et al.* (2008) มีการใช้ตัวกลางชนิดฟองน้ำสำหรับวิเคราะห์การดำรงชีวิตของไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (nitrifying bacteria) ที่เกาะอยู่บนตัวกลาง (ภาพที่ 6)

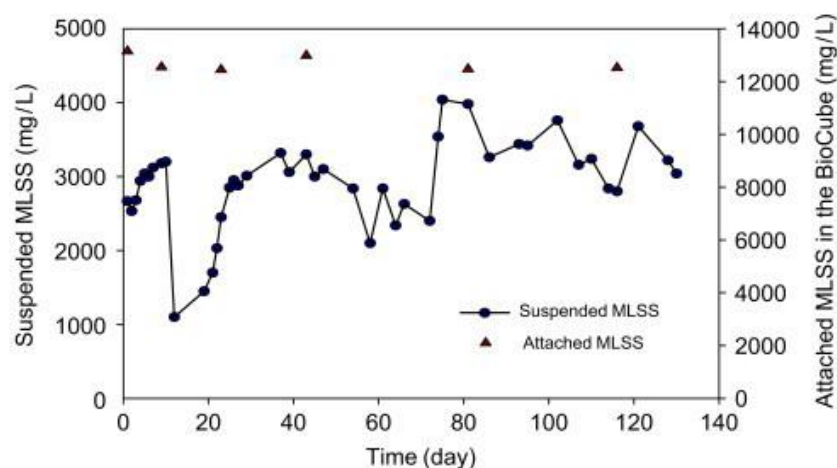


ภาพที่ 6 ตัวกลางชนิดฟองน้ำ

ที่มา: Chae *et al.* (2008)

โดยเลือกใช้ตัวกลางที่เป็นฟองน้ำรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์มีขนาด 15x15x15 มิลลิเมตร เดิมลงไปในถังเดิมอากาศ 30% โดยปริมาตรเพื่อเป็นการเพิ่มอัตราการออกซิไดส์สารอินทรีย์ให้มากขึ้น โดยที่ฟองน้ำ 1 ชิ้นจะมีพื้นที่ที่เป็นรูพรุนมากกว่า 95 % ทำให้มีพื้นที่ผิวมากพอที่จุลินทรีย์จะสามารถเกาะติดอยู่ได้ และมีรูพรุนอยู่ในช่วง 25-40 รูต่อนิ้ว โดยมีค่าความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) ใกล้เคียง 1 นอกจากนี้จากงานวิจัยดังกล่าวยังพบอีกว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อแบบแขวนลอยกับการเลี้ยงเชื้อแบบเกาะติด เป็นระยะเวลากว่า 100 วันพบว่า เชื้อที่เลี้ยงแบบแขวนลอยจะมีปริมาณที่ไม่คงที่และเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา และมีการลดลงของเชื้อเมื่อ

ระยะเวลาผ่านไป ส่วนเชื้อที่เลี้ยงแบบเกาะติดจะมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาระบบ เชื้อที่เลี้ยงก็มีความเสถียรและแอ็กทิฟมาก ส่วนความหนาของแผ่นฟิล์มที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเกาะของเชื้อถูกทำให้หลุดได้โดยการหมุนเวียนน้ำภายในระบบนั่นเอง ดังที่แสดงให้เห็นในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบบแขวนลอยและเกาะติด

ที่มา: Chae *et al.* (2008)

8. เทคนิคการทำฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน (fluorescence *in situ* hybridization: FISH)

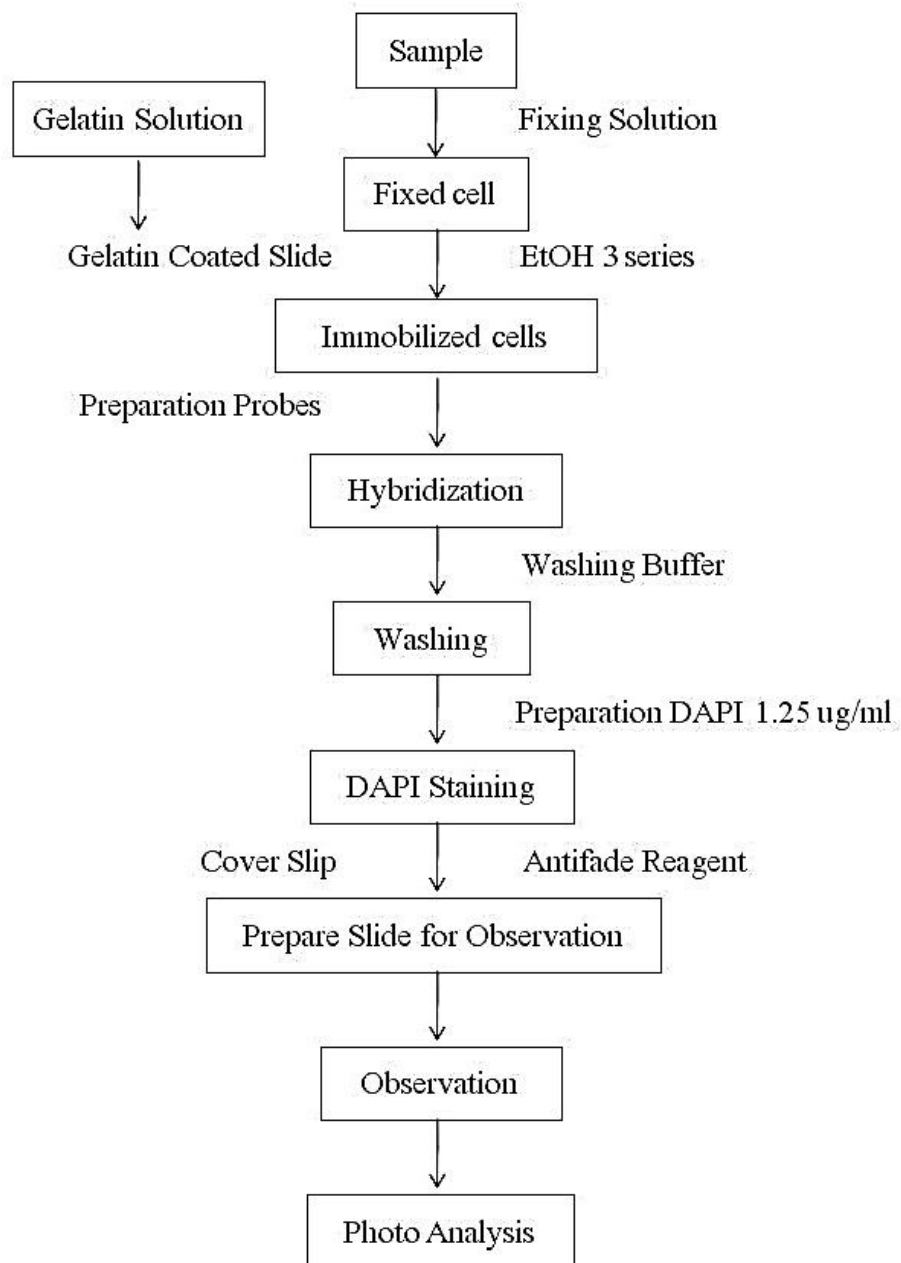
เทคนิคการทำฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันหรือฟิชเป็นวิธีการตรวจหาชนิดของจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมและแม่นยำจำเพาะต่อจุลินทรีย์นั้นๆ โดยการใช้โพรบ (probe) ซึ่งโพรบที่ใช้ก็คือ ลำดับเบสในสายนิวคลีโอไทด์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาดังกล่าว โดยโพรบนี้จะทำการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่สามารถคายพลังงานออกมาในรูปของแสงเมื่อถูกซึมหรือกระทบเข้ากับพลังงานสูง เช่นแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อใช้ในการทดสอบดังกล่าวในเชิงปริมาณ

การใช้โพรบติดฉลากเข้าจับกับกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ เกิดขึ้นครั้งแรกเมื่อปี 1969 โดย Gall และ John ได้ใช้โพรบติดฉลากด้วยสารรังสี (Gall and Pardue, 1969; John *et al.*, 1969) ต่อมาปี 1980 Bauman ได้พัฒนาการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงแทนการใช้รังสี เนื่องจากสาร

เรืองแสงจะช่วยให้ทำงานสะดวก รวดเร็วและมีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น สัญญาณมีความคมชัดมากขึ้นและมีความคงตัวมากกว่า (Bauman *et al.*, 1980) ในปลายปี ค.ศ. 1980 ได้มีการใช้โพรบหลายประเภทติดฉลากเรืองแสงแต่ที่นิยมในงานพืช เป็นโพรบที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือ ไดออกซิจีนิน (dioxigenin) แล้วใช้อะวิดิน (avidin) หรือแอนติไดออกซิจีนิน (anti-dioxigenin) มาเชื่อมต่อกับสารเรืองแสงหรือโรมาดิน (rhodamine) เข้าจับอีกชั้นหนึ่งเมื่อโพรบที่ติดสารเรืองแสงเข้าสู่สร้างพันธะกับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายแล้วสามารถตรวจหาสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์

สำหรับการทำอินซิติวไฮบริไดเซชันนั้นสามารถทำได้โดยที่กรดนิวคลีอิกจะไม่ถูกแยกสกัดออกมาจากตัวอย่างที่วิเคราะห์ โดยจะถูกรักษาให้อยู่ในสภาพเดิมมากที่สุดและนำมาปะติดบนสไลด์ ในขั้นตอนของการทำอินซิติวไฮบริไดเซชันจะทำบนแผ่นสไลด์ซึ่งปฏิกริยาไฮบริไดเซชันจะเกิดขึ้นภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อจึงทำให้ทราบว่าในตัวอย่างดังกล่าวมีกรดนิวคลีอิกเป้าหมายหรือไม่ พร้อมทั้งสามารถระบุตำแหน่งที่อยู่ของกรดนิวคลีอิกได้อีกด้วย หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ต้องการตรวจมาทำการล้าง (washing) แล้วสามารถตรวจหาสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ทันที สามารถแสดงขั้นตอนการศึกษาได้ดังนี้ (ภาพที่ 8) แต่ในปัจจุบันการตรวจหาสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากโพรบที่ได้รับการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงโดยตรง ไม่เป็นปัญหาอีกต่อไปเนื่องจากมีอุปกรณ์ตรวจจับสัญญาณแสงที่มีความไวสูง เช่น cooled CCD cameras ที่ต่อเข้ากับคอมพิวเตอร์ประสิทธิภาพสูงเพื่อช่วยในการขยายสัญญาณและประมวลผล การใช้โพรบติดฉลากเรืองแสงโดยตรงมีข้อที่ควรระวังคือ แสงอาจจะอ่อนหรืออาจลงในระหว่างการทำไฮบริไดเซชัน จึงควรหลีกเลี่ยงไม่ให้กระทบกับแสงสว่างมากเกินไป

สำหรับโพรบที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อเมทาโนโทรฟเป็นโพรบที่มีความจำเพาะต่อเมทาโนโทรฟ Type I ได้แก่ *Methylobacter* spp., *Methylobacter* spp., *Methylococcus* spp., *Methylobacterium* spp. และ Type II ได้แก่ *Methylosinus* spp. และ *Methylocystis* spp. นอกจากนี้ยังมีเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II อีกบางส่วนที่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยโพรบดังกล่าว รายละเอียดของโพรบดังแสดงในตารางที่ 5



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการทำฟิช

ตารางที่ 5 โพรบที่ใช้ในการศึกษาเมทาโนโทรฟชนิด Type I และ Type II

Probe	Target group	Target Site	Formamide in FISH (%)	Probe and Target Sequence
M γ 84	Type I Methanotroph	84-103	20	Probe: 3'AGCCCGCGACTGCTCACCT5' Target: 5'UCGGGCGCUGACGAGUGG3'
M γ 705	Type I Methanotroph	705-724	20	Probe: 3'CTAGACTTCCTTGTGGTC5' Target: 5'GAUCUGAAGGAACACCAG3'
M α 450	Type II Methanotroph	450-470	20	Probe: 3'CTATTACTGCCATGGACCTA5' Target: 5'GAUAAUGACGGUACCUGGAU3'

ที่มา: Eller *et al.* (2001)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. แก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) รุ่น GC 6890 Agilent Technologies
Model: G1530A

สถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของก๊าซ

ติดตั้งดีเทคเตอร์ (detector) แบบทีซีดี (thermal conductivity detector: TCD) ใช้คอลัมน์ (column) แบบ CTR I ลักษณะภายในคอลัมน์เป็นสแตนเลสสตีล ขนาด 1.8 เมตร x 6.35 มิลลิเมตร บรรจุด้วย activated molecular sieve และ เป็นลักษณะภายนอกคอลัมน์เป็นสแตนเลสสตีล ขนาด 1.8 เมตร x 12.7 มิลลิเมตร บรรจุด้วย porous polymer mixture ตั้งค่าอุณหภูมิอินเจกเตอร์ (injector) คอลัมน์และดีเทคเตอร์เท่ากับ 120 35 และ 180 องศาเซลเซียสตามลำดับ ตัวพา (carrier gas) เป็นก๊าซฮีเลียม (He) บริสุทธิ์ 99.99% ซึ่งมีอัตราการไหล 50 มิลลิลิตรต่อนาที ช่วงเวลาในการวิเคราะห์ 5.2 นาที

2. แก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) รุ่น GC-14B Shimadzu

สถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์เมทานอล

ติดตั้งดีเทคเตอร์ (detector) แบบเอฟไอดี (flame ionization detector: FID) ใช้คอลัมน์ (column) เป็นสแตนเลสสตีล ยาว 3 เมตร ภายในบรรจุด้วยคาร์บอน (Carbopack B/1% SPTM-1000) โดยตั้งค่าอุณหภูมิของอินเจกเตอร์ (injector) คอลัมน์และดีเทคเตอร์ เท่ากับ 120, 150 และ 180 องศาเซลเซียสตามลำดับ ตัวพา (carrier gas) เป็นก๊าซไนโตรเจน (N₂) ซึ่งมีอัตราการไหล 28 มิลลิลิตรต่อนาที ช่วงเวลาในการวิเคราะห์ 3 นาที

3. เข็มฉีดยาอย่างแน่น (gas tight syringe) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร

4. เข็มฉีดยาอย่าง सरल ขนาด 10 ไมโครลิตร

5. ก๊าซผสมระหว่างมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์อัตราส่วนร้อยละ 60:40 ใช้เป็นก๊าซชีวภาพสังเคราะห์ (synthetic biogas) ของบริษัทไทยอินดัสเทรียลแก๊ส จำกัด (Thai Industrial Gas: TIG)
6. ก๊าซมีเทนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 (บริษัทไทยอินดัสเทรียลแก๊ส จำกัด)
7. ถังปฏิกิริยาชีวภาพชนิดต่อเนื่องทำด้วยอะคริลิก เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 100 เซนติเมตร
8. ขวดเซรัม (serum) ขนาด 118 มิลลิลิตร
9. ตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำไปล้างให้สะอาดและอบให้แห้งก่อนนำไปใช้
10. ตัวกลางฟองน้ำขนาด 1x1x1 เซนติเมตร ก่อนบรรจุลงในถังปฏิกิริยาต้องนำไปอบในหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °เซลเซียส 15 นาทีเพื่อฆ่าเชื้อโรคเสียก่อน
11. เครื่องเขย่า (shaker) ตั้งค่าอัตราเร็วในการเขย่า 120-150 รอบต่อนาที
12. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5600 LV หัว Oxford กำลังขยาย 50-10,000 เท่า
13. ดีโอมิเตอร์ ยี่ห้อ Euteoh instruments รุ่น CyberScan 100
14. พีเอชมิเตอร์ ยี่ห้อ Metrohm Siam รุ่น 827 pH lab

วิธีการ

1. การแยกเชื้อเมทาโนโทรฟจากดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแบบจำลองหน้าดินหลุมฝังกลบมูลฝอยมา 10 กรัม ใส่ลงในขวดเซรัมขนาด 118 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอส (nitrate mineral salt: NMS) บรรจุอยู่ในปิศาจขวดให้แน่นด้วยจุกยางและรัดด้วยลวดนิยมนก่อนฉีดก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 99.9 ลงไปเพื่อให้ความเข้มข้นของบรรยากาศในขวดได้ร้อยละ 30 จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง (พิกษาและคณะ, 2551) ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอนแล้วถ่ายส่วนที่เป็นของเหลวเพื่อขยายพันธุ์ต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอสอีกครั้ง ส่วนที่ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นก่อนนำไปเดินระบบจะถูกทดสอบด้วยเทคนิคพีชเพื่อทำการคัดแยกเชื้อเมทาโนโทรฟทั้ง 2 ชนิด

2. การศึกษาลักษณะของตัวกลาง

ศึกษาและสังเกตลักษณะรูปร่างภายนอกและสัณฐานของตัวกลางแต่ละชนิดเพื่อหาน้ำหนัก ขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลางสำหรับตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติกทรงกลม ความกว้าง x ความยาว x ความสูงสำหรับตัวกลางชนิดฟองน้ำ) พื้นที่หน้าตัด เพื่อทราบปริมาตรของตัวกลางที่ต้องเติมลงไปจนถึงปฏิกริยา (ภาพที่ 9) สำหรับตัวกลางชนิดฟองน้ำนำไปส่องดูลักษณะรูพรุนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) ที่กำลังขยายต่างๆ



ก) ตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติก



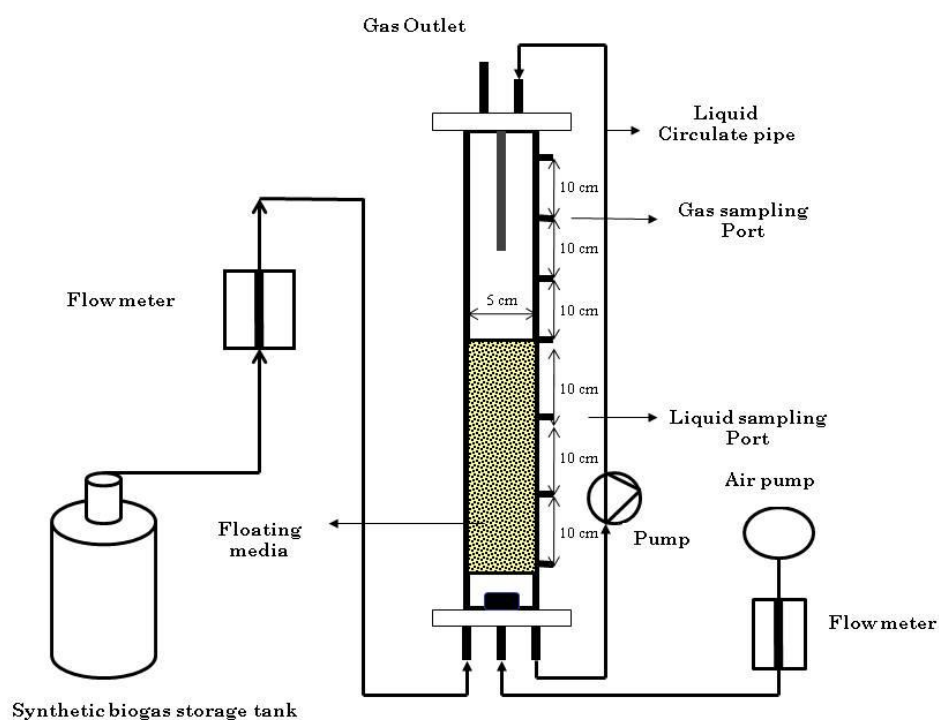
ข) ตัวกลางชนิดฟองน้ำ

ภาพที่ 9 ตัวกลางสองชนิดที่ใช้ในการศึกษา

3. การทดสอบการผลิตเมทานอลโดยถังปฏิกริยาชีวภาพกึ่งต่อเนื่อง

3.1 การติดตั้งระบบถังปฏิกริยา

ถังปฏิกริยาปริมาตร 2 ลิตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ความสูง 100 เซนติเมตร (ดังภาพที่ 10) ภายในบรรจุอาหารเหลวเอ็นเอ็มเอส 800 มิลลิลิตรที่มีเชื้อเมทาโนโทรฟรีย่อยละ 10 โดยปริมาตร ใส่ตัวกลางลอยและด้านล่างของถังปล่อยก๊าซชีวภาพและอากาศโดยมีอัตราการระบายก๊าซชีวภาพสังเคราะห์ (60% มีเทนและ 40% คาร์บอนไดออกไซด์) และอากาศ เท่ากับ 2 และ 8 มิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกริยาเป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อให้เชื้อเกาะกับตัวกลาง จากนั้นจึงเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ผสมเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เพื่อกระตุ้นการผลิตเมทานอล (Xin *et al.*, 2004) ซึ่งมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.8.-7.0 เข้าสู่ระบบและทำการหมุนเวียนสารละลายในระบบ เก็บตัวอย่างแล้วเปรียบเทียบกับปริมาณเมทานอลที่ผลิตได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 10 ส่วนประกอบของถังปฏิกริยาชีวภาพชนิดกึ่งต่อเนื่อง

3.2 การศึกษาชนิดตัวกลาง

เมื่อติดตั้งระบบถังปฏิกริยาเสร็จแล้ว จึงทำการศึกษานิตของตัวกลางลอยที่เหมาะสม โดยใส่ตัวกลางลอยชนิดเม็ดพลาสติกทรงกลม (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร) ลงในถังปฏิกริยาที่ 1 และใส่ตัวกลางลอยชนิดฟองน้ำรูปลูกบาศก์ (10x10x10 มิลลิเมตร) ลงในถังปฏิกริยาที่ 2 เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกริยาเป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อให้เชื้อเกาะกับตัวกลาง จากนั้นจึงเติมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ผสมเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่า pH อยู่ในช่วง 6.8.-7.0 เข้าสู่ระบบ ครั้งละ 160 มิลลิลิตรทุกวันคิดเป็นระยะเวลาพักเก็บสารละลายเท่ากับ 5 วันด้วยอัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อนาที ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างตัวกลางลอย 2 ชนิด โดยทำการเดินระบบทั้งสิ้น 30 วัน เก็บตัวอย่างแล้วเปรียบเทียบปริมาณเมทานอลที่ผลิตได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง

3.3 การศึกษาระยะเวลากักเก็บ (Hydraulic Retention Time: HRT)

เมื่อได้ชนิดของตัวกลางลอยที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการศึกษาระยะเวลากักเก็บสารละลาย โดยใส่ตัวกลางและเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกริยาเป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อให้เชื้อเกาะกับตัวกลางในถังปฏิกริยา 3 ถัง จากนั้นจึงเติมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ผสมเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่า pH อยู่ในช่วง 6.8.-7.0 เข้าสู่ระบบ โดยแปรผันระยะเวลากักเก็บสารละลายในแต่ละถังให้เท่ากับ 1 3 และ 5 วันหรือมีการเปลี่ยนถ่ายสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เป็น 800 และ 267 160 มิลลิลิตรต่อวันตามลำดับ หมุนเวียนสารละลายในถังปฏิกริยาด้วยอัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อนาที เติมน้ำในระบบทั้งสิ้น 30 วัน เก็บตัวอย่างแล้วเปรียบเทียบปริมาณเมทานอลที่ผลิตได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อหาค่าระยะเวลากักเก็บที่เหมาะสม

3.4 การศึกษาอัตราการหมุนเวียนสารละลาย (Liquid Recirculation Rate: LRR)

เมื่อได้ชนิดของตัวกลางลอยและระยะเวลากักเก็บที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการศึกษาอัตราการหมุนเวียนสารละลายในถังปฏิกริยา โดยใส่ตัวกลางและเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกริยาเป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อให้เชื้อเกาะกับตัวกลางในถังปฏิกริยา 3 ถัง จากนั้นจึงเติมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ผสมเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่า pH อยู่ในช่วง 6.8.-7.0 เข้าสู่ระบบ ในระยะเวลากักเก็บหรือการเปลี่ยนถ่ายสารละลายในปริมาณที่เหมาะสม จากนั้นจึงหมุนเวียนสารละลายในแต่ละถังให้มีค่าเท่ากับ 2 20 และ 200 มิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ เติมน้ำในระบบทั้งสิ้น 30 วันต่ออัตราการหมุนเวียน เก็บตัวอย่างแล้วเปรียบเทียบปริมาณเมทานอลที่ผลิตได้ทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อหาค่าอัตราการหมุนเวียนสารละลายในถังปฏิกริยา ที่เหมาะสม

4. การเก็บตัวอย่าง

4.1 ทำการเก็บตัวอย่างสารละลายตามความลึกของถังทุกๆ ระยะ 10 เซนติเมตร เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (GC 14B, Shimadzu) ทุกๆ 24 ชั่วโมง หรืออาจเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ หากไม่ได้วิเคราะห์ทันที

4.2 วัดค่าออกซิเจนละลายน้ำทุกๆ ระยะ 10 เซนติเมตรตามระดับความลึกและวัดค่าความเป็นกรดด่างของสารละลาย ทุกๆ 24 ชั่วโมง

4.3 วิเคราะห์ปริมาณเชื้อแขวนลอย ชนิดและปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟทุก 48 ชั่วโมงด้วยวิธีฟิช (fluorescent *in situ* hybridization: FISH) โดยโพรบที่ใช้คือ MY84 และ MY705 (Eller *et al.*, 2001) สำหรับวิเคราะห์เชื้อเมทาโนโทรฟ Type I และ MO450 (Eller *et al.*, 2001) สำหรับวิเคราะห์เชื้อเมทาโนโทรฟ Type II และ DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) สำหรับวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด (Eller *et al.*, 2001) สำหรับสกุล (genus) ที่อยู่ในขอบข่ายของโพรบที่ใช้ดังนี้ เมทาโนโทรฟ Type I ได้แก่ *Methylococcus* spp., *Methylobacter* spp., *Methyломicrobium* spp., *Methyломonas* spp., *Methylosarcina* spp., *Methylosphaera* spp., *Methylocadum* spp. และเมทาโนโทรฟ Type II ได้แก่ *Methylocystis* spp., *Methylosinus* spp. (พิชญะและคณะ 2551; Eller *et al.*, 2001)

4.4 เก็บตัวอย่างก๊าซเพื่อวิเคราะห์ปริมาณก๊าซมีเทน ออกซิเจน คาร์บอน ไดออกไซด์ ในระบบตลอดการเดินระบบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC 6890, Agilent) ทุกๆ 48 ชั่วโมง

4.5 เก็บตัวอย่างเม็ดพลาสติกและฟองน้ำตอนเริ่มต้นและเสร็จสิ้นการเดินระบบในถังปฏิกิริยาเพื่อศึกษาการเกาะติดของเชือบนตัวกลางโดยทำการเตรียมตัวอย่างก่อนส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยายต่างๆ

สถานที่และระยะเวลาในการทำงานวิจัย

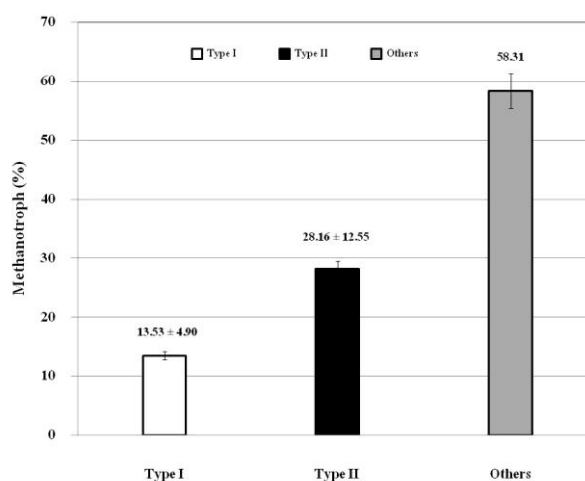
1. สถานที่ทำงานวิจัย: ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม 2 คณะวิศวกรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กทม.

2. ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย: เริ่มดำเนินการวิจัยตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2550-เดือนเมษายน 2552

ผลและวิจารณ์

1. ชนิดและปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟ

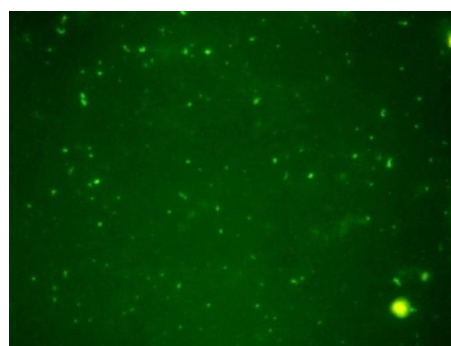
เชื้อเมทาโนโทรฟผสมที่แยกได้จากดินของหลุมฝังกลบมูลฝอยซึ่งนำมาแยกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอสและตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีโดยโพรบที่ใช้คือ MY84 และ MY705 สำหรับวิเคราะห์เชื้อเมทาโนโทรฟ Type I และ MQ450 สำหรับวิเคราะห์เชื้อเมทาโนโทรฟ Type II และสีย้อม DAPI สำหรับวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด (Eller *et al.*, 2001) (ภาพที่ 12) พบว่ามีเชื้อเมทาโนโทรฟคิดเป็นอัตราส่วนร้อยละ 41.69 ± 15.82 ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟ Type I และเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II ร้อยละ 13.53 ± 4.90 และ 28.16 ± 12.55 ตามลำดับตลอดระยะเวลาการศึกษา (ภาพที่ 11) และเมื่อนำหัวเชื้อเริ่มต้นนี้ไปถ่ายเชื้อในครั้งต่อไปด้วยอาหารเอ็นเอ็มเอสเพื่อใช้ในการเริ่มต้นเดินระบบการผลิตเมทานอลในถังปฏิกรณ์ พบว่าปริมาณเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของเมทาโนโทรฟ Type I และ Type II แตกต่างจากหัวเชื้อเริ่มต้นเล็กน้อย โดยเชื้อเมทาโนโทรฟชนิด Type I มีค่าค่อนข้างคงที่และ Type II มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ตารางที่ 6) เนื่องจากเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II เป็นเชื้อที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรดต่ำในช่วง 5.5-6.7 (Hanson and Hanson, 1996) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอส (6.7-6.9) และสภาวะที่มีความเข้มข้นของมีเทนสูง (Dedysh *et al.*, 1998) แต่เมทาโนโทรฟ Type I เจริญได้ไม่ดีในสภาวะดังกล่าวจึงมีปริมาณน้อยกว่า Type II (Hanson and Hanson, 1996)



ภาพที่ 11 ชนิดและปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟเฉลี่ยที่แยกได้จากดินหลุมฝังกลบ



ก) เชื้อเมทาโนโทรฟชนิด Type I



ข) เชื้อเมทาโนโทรฟชนิด Type II



ค) เซลล์จุลินทรีย์ที่ย้อมด้วย DAPI

ภาพที่ 12 เซลล์จุลินทรีย์ที่ย้อมด้วยโพรบชนิดต่างๆ ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟิช

ตารางที่ 6 ปริมาณเมทาโนโทรฟแต่ละชนิดก่อนเดินระบบในสถานะต่างๆ

สถานะเดินระบบ	เมทาโนโทรฟ Type I (%)	เมทาโนโทรฟ Type II (%)
ศึกษาชนิดตัวกลาง	12.98-13.53	27.09-28.16
ศึกษาระยะกักเก็บสารละลาย	12.85-13.63	31.40-35.74
ศึกษาอัตราการหมุนเวียนสารละลาย	13.63-16.30	32.18-38.55

2. ผลของชนิดตัวกลางต่อการผลิตเมทานอล

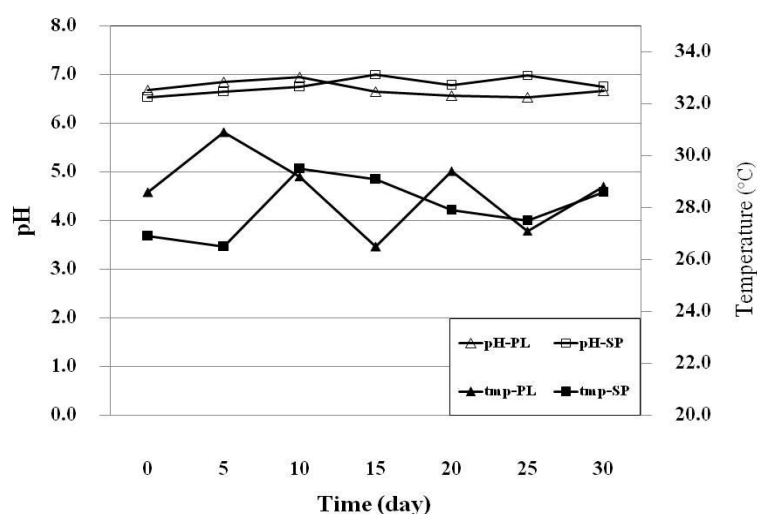
จากการศึกษาตัวกลางทั้งสองชนิดพบว่าตัวกลางแต่ละชนิดมีค่าต่างๆ ดังตารางที่ 7 โดยตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติกมีรูปร่างกลม ทึบ ผิวหน้ามีลักษณะเรียบและมันวาวคล้ายลูกปัด น้ำหนักเบา ลอยน้ำ และตัวกลางชนิดฟองน้ำมีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ผิวสัมผัสมีลักษณะเป็นรูพรุนตลอดทั้งหมด สามารถดูดซับน้ำและฟองอากาศสามารถแทรกตัวเข้าไปในรูพรุนได้ โดยจำนวนเม็ดพลาสติกและฟองน้ำที่เติมลงไปจนถึงปฏิกิริยาเท่ากับ 6,500 และ 400 ชิ้น ตามลำดับ (โดยประมาณ) ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 35 และ 80 ของปริมาตรสารละลายในถังปฏิกิริยา (Working volume) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 800 มิลลิลิตรหรือเทียบเท่าความลึกของสารละลาย 40 เซนติเมตร การใช้ตัวกลางชนิดฟองน้ำ 1 ชิ้นเทียบเท่ากับการใช้ตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติก 8 ชิ้น เนื่องจากฟองน้ำขนาด 1x1x1 เซนติเมตร มีพื้นที่หน้าตัดที่ใหญ่กว่าเม็ดพลาสติก ดังนั้นเพื่อให้มีปริมาตรรวมของทั้งสองชนิดเท่ากัน จำนวนฟองน้ำที่ใช้จึงมีค่าน้อยกว่าเม็ดพลาสติก (การคำนวณดูในภาคผนวก ก)

ตารางที่ 7 ลักษณะของตัวกลางแต่ละชนิดที่ศึกษา

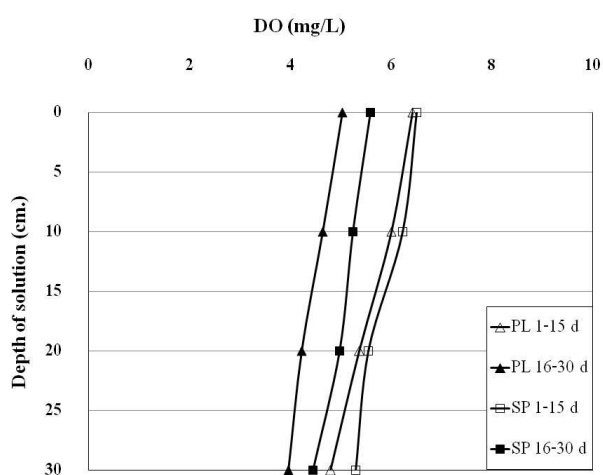
ชนิดตัวกลาง	รูปร่าง	ขนาด (ม.)	พื้นที่ผิว (ม. ² /ชิ้น)	ปริมาตร (ม. ³ /ชิ้น)	ปริมาตรรวม (ม. ³)
เม็ดพลาสติก	ทรงกลม	$\varnothing 5 \times 10^{-3}$	7.85×10^{-5}	6.54×10^{-8}	7.1×10^{-2}
ฟองน้ำ	ลูกบาศก์	1×10^{-2}	6×10^{-4}	1×10^{-6}	7.1×10^{-2}

ตลอดระยะเวลาการเดินระบบพบว่า สารละลายทั้งสองระบบมีค่าความเป็นกรดค้างอยู่ในช่วง 6.50-7.10 และอุณหภูมิของสารละลายอยู่ในช่วง 25.3-31.2 °ซ (ภาพที่ 13) ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเมทาโนโทรฟ (pH = 6.5-7.5 และอุณหภูมิ 25-35 °ซ; Writternbury *et al.*, 1970; Chiemchaisri *et al.*, 2001) และมีค่าออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen: DO) อยู่ในช่วง 4-7 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเพียงพอต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ชนิดใช้อากาศ (Sawyer *et al.*, 2003) โดยตัวกลางชนิดฟองน้ำมีค่าออกซิเจนเฉลี่ยละลายน้ำสูงกว่าตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติกตลอดระยะเวลาการศึกษา (ภาพที่ 14) ทั้งนี้เพราะฟองน้ำมีรูพรุนซึ่งสามารถกักเก็บฟองมีเทนและอากาศได้ดีกว่าเม็ดพลาสติก ดังนั้นจึงตรวจพบปริมาณมีเทนที่ละลายน้ำของตัวกลางชนิดฟองน้ำมีค่าสูงกว่าเม็ดพลาสติกและปริมาณมีเทนเหนือสารละลายมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย (ภาพที่ 15) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าฟองน้ำขนาด 15x15x15 มิลลิเมตร มีรูพรุนถึง 95% ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

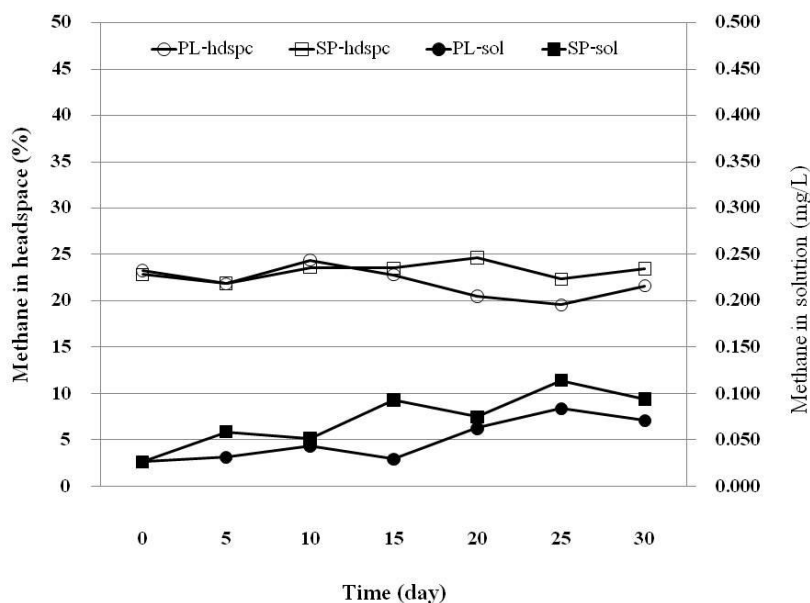
หรือมีรูปพูนเท่ากับ 25-40 รูต่อนิ้ว (Chae *et al.*, 2008) อีกทั้งพบว่ามีปริมาณมีเทนเหนือสารละลาย ในช่วง 19.6-24.67% ของปริมาณก๊าซทั้งหมด ซึ่งเพียงพอต่อการละลายของมีเทนสู่สารละลาย และมีเทนละลายอยู่ในสารละลายในระบบอยู่ในช่วง 0.027-0.114 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค่าอิ่มตัวการละลายของมีเทนเท่ากับ 0.0266 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30° เซลเซียส) (Perry, 1963)



ภาพที่ 13 ค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิตามระยะเวลาโดยตัวกลางสองชนิด
(PL: ตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติก SP: ตัวกลางชนิดฟองน้ำ)



ภาพที่ 14 ออกซิเจนละลายเฉลี่ยตามระดับความลึกโดยตัวกลางสองชนิด

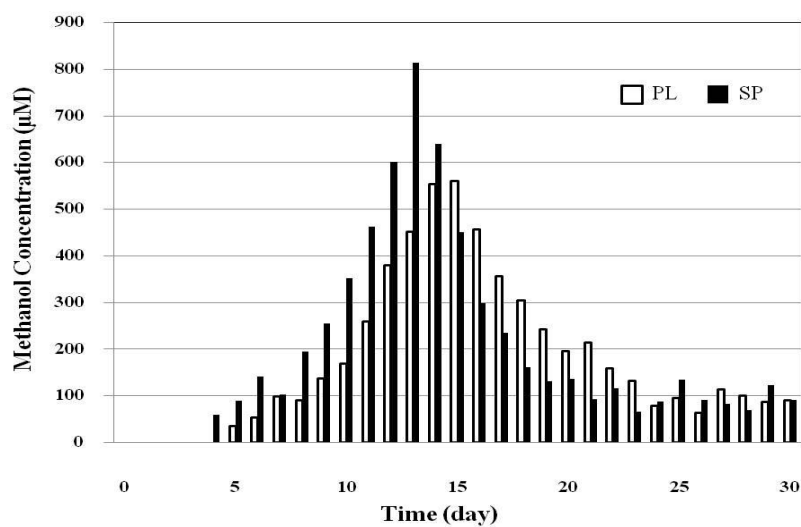


ภาพที่ 15 ปริมาณมีเทนเหนือสารละลายและปริมาณมีเทนในสารละลายโดยตัวกลางสองชนิด

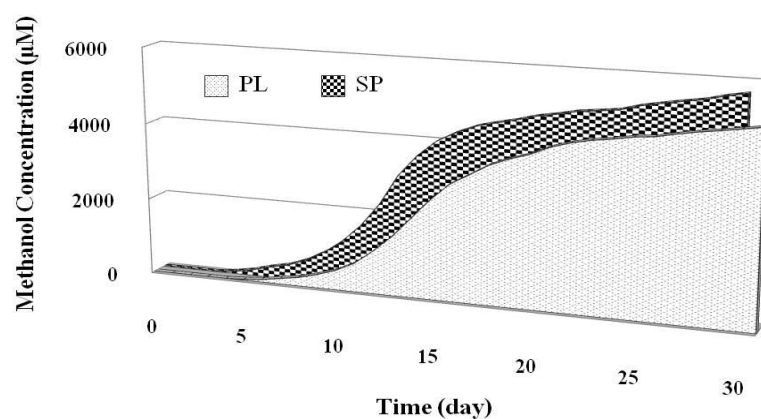
สำหรับการผลิตเมทานอลโดยเชื้อเมทาโนโทรฟที่เกาะบนตัวกลาง 2 ชนิด พบว่าปริมาณเมทานอลที่ผลิตได้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทั้งสองชนิดตัวกลางในช่วง 14 วันแรก และมีความเข้มข้นสูงสุดที่ 794 และ 526 ไมโครโมลาร์สำหรับฟองน้ำ (SP) และเม็ดพลาสติก (PL) ตามลำดับ โดยความชันหรืออัตราการผลิตเมทานอลในช่วงนี้ของตัวกลางฟองน้ำมีค่าสูงกว่าเม็ดพลาสติก (ภาพที่ 16) (39.68 และ 27.63 ไมโครโมลาร์ต่อวัน) หลังจากนั้นความเข้มข้นเมทานอลมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลา โดยมีอัตราการผลิตลดลงเท่ากับ 9.99 และ 12.21 ไมโครโมลาร์ต่อวันตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตามเมื่อพลอตกราฟปริมาณเมทานอลสะสมโดยตัวกลางทั้งสองชนิดตลอดระยะเวลาการเดินระบบ 30 วัน พบว่ามีค่าต่างกันเล็กน้อย (5,699 และ 5,032 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) (ภาพที่ 17) และเมื่อคำนวณหาอัตราการผลิตเมทานอลเฉลี่ยต่อวันได้จึงมีค่าเท่ากับ 189.97 และ 167.73 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

นอกจากนี้เมื่อพลอตกราฟการผลิตเมทานอลต่อมวลมีเทนที่ให้เข้าไปและกราฟการผลิตเมทานอลต่อพื้นที่ผิวตัวกลางพบว่า ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกันคือ ตัวกลางชนิดฟองน้ำให้อัตราการผลิตเมทานอลสูงกว่าตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติก (5,466 และ 4,826 ไมโครกรัมเมทานอลต่อกรัมมีเทนต่อวัน และเท่ากับ 828.94 และ 315.73 มิลลิกรัมต่อลิตรเมทานอลต่อพื้นที่ผิวตัวกลาง) (ภาพที่ 18) และเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ผ่านมาซึ่งทำการผลิตเมทานอลจาก

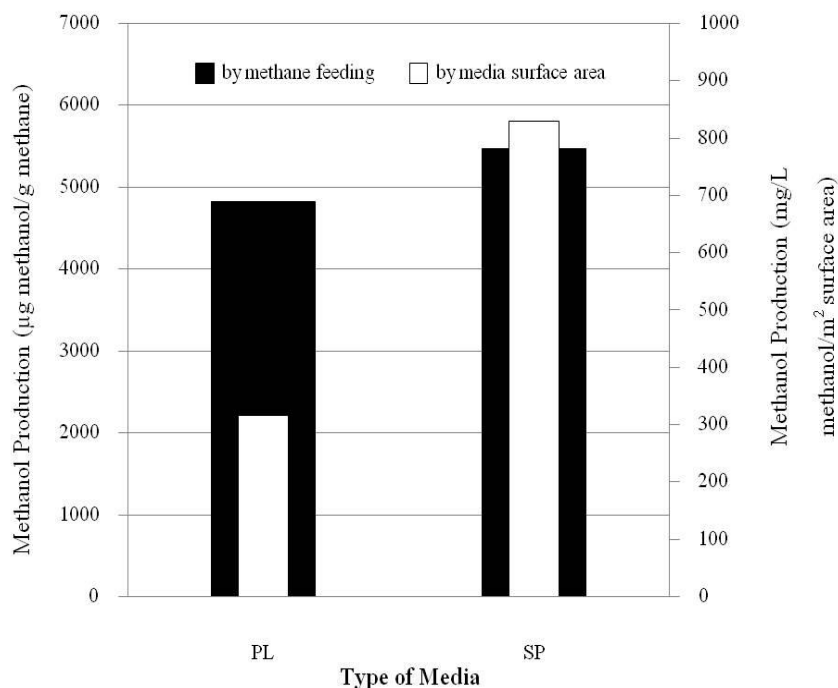
ก๊าซชีวภาพด้วยถังปฏิกริยาแบบกะ (batch) (สยามมล, 2551) พบว่า มีแนวโน้มในการผลิตเมทานอลตามระยะเวลาไปในทิศทางเดียวกัน แต่การผลิตเมทานอลด้วยถังปฏิกริยาชนิดกึ่งต่อเนื่องโดยการเลี้ยงเชื้อบนตัวกลางสามารถผลิตเมทานอลได้สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบแขวนลอยในถังปฏิกริยาแบบกะ (1,185 นาโนกรัมเมทานอลต่อกรัมมีเทนต่อวัน)



ภาพที่ 16 ปริมาณเมทานอลที่ผลิตแต่ละวัน โดยตัวกลางสองชนิด (ระดับผิวหน้า)

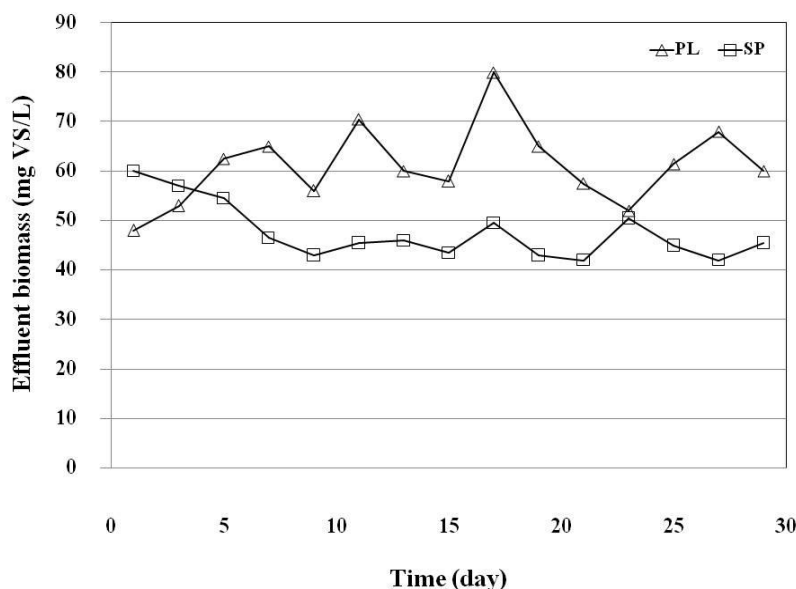


ภาพที่ 17 ปริมาณเมทานอลสะสมตามระยะเวลาที่ HRT 5 วัน โดยตัวกลางสองชนิด



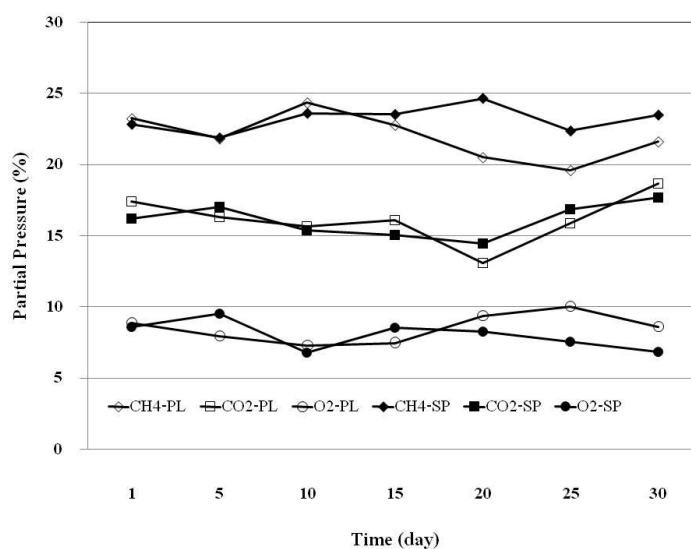
ภาพที่ 18 การผลิตเมทานอลต่อมวลมีเทนและการผลิตเมทานอลต่อพื้นที่ผิวของตัวกลางสองชนิด

ทั้งนี้ปริมาณเมทานอลโดยตัวกลางชนิดฟองน้ำที่มีค่ามากกว่า เนื่องจากฟองน้ำมีลักษณะที่ขรุขระและมีรูพรุน จึงสามารถกรองเชื้อได้ดีในระหว่างที่มีการเปลี่ยนถ่ายสารละลายและเชื้อสามารถยึดเกาะได้ง่าย รวมทั้งออกซิเจนและก๊าซมีเทนที่ปล่อยเข้าสู่ระบบถังปฏิกรณ์ในทางด้านล่างสามารถแทรกตัวอยู่ระหว่างรูพรุนของฟองน้ำได้ตลอดความลึกก่อนจะลอยขึ้นสู่ผิวสารละลายและระบายออกในที่สุด ทำให้เชื้อในระบบสามารถนำก๊าซดังกล่าวไปใช้ในการผลิตเมทานอลได้มากเมื่อเปรียบเทียบกับตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติกซึ่งมีลักษณะผิวหน้าที่เรียบและมัน เชื้อจึงเกาะติดยากและเชื้อบางส่วนที่อยู่ในรูปแขวนลอยจึงสามารถหลุดออกจากระบบได้ง่ายกว่า (ภาพที่ 19) (Xin *et al.*, 2004) และด้วยลักษณะภายนอกที่มีความทึบ ดังนั้นก๊าซต่างๆ จึงไม่สามารถแทรกตัวอยู่ระหว่างเม็ดพลาสติกได้ ออกซิเจนและก๊าซมีเทนที่ละลายน้ำจึงมีปริมาณน้อยกว่า ผลการทดลองจึงชี้ให้เห็นว่า ตัวกลางชนิดฟองน้ำสามารถให้ผลผลิตเมทานอลได้เหมาะสมกว่าตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติกในการเดินระบบแบบกึ่งต่อเนื่อง



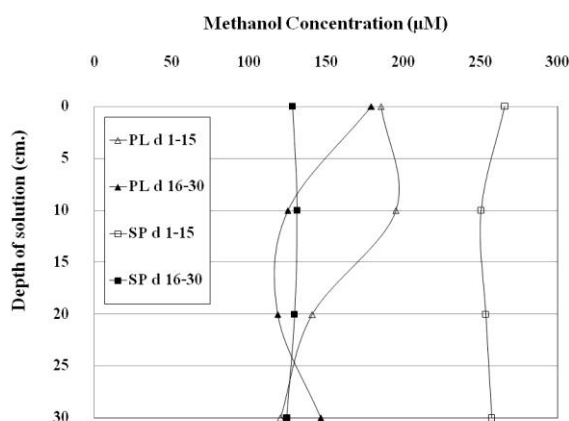
ภาพที่ 19 ปริมาณเชื้อที่หลุดออกจากระบบโดยตัวกลางสองชนิด

จากภาพที่ 21 แสดงปริมาณเมทานอลเฉลี่ยตามระดับความลึก โดยตัวกลางชนิดฟองน้ำให้ปริมาณเมทานอลสม่ำเสมอไปตลอดความลึกได้ดีกว่าเม็ดพลาสติก เนื่องจากการกระจายตัวของฟองน้ำที่ค่อนข้างสม่ำเสมอไปตลอดทั้งความลึกของสารละลาย (40 เซนติเมตร) ตลอดระยะเวลาเดินระบบ (1-30 วัน) ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟจึงมีค่าไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเทียบกับตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติกซึ่งลอยอยู่เฉพาะช่วงบนของสารละลาย (15-20 เซนติเมตร) ทำให้เชื้อเมทาโนโทรฟในคอลัมน์กระจายตัวได้ไม่สม่ำเสมอ ส่งผลให้ปริมาณเมทานอลที่ผลิตได้แตกต่างกันในแต่ละระดับความลึก ทั้งนี้ตรวจพบปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II สูงกว่า Type I ในทั้งสองระบบ ตลอดระยะเวลาการศึกษาทั้งสองชนิดตัวกลาง (ภาพที่ 22) (มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 26.87 และ 12.67 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด) เนื่องจากเมทาโนโทรฟ Type II สามารถเจริญได้ดีกว่า Type I ในสถานะที่ปริมาณมีเทนต่อออกซิเจนในระบบมีค่าสูง (ภาพที่ 20) หรือในสถานะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ (Dedysh *et al.*, 1998) สอดคล้องกับการศึกษาของพิชญาและคณะ (2551) ที่พบปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II เป็นสัดส่วนที่มากกว่า Type I เมื่อคืนกลับทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยมีค่าลึกลง ทำให้ปริมาณออกซิเจนมีค่าลดลง

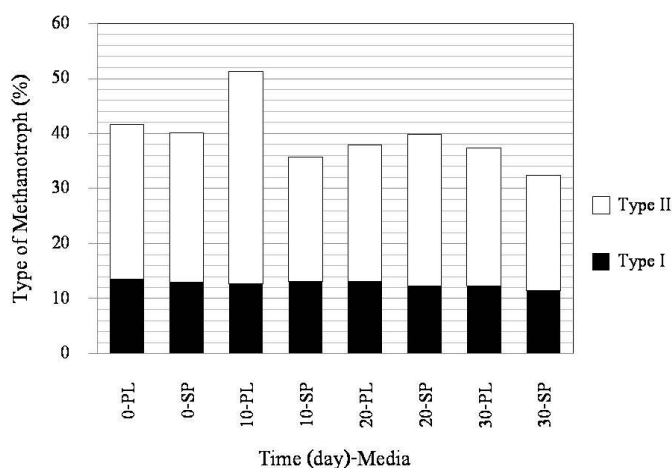


ภาพที่ 20 องค์ประกอบของก๊าซในระบบโดยตัวกลางสองชนิด

การศึกษาที่ผ่านมามีการใช้เชื้อเมทาโนโทรฟ Type II บริสุทธิ์ (*Methylosinus* spp.) ในการผลิตเมทานอล (Furuto, 1998; Xin *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2006) ได้แก่ สายพันธุ์ *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 ในขณะที่การใช้เชื้อเมทาโนโทรฟ Type I บริสุทธิ์ (*Methylomonas* spp.) ก็มีการศึกษาบ้างแต่ก็มีข้อจำกัดในการเจริญเติบโต (Malashenko *et al.*, 2000) นอกจากนี้มักพบปัญหาการปนเปื้อนได้ง่ายจากการใช้เชื้อบริสุทธิ์ ดังนั้นการใช้เชื้อแบบผสมจึงช่วยลดปัญหานี้ลงได้และเหมาะกับการนำไปใช้ในงานด้านสิ่งแวดล้อม

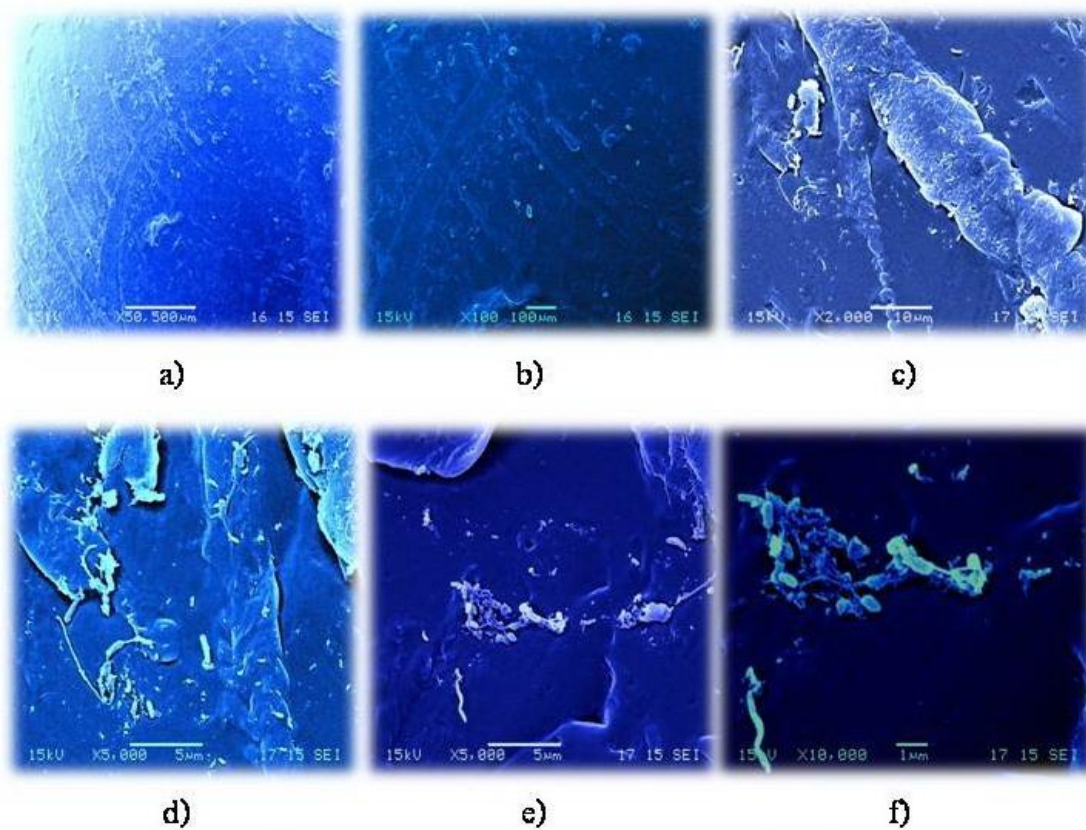


ภาพที่ 21 ปริมาณเมทานอลเฉลี่ยโดยตัวกลางสองชนิดตามระดับความลึก



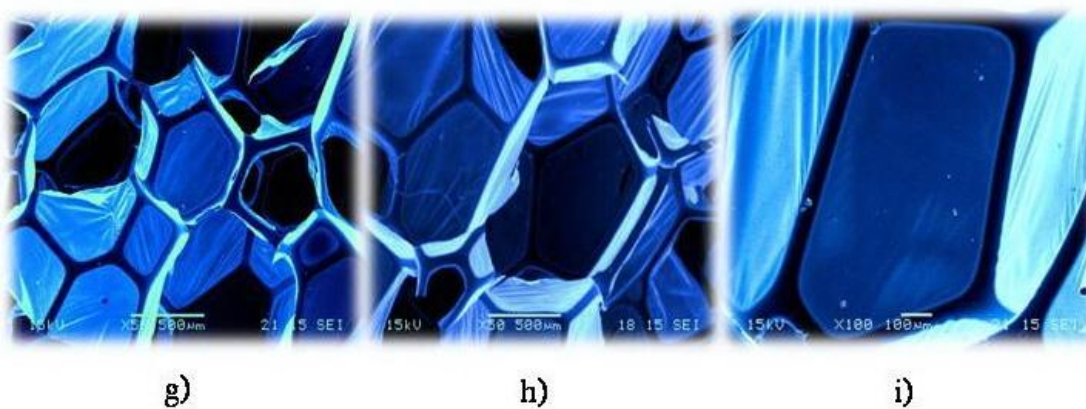
ภาพที่ 22 เปรียบเทียบปริมาณและชนิดของเชื้อเมทาโนโทรฟในสารละลายทั้งสองระบบ

นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาลักษณะการเกาะติดของเชือบนตัวกลางทั้งสองชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) พบว่า ที่กำลังขยาย 50 และ 100 เท่า สังเกตเห็นเชือบนตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติกไม่ชัดเจน แต่เมื่อเพิ่มกำลังขยายเป็น 2,000 และ 5,000 เท่า ก็จะเห็นเป็นลักษณะแผ่นฟิล์มบางๆและอนุภาคเล็กๆเกาะอยู่บนผิวตัวกลาง และเมื่อเพิ่มกำลังขยายเป็น 10,000 เท่า ก็จะเห็นเชื้อชัดเจนขึ้น มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆหลายๆ เซลล์ที่เกาะกัน (ภาพที่ 23) เมื่อนำตัวกลางฟองน้ำก่อนที่จะเดินระบบมาศึกษาพบว่าที่กำลังขยาย 50 และ 100 เท่า ฟองน้ำมีลักษณะเป็นเยื่อบางๆและมีรูพรุนจำนวนมาก ซึ่งมีรูปร่างตั้งแต่ 5-8 เหลี่ยม (ภาพที่ 24) จากนั้นเมื่อเดินระบบเสร็จสิ้นจึงนำตัวกลางฟองน้ำมาศึกษาอีกครั้งที่กำลังขยาย 50 และ 100 เท่า พบว่ามีอนุภาคเล็กๆจำนวนมากติดอยู่ตามเยื่อและรูพรุนของฟองน้ำ และเมื่อเพิ่มกำลังขยายเป็น 2,000-10,000 เท่า พบว่า อนุภาคเล็กๆที่เห็นข้างต้นเป็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่และมีเซลล์ขนาดเล็กจำนวนมากหลายเซลล์มาเกาะรวมกัน (ภาพที่ 25)



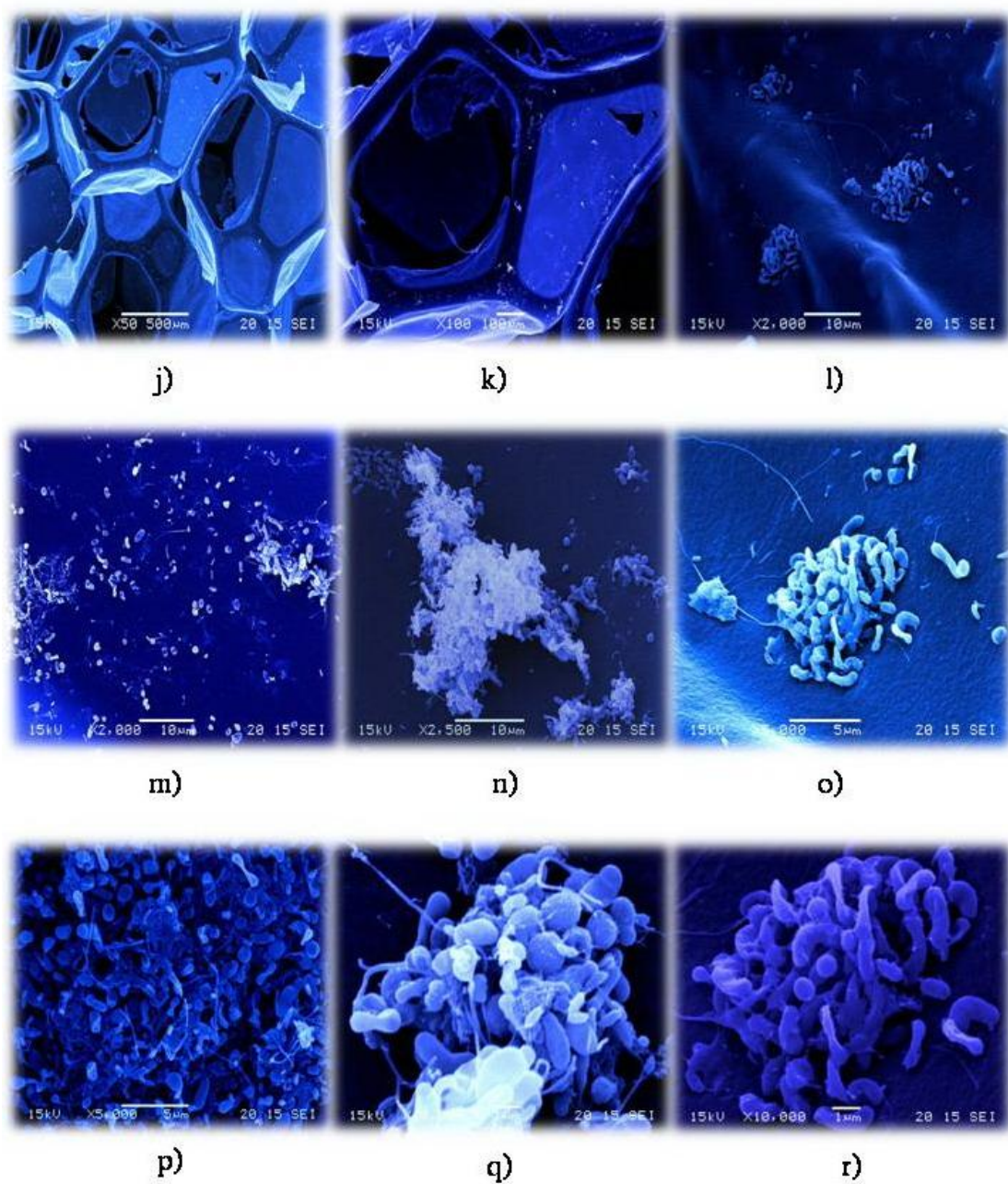
ภาพที่ 23 ลักษณะของเชื่อบนตัวกลางชนิดเม็ดพลาสติก

a)-50x b)-100x c)-2,000x d)-5,000x e)-5,000x และ f)-10,000x



ภาพที่ 24 ลักษณะรูพรุนของตัวกลางชนิดฟองน้ำก่อนเดินระบบ

g)-50x h)-50x และ i)-100x



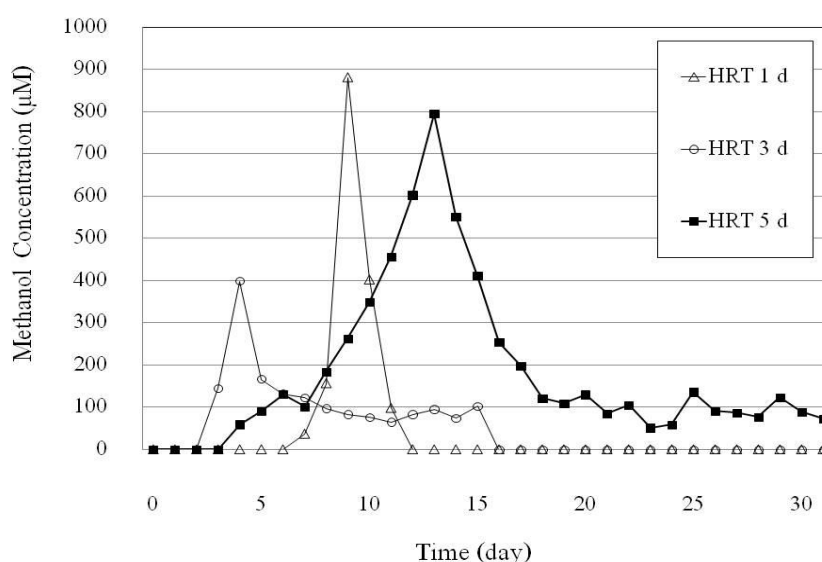
ภาพที่ 25 ลักษณะของเชือบนตัวกลางชนิดฟองน้ำหลังจากเดินระบบ

j)-50x k)-100x l)-2,000x m)-2,000x n)-2,500x o)-5,000x p)-5,000x q)-10,000x และ r)-10,000x

3. ผลของระยะเวลากักเก็บสารละลายต่อการผลิตเมทานอล

ผลการทดลองเดินระบบผลิตเมทานอลโดยเชื้อเมทาโนโทรฟเกาะบนตัวกลางชนิดฟองน้ำ เมื่อแปรผันระยะเวลากักเก็บสารละลายเป็น 1 3 และ 5 วัน พบว่าความเข้มข้นเมทานอลที่ระยะเวลากักเก็บ 3 และ 5 วัน มีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน โดยมีช่วงปรับตัว (ยังไม่มีการผลิตเมทานอล)

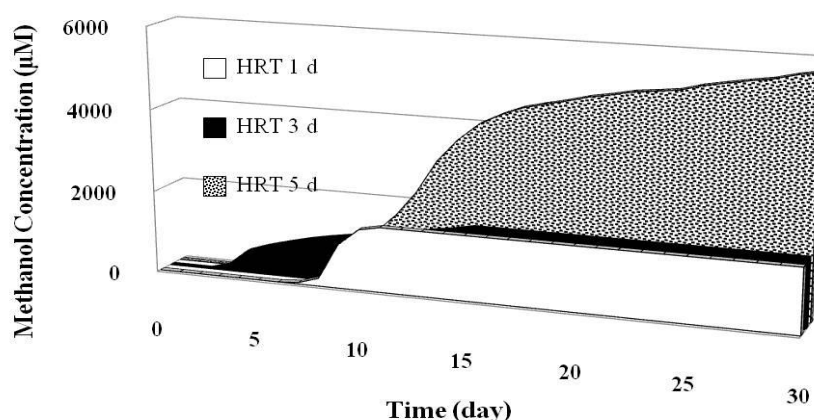
ประมาณ 1 รอบและมีช่วงการผลิต 4 รอบของระยะเวลากักเก็บ ส่วนระยะเวลากักเก็บ 1 วันมีช่วงการปรับตัวถึง 7 รอบและมีช่วงการผลิต 4 รอบของระยะเวลากักเก็บและหยุดการผลิตหลังจากเดินระบบตั้งแต่วันที่ 12 เป็นต้นไป และความเข้มข้นเมทานอลที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดที่ 881 794 และ 398 ไมโครโมลาร์ สำหรับระยะเวลากักเก็บ 1 5 และ 3 วัน ตามลำดับ (ภาพที่ 26) เมื่อพิจารณาความเข้มข้นเมทานอลสูงสุดที่ระยะเวลากักเก็บ 1 และ 5 วันมีค่าต่างกันเล็กน้อย แต่ที่ระยะเวลากักเก็บ 5 วันสามารถผลิตเมทานอลได้อย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเดินระบบ 30 วัน



ภาพที่ 26 ความเข้มข้นเมทานอลที่ระยะเวลากักเก็บแตกต่างกันในตัวกลางชนิดฟองน้ำ

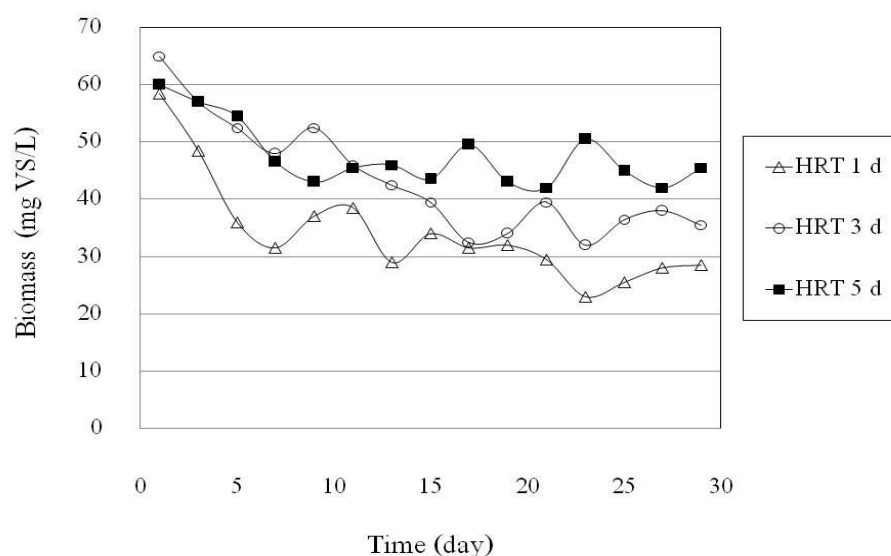
เมื่อพลอตกราฟปริมาณเมทานอลสะสมพบว่ามีค่าเท่ากับ 1,575 1,641 และ 5,699 ไมโครโมลาร์ สำหรับระยะเวลากักเก็บ 1 3 และ 5 วัน ตามลำดับในการเดินระบบ 30 วัน (ภาพที่ 27) โดยอัตราการผลิตเมทานอลเฉลี่ยต่อวันมีค่าเท่ากับ 190 55 และ 53 ไมโครโมลาร์ สำหรับระยะเวลากักเก็บ 5 3 และ 1 วันตามลำดับ โดยที่ระยะเวลากักเก็บ 3 และ 1 วันพบเมทานอลน้อยกว่าที่ระยะเวลากักเก็บ 5 วันค่อนข้างมากเนื่องจากที่ระยะเวลากักเก็บ 5 วันเมทานอลสามารถผลิตได้ถึงวันที่ 30

ของการเดินระบบแต่ที่ระยะเวลากักเก็บ 3 และ 1 วัน เมทานอลผลิตได้ถึงวันที่ 11 และ 15 ตามลำดับ หลังจากนั้นไม่มีการผลิตเมทานอล และการพบเมทานอลสูงสุดในระบบที่มีระยะเวลากักเก็บ 5 วัน อาจเนื่องจากเชื้อมีการปรับตัวได้ดี เพราะการเปลี่ยนถ่ายระหว่างฟอตเฟตบัฟเฟอร์และเอ็นเอ็มเอสเป็นไปอย่างช้าๆ ปริมาณเมทานอลที่ถูกผลิตจึงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตรงข้ามกับการเปลี่ยนถ่ายสารละลายด้วยระยะเวลากักเก็บที่น้อยกว่า ซึ่งมีปริมาตรในการเปลี่ยนถ่ายที่สูงกว่า



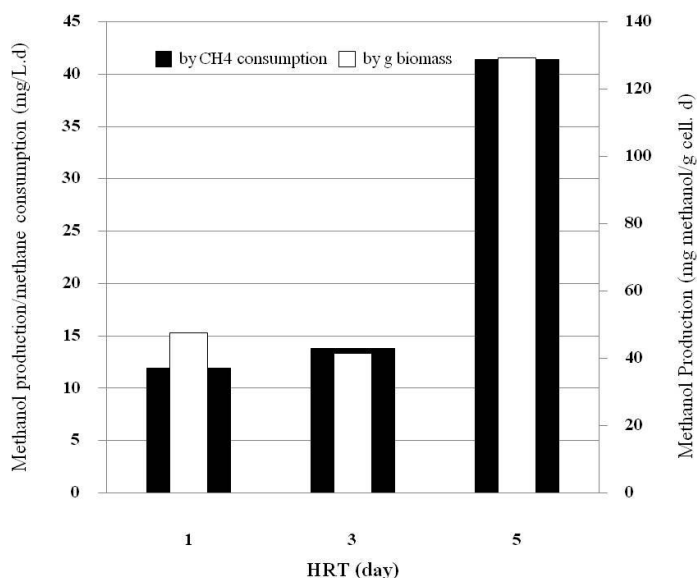
ภาพที่ 27 ปริมาณเมทานอลสะสมจากการแปรผันระยะเวลากักเก็บ

เมื่อพิจารณาเวลาที่เชื้อใช้ในการปรับตัวก่อนที่จะผลิตเมทานอล พบว่าที่ระยะเวลากักเก็บ 1 วันเชื้อใช้เวลาปรับตัวนานที่สุดคือ 7 วันของการเดินระบบก่อนที่จะผลิตเมทานอล (หรือ 7 รอบของระยะเวลากักเก็บ) เนื่องจากสภาพแวดล้อมในถังปฏิกรณ์ที่ยังไม่เสถียรพอที่จะทำให้เชื้อสามารถปรับตัวและเริ่มย่อยสลายก๊าซมีเทนให้เป็นเมทานอลภายในระยะเวลา 1 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่ระยะเวลากักเก็บ 1 วันอาจไม่เพียงพอต่อการปรับตัวของเชื้อให้เข้ากับสารละลายใหม่ที่จะถูกเปลี่ยนถ่ายไปเรื่อยๆ แต่ก็อาจมีเชื้อบางส่วนที่มีความแข็งแรงสามารถยึดเกาะกับตัวกลางได้ทันทีและปรับตัวได้ เมื่อถึงวันที่ 7 จึงสามารถผลิตเมทานอลได้จนถึงวันที่ 12 เชื้อจึงหยุดการผลิตเนื่องจากเชื้อในระบบเริ่มมีอายุมากขึ้น อีกทั้งพบว่า ปริมาณเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่ระยะเวลากักเก็บ 1 และ 3 วัน มีค่าต่ำกว่าที่ 5 วันและมีค่าลดลงอย่างช้าๆ ตามระยะเวลา แสดงให้เห็นว่า เชื้อปรับตัวได้ยาก ความแอกทีฟอาจลดลง ประกอบกับเชื้อในระบบที่มีปริมาณน้อยและจำนวนลดลงตามระยะเวลาที่เดินระบบ เนื่องจากหลุดในระหว่างเปลี่ยนถ่ายได้ (ภาพที่ 28) ส่งผลให้การผลิตเมทานอลลดลง ดังนั้นความสามารถในการผลิตเมทานอลจึงลดลงและหยุดชะงักในที่สุด



ภาพที่ 28 ปริมาณเชื้อแขวนลอยในระบบเปรียบเทียบกับที่ระยะเวลากักเก็บแตกต่างกัน

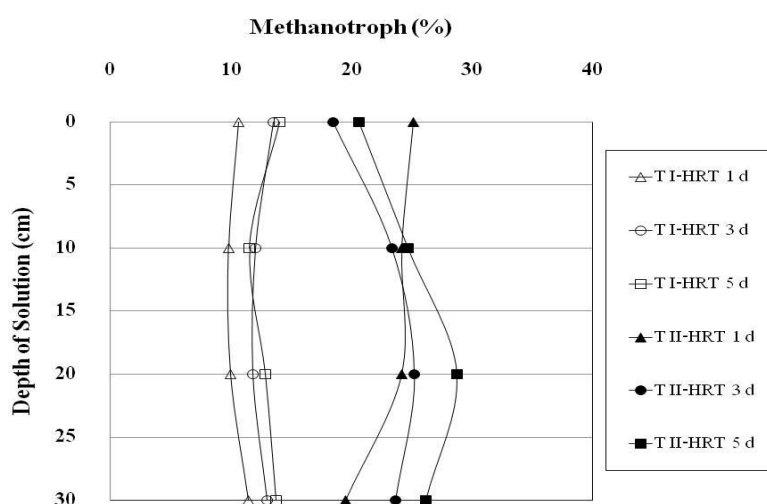
นอกจากนี้เมื่อพลอตกราฟการผลิตเมทานอลต่อมวลมีเทนที่ถูกใช้ไปและกราฟการผลิตเมทานอลต่อมวลของเชื้อในถังปฏิกรณ์ (ภาพที่ 29) พบว่า การเดินระบบด้วยตัวกลางชนิดฟองน้ำที่ระยะเวลากักเก็บสารละลาย 5 วันอัตราการผลิตเมทานอลมีค่าสูงกว่าที่ 3 และ 1 วันตามลำดับ (41.4 13.8 และ 11.9 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน) และอัตราการผลิตเมทานอลต่อมวลของเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่ระยะเวลากักเก็บ 5 วันมีค่าสูงกว่าที่ 1 และ 3 วันตามลำดับ (129.48 และ 33 มิลลิกรัมเมทานอลต่อกรัมเซลล์ต่อวัน) โดยที่ระยะเวลากักเก็บ 1 วันมีอัตราการผลิตเมทานอลสูงกว่าที่ระยะเวลากักเก็บ 3 วัน เนื่องจากปริมาณเชื้อเฉลี่ยในระบบที่ระยะเวลากักเก็บ 1 วันต่ำกว่าที่ระยะเวลากักเก็บ 3 วัน (35.37 และ 53.06 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยที่ปริมาณเมทานอลสะสมที่ถูกผลิตมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นอัตราการผลิตเมทานอลต่อมวลของเชื้อที่ระยะเวลากักเก็บ 1 วันจึงมีค่าสูงกว่า



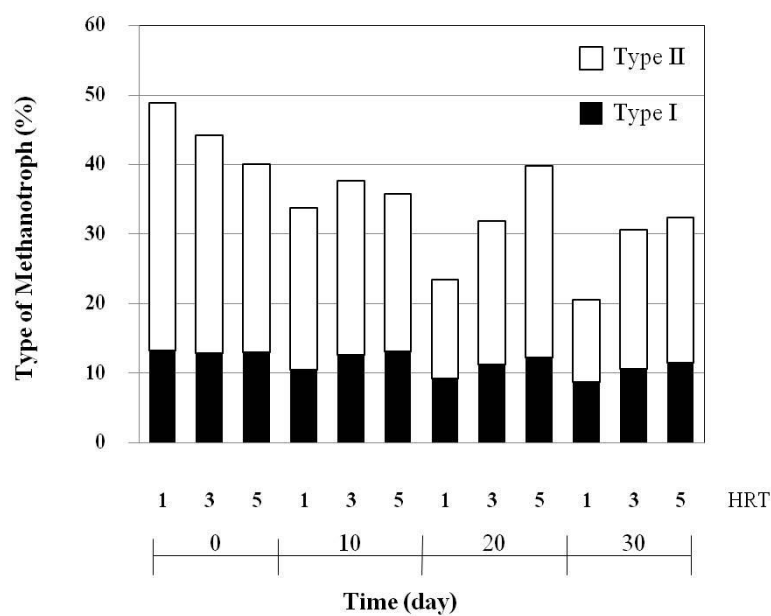
ภาพที่ 29 เมทานอลต่อมวลมีเทนที่ถูกใช้ไปและเมทานอลต่อมวลเชื้อที่ระยะเวลาพักเก็บต่างๆ

เมื่อพิจารณาชนิดและปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟ (ภาพที่ 30 และ 31) พบว่าปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟมีการเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะ Type II โดยพบว่า สัดส่วนของเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II ที่มากกว่าร้อยละ 20 จะพบการผลิตเมทานอลในทุกระยะเวลากักเก็บ แต่เมื่อเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II ลดลงจนถึงร้อยละ 10 จะไม่พบการผลิตเมทานอลในระบบ (ที่ระยะเวลาเดินระบบ 10 วัน) ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงของเชื้อเมทาโนโทรฟ Type I มีค่าแตกต่างกันเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลากักเก็บต่างๆ กันและเมื่อพิจารณาชนิดและปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟตามระดับความลึก (ภาพที่ 30) และความเข้มข้นของเมทานอลตามระดับความลึก (ภาพที่ 32 พบว่าวันที่ 15 ของการเดินระบบที่ระยะเวลากักเก็บ 5 วัน มีปริมาณเมทานอลสูงสุดที่ความลึก 20 เซนติเมตรซึ่งเป็นระดับความลึกเดียวกับที่ตรวจพบปริมาณเมทาโนโทรฟชนิด Type II สูงสุดและวันที่ 15 ของการเดินระบบที่ระยะเวลากักเก็บ 3 วันก็พบความเข้มข้นของเมทานอลที่มีค่าใกล้เคียงกันที่ความลึก 10 และ 30 เซนติเมตรเช่นเดียวกันกับที่พบเมทาโนโทรฟชนิด Type II ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันเช่นกัน จากผลการทดลองนี้ อาจชี้ให้เห็นว่า เมทาโนโทรฟชนิด Type II มีผลต่อการผลิตเมทานอลในการเดินระบบ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของเมทาโนโทรฟ Type II อาจสืบเนื่องจากการปรับตัวของเชื้อจากการเปลี่ยนสารละลายเอ็นเอ็มเอสเป็นฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกันที่ระยะเวลากักเก็บต่างๆ ส่งผลต่อการผลิตเมทานอลและปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟในระบบ และเมื่อพลอตกราฟปริมาณเชื้อในสารละลายตามระดับความลึก ณ วันที่สามารถผลิตเมทานอลได้สูงสุดแต่ละระยะเวลากักเก็บ (HRT 1 5 และ 3 วัน เท่ากับ 881 794 และ 398 ไมโคร โมลาร์ตามลำดับ) (ภาพที่ 33) พบว่า ปริมาณ

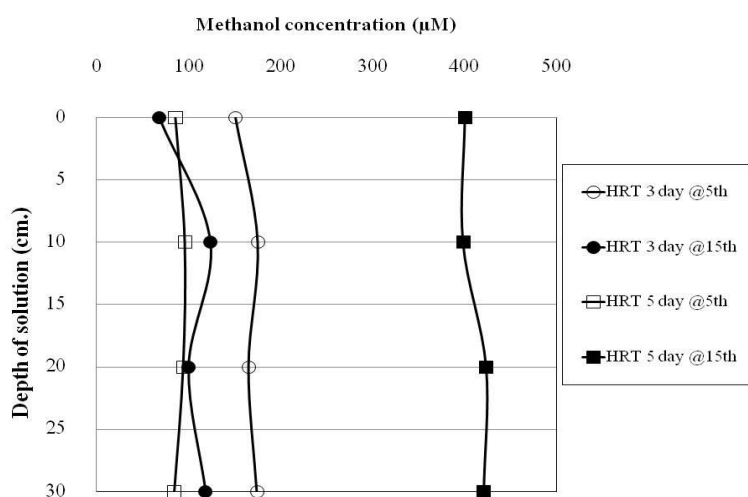
เชื้อตามระดับความลึกที่ระยะเวลาเก็บเดียวกันมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย ที่ระยะเวลากักเก็บ 3 วัน มีปริมาณเชื้อเฉลี่ยในสารละลายสูงสุด (52.5 mg/L) อาจเนื่องมาจากที่ระยะเวลากักเก็บดังกล่าว ปริมาณเชื้อในสารละลายหลุดจากการเกาะติดกับตัวกลางในระหว่างเปลี่ยนถ่ายสารละลายมากกว่า ค่าอื่นๆ ทำให้มีปริมาณเชื้อที่เกาะติดกับตัวกลางมีค่าน้อย ซึ่งเชื้อที่เกาะติดกับตัวกลางมักมีความ แอวกทีฟหรือผลิตเมทานอลได้ดีกว่าเชื้อที่แขวนลอยในระบบ ดังนั้นความเข้มข้นเมทานอลที่ผลิตได้ ดังกล่าวจึงมีค่าต่ำสุด



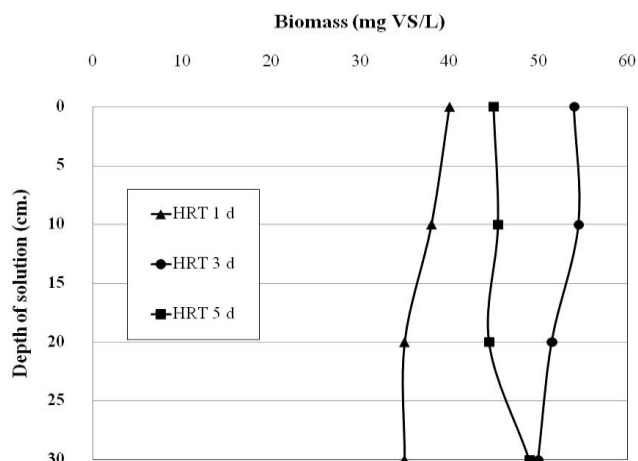
ภาพที่ 30 ชนิดและปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟในสารละลายที่ระยะเวลากักเก็บต่างๆ ตามระดับความลึก



ภาพที่ 31 ค่าเฉลี่ยชนิดของเชื้อเมทาโนโทรฟตามระยะเวลาจากการแปรผันระยะเวลากักเก็บ



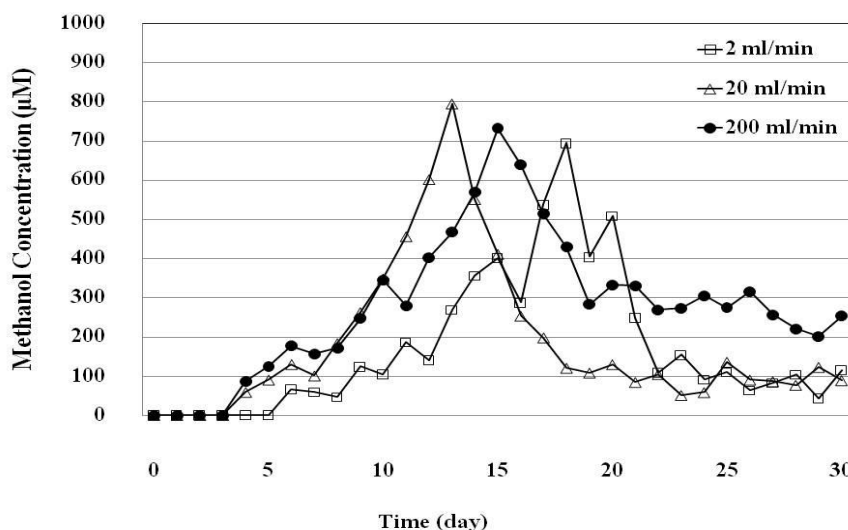
ภาพที่ 32 ความเข้มข้นของเมทานอลตามระดับความลึกที่ระยะเวลาเก็บต่างๆ
(HRT 1 วัน ไม่แสดงเนื่องจากไม่มีการผลิตเมทานอล)



ภาพที่ 33 ปริมาณเชื้อในสารละลายตามระดับความลึก ณ วันที่ความเข้มข้นเมทานอลสูงสุด ในแต่ละระยะเวลากักเก็บ

4. ผลของอัตราการหมุนเวียนสารละลายต่อการผลิตเมทานอล

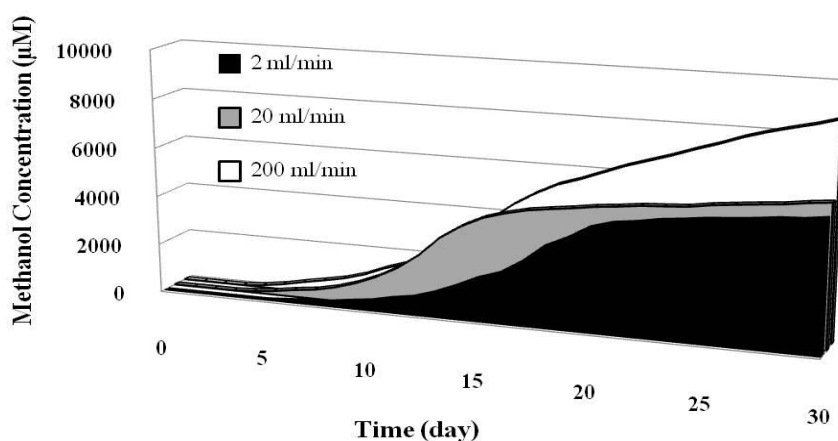
ผลการทดลองเดินระบบผลิตเมทานอลโดยเชื้อเมทาโนโทรฟเกาะบนตัวกลางชนิดฟองน้ำ ที่ระยะเวลากักเก็บสารละลาย 5 วัน โดยแปรผันอัตราการหมุนเวียนสารละลายเป็น 2 20 และ 200 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าการผลิตเมทานอลด้วยอัตราการหมุนเวียนสารละลายที่ค่าต่างๆ มีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน โดยมีช่วงปรับตัวไม่เกิน 1 รอบและมีช่วงการผลิตซึ่งความเข้มข้นของเมทานอลค่อยๆ เพิ่มขึ้นไม่เกิน 4 รอบของระยะเวลากักเก็บ โดยความเข้มข้นเมทานอลที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดที่ 694 794 และ 731 ไมโครโมลาร์ สำหรับอัตราการหมุนเวียนสารละลาย 200 20 และ 2 มิลลิลิตรต่อนาที (ภาพที่ 34) จากนั้นความเข้มข้นของเมทานอลจึงค่อยๆ มีค่าลดลงและเริ่มผลิตอย่างคงที่ในรอบที่ 5 ของระยะเวลากักเก็บ โดยอัตราเร็ว 200 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณเมทานอลที่ผลิตได้มีค่าคงที่ที่ประมาณ 300 ไมโครโมลาร์จนเสร็จสิ้นระยะเวลาการเดินระบบซึ่งมีค่าสูงกว่าที่อัตราเร็วอื่นๆ



ภาพที่ 34 ความเข้มข้นเมทานอลที่อัตราการหมุนเวียนสารละลายต่างๆ ที่ระยะเวลาเก็บ 5 วัน ในตัวกลางชนิดฟองน้ำ

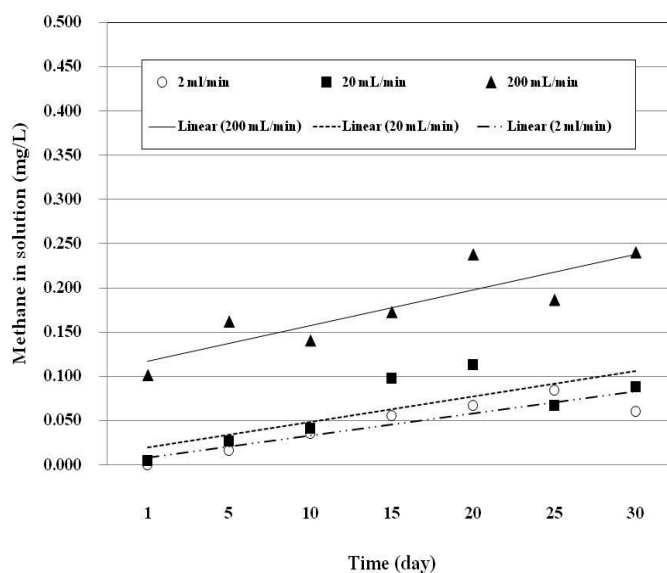
เมื่อพลอตกราฟปริมาณเมทานอลสะสมตามระยะเวลาพบว่าที่อัตราการหมุนเวียนสารละลาย 200 20 และ 2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณเมทานอลสะสมตลอดระยะเวลาการเดินระบบ 30 วันมีค่าเท่ากับ 8,648 5,699 และ 5,297 ไมโครโมลาร์และมีอัตราการผลิตเมทานอลเฉลี่ยต่อวันเท่ากับ 288.27 189.97 และ 176.57 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ (ภาพที่ 35) การพบปริมาณเมทานอลสูงสุดที่อัตราการหมุนเวียนสารละลาย 200 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากการเพิ่มอัตราเร็วในการหมุนเวียนสารละลายในระบบ ทำให้มีเทนและออกซิเจนซึ่งอยู่ในรูปของก๊าซที่ถูกปล่อยเข้าทางด้านล่างของถังปฏิกิริยามีโอกาสสัมผัสกับสารละลายที่หยดจากด้านบนสฟิวของเหลวได้มากขึ้น ก๊าซมีเทนและออกซิเจนที่อยู่เหนือผิวของเหลวจึงสามารถละลายลงไปในสารละลายและเปลี่ยนมาอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้มากขึ้นตามไปด้วย (ภาพที่ 36) ทำให้เชื้อเมทาโนโทรฟที่เกาะบนตัวกลางในระบบจึงสามารถนำก๊าซดังกล่าวไปใช้ในการผลิตเมทานอลได้มากขึ้นเช่นกัน อีกทั้งการเพิ่มอัตราเร็วในการหมุนเวียนสารละลายยังทำให้เกิดความปั่นป่วน ปริมาณออกซิเจนในสารละลายที่ระดับผิวน้ำจึงมีค่าสูงขึ้นไปด้วย (ภาพที่ 37) จากกราฟแสดงปริมาณออกซิเจนละลายน้ำตามระดับความลึกที่อัตราเร็วต่างๆ จะเห็นว่าที่อัตราเร็ว 200 มิลลิลิตรต่อนาทีที่มีค่าออกซิเจนละลายน้ำสูงกว่าที่อัตราเร็วอื่นๆ ทั้งหมด 15 วันแรกและ 15 วันหลังของการเดินระบบ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 5.25-6.76 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่อัตราเร็ว 2 และ 20 มิลลิลิตรต่อนาทีที่มีค่าอยู่ในช่วง 3.98-6.15 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มอัตราเร็วในการหมุนเวียนสารละลายมีผลให้ปริมาณออกซิเจน

สามารถละลายในน้ำได้เพิ่มขึ้น ซึ่งช่วยลดการขาดออกซิเจนในถังปฏิกิริยาเมื่อระยะเวลาในการเดินระบบยาวนานขึ้นแม้ว่าจะเป็นส่วนที่เล็กที่สุดก็ตามและช่วยให้ปฏิกิริยาในการย่อยสลายก๊าซมีเทนไปเป็นเมทานอลเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องอีกด้วย ทั้งนี้ทั้งนั้นความปั่นป่วนที่เกิดจากการเพิ่มอัตราเร็วเป็น 200 มิลลิลิตรต่อวินาทียังช่วยให้ก๊าซมีเทนสามารถละลายในสารละลายเพิ่มขึ้นได้เช่นกัน โดยพบว่าปริมาณมีเทนที่ละลายอยู่ในช่วง 19.5-24.03 % ซึ่งเพียงพอต่อการละลายของมีเทนสู่สารละลาย (ค่าปกติของการละลายมีเทนเท่ากับ 0.0266 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30° เซลเซียส) (Perry, 1963)

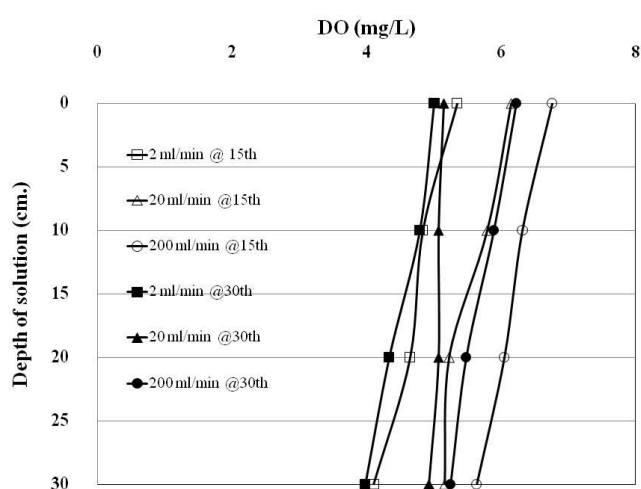


ภาพที่ 35 ปริมาณเมทานอลสะสมจากการแปรผันอัตราการหมุนเวียนสารละลาย

นอกจากนี้การเพิ่มอัตราการหมุนเวียนสารละลายในระบบ เป็นการเพิ่มแบบค่าลอการิทึม สังเกตเห็นว่าที่อัตราเร็ว 2 และ 20 มิลลิลิตรต่อวินาทีมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นพื้นที่ใต้กราฟหรือปริมาณเมทานอลสะสมที่ผลิตได้ตลอดระยะเวลาเดินระบบจึงมีค่าต่างกันเล็กน้อย (5,699 และ 5,297 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) แต่เมื่อเพิ่มอัตราเร็วเป็น 200 มิลลิลิตรต่อวินาที ปริมาณเมทานอลสะสมที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้นมากอย่างเห็นได้ชัด (8,648 ไมโครโมลาร์) และอาจมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างคงที่หากเดินระบบต่อไปอีก



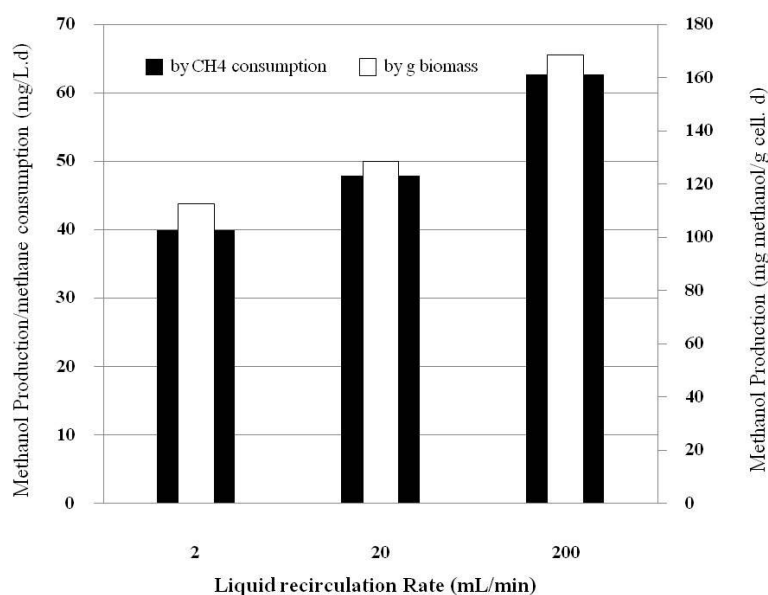
ภาพที่ 36 ปริมาณมีเทนละลายน้ำ (เฉลี่ยทุกระดับความลึก) ที่อัตราเร็วต่างๆ ตามระยะเวลา



ภาพที่ 37 ออกซิเจนละลายเฉลี่ยตามระดับความลึกที่อัตราเร็วค่าต่างๆ

เมื่อพลอตกราฟการผลิตเมทานอลต่อมวลมีเทนและการผลิตเมทานอลต่อมวลของเชื้อในถังปฏิกริยาพบว่า เมื่อใช้ตัวกลางชนิดฟองน้ำที่ระยะเวลาเก็บสารละลาย 5 วันและอัตราเร็วในการหมุนเวียนสารละลาย 200 มิลลิลิตรต่อนาที ให้อัตราการผลิตเมทานอลสูงกว่าที่ 20 และ 2

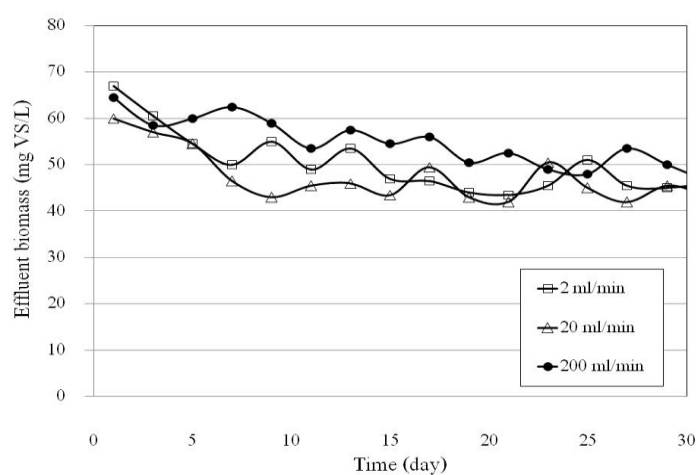
มิลลิลิตรต่อนาที่ตามลำดับ (62.81 47.92 และ 40.03 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวันและ 168.48 128.49 และ 112.51 มิลลิกรัมเมทานอลต่อกรัมเซลล์ต่อวัน) (ภาพที่ 38)



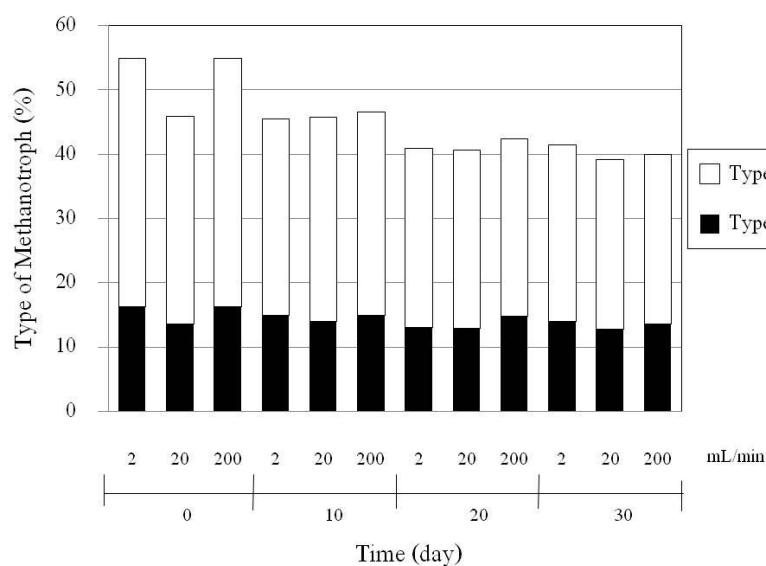
ภาพที่ 38 เมทานอลต่อมวลมีเทนที่ใช้ไปและเมทานอลต่อมวลเชื้อเมื่อแปรผัน อัตราการหมุนเวียนสารละลาย

การเพิ่มอัตราเร็วในการหมุนเวียนสารละลายช่วยให้ก๊าซมีเทนและออกซิเจนละลายในสารละลายได้มากขึ้น แต่ความปั่นป่วนที่เกิดจากการหยดของสารละลายลงบนผิวของของเหลวโดยการเพิ่มอัตราเร็ว ก็ส่งผลให้เชื้อที่เกาะกับตัวกลางบริเวณผิวของเหลวด้านบนบางส่วนหลุดและอยู่ในลักษณะแขวนลอยในสารละลายได้มากกว่าที่อัตราเร็วในการหมุนเวียนสารละลายต่ำๆ (ภาพที่ 39) สอดคล้องกับค่าเฉลี่ยของเชื้อเมทาโนโทรฟทั้งสองชนิดซึ่งมีค่ามากกว่า 40% ในตอนเริ่มเดินระบบและมีค่าลดลงน้อยกว่า 40% หลังจากเดินระบบเสร็จสิ้น การที่เชื้อมีลดลงน่าจะเนื่องจากเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่กำหนดให้หรือในสภาวะที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (N-source) และเมื่อพิจารณาปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟแต่ละชนิด พบว่าปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟ Type II มีค่าลดลงเล็กน้อยและปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟ Type I มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาที่เดินระบบ 30 วัน อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนถ่ายสารละลายที่ระยะเวลากักเก็บ 5 วัน เท่ากันทั้ง 3 ระบบ ปริมาณเชื้อภายในถังปฏิกรณ์จึงมีค่าใกล้เคียง (ภาพที่ 40) อีกทั้งการแปรผันอัตราการหมุนเวียนสารละลายในระบบที่แตกต่างกันไม่ได้ทำให้สารละลายภายในถังปฏิกรณ์ถูก

ถ่ายเทออกมา ปริมาณเชื้อในระบบจึงค่อนข้างคงที่ ซึ่งการเพิ่มอัตราการหมุนเวียนสารละลายส่งผลต่อการละลายของก๊าซมีเทนที่เพิ่มขึ้นมากกว่า ทำให้เชื้อเมทาโนโทรฟสามารถนำก๊าซดังกล่าวไปออกซิไดส์ให้เป็นเมทานอลได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ



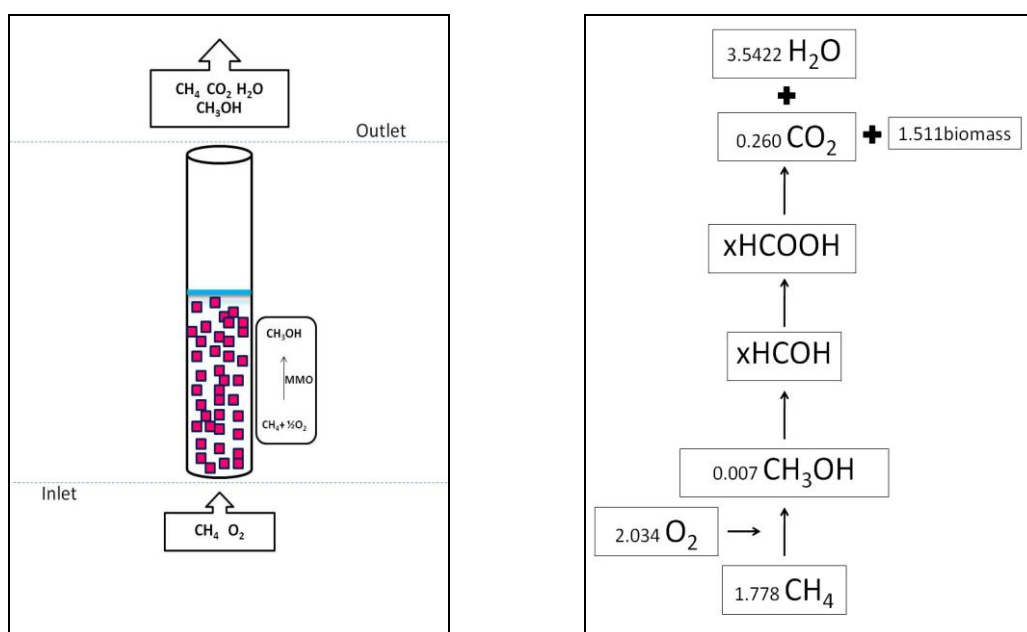
ภาพที่ 39 ปริมาณเชื้อที่หลุดจากระบบจากการแปรผันอัตราการหมุนเวียนสารละลาย



ภาพที่ 40 ค่าเฉลี่ยชนิดของเชื้อเมทาโนโทรฟจากการแปรผันอัตราการหมุนเวียนสารละลาย

5. การทำสมดุลมวลภายในระบบ

การทำสมดุลมวลสารภายในระบบประกอบด้วย 3 ส่วนคือ ส่วนแรกมีการป้อนก๊าซเข้าทางด้านล่างของถังปฏิกิริยา (Inlet) ส่วนที่สองเป็นส่วนที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นชนิดต่างๆ และส่วนสุดท้ายอยู่ด้านบนของถังปฏิกิริยาซึ่งมีการระบายก๊าซออกและมีจุดเก็บตัวอย่างสารละลายเพื่อหาปริมาณการผลิตเมทานอล (Outlet) แสดงดังภาพที่ 41



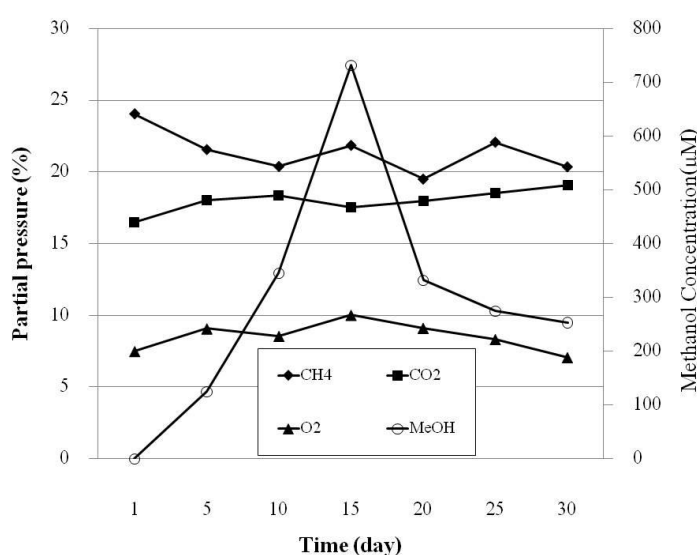
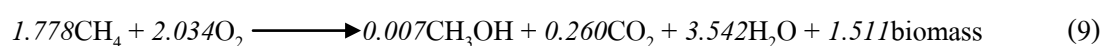
ก) ชนิดและทิศทางของมวลสารในระบบ

ข) ปริมาณมวลสารที่เข้าออกจากระบบ

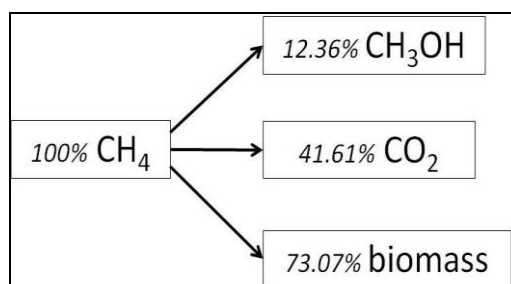
ภาพที่ 41 สมดุลมวลสารที่เข้าและออกจากระบบการผลิตเมทานอล

จากการศึกษาพบว่า ก๊าซมีเทนที่ป้อนเข้าถังปฏิกิริยาไม่ได้เปลี่ยนเป็นเมทานอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เป้าหมายทั้งหมด แต่มีบางส่วนที่ถูกย่อยสลายแล้วกลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เนื่องจากตรวจพบสัดส่วนของคาร์บอนไดออกไซด์มีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาเดินระบบ 30 วัน โดยพบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีค่าเพิ่มขึ้น 0.26 โมลและมีเทนมีค่าลดลง 0.31 โมลตลอดระยะเวลาเดินระบบ (ภาพที่ 42) โดยปกติการย่อยสลายก๊าซมีเทนของเชื้อเมทาโนโทรฟตามธรรมชาติ เมทานอลที่เกิดขึ้นเป็น Intermediate product แต่ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จริง คือ CO_2 ดังนั้นในกรณีที่สารยับยั้งการย่อยสลายเมทานอลมีความเข้มข้นไม่สูงมากนัก อาจส่งผลให้เมทานอลที่ถูกผลิตไม่

เสถียรและถูกย่อยสลายต่อกลายเป็น CO_2 ในทางตรงกันข้ามการเติมสารยับยั้งการย่อยสลายเมทานอลในความเข้มข้นที่สูงเกินไป ก็อาจส่งผลให้เกิดความเป็นพิษแก่เซลล์ได้ เช่นเดียวกับการที่มีเมทานอลสะสมในความเข้มข้นที่สูงเกินไปก็อาจส่งผลต่อการผลิตเมทานอลที่ชะงักงันได้เช่นกัน ดังนั้นการผลิตเมทานอลด้วยระบบแบบกึ่งต่อเนื่องภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจึงอาจแสดงได้ดังสมการที่ 9 และสามารถคิดร้อยละของมีเทนที่ถูกใช้ไปเพื่อเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ได้ดังภาพที่ 43



ภาพที่ 42 องค์ประกอบของก๊าซเนื้อสารละลายภายในระบบการผลิตเมทานอลที่สภาวะเหมาะสม (ตัวกลางชนิดฟองน้ำที่ HRT 5 วันและ LRR 200 mL/min)



ภาพที่ 43 ร้อยละของมีเทนที่ถูกใช้ไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การผลิตเมทานอลจากก๊าซชีวภาพด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟแบบผสมในถังปฏิกริยาชีวภาพชนิดกึ่งต่อเนื่องมีความเป็นไปได้ภายใต้สภาวะที่กำหนด ได้แก่ การเลี้ยงเชื้อเมทาโนโทรฟในสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ผสมเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้อัตราการระบายก๊าซชีวภาพและอากาศเท่ากับ 2 และ 8 มิลลิลิตรต่อนาที
2. การเลี้ยงเชื้อเมทาโนโทรฟแบบผสมบนตัวกลางชนิดฟองน้ำในถังปฏิกริยาชีวภาพชนิดกึ่งต่อเนื่องให้อัตราการผลิตเมทานอลที่มีค่า 5,699 ไมโครโมลาร์ซึ่งสูงกว่าเม็ดพลาสติกเล็กน้อย (5,032 ไมโครโมลาร์)
3. ระยะเวลาที่เก็บสารละลายในถังปฏิกริยา 5 วันให้อัตราการผลิตเมทานอลสูงสุดและมีปริมาณเมทานอลสะสมเท่ากับ 5,699 ไมโครโมลาร์ตลอดระยะเวลาการเดินระบบทั้งหมด 30 วัน โดยที่ระยะเวลาที่เก็บ 3 และ 1 วัน มีปริมาณเมทานอลสะสมเท่ากับ 1,641 และ 1,575 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ
4. อัตราการหมุนเวียนสารละลายในระบบ 200 มิลลิลิตรต่อนาที ให้อัตราการผลิตเมทานอลสูงสุดโดยสามารถผลิตความเข้มข้นเมทานอลสูงสุดได้ 731 ไมโครโมลาร์ในวันที่ 15 ของการเดินระบบ และมีปริมาณเมทานอลสะสมเท่ากับ 8,648 ไมโครโมลาร์ ตลอดระยะเวลาการเดินระบบทั้งหมด 30 วัน โดยที่อัตราการหมุนเวียน 20 และ 2 มิลลิลิตรต่อนาที มีปริมาณเมทานอลสะสมเท่ากับ 5,699 และ 5,297 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ
5. ข้อมูลการออกแบบเบื้องต้นของระบบการผลิตเมทานอลจากก๊าซชีวภาพด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟแบบผสมในถังปฏิกริยาชีวภาพชนิดกึ่งต่อเนื่อง สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เกณฑ์การออกแบบเบื้องต้น

เกณฑ์การออกแบบ	ค่าที่ใช้ในการเดินระบบ
ตัวกลาง	ฟองน้ำขนาด 1x1x1 cm
ปริมาตรตัวกลาง	80% v/v solution
ระยะเวลากักเก็บสารละลาย	5 day
อัตราการหมุนเวียนสารละลาย	0.17 cm/sec
สารละลาย	ฟอสเฟตบัพเฟอร์ 20 mM
สารยับยั้งการย่อยสลายเมทานอล	แมกนีเซียมคลอไรด์ 5 mM
อัตราการป้อนอากาศ	10 L/m ³ .min
อัตราการป้อนก๊าซมีเทน	2.5 L/ m ³ .min
ปริมาณเชื้อเริ่มต้น	60-70 mg/L
ระยะเวลาเดินระบบ	15 day

ข้อเสนอแนะ

1. ในการเดินระบบจริง ควรใช้ระยะเวลา 15 วันในการเดินระบบ เนื่องจากเป็นช่วงที่สามารถผลิตความเข้มข้นเมทานอลได้สูงสุด แล้วจึงค่อยเริ่มเดินระบบใหม่อีกครั้ง
2. ในการวิจัยขั้นต่อไป อาจเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์เข้าไปอีก เนื่องจากเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นการผลิตเมทานอล แต่ไม่ควรเติมในความเข้มข้นที่สูงเกินไป เพราะอาจทำให้เกิดการตกตะกอนของเกลือด้านล่างถังปฏิกิริยาได้ ซึ่งอาจมีผลต่อการระบายก๊าซและอากาศเข้าสู่ถังปฏิกิริยาได้
3. ในการทดลองครั้งต่อไป นอกจากการผลิตเมทานอลแล้ว ควรทำการศึกษาอนุพันธ์ของเมทานอลตัวอื่นๆ ที่เชื้อเมทาโนโทรฟสามารถผลิตได้ด้วย เนื่องจากก๊าซมีเทนไม่ได้ถูกย่อยสลายเป็นเมทานอลทั้งหมด
4. ในการวิจัยขั้นต่อไป อาจทำการเพิ่มอัตราเร็วในการหมุนเวียนสารละลายให้มากขึ้น เพื่อให้ก๊าซมีเทนสามารถละลายน้ำได้มากขึ้นไปอีก
5. ในการแปรผันค่าระยะเวลากักเก็บสารละลาย ควรหาอุปกรณ์ที่สามารถป้องกันการหลุดของเชื้อในระบบในช่วงที่มีการเปลี่ยนถ่ายสารละลายด้วย เช่น ฟิลเตอร์
6. อาจออกแบบถังปฏิกิริยาให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยลงและเพิ่มความสูงมากขึ้น โดยปริมาตรรวมยังคงที่ เพื่อให้มีระยะเวลาสัมผัส (Contact time) ระหว่างก๊าซและของเหลวที่หยดลงมากขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. 2538. คู่มือการจัดการน้ำเสียจากฟาร์มสุกรโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ. กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.
- คุชฎี ชนะบริพัฒน์. 2546. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ครั้งที่ 3. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- พิชญา สัมเกลี้ยง, วิไล เจียมไชยศรี และ ชาดิ เจียมไชยศรี. 2551. การจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟโดยเทคนิคพีชและวัดอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย. วารสารวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมไทย 22 (1): 75-87.
- สมพงษ์ ใจมา. 2549. แนวทางการนำก๊าซชีวภาพไปใช้ประโยชน์เป็นพลังงานทดแทน. เกษตรกรรมธรรมชาติ ศูนย์สื่อสารเพื่อการพัฒนา 9: 55-58.
- สยามมล พิมพ์ทอง. 2551. การผลิตเมทานอลจากมีเทนด้วยเชื้อเมทาโนโทรฟ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุเทพ สิริวิทยาปกรณ์. 2549. เทคโนโลยีน้ำเสีย. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เสริมพล รัตสุข และ ไชยยุทธ กลิ่นสุคนธ์. 2527. การกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและแหล่งชุมชน. สถาบันวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.
- Amaral, J.A. and R. Knowles. 1994. Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradient. **Microbiology Letters** 126: 215-220.
- Anthony, C. 1982. **The Biochemistry of Methylotroph**. Academic Press Ltd., London.

- Anthony, C. 1986. Bacterial oxidation of methane and methanol. **Advanced Microbiology and Physiology** 27: 113-210.
- Anthony, C. and P. Williams. 2003. The structure and mechanism of methanol dehydrogenase. **Biochemica et Biophysica Acta** (1674): 18-23.
- Bauman, J.G., J. Wiegant, P. Borst and P. van Duijn. 1980. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. **Exp. Cell Res.** 128: 485-490.
- Boeckx, P. and O.V. Cleemput. 1996. Methane oxidation in a neutral landfill cover soil: influence of moisture content, temperature and nitrogen-turnover. **Journal of Environmental Quality** 25: 178-183.
- Bowman, J.P., L.I. Sly, P.D. Nichols and A.C. Hayward. 1993. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *methylobacter* gen. nov., emendation of *methylococcus*, validation of *methylosinus* and *methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceas* includes only the group I methanotrophs. **Journal Systematic Bacteriology** 43: 178-183.
- Carver, M.A., K.M. Humphrey, R.A. Patchett and C.W. Jones. 1984. The effect of EDTA and related chelating agents on the oxidation of methanol by the methylotrophic bacterium, *Methylophilus methylotrophus*. **European Journal of Biochemistry** 138 (3): 611-615.
- Chae, K.J., T. Rameshwar, A. Jang, S.H. Kim and I.S. Kim. 2008. Analysis of nitrifying bacterial community in biocube sponge media using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and microelectrodes. **Environmental Management** 88(4): 1426-35.

- Chiemchaisri, W., J.S. Wu and C. Visvanathan. 2001. Methanotrophic production of extracellular polysaccharide in landfill cover soils. **Water Science and technology** 43 (6): 151-159.
- Cox J.M., J.M. Day and C. Anthony. 1992. The interaction of methanol dehydrogenase and its electron acceptor, cytochrome c_L in methanotroph. **Biochim.Biophys.Acta.** (1119): 97-106.
- Dales, S.L. and C. Anthony. 1995. The interaction of methanol dehydrogenase and its cytochrome electron acceptor. **Biochemical Journal.** 312: 261-265.
- Davis, L.N. 1980. Gambling of 'Frozen Fire'. **New Scientist** 85: 70.
- Dedysh, N.S., P.F. Dunfield, M. Derakshani, S. Stubner, J. Heyer and W. Liesack. 2003. Differential detection of Type II methanotrophic bacteria in acidic peatlands using newly developed 16S rRNA-targeted fluorescent oligonucleotide probes. **FEMS Microbiol. Ecol** 43: 299-308.
- Dispirito, A.A., J. Gullledge, J.C. Murrell, A.K. Shiemke, M.E. Lidstrom and C.L. Krema. 1992. Trichloroethylene oxidation by membrane associated methane monooxygenase in Type I, Type II and Type X methanotrophs. **Biodegradation** 2: 151-164.
- Dolan, M.E. and P.L. McCarty. 1995. Methanotrophic chloroethene transformation capacities and 1,1-dichloroethene transformation product toxicity. **Environmental Science and Technology** 29 (11): 2741-2747.
- Eller, G., S. Stubner and P. Frenzel. 2001. Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of Type I and Type II methanotroph by fluorescence *in situ* hybridization. **FEMS Microbiol. Lett** 198: 91-97.

- EMCON Associate. 1980. Methane generation and recovery from landfills. Ann Arbor Science. Michigan, USA.
- Fogel, M.M., A.R. Taddeo and S. Fogel. 1986. Biodegradation of chlorinated ethenes by a methane-utilizing mixed culture. **Applied and Environmental Microbiology** 51 (4): 720-724.
- Fox, B.G., W.A. Froland, D.R. Jollie and J.D. Lipscomp. 1990. Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Meth. Enzymol** 188: 191-202.
- Frank, J.Jr., S.H.V. Krimpen, P.E.J. Verwiel, J.A. Jongejan, A.C. Mulder and J.A. Duine. 1989. On the mechanism of inhibition of methanol dehydrogenase by cyclopropane-derived inhibitors. **European Journal of Biochemistry** 184 (1): 187-195.
- Furuto, T., M. Takeguchi and I. Okura. 1999. Semicontinuous methanol biocatalysis by *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Molecular Catalysis Chemical** 144: 257-261.
- Gall, J.G. and M.L. Pardue. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proc Natl Acad Sci (USA)** 63: 378-383.
- Ghisalba, O. and F. Heinzer. 1982. Methanol from methane: a hypothetical microbial conversion compared with the chemical process. Basel, Switzerland. **Experientia** (38): 218-223.
- Hanson, R.S. and T.E. Hanson. 1996. Methanotrophic bacteria. **Microbiology Reviews** 60 (20): 439-471.
- Hatch, L.F. and S. Matar. 1977. From hydrocarbons to petrochemicals. **Hydrocarbon processing** pp 165-173.

Higgins, I.J., D.J. Best, R.C. Hammond and D. Scott. 1981. Methane-oxidizing microorganism. **Microbiol. Rev.** 45 (4): 556-590.

Hocking M.B. 1998. **Handbook of Chemical Technology and Pollution Control.** , Academic Press, San Diego, California. 12-14.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 2001. **The scientific basis-contribution of working group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC).** Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Japan Meteorological Agency. 1997. World Meteorological Organization WDCGG Data Report. 4: (12) 47-115.

John, H.A. *et al.* 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. **Nature** 223: 582-587.

Khalil, M.A.K. and R.A. Rasmusen. 1985. Cause of increasing atmospheric methane. **Atmos. Environ** (19): 397-407.

Kreileman, G.J.J. and A.F. Bouwman. 1994. Computing land use emission of green house gases. **Water Air and Soil Pollution** 76 (2): 231-257.

Kune, H., H. Sahm and F. Wagner. 1976. Methanol: a fermentation substrate. **Eur. J. Appl. Microbiol** 2: 175-184.

Lee, S.G., J.H. Goo, H.G. Kim, J.I. Oh, Y.M. Kim and S.W. Kim. 2004. Optimization of methanol biosynthesis from methane using *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Biotechnology Letters** 26 (11): 947-950.

- Malashenko, Y., I. Sokolov and V. Romanovskaya. 2000. Role of monooxygenase reaction during assimilation of non-growth substrates by methanotrophs. **Molecular Catalysis B, Enzymatic** (10): 305-312.
- Marchionna, A.Y., M. D. Girolamo, L. Tagliabue, M.J. Spangler and T.H. Fleisch. 1998. A review of low temperature methanol synthesis. **Studies in Surface Science and Catalysis** (199): 539-544.
- Metcalf and Eddy, Inc. (revised by Tchobanoglous, G., L.B. Franklin and H.D. Stensel). 2004. **Wastewater Engineering Treatment and Reuse**. 4 ed. McGrawHill, NY.
- Murrell, J.C., I.R. McDonald and B. Gibert. 2000. Regulation of expression of methane monooxygenase by copper ion. **Trend in Microbiology** 8 (5): 221-225.
- Murrell, J.C., I.R. McDonald and D.G. Bourne. 1998. Molecular methods for the study of methanotroph ecology. **Microbiology Ecology** 27: 103-114.
- Noriyuki, K., M. Akimitsu, K. Thoshiaki and O. Ichiro. 2002. Effect of acetate and lactate on the methane monooxygenase activity of *Methylosinus trichosporium* OB3b. **9th International SPACC Symposium**, Waseda University.
- Nozhevnikova, A.N., V.K. Nekrasova, V.S. Lebedev and A.B. Lifshits. 1993. Microbiological processes in landfills. **Water Science and Technology** 27 (2): 243-252.
- Okubo, K., T. Kodaki and T. Sakawa. 2000. Advanced Functional Materials Research Section. <http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/press/AR/AR-00/00023.PDF>
- Oldenhuis, R., J.Y. Oedzes, J.J. Van der Waarde and D.B. Janssen. 1991. Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and toxicity of trichloroethylene. **Applied and Environmental Microbiology** 57: 7-14.

- Park, S., M.L. Hanna, R.T. Taylor and M.W. Droege. 1991. Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b. i. production of soluble methane monooxygenase. **Biotechnology and Bioengineering** 38 (4): 423-433.
- Patel, R.N., C.T. Hou, A.I. Laskin, A. Felix and P. Derelanko. 1980. Microbial oxidation of gaseous hydrocarbons: production of methylketones from corresponding n-alkanes by methane-utilizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 39 (4): 727-733.
- Ramanathan, V., J. Cicerone, H.B. Singh and J.T. Kuehl. 1985. trace gas trends and their potential role in climate change. **Journal of Geophys. Res** (90): 5547-5566.
- Reddy, S.Y. and T.C. Bruice. 2004. Determination of enzyme mechanisms by molecular dynamics: studies on quinoproteins, methanol dehydrogenase and soluble glucose dehydrogenase. **Protein Science** 13: 1965-1978.
- Rowell, R.M. and A.E. Hokanson. 1979. Methanol from wood: a critical assessment, in progress in biomass, conversion. Volume 1 Academic Press, New York.
- Sawyer, C. N., P.L. McCarty and G.F. Parkin. 2003. **Chemistry for Environmental Engineering and Science fifth edition**. 5 ed. McGraw-Hill, NewYork.
- Shimoda, M. and I. Okura. 1991. Selective inhibition of methanol dehydrogenase from *Methylosinus trichosporium* (OB3b) by cyclopropanol. **Journal of Molecular catalysis** 64: 23-25.
- Sugimori, D., M. Takeguchi and I. Okura. 1995. Biocatalytic methanol from methane with *Methylosinus trichosporium* OB3b; an approach to improve methanol accumulation. **Biotechnology Letters** 17 (8): 783-784.

Tchobanoglous, G., H. Theisen and S.A. Vigil. 1993. **Integrated Solid Waste Management**. McGrawHill, NY.

The Learning Module on Earth Science and Astronomy (LESA). (2003)

Visvanathan, C., D. Pokhrel, W. Chiemchaisri, J.P.A. Hettiaratchi and J.S. Wu. 1999.

Methanotrophic activities in tropical landfill cover soils: effects of temperature, moisture content and methane concentration.. **Waste Management and Research** 17: 313-323.

Whalen, S.C., W.S. Reeburg and K.A. Sandbeck. 1990. Rapid methane oxidation rate in landfill cover soil. **Applied and Environmental Microbiology** 56 (11): 3405-3411.

Wilson, J.T. and B.H. Wilson. 1987. Biotransformation of trichloroethylene in soil. **Applied and Environmental Microbiology** 49 (1): 242-243.

Witternburg, R., K.C. Phillips and J.F. Wilkinson. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. **Journal of General Microbiology** 61 (3): 219-226.

Xin, J.Y., J.R. Cui, J.Z. Niu, S.F. Hua, C.G. Xia, S.B. Li and L.M. Zhu. 2004. Biosynthesis of methanol from CO₂ and CH₄ by methanotrophic bacteria. **Biotechnology** 3 (1): 67-71.

Xing, X., H. Wu., M. Luo and B. Wang. 2006. Effects of organics on growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Biochemical Engineering** 31: 113-117.

Yu, C., S. Xia, R. Chen and S. Li. 1995. Methanol biosynthesis by methanotrophic bacterial cells: effects of various immobilization methods on biocatalytic activity of immobilized cellsa. **Annals of the New York Academy of Sciences** 864 (1): 609-615.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมี วัสดุและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ็มเอส (nitrate mineral salt: NMS)

ส่วนประกอบ

MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	กรัม
KNO ₃	1	กรัม
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0.717	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.272	กรัม
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.2	กรัม
Ferric ammonium EDTA	0.004	กรัม
trace element solution	0.5	มิลลิลิตร

trace element solution

EDTA	0.5	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.003	กรัม
HBO	0.03	กรัม
⁵⁵ CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.02	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.001	กรัม
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.002	กรัม
22Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.003	กรัม
distilled water	1.0	ลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เป็น 6.9 แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

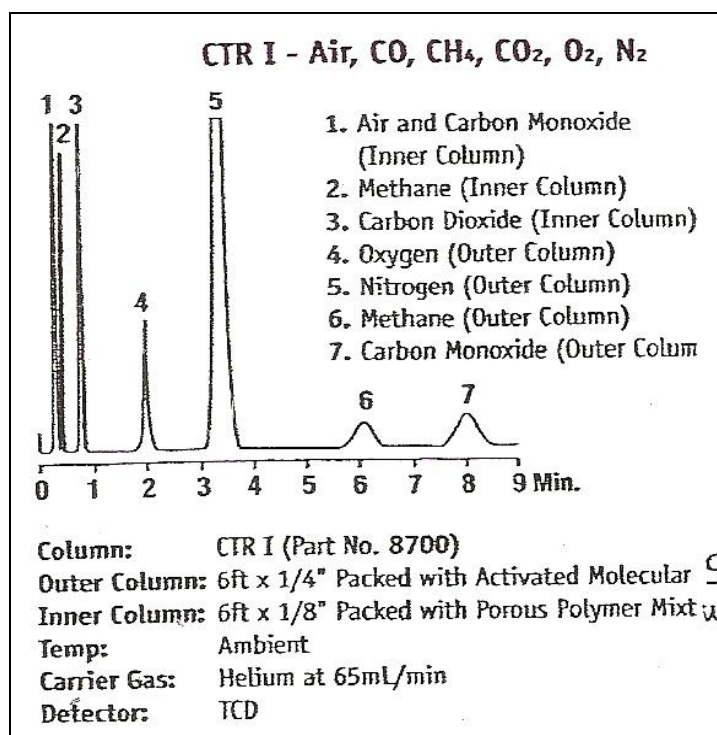
2. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบ

K_2HPO_4	2.1402	กรัม
KH_2PO_4	1.0472	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เป็น 7.0 แล้วนำสารละลายดังกล่าวไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซ



ภาพผนวกที่ ก1 ชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซ



ภาพผนวกที่ ก2 อุปกรณ์ต่อเข้าถึงปฏิกิริยา



ภาพผนวกที่ ก3 อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการศึกษาเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยเทคนิคพีชและ
การเตรียมตัวอย่างก่อนส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

1. ขั้นตอนการศึกษาและวิเคราะห์จำนวนเชื้อเมทาโนโทรฟ Type I และ Type II ด้วยเทคนิคฟิช

ขั้นแรกเริ่มจากนำตัวอย่างที่ต้องการจะศึกษา มา fixed cells เพื่อช่วยให้เซลล์คงสภาพ หลังจากที่ได้เก็บตัวอย่างมา เมื่อผ่านขั้นตอนนี้ตัวอย่างจะอยู่ในรูปสารละลาย ต่อมานำ fixed cells ดังกล่าวมาเกลี่ยลงบน slide หลุม สำหรับการทำให้ FISH ซึ่ง slide ที่นำมาใช้นั้นต้องผ่านกระบวนการเคลือบก่อนเพื่อช่วยให้ตัวอย่างที่มองผ่านกล้องมีความคมชัดขึ้น ซึ่งขั้นตอนการ fixed cell และการเคลือบ slide นั้น จะใช้วิธีการใดขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อว่าเป็นแกรมบวกหรือแกรมลบ จากนั้นทำการ immobilization cells ด้วย EtOH 3 ความเข้มข้นคือ 50% 80% และ 98% ตามลำดับ เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ และเป็นการตรึงเซลล์ให้อยู่บน slide ถัดมาเป็นขั้นตอนสำคัญสุดนั่นคือการ hybridization ซึ่งเป็นการทำให้ probes ไปจับกับสายดีเอ็นเอของเชื้อที่ต้องการวิเคราะห์ โดยทำในสภาวะที่เหมาะสมซึ่งขึ้นกับชนิดของ probe ที่ใช้ด้วย จากนั้นทำการ washing เพื่อล้างส่วนที่ไม่ต้องการออกไป

probes คือสายดีเอ็นเอเส้นสั้นๆ มีความยาวประมาณ 20 เบส ในขั้นนี้ทำการติดสารเรืองแสงที่ปลาย probes ใช้สีที่ช่วยให้มองเห็นภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ในช่วงความยาวคลื่นสีเขียว

เมื่อผ่านขั้นตอนการติด probes แล้ว ทำการติดสารเรืองแสงอีกชนิดในตัวอย่างเดียวกันเพื่อใช้เปรียบเทียบปริมาณเชื้อ ในขั้นนี้ใช้ dapi ซึ่งมองเห็นในช่วงความยาวคลื่นสีน้ำเงิน เมื่อติดสารเรืองแสงครบ 2 สี ทำการหยด antifade reagent ในแต่ละหลุม เพื่อป้องกันการเลือนหาย (fade) ของสารเรืองแสง โดย antifade มีส่วนช่วยให้ส่องตัวอย่างได้นานขึ้น จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์แบบยาว ทาขอบสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บเพื่อกันเลือน จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

จากนั้นนำสไลด์ที่เตรียมเสร็จมาส่องภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ เพื่อดูการเรืองแสงของเชื้อ แล้วทำการถ่ายภาพผ่านกล้องจุลทรรศน์ และสุดท้ายนำภาพที่ถ่ายไปวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแต่ละชนิดต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างก่อนส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)

ตารางผนวกที่ ข1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

	Chemical	Temperature	Time	Repetitions
Primary fixation	2.5% glutaraldehyde in distilled water	room or 0-4°C	1-2 hours or microwave*	1
Wash	distilled water	room or 0-4°C	10-20 minutes	3-5
Secondary fixation	1-4% osmium tetroxide in distilled water	room or 0-4°C	1-2 hours	1
Wash	distilled water	room or 0-4°C	10-20 minutes	3-5
Dehydration	25% ethanol	room or 0-4°C	10 minutes	1
	50% ethanol		10 minutes	1
	70-75% ethanol		10 minutes	1
	90-95% ethanol		10 minutes	1
	100% ethanol		10 minutes	2
Critical point dry				
Mount on specimen stub with silver paste or graphite				
Coat with gold/palladium alloy				
Store stubs in desiccator				

* MICROWAVE FIXATION

- Place glass and grid sheet in microwave with numbered coordinates aligned with left edge of plate.
- Place 400-ml beaker with 300 ml distilled water in back left corner of the oven.
- Heat on COOK 1-2 min.

- Replace heated beaker with fresh beaker of water (same amount and same position in microwave)
- Place 3 ml of sample in fixative in flat bottom glass tube.
- Place tube on square at X-18 coordinates.
- Heat 15 sec on COOK 1.

ภาคผนวก ค
การคำนวณและผลการทดลอง

1. การคำนวณปริมาณตัวกลาง

a. เม็ดพลาสติก

$$\text{เส้นผ่านศูนย์กลาง} = 5 \text{ มม.}$$

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ผิว} &= 4\pi r^2 \\ &= 4 \times 3.14 \times (2.5 \times 10^{-3})^2 \\ &= 7.85 \times 10^{-5} \text{ ม}^2 \end{aligned}$$

$$\text{Working volume} = 800 \text{ มล. มีค่าเทียบเท่า Working depth} = 40 \text{ ซม.}$$

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการเติมตัวกลางในสัดส่วน 30-40 % ของ working depth

$$\begin{aligned} \text{เพราะฉะนั้น จึงเติมตัวกลาง} &= 0.35 \times 0.4 \\ &= 0.14 \text{ ม. หรือประมาณ 6,500 ชั้น} \\ \text{พื้นที่ผิวรวมทั้งหมดของตัวกลาง} &= \text{พื้นที่ผิวตัวกลาง 1 ชั้น} \times \text{จำนวนตัวกลาง} \\ &= 7.85 \times 10^{-5} \times 6,500 \\ &= 0.51 \text{ ม}^2 \\ \text{ปริมาตรรวมทั้งหมดของตัวกลาง} &= 0.51 \times 0.14 \\ &= 0.071 \text{ ม}^3 \end{aligned}$$

b. ฟองน้ำ

$$\begin{aligned} \text{กว้าง, ยาว, สูง} &= 1 \text{ ซม.} \\ \text{พื้นที่ผิว} &= 6 \times (\text{กว้าง} \times \text{ยาว}) \\ &= 6 \times 10^{-2} \times 10^{-2} \\ &= 6 \times 10^{-4} \text{ ม}^2 \end{aligned}$$

$$\text{Working volume} = 800 \text{ มล. มีค่าเทียบเท่า Working depth} = 40 \text{ ซม.}$$

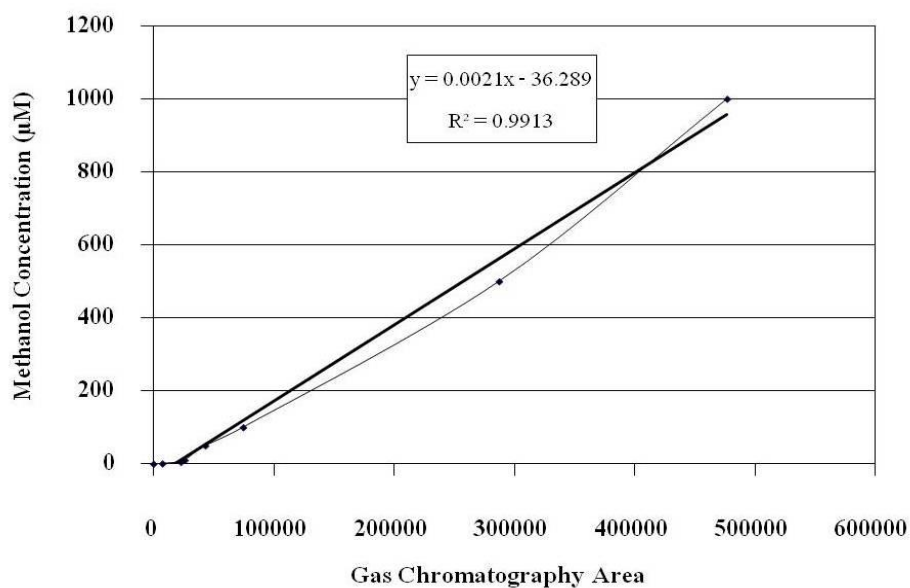
จากการศึกษาที่ผ่านมา เพื่อให้ได้ปริมาตรรวมทั้งหมดของตัวกลางเท่ากับเม็ดพลาสติก

$$0.071 \text{ ม}^3 \text{ จึงต้องเติมตัวกลาง ในสัดส่วน 80 \% ของ working depth} = 0.80 \times 0.4 = 0.32 \text{ ม.}$$

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ผิวรวมทั้งหมดของตัวกลาง} &= \text{ปริมาตรรวมทั้งหมดของตัวกลาง} / \text{ความสูงของชั้นตัวกลาง} \\ &= 0.071 / 0.32 \\ &= 0.22 \text{ ม}^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{จำนวนตัวกลางทั้งหมด} &= \frac{\text{พื้นที่ผิวรวมทั้งหมดของตัวกลาง}}{\text{พื้นที่ผิวตัวกลาง 1 ชั้น}} \\
 &= 0.22/6 \times 10^{-4} \\
 &= 367 \text{ ชั้น}
 \end{aligned}$$

2. การคำนวณปริมาณเมทานอล



ภาพผนวกที่ ค1 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นเมทานอลกับพื้นที่ใต้กราฟโครมาโตกราฟ

ตัวอย่าง

$$\begin{aligned}
 \text{พื้นที่กราฟโครมาโตกราฟ} &= 250,000 \\
 \text{ความเข้มข้นของเมทานอล} &= 0.0021(250,000) - 36.29 \\
 &= 488.71 \text{ } \mu\text{M} \\
 \text{หรือปริมาณเมทานอล} &= 488.71 \text{ } \mu\text{mol/L} \times 800 \text{ mL} \\
 &= 390.97 \text{ } \mu\text{mol CH}_3\text{OH}
 \end{aligned}$$

3. การคำนวณปริมาณมีเทน

3.1 Mixture gas CH₄:CO₂ (60:40) upflow

$$\begin{aligned}
 \text{กำหนดให้ } \text{CH}_4 \text{ feeding} &= 2 \text{ mL/min} \\
 &= 2.88 \text{ L/d} \\
 \text{จาก } PV &= nRT \\
 n &= PV/RT \\
 \frac{g \text{ CH}_4}{d} &= \left[\frac{\text{percentage}}{100} \times MW \times \frac{1}{RT} \right] \frac{g}{L} \times 2.88 \frac{L}{d} \dots (1) \\
 &= \left[\frac{60}{100} \times 16 \times \frac{1}{0.08205 \times (273+30)} \right] \frac{g}{L} \times 2.88 \frac{L}{d} \\
 &= 1.112 \text{ g/day}
 \end{aligned}$$

3.2 CH₄ in headspace (ใช้สูตร PV = nRT; V= 1.2 L)

ตารางผนวกที่ ค1 องค์ประกอบของก๊าซในถังปฏิกิริยา

Gas	Area	Correction Factor	Correction Area (Area * Corr. F)
CH ₄	3367.91	1.00	3367.91
CO ₂	817.91	0.7	572.54
O ₂	2141.83	0.45	963.82
N ₂	11453.10	0.55	6299.21

$$\begin{aligned}
 \text{วิธีคิด } \% \text{ CH}_4 &= \frac{\text{Correction Area of CH}_4}{\text{Total Correction Area}} \times 100 \\
 &= \frac{3367.91}{3367.91+572.54+963.82+6299.21} \times 100
 \end{aligned}$$

$$= 30.06$$

3.3 CH₄ in solution (สามารถคำนวณโดยอาศัย Henry's law)

จากสมการ	P_g	=	$\frac{H(X_g)}{P_T}$
โดย	P_g	=	สัดส่วนโมลของก๊าซในอากาศ (mol gas/mol air)
	H	=	ค่าคงที่ของก๊าซตามกฎของเฮนรี (atm . $\frac{\text{mol gas/mol air}}{\text{mol gas/mol water}}$)
	P_T	=	ความดันทั้งหมด (1 atm)
	X_g	=	สัดส่วนโมลของก๊าซในน้ำ (mol gas/mol water)
	X_g	=	$n_g / (n_g + n_w)$
	n_g	=	โมลของก๊าซในอากาศ
	n_w	=	โมลของก๊าซในน้ำ

ตัวอย่าง พื้นที่ใต้กราฟของมีเทนจากบรรยากาศเหนือสารละลายในถังปฏิกิริยาชีวภาพเท่ากับ 12 %
จากก๊าซทั้งหมด ดังค่าการละลายอิมตัวของมีเทนในสารละลาย

จากสมการ	P_g	=	$\frac{H(X_g)}{P_T}$
แทนค่า	P_g	=	0.12 mol CH ₄ /mol air
	H	=	37,600 (ที่มา: Metcalf and Eddy, Inc. 2004)
	P_T	=	ความดันทั้งหมด (1 atm)
ดังนั้น	X_g	=	$\frac{P_g \cdot P_T}{H}$
		=	$\frac{(0.12 \text{ mol CH}_4/\text{mol air})(1 \text{ atm})}{37,600 \text{ (atm. } \frac{\text{mol CH}_4/\text{mol air}}{\text{mol CH}_4/\text{mol water}})}$
		=	$3.19 \times 10^{-6} \text{ mol CH}_4/\text{mol water}$

น้ำ 1 ลิตร เท่ากับ น้ำ 1 กิโลกรัม เท่ากับ 1,000 กรัม

มวลโมเลกุลของน้ำ เท่ากับ 18 ดังนั้น โมลของน้ำ 1,000 กรัม เท่ากับ $1,000/18 = 55.6$ โมล

$$\begin{aligned}
 \text{จาก} \quad X_g &= n_g / (n_g + n_w) \\
 \text{ดังนั้น} \quad 3.19 \times 10^{-6} &= n_g / (n_g + 55.6) \\
 \text{เนื่องจาก} \quad n_g + 55.6 &= 55.6 \text{ (เนื่องจาก } n_g \text{ มีค่าน้อยมาก)} \\
 n_g &= 1.77 \times 10^{-4} \text{ mol} \\
 \text{เพราะฉะนั้น} \quad C_s &= (1.77 \times 10^{-4} \text{ mol/L})(16 \text{ g/mol})(1000 \text{ mg/g}) \\
 &= 2.84 \text{ mg/L}
 \end{aligned}$$

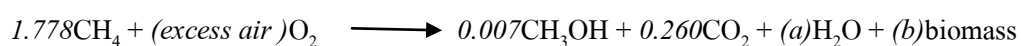
4. การคำนวณสมดุลมวลสารในระบบ

(อ้างอิงข้อมูลจากตารางผนวกและจากการทดลองจริงคิดจากมวลสารที่เปลี่ยนแปลง

ตลอดระยะเวลาเดินระบบ 30 วัน)

$$\begin{aligned}
 \text{CH}_4 \text{ consumption} &= \text{CH}_4 \text{ feeding} - \text{CH}_4 \text{ in headspace} \\
 \text{CH}_4 \text{ consumption} &= 2.088 \text{ mol/mnth} - 0.31 \text{ mol/mnth} \\
 &= 1.778 \text{ mol/mnth} \\
 \text{CO}_2 \text{ ที่เกิดขึ้น} &= \text{CO}_2 \text{ in headspace} \\
 &= 0.26 \text{ mol/mnth} \\
 \text{CH}_3\text{OH} &= 8,648 \mu\text{M} \text{ หรือเท่ากับ } 0.0069 \text{ mol in 800 mL sol.}
 \end{aligned}$$

จากนั้นจึงนำค่าต่างๆที่คำนวณได้มาดุลสมการการผลิตเมทานอลเพื่อหาค่า excess air, a และ b เพื่อให้สมการสมบูรณ์



ตารางผนวกที่ ค2 ความเข้มข้นเมทานอลเฉลี่ยโดยตัวกลางแต่ละชนิด

วันที่	ความเข้มข้นเมทานอล (μM)	
	เม็ดพลาสติก	ฟองน้ำ
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	58.92
5	27.99	90.33
6	45.15	130.2
7	80.5	100.9
8	78.37	183.26
9	126.55	262.51
10	159.1	348.42
11	234.85	456.05
12	366.98	601.74
13	427.03	794.45
14	519.76	551
15	525.58	411.18
16	445.09	253.38
17	280.75	198.05
18	286.67	120.54
19	194.53	108.21
20	152.11	129.78
21	218.4	84.46
22	145.95	104.7
23	100.62	51.09
24	67.85	58.5
25	87.39	135.75
26	46.01	90.54
27	103.42	86.24
28	85.48	77.01
29	69.98	122.8
30	75.04	88.95

ตารางผนวกที่ ค3 ความเข้มข้นเมทานอลเฉลี่ยแต่ละระยะเวลากักเก็บ

วันที่	ความเข้มข้นเมทานอล (μM)		
	HRT 1 วัน	HRT 3 วัน	HRT 5 วัน
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	144.55	0
4	0	398.23	58.92
5	0	166.41	90.33
6	0	131.82	130.2
7	36.91	122.67	100.9
8	156.61	97.52	183.26
9	881.19	83.1	262.51
10	402.03	76.42	348.42
11	98.05	65.39	456.05
12	0	82.98	601.74
13	0	95.47	794.45
14	0	74.09	551
15	0	102.63	411.18
16	0	0	253.38
17	0	0	198.05
18	0	0	120.54
19	0	0	108.21
20	0	0	129.78
21	0	0	84.46
22	0	0	104.7
23	0	0	51.09
24	0	0	58.5
25	0	0	135.75
26	0	0	90.54
27	0	0	86.24
28	0	0	77.01
29	0	0	122.8
30	0	0	88.95

ตารางผนวกที่ ค4 ความเข้มข้นเมทานอลแต่ละค่าอัตราหมุนเวียนสารละลาย

วันที่	ความเข้มข้นเมทานอล (μM)		
	2 mL/min	20 mL/min	200 mL/min
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	58.92	87.15
5	0	90.33	124.29
6	66.38	130.2	176.95
7	58.55	100.9	156.73
8	46.11	183.26	172.05
9	123.87	262.51	246.89
10	104.6	348.42	345.18
11	185.83	456.05	278.94
12	139.75	601.74	402.51
13	269.05	794.45	467.3
14	355.78	551	568.05
15	400.62	411.18	731.25
16	286.89	253.38	638.24
17	537.12	198.05	513.49
18	694.41	120.54	429.15
19	403.56	108.21	282.47
20	508.42	129.78	331.72
21	247.91	84.46	330.55
22	108.06	104.7	268.14
23	153.65	51.09	272.75
24	90.52	58.5	304.48
25	109.81	135.75	274.35
26	62.74	90.54	315.52
27	81.99	86.24	255.93
28	103.54	77.01	219.84
29	42.35	122.8	201.36
30	115.3	88.95	253.11

ตารางผนวกที่ ค5 ความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิโดยตัวกลางแต่ละชนิด

วันที่	pH		Temperature (°C)	
	PL	SP	PL	SP
0	6.69	6.53	28.6	26.9
5	6.86	6.66	30.9	26.5
10	6.96	6.76	29.2	29.5
15	6.65	7.01	26.5	29.1
20	6.57	6.78	29.4	27.9
25	6.53	6.99	27.1	27.5
30	6.67	6.75	28.8	28.6

ตารางผนวกที่ ค6 ความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิแต่ละระยะเวลากักเก็บ

วันที่	pH			Temperature (°C)		
	HRT (day)			HRT (day)		
	1	3	5	1	3	5
0	6.56	6.67	6.53	25.8	26.2	26.9
5	6.63	6.87	6.66	27.9	28.3	26.5
10	6.75	6.91	6.76	25.4	25.4	29.5
15	6.78	6.86	7.01	26.8	26.7	29.1
20	6.80	6.69	6.78	29.2	28.9	27.9
25	6.90	6.74	6.99	27.1	26.5	27.5
30	6.85	6.93	6.75	26.6	25.7	28.6

ตารางผนวกที่ ค7 ความเป็นกรดค้างและอุณหภูมิแต่ละอัตราการหมุนเวียนสารละลาย

วันที่	pH			Temperature (°C)		
	LRR (mL/min)			LRR (mL/min)		
	2	20	200	2	20	200
0	6.55	6.53	6.56	25.1	26.9	26.3
5	6.60	6.66	6.78	26.8	26.5	26.8
10	6.77	6.76	6.85	24.9	29.5	25.5
15	6.65	7.01	6.89	25.5	29.1	26.0
20	6.82	6.78	6.91	27.3	27.9	27.9
25	6.74	6.99	6.95	28.5	27.5	28.5
30	6.89	6.75	6.82	27.3	28.6	28.1

ตารางผนวกที่ ค8 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำโดยตัวกลางแต่ละชนิด

วันที่	ระดับความลึก (cm)	DO (mg/L)	
		PL	SP
1-15	0	6.43	6.52
	10	6.01	6.24
	20	5.38	5.56
	30	4.81	5.3
16-30	0	5.04	5.6
	10	4.65	5.25
	20	4.23	4.98
	30	3.97	4.45

ตารางผนวกที่ ค9 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำแต่ละระยะเวลากักเก็บโดยใช้โพรป

วันที่	ระดับความลึก (cm)	DO (mg/L)		
		HRT 1 day	HRT 3 day	HRT 5 day
1-15	0	6.20	6.19	6.52
	10	5.85	5.89	6.24
	20	5.67	5.54	5.56
	30	5.30	5.25	5.3
16-30	0	5.76	5.57	5.6
	10	5.48	5.32	5.25
	20	5.19	4.95	4.98
	30	4.83	4.60	4.45

ตารางผนวกที่ ค10 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำแต่ละอัตราการหมุนเวียน

วันที่	ระดับความลึก (cm)	DO (mg/L)		
		LRR 2 mL/min	LRR 20 mL/min	LRR 200 mL/min
1-15	0	5.35	6.52	6.76
	10	4.84	6.24	6.32
	20	4.65	5.56	6.05
	30	4.11	5.3	5.64
16-30	0	5.01	5.6	6.23
	10	4.79	5.25	5.89
	20	4.34	4.98	5.48
	30	3.98	4.45	5.25

ตารางผนวกที่ ค11 ปริมาณมีเทนละลายน้ำโดยตัวกลางแต่ละชนิด

วันที่	CH ₄ (mg/L)	
	PL	SP
0	0.027	0.027
5	0.032	0.059
10	0.044	0.052
15	0.030	0.093
20	0.063	0.075
25	0.084	0.114
30	0.071	0.094

ตารางผนวกที่ ค12 ปริมาณมีเทนละลายน้ำแต่ละระยะเวลากักเก็บ

วันที่	CH ₄ (mg/L)		
	HRT 1 day	HRT 3 day	HRT 5 day
0	0.032	0.023	0.027
5	0.045	0.038	0.059
10	0.060	0.047	0.052
15	0.086	0.080	0.093
20	0.071	0.091	0.075
25	0.092	0.071	0.114
30	0.108	0.094	0.094

ตารางผนวกที่ ค13 ปริมาณมีเทนละลายน้ำแต่ละอัตราการหมุนเวียน

วันที่	CH ₄ (mg/L)		
	LRR 2 mL/min	LRR 20 mL/min	LRR 200 mL/min
0	0	0.005	0.101
5	0.017	0.027	0.162
10	0.035	0.042	0.140
15	0.056	0.058	0.173
20	0.067	0.114	0.238
25	0.084	0.067	0.187
30	0.061	0.089	0.240

ตารางผนวกที่ ค14 ปริมาณเชื้อเพลิงที่หลุดจากระบบโดยตัวกลางแต่ละชนิด

วันที่	VS (mg/L)	
	PL	SP
0	0	0
5	62.5	54.5
10	63.3	44.3
15	58	43.5
20	61.3	42.5
25	61.5	45
30	61.3	44.5

ตารางผนวกที่ ค15 ปริมาณเชื้อเฉลี่ยที่หลุดจากระบบแต่ละระยะเวลากักเก็บ

วันที่	VS (mg/L)		
	HRT 1 day	HRT 3 day	HRT 5 day
0	0	0	0
5	36	52.5	54.5
10	37.8	49.3	44.3
15	34	39.5	43.5
20	30.8	36.8	42.5
25	25.5	36.5	45
30	28.5	35.5	44.5

ตารางผนวกที่ ค16 ปริมาณเชื้อเฉลี่ยที่หลุดจากระบบแต่ละอัตราการหมุนเวียน

วันที่	VS (mg/L)		
	LRR 2 mL/min	LRR 20 mL/min	LRR 200 mL/min
0	0	0	0
5	54.5	54.5	60
10	52	44.3	56.3
15	47	43.5	54.5
20	43.8	42.5	51.0
25	51	45	48
30	45.5	44.5	48.3

ตารางผนวกที่ ค17 ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟโดยตัวกลางแต่ละชนิด

วันที่	ระดับความลึก (cm)	PL		SP	
		Type I (%)	Type II (%)	Type I (%)	Type II (%)
0	-	13.53	28.16	12.98	27.09
10	0	10.5	18.96	14.06	18.5
	10	13.67	25.85	11.57	23.4
	20	11.94	68.45	12.85	25.26
	30	14.40	41.52	13.75	23.69
20	0	13.6	13.55	12.11	24.75
	10	12.25	20.47	10.68	23.11
	20	12.48	40.55	11.90	28.05
	30	14.15	24.62	14.22	34.48
30	0	13.45	10.35	10.98	17.96
	10	11.76	26.75	9.59	21.67
	20	11.2	37.21	13.65	14.3
	30	12.88	25.8	11.78	29.5

ตารางผนวกที่ ค18 ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแต่ละระยะเวลากักเก็บ

วันที่	ความลึก (cm)	HRT (day)					
		1		3		5	
		Type I (%)	Type II (%)	Type I (%)	Type II (%)	Type I (%)	Type II (%)
0	-	13.21	35.74	12.85	31.40	12.98	27.09
10	0	10.66	25.15	13.56	20.62	14.06	18.5
	10	9.82	24.2	12.1	24.7	11.57	23.4
	20	10.01	24.18	11.87	28.75	12.85	25.26
	30	11.45	19.56	13.02	26.22	13.75	23.69
20	0	9.5	16.05	10.45	21.65	12.11	24.75
	10	7.85	14.35	11.28	15.63	10.68	23.11
	20	9.45	15.44	10.9	19.37	11.90	28.05
	30	10.2	11.1	12.45	25.88	14.22	34.48
30	0	8.75	9.65	10.65	22.84	10.98	17.96
	10	6.45	11.67	9.88	13.39	9.59	21.67
	20	7.05	13.49	10.24	24.77	13.65	14.3
	30	12.4	12.86	11.66	18.95	11.78	29.5

ตารางผนวกที่ ค19 ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแต่ละอัตราการหมุนเวียน

วันที่	ความลึก (cm)	LRR (mL/min)					
		2		20		200	
		Type I (%)	Type II (%)	Type I (%)	Type II (%)	Type I (%)	Type II (%)
0	-	16.30	38.55	12.98	27.09	16.30	38.55
10	0	15.41	32.58	14.06	18.5	14.55	32.10
	10	12.75	28.39	11.57	23.4	12.86	28.68
	20	16.23	34.2	12.85	25.26	15.2	35.57
	30	15.1	27.04	13.75	23.69	16.87	30.46
20	0	11.79	26.77	12.11	24.75	12.45	24.75
	10	13.68	29.45	10.68	23.11	15.56	23.10
	20	14.3	30.95	11.90	28.05	17.2	28.05
	30	12.57	24.15	14.22	34.48	13.98	34.48
30	0	14.85	25.27	10.98	17.96	14.1	23.96
	10	14.02	28.11	9.59	21.67	11.95	21.67
	20	11.27	25.43	13.65	14.3	13.62	30.42
	30	15.93	30.80	11.78	29.5	14.55	29.54

ตารางผนวกที่ ค20 องค์ประกอบของก๊าซภายในระบบจากการศึกษาชนิดตัวกลาง

วันที่	Gas composition (%)					
	PL			SP		
	CH ₄	CO ₂	O ₂	CH ₄	CO ₂	O ₂
1	23.25	17.43	8.9	22.85	16.24	8.6
5	21.84	16.32	7.95	21.9	17.03	9.52
10	24.36	15.69	7.32	23.62	15.39	6.79
15	22.79	16.11	7.5	23.54	15.08	8.55
20	20.51	13.12	9.39	24.67	14.48	8.26
25	19.6	15.9	10.04	22.38	16.87	7.56
30	21.62	18.66	8.64	23.5	17.68	6.87

ตารางผนวกที่ ค21 องค์ประกอบของก๊าซภายในระบบจากการแปรผันระยะเวลากักเก็บ

วันที่	Gas composition (%)								
	HRT 1 day			HRT 3 day			HRT 5 day		
	CH ₄	CO ₂	O ₂	CH ₄	CO ₂	O ₂	CH ₄	CO ₂	O ₂
1	25.23	16.89	8.45	25.20	14.37	9.48	22.85	16.24	8.6
5	23.26	15.48	9.12	24.10	14.29	8.55	21.90	17.03	9.52
10	24.65	14.03	9.52	22.00	13.43	7.09	23.62	15.39	6.79
15	24.51	16.35	7.86	26.50	12.86	6.99	23.54	15.08	8.55
20	26.79	15.48	8.3	23.40	14.95	7.43	24.67	14.48	8.26
25	24.83	16.28	7.24	22.00	15.87	7.03	22.38	16.87	7.56
30	25.51	15.27	7.56	22.50	16.1	6.92	23.50	17.68	6.87

ตารางผนวกที่ ค22 องค์ประกอบของก๊าซภายในระบบจากการแปรผันอัตราการหมุนเวียน

วันที่	Gas composition (%)								
	LRR 2 mL/min			LRR 20 mL/min			LRR 200 mL/min		
	CH ₄	CO ₂	O ₂	CH ₄	CO ₂	O ₂	CH ₄	CO ₂	O ₂
1	22.79	15.36	8.31	22.85	16.24	8.6	24.43	16.49	7.48
5	24.28	17.21	7.58	21.90	17.03	9.52	21.55	18.01	9.06
10	23.75	14.90	9.44	23.62	15.39	6.79	20.38	18.34	8.54
15	23.96	16.45	7.85	23.54	15.08	8.55	21.84	17.55	10.01
20	21.38	17.08	6.83	24.67	14.48	8.26	19.50	17.98	9.10
25	20.74	15.72	8.69	22.38	16.87	7.56	22.06	18.55	8.32
30	19.67	16.44	7.65	23.50	17.68	6.87	20.35	19.08	7.05

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวกนกวรรณ หนูช่วย
วัน เดือน ปี ที่เกิด	31 ตุลาคม 2526
สถานที่เกิด	สุราษฎร์ธานี
ประวัติการศึกษา	2549 วท.บ. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม) คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นิสิตปริญญาโท ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะ วิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KURDI)