1.7 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

แผนงาน	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. หาแหล่งและเก็บตัวอย่างของแหล่งเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ	←	—	→									
2. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพจากแหล่งต่างๆ			←	—	—	→						
3. ศึกษาในถังปฏิกรณ์และควบคุมสภาวะแวดล้อมเพื่อศึกษา SLR และ GRT ของ biofilter							←	—	—	→		
4. วิเคราะห์และสรุปผล											←	→

2. วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 การคัดเลือกแหล่งจุลินทรีย์ที่เหมาะสม

2.1.1 แหล่งจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษา

แหล่งหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้นำมาจากบ่อเปิดไม่ใช้อากาศ (anaerobic open lagoon) ของโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง ฟาร์มสุกร และโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม

ดังนั้นในการศึกษานี้ได้พัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบเบื้องต้นถึงกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการกำจัดซัลไฟด์และจำนวนของจุลินทรีย์ *Thiobacillus* sp. ของหัวเชื้อจากแหล่งต่างๆ ที่เป็นพวก sulfate oxidizing bacteria (SOB) เพื่อคัดเลือกแหล่งหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สำหรับถังปฏิกรณ์ biofilter

2.1.2 การหากิจกรรมของจุลินทรีย์ในการกำจัดซัลไฟด์

การวัดกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกลุ่มของ SOB ได้ทำใน flask ด้วยการใช้ตะกอนจุลินทรีย์ประมาณ 0.2 gVSS โดยใช้อาหารชื่อว่า thiosulfate mineral salt medium (ตารางที่ 5) และมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ใน flask ทดลองนั้นจะมี 2 flask คือ flask อาหารที่มีส่วนผสมของโซเดียมไธโอซัลเฟตและไม่มีการใส่ตะกอนจุลินทรีย์ ส่วนอีก flask ใส่ตะกอนเชื้อและใส่อาหารที่ไม่มีส่วนผสมของโซเดียมไธโอซัลเฟต จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยในแต่ละวันจะมีการเก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร เพื่อที่จะนำไปหาปริมาณของไธโอซัลเฟตที่ถูกใช้ไปและหากิจกรรมของจุลินทรีย์ SOB โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Tantunvate (2003)

2.1.3 การหาจำนวนของจุลินทรีย์ *Thiobacillus* sp. โดยวิธี Real-time polymerase chain reaction (qPCR)

Real time polymerase chain reaction (qPCR) โดยใช้วิธีของ SYBR® Green ได้ถูกนำมาใช้เพื่อที่จะทำการดูจำนวนของ 16S rDNA หรือยีน 16S rRNA ของ *Thiobacillus* sp. and *Eubacteria* domain

2.2.3.1 *Eubacteria* domain

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกลุ่มนี้จะใช้ไพรเมอร์ 338GC-F และ 518R โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นต้นแบบด้วย KAPA SYBR® Fast qPCR Kit (KAPA, Brazil) แล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่เครื่อง fluorescence-detecting thermocycler (Stratagene Mx3005P) (Amann, et al., 1996) สำหรับ *Eubacteria* domain plasmid DNA จะมียีนที่ใส่เข้าไปใน *E.coli* DH5α เพื่อที่จะนำมาใช้ในการสร้าง standard curve ความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จะนำมาวัดด้วยเครื่อง NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer จากนั้นทำการเจือจางให้อยู่ในช่วง 10^3 – 10^9 copies rDNA μl^{-1} สภาวะที่ใช้ใน

การทำปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 6 โดยปริมาณ copy ของพลาสมิดดีเอ็นเอจะคำนวณโดยใช้สมการที่ (1) (Whelan et al., 2003)

2.2.3.2 *Thiobacillus* sp.

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกลุ่มนี้จะใช้ไพรเมอร์ BONE663cF และ Thio840R โดยในการสร้าง Standard curve ของ *Thiobacillus* sp. จะใช้พลาสมิดดีเอ็นเอจาก *Thiobacillus thioparus* ในช่วง $10^3 - 10^9$ copies rDNA μl^{-1} สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของ *Thiobacillus* sp. แสดงในตารางที่ 6 โดยปริมาณ copy ของพลาสมิดดีเอ็นเอจะคำนวณโดยใช้สมการที่ (1)

$$\text{DNA copy} = \frac{(6.02 \times 10^{23} \text{ copy/mole}) \times \text{DNA amount (g)}}{\text{DNA length (bp)} \times 660 \text{ (g/mol/bp)}} \quad (1)$$

ตารางที่ 5 Thiosulfate mineral salt medium (Rattanapan et al., 2010)

Constituent	Concentration (g/l)	Trace element*	Concentration (g/l)
KNO_3	2.0	Na_2-EDTA	50.0
NH_4Cl	1	$CaCl_2.2H_2O$	7.3
KH_2PO_4	2	$FeSO_4.7H_2O$	5.0
$NaHCO_3$	2	$MnCl_2.4H_2O$	2.5
$MgSO_4.7H_2O$	0.8	$ZnSO_4.7H_2O$	2.2
$Na_2S_2O_3.5H_2O$	5	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.5
Trace element*	1.0 ml	$CaSO_4.5H_2O$	0.2
pH adjusted to 6 with 1N KOH		NaOH	11.0

ตารางที่ 6 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของ *Thiobacillus* sp. และ *Eubacteria* domain ด้วยเทคนิค real-time PCR โดย SYBR® Green (Kawakami, et al., 2005)

Cycle	PCR reaction steps	Temperature (°C)	Time	Repeat
1	Initial denaturing	95	10 min	1
2	1 Denaturing	95	30 sec	40
	2 Annealing	55 (58)[3]	30 sec	
	3 Extension[1]	72	30 (50)[3] sec	
3	Final denaturing[2]	95	1 min	1
		55	30 sec	
		95	30 sec	

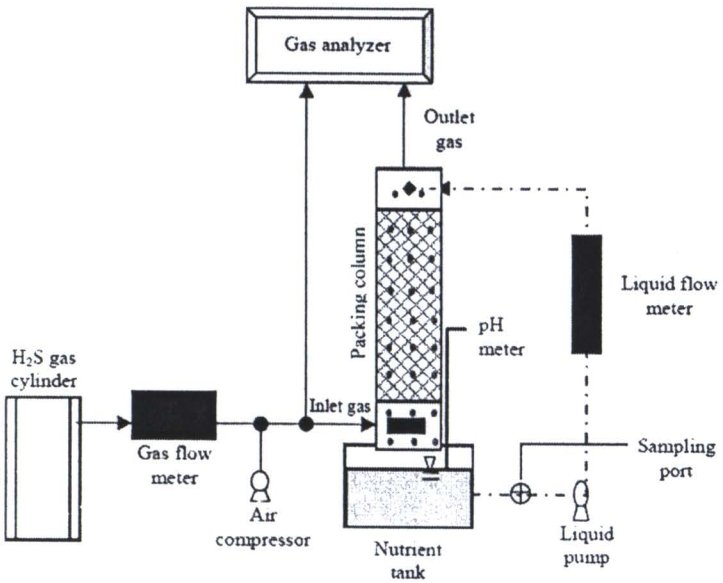
[1]Real time – ข้อมูลแต่ละขั้นจะถูกเก็บไว้, [2]Melt curve – ข้อมูลในขั้นที่ทำ melting curve จะถูกเก็บ [3]สำหรับการเพิ่มปริมาณของ *E coli*

2.2 การศึกษาการกำจัดไฮโดรเจนซัลไฟด์ในถังปฏิกรณ์ biofilter ด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

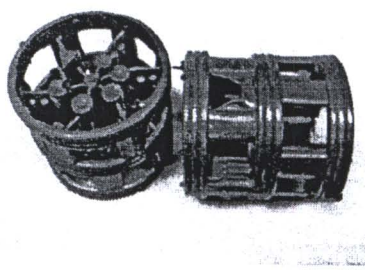
2.2.1 ถังปฏิกรณ์

ถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในการทดลองเป็นถังทรงกระบอกทำด้วยอะคริลิกใส ขนาดบรรจุ 18 ลิตร มีปริมาตรของเหลว 12 ลิตร ภายในบรรจุด้วยวัสดุตัวกลาง ดังรูปที่ 2 วัสดุตัวกลางที่ใช้ในการทดลองผลิตจาก polyethyline (PE) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 มิลลิเมตร และพื้นที่ผิว 240 ตารางเมตรต่อลูกบาศก์เมตร (รูปที่ 3) ถังปฏิกรณ์นั้นกำหนดให้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้าจากทางด้านล่างของถังผ่าน Packing Zone ขึ้นสู่ด้านบน (Upflow) ในระหว่างที่ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

ไหลขึ้น ของเหลวที่ใช้เป็นสารอาหาร ซึ่งบรรจุใน Nutrient Tank จะถูกปั๊มไปตามท่อ แล้วพ่นจากด้านบนถังผ่าน Packing Zone ลงสู่ด้านล่าง ซึ่งจะสวนทางกับก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ไหลขึ้น



รูปที่ 2 องค์ประกอบของถังปฏิกรณ์ biofilter ที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 3 วัสดุตัวกลางที่ใช้ในการทดลองโดยทำจาก polyethylene

2.2.2 การเริ่มต้นและดำเนินระบบถังปฏิกรณ์

นำแหล่งหัวเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกในหัวข้อ 2.1 เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในถังปฏิกรณ์ ปรับตะกอนเชื้อจุลินทรีย์ให้คุ้นเคยกับอาหาร thiosulfate mineral salt medium (Thiosulfate MSM) ประมาณ 1 อาทิตย์ก่อนที่จะนำไปใส่ในถังปฏิกรณ์ โดยใส่ตะกอนเชื้อจุลินทรีย์ 20 gVSS ต่อ 1 ลิตรถังปฏิกรณ์ ในการตรึงเชื้อจุลินทรีย์นั้นทำโดยการหมุนเวียนตะกอนเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 2 อาทิตย์ หลังจากนั้นจึงเริ่มป้อนก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ความเข้มข้นคงที่ 3,000 ppm เข้าไปในถังปฏิกรณ์ในทิศทาง upflow และออกแบบการทดลองโดยมีอัตราการไหล ระยะเวลาการกักเก็บก๊าซ และอัตราการรับภาระของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในแต่ละสภาวะ ดังแสดงในตารางที่ 7 สภาวะแวดล้อมภายในถังปฏิกรณ์ระหว่างการทดลองได้มีการควบคุมให้ค่า pH และ DO อยู่ที่ 7 และ <1.0 mg l^{-1} ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง โดยเชื้อตะกอนจุลินทรีย์ได้ถูกหมุนเวียนอย่างต่อเนื่องและมีการดำเนินระบบจนกระทั่งเข้าสู่ steady state ในแต่ละ operating condition จากนั้น ประสิทธิภาพการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ความสามารถในการกำจัด อีกทั้งในส่วนของ nutrient solution ได้ถูกเก็บเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ ซัลไฟด์ ซัลเฟต และซัลเฟอร์ ในระบบ

ตารางที่ 7 อัตราการป้อนซัลไฟด์เข้าสู่ระบบในแต่ละ operating condition

operating condition	Gas Retention Time; GRT (min)	Sulfide Loading Rate; SLR (g H_2S m^{-3} h^{-1})
1	120	2.06
2	60	4.13
3	40	6.19
4	30	8.25

2.2.3 การวิเคราะห์

2.2.3.1 ความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เข้าและออกจากถังปฏิกรณ์จะถูกวัดโดย BIOGAS Geo-Tech gas analyzer (GeoTech, UK)

2.2.3.2 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และค่าการละลายของออกซิเจน (DO)

ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) วัดโดย pH meter ของ Denver Instrument UB-5 Ultrabasic และค่าการละลายของออกซิเจน (dissolved oxygen; DO) วัดโดยเครื่องมือ DO meter รุ่น HACH LDO HQ10 ซึ่ง pH meter และ DO probe ต้องมีการ calibrate ก่อนที่ใช้งาน

2.2.3.3 ปริมาณชีวมวล (biomass)

ปริมาณชีวมวลวิเคราะห์ในรูปของแข็งที่ระเหยได้ (volatile suspended solid; VSS) คือปริมาณของน้ำหนักของตัวอย่างที่หายไปเมื่อนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 °C ซึ่งปริมาณสารอินทรีย์ทั้งหมดได้ใช้เป็นตัวชี้วัดถึงปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่าง โดยวิธีที่ใช้ในการหา VSS นั้น ใช้วิธีของ Wisconsin State Laboratory of Hygiene (1993)

2.2.3.4 ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Metabolic products analysis) สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระบบนั้นจะใช้วิธีการวัดในรูปของซัลไฟด์ ซัลเฟต และซัลเฟอร์ โดยที่วิธีวิเคราะห์ซัลไฟด์จะใช้วิธีไอโอโดเมตริก (APHA, 2005) วิธีวิเคราะห์ปริมาณของซัลเฟตจะใช้วิธี turbidimetric ตามวิธีของStandard Method (APHA, 2005) และวิธีวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟอร์(Sulfur element)ในระบบนั้นจะใช้วิธี Eschka method (Adeleke, 2006)

2.2.4 การคำนวณ

2.2.4.1 ประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Removal efficiency; RE)

ประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ได้คำนวณจากก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เข้าและผ่านการกำจัดที่ออกจากระบบในแต่ละรอบของการดำเนินระบบ โดยคำนวณได้จากสมการด้านล่าง:

$$RE\ (\%) = [(Ci - Ce)/ Ci] \times 100$$

Ci = ความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เข้าสู่ระบบ (g m^{-3})

Ce = ความเข้มข้นของไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ออกจากระบบ (g m^{-3})

2.2.4.2 ความสามารถในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Elimination capacity; EC)

ความสามารถในการกำจัดคือ ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ถูกกำจัดต่อปริมาตรของวัสดุตัวกลางต่อเวลา เพื่อที่จะให้ทราบถึงความสามารถของถังปฏิกรณ์ในการกำจัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ภายใต้ปริมาตรบรรจุของเหลวที่มีวัสดุตัวกลางของถังปฏิกรณ์ และเวลา โดยสามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$EC = Q \times (Ci - Ce) / V$$

Q = อัตราการไหล (m^3 h^{-1})