ผลของกรดไขมันระเหยได้ในน้ำทิ้งหลังจากการผลิตไฮโดรเจนต่อการผลิตมีเทน และโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง

Effects of Volatile Fatty Acid Containing in Biohydrogen Effluent on Methane Production and Microbial Community Structure under Thermophilic Condition

ชลธิชา มามิมิน[1], พูนสุข ประเสริฐสรรพ์[2], ประวิทย์ คงจันทร์[3] และสมพงศ์ โอทอง[4*]
Chonticha Mamimin[1], Poonsuk Prasertsan[2], Prawit Kongjan[3] and Sompong O-Thong [1,4*]

บทคัดย่อ

ผลได้มีเทนจากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ปริมาณสารอินทรีย์ 11.8 17.7 23.6 และ 29.5 gVS/l (คิดเป็นกรดไขมันระเหยได้เริ่มต้น 0.9 1.8 3.6 และ 4.7 g/l ตามลำดับ) เท่ากับ 510 467 428 และ 401 ml CH_4/g VS พื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology) ถูกนำมาใช้ในการออกแบบการทดลอง เพื่อศึกษาผลของกรดไขมันระเหยได้ในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนต่อการผลิตมีเทนและโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง ผลการศึกษาพบว่ากรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้นสูง (8 g/l) ยับยั้งกระบวนการผลิตมีเทน และเกิดการยับยั้งการผลิตมีเทนอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90% ($P<0.1$) เมื่อมีการเติมกรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก สภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตมีเทน คือ กรดแลคติก 2.88 g/l กรดอะซิติก 5.01 g/l กรดบิวทีริก 0.44 g/l และกรดโพรพิโอนิก 5.55 g/l โดยให้ผลได้มีเทนสูงสุดที่ 447 ml CH_4/gVS ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ระเหยได้สูงกว่า 10 g/l ส่งผลกระทบต่อประชากรอาร์เคียแต่ไม่ส่งผลกระทบต่อแบคทีเรีย และพบประชากรอาร์เคียกลุ่มเด่น คือ *Methanoculleus thermophiles*

คำสำคัญ : การผลิตมีเทนที่อุณหภูมิสูง กรดไขมันระเหยได้ พื้นผิวตอบสนอง น้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

Abstract

Methane yield from POME hydrogenic effluent at VS loading of 11.8, 17.7, 23.6 and 29.5 gVS/l corresponding to initial volatile fatty acid loading of 0.9, 1.8, 3.6 and 4.7 g/l, respectively was 510, 467, 428 and 401 ml CH_4/g VS. Response surface methodology was employed to studies the individual effect and interactive effect of lactic, acetic, butyric and propionic acid containing in POME hydrogenic effluent on methane production and microbial community under thermophilic condition. Acetic and butyric acid at high concentration (8 g/l) was found to significantly inhibit methane production process and was more significantly when presented of lactic and propionic acid. An optimization analysis showed that lactic, acetic, butyric and propionic acid at concentrations of 2.88, 5.01, 0.44 and 5.55 g/l, respectively, led to the methane yield of 447 ml CH_4/gVS. The VFA concentration more than 10 g/l has effect on archaea but not effect on bacteria. The abundant archaeal species could be identified as *Methanoculleus thermophiles*.

Keywords : Thermophilic Methane Production, Volatile fatty acids, Response surface methodology, Hydrogenic effluent.

[1] นิสิตปริญญาเอก สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210
[2] ศ.ดร., ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112
[3] อ.ดร., ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปัตตานี 94000
[4] ผศ.ดร., สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210
*Corresponding author: e-mail: sompong.o@gmail.com Tel. 074-693992

บทนำ

ความท้าทายของการผลิตไบโอไฮโดรเจน คือ การผลิตให้มีความคุ้มค่าทางเศษฐศาสตร์ ความท้าทายแรก คือ ประสิทธิภาพการเปลี่ยนไปของวัตถุดิบที่ต่ำ ซึ่งในการผลิตไฮโดรเจนแบบดั้งเดิมนั้นจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นพลังงาน (ไฮโดรเจน) ได้เพียงร้อยละ 7.5-15 ของพลังงานทั้งหมดที่มีในของของเสียอินทรีย์ ส่วนพลังงานที่เหลือ (ประมาณร้อยละ 65) ที่ไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนจะอยู่ในรูปของกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acids; VFA) [1] ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นกรดบิวทีริก (butyric acid) กรดอะซิติก (acetic acid) กรดแลคติก (lactic acid) และกรดโพรไพโอนิก (propionic acid) VFA สามารถเปลี่ยนไปเป็นพลังงานมีเทนได้ ผ่านกระบวนการเมทาโนจีนีซิส (methanogenesis) โดยจุลินทรีย์กลุ่มเมทาโนเจน (methanogens) ภายใต้สภาวะการย่อยสลายแบบไร้อากาศ [2] ผลิตภัณฑ์จากการผลิตไฮโดรเจนมีพีเอชต่ำและมีปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยได้สูง ส่งผลต่อภาระบรรทุกสารอินทรีย์เข้าระบบและความเสถียรของระบบในขั้นตอนเมทาโนจีนีซีส อัตราการเปลี่ยนจากกรดบิวทีริก และโพรพิโอนิกเป็นกรดอะซิติกส่งผลต่อคุณภาพของ methanogenic archaea และมีผลต่ออัตราการย่อยสลายของกรดอะซิติกและผลได้มีเทน (methane yield) กรดแลคติกมีศักยภาพในการเปลี่ยนไปเป็นกรดโพรพิโอนิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็น พิษต่อ methanogenic archaea ดังนั้นการสะสมของกรดโพรพิโอนิกจึงส่งผลให้กระบวนการเมทาโนจีนีซิสล้มเหลว เนื่องจากกรดโพรพิโอนิกยับยั้งการเจริญของ methanogenic archaea [3] จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาผลของกรดไขมันระเหยได้ต่อการผลิตมีเทน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ผ่านมาเป็นการศึกษาผลของกรดไขมันระเหยได้เพียงชนิดเดียว แต่ในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนประกอบไปด้วยกรดไขมันระเหยได้หลายชนิด ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ ศึกษาผลของกรดไขมันระเหยได้ ในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนต่อการผลิตมีเทนและโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิสูง เพื่อระบุชนิดและความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ที่เหมาะสมต่อกระบวนการเมทาโนจีนีซิส โดยออกแบบการทดลองด้วยผิวตอบสนอง (response surface methodology) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ ด้วยเทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

วิธีการวิจัย

วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในงานวิจัยนี้นำมาจากระบบการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มภายใต้อุณหภูมิสูง ของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ วิเคราะห์องค์ประกอบน้ำทิ้ง ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งสารอินทรีย์ระเหยได้ ไขมัน ค่าความเป็นด่าง พีเอช และกรดไขมันระเหยได้ [4]

การทดสอบแนวโน้มในการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันระเหยได้ เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทิริก กรดโพพิโอนิก ซึ่งเป็นซับสเตรตที่สำคัญสำหรับการผลิตมีเทน โดยการทดลองในขวดน้ำเกลือขนาด 500 ml เชื้อเริ่มต้น (non-defined mix culture) ที่อัตราส่วน S:I 4:1 แปรผันปริมาณน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจน 11.8 17.7 23.6 และ 29.5 gVS/l ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย 1 M NaOH ทำการหมักที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 45 วัน [5] เปรียบผลผลิตก๊าซที่เกิดขึ้นเทียบกับชุดการทดลองเติมน้ำกลั่นแทนน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ชุดควบคุมบวก (positive controls) เติม

เซลลูโลส 20 g/l เติมกรดอะซิติก และกรดบิวทีริก 5 g/l วัดปริมาตรการผลิตก๊าซชีวภาพโดยการแทนที่น้ำทุกวัน และวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ทุกสองวัน

ผลของกรดไขมันระเหยได้ (VFA) ในน้ำทิ้งจากการผลิตไฮโดรเจนต่อการผลิตมีเทน

กระบวนการหมักแบบกะ ดำเนินการทดลองในขวดซีรั่มขนาด 500 mL นำน้ำหมักที่เหลือจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเป็นแหล่งคาร์บอนมาเติมกรดแลกติก (A) กรดอะซิติก (B) กรดบิวทีริก (C) และกรดโพรพิโอนิก (D) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นเติมหัวเชื้อไร้อากาศ160 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย 1 M NaOH ทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอัตราส่วน 80:20 โดยการประยุกต์ใช้วิธีทางสถิติ Response Surface Method (RSM) ร่วมกับ Central Composite Design (CCD) ในการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาผลของกรดไขมันระเหยได้ต่อการผลิตมีเทน ทำการหมักที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 45 วันระหว่างการทดลองทำการเก็บตัวอย่างทุกๆวัน และทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ระหว่างการทดลอง คือ ปริมาณและชนิดกรดไขมันระเหยง่าย ด้วยเครื่อง HPLC วัดปริมาตรก๊าซ วิเคราะห์ชนิดและเปอร์เซ็นต์ของก๊าซที่เกิดขึ้นที่เกิดขึ้น (โดยใช้ GC-TCD) วิเคราะห์ค่า COD ของน้ำหมักจนกระทั่งได้ปริมาณมีเทนสะสมคงที่จึงหยุดการทดลอง ศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียและอาเคียร์ ด้วยเทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

การศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

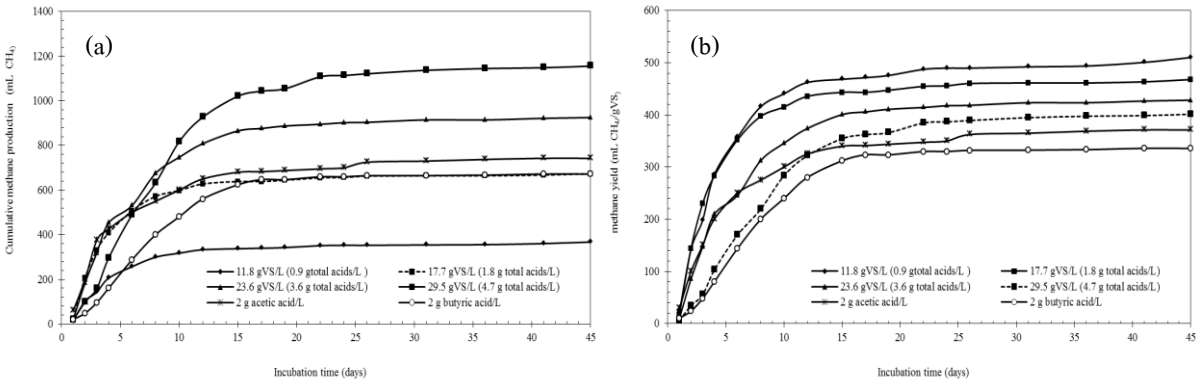
สกัด total genomic DNA จากตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ในชุดการผลิตมีเทน หลังจากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR สำหรับการทำ PCR ครั้งแรก total genomic DNA ถูกใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบร่วมกับไพรเมอร์ Arch21f (5' TTCCGGTTGATCCYGCCGGA 3') และ Arch958r (5' YCCGGCGTTGAMTCCAATT 3') (สำหรับศึกษาประชากรอาเคียร์) 1492r (5' GAAAGGAGGTGATCCAGCC 3') และ 27f (5' GAGTTTGATCCTTGGCTCAG 3') (สำหรับศึกษาประชากรแบคทีเรีย) นำ PCR Product ครั้งแรกใช้ในการทำ PCR ครั้งที่สองสำหรับอาเคียร์ใช้ไพรเมอร์ Arch519r (5' TTACCGCGGCKGCTG 3' with 40 bp GC clamp) และ Arch340f (5' CCTACGGGGYGCASCAG 3' with 40 bp GC clamp) สำหรับแบคทีเรียใช้ไพรเมอร์ 518r (5' ATTACCGAGCTGCTGG 3' with 40 bp GC clamp) และ 357f (5' CCTACGGGAGGCAGCAG 3' with 40 bp GC clamp) นำ PCR products ครั้งที่สอง วิเคราะห์บน 8% (v/v) polyacrylamide gels, denaturant gradient ที่ร้อยละ 40–70, electrophoresis ที่ 70 โวลต์ นาน 16 ชั่วโมง ใน 0.5x TAE buffer ที่ 60 องศาเซลเซียส ตัดแถบแบนดีเอ็นเอเด่นจากเจล DGGE แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ผลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของจุลินทรีย์อ้างอิง ในฐานข้อมูล NCBI web interface (http://www.ncbi.nlm.nih-.gov) [6]

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ศักยภาพการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนมีองค์ประกอบของกรดไขมันระเหยได้สูง 9.4 g/l มีปริมาณไขมัน 8.1 g/l ปริมาณของแข็งทั้งหมด 68 g/l และมีพีเอชต่ำ (4.3) กรดไขมันระเหยได้ที่พบในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนประกอบด้วย กรดบิวทีริก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดแลคติก และเอทานอลที่ความเข้มข้น 3.95 2.13 0.25 1.5 และ 0.99 g/l, ตามลำดับ การศึกษาศักยภาพการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ทำการทดลองที่ปริมาณสารอินทรีย์ 11.8 17.7 23.6 และ 29.5 gVS/l (คิดเป็นกรดไขมันระเหยได้เริ่มต้น 0.9 1.8 3.6 และ 4.7 g/l ตามลำดับ) โดยให้มีเทนสะสม เท่ากับ 367 673 925 และ 1155 ml CH_4ตามลำดับ คิดเป็นผลได้มีเทน เท่ากับ 510 467 428 และ 401 ml CH_4/g

VS ตามลำดับ มีเทนสะสมจากกรดอะซิติกและกรดบิวทีริก คือ 742 และ 671 ml CH_4 (คิดเป็นผลได้มีเทน 371 และ 335 ml CH_4/g VS) แสดงให้เห็นถึงคุณภาพที่ดีของหัวเชื้อในการผลิตมีเทน ที่ปริมาณสารอินทรีย์ 11.8 และ 17.7 gVS/l ก๊าซมีมีมากกว่าร้อยละ 90 ของการผลิตมีเทนทั้งหมดเกิดขึ้น ภายใน 7 วันและเข้าสู่ stationary phase ส่งผลให้ผลได้มีเทนสูงกว่าผลได้มีเทนที่ปริมาณสารอินทรีย์ 23.6 และ 29.5 gVS/l โดยกรดไขมันระเหยได้และกรดแลคติกแม้ว่าจะเป็นสารตั้งต้นที่ดีสำหรับการผลิตมีเทนแต่กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก ที่ความเข้มข้นสูงจะส่งผลยับยั้งกระบวนการ methanogenesis เมื่อสิ้นสุดการย่อยสลายที่ 45 วัน น้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถย่อยสลายได้ง่ายและเกิดมีเทนได้เร็ว แต่ในน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นกรดไขมันระเหยได้สูง (23.6 และ 29.5 gVS/l) เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพไม่ดี เนื่องจากปริมาณกรดไขมันระเหยได้ที่สูงส่งผลให้พีเอชในระบบต่ำสารอินทรีย์ทั้งหมดในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจะถูกย่อยสลายและเปลี่ยนไปเป็นมีเทนอยู่ที่ร้อยละ 76–89 ของผลได้มีเทนทางทฤษฎีที่ปริมาณสารอินทรีย์สูง (17.7-29.5gVS/l) ในขณะที่ปริมาณสารอินทรีย์ต่ำ (11.8 gVS/l) อยู่ที่ร้อยละ 97 -v'ผลได้มีเทนทางทฤษฎี



ภาพที่ 1 แสดงมีเทนสะสม (a) และผลได้มีเทน (b) จากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

ผลของกรดไขมันระเหยได้ต่อการผลิตมีเทน

เมื่อความเข้มข้นของกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 3 8 8 และ 3 g/l จะเกิดการยับยั้งกิจกรรมของ methanogenic archaea อย่างมีนัยสำคัญ ประสิทธิภาพการย่อยสลายกรดแลคติกและกรดไขมันระเหยได้ในทุกชุดการทดลองสูงกว่า 80% ยกเว้นในชุดการทดลอง R5 R7 R9 R12 และ R19 ซึ่งมีประสิทธิภาพการย่อยสลายอยู่ที่ 75 78 65 78 และ 68% ตามลำดับ (ภาพที่ 2) อย่างไรก็ตามมีการสะสมของกรดบิวทีริกและกรดโพรพิโอนิกสูงในชุดการทดลอง R9 และ R19 จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นกรดอะซิติก และกรดบิวทีริกที่สูงถึง 8 g/l ส่งผลต่อการผลิตมีเทน ความเข้มข้นกรดบิวทีริกสูงขึ้นถึง 8 g/l และผสมกับกรดชนิดอื่นส่งผลยังยั้งการผลิตมีเทนอย่างมีนัยสำคัญ ส่งผลให้จำนวนและความหลากหลายของแบคทีเรียและอาเคียร์ลดลง ผลของการสะสมกรดบิวทีริกและกรดบิวทีริก ส่งผลให้ผลได้มีเทนทั้งหมดและประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพลดต่ำลง (302-308 ml CH_4/gVS และ 65-68%) (ตารางที่ 1) กรดอะซิติกเดี่ยวๆ ที่ความเข้มข้น 3-8 g/l ไม่ยับยั้งกระบวนการ methananogenesis ในขณะที่หากมีอยู่ในสภาวะที่มีกรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก จะเกิดการยับยั้งการผลิตมีเทนและประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) กรดบิวทีริกเดี่ยวๆ ที่ความเข้มข้น 3-8 g/l ยับยั้งกระบวนการ methananogenesis อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) เช่นเดียวกับสภาวะที่มีกรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิก ก่อนการย่อยสลายสารอินทรีย์เพื่อเปลี่ยนไปเป็นมีเทน กรดไขมันระเหยได้ทั้งหมดจะถูก

เปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติก สำหรับอัตราการย่อยสลายของกรดไขมันระเหยได้ไปเป็นมีเทน เริ่มจาก กรดอะซิติก > เอทานอล > กรดบิวทีริก > กรดโพรพิโอนิก [7] ส่งผลให้เกิดการสะสมกรดบิวทีริกและกรดโพรพิโอนิกในกระบวนการ จากผลการศึกษาผลของกรดไขมันระเหยได้ต่อการผลิตมีเทนภายใต้อุณหภูมิสูงโดย RSM พบว่ากรดแลคติกและกรดบิวทีริกอย่างเดี่ยวส่งผลกระทบเชิงบวก ในขณะที่กรดโพรพิโอนิกอย่างเดี่ยวส่งผลเชิงลบต่อกระบวนการ methanogenesis เมื่อผสมกรดแลคติกและกรดอะซิติก กรดอะซิติกและกรดบิวทีริก กรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก ส่งผลกระทบเชิงบวก แต่ในกรณีการผสมกันระหว่างกรดแลคติกและกรดบิวทีริก กรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิก กรดบิวทีริกและกรดโพรพิโอนิก ส่งผลเชิงลบต่อกระบวนการ methanogenesis กรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้นสูง (8 g/l) ยับยั้งกระบวนการผลิตมีเทนอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเติมกรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก โดยกรดบิวทีริกและกรดโพรพิโอนิกเป็นสารตั้งต้นหลักที่ส่งผลต่อการย่อยสลายของกรดไขมันระเหยได้ สภาวะที่เหมาะสมที่กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก ที่ความเข้มข้น 2.88, 5.01,0.44 และ 5.55 g/l ตามลำดับ ให้มีเทนสะสมสูงสุดที่ 1194 ml และผลได้มีเทน 447 ml CH_4/gVS

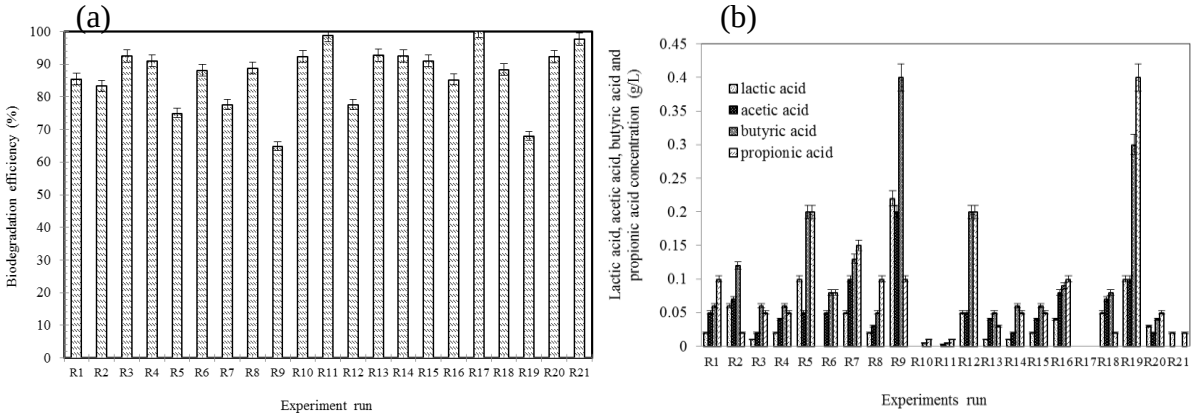
ตารางที่ 1 การออกแบบการทดลองโดย RSM

Run	Parameter (g/L)				Response		
	Lactic acid (A)	Acetic acid (B)	Butyric acid (C)	Propionic acid (D)	Methane (mL CH_4)	Methane yield (mL CH_4/gVS)	Biodegradability (%)
1	1.5	5.5	4.25	1.5	963	364	85
2	3	8	3	0	943	374	83
3	1.5	5.5	5.5	1.5	1080	389	93
4	1.5	5.5	5.5	1.5	1069	385	91
5	1.5	5.5	6.75	1.5	1019	339	75
6	1.5	4.25	5.5	1.5	1008	381	88
7	1.5	5.5	5.5	2.25	1008	349	78
8	0	8	3	3	1016	383	89
9	3	8	8	0	1038	302	65
10	0	3	8	0	1014	394	92
11	3	3	3	3	1008	413	99
12	3	3	8	3	1133	338	78
13	0.75	5.5	5.5	1.5	1056	392	93
14	1.5	5.5	5.5	1.5	1080	389	93
15	1.5	5.5	5.5	1.5	1069	385	91
16	1.5	6.75	5.5	1.5	1070	368	85
17	0	3	3	0	744	446	100
18	1.5	5.5	5.5	0.75	1016	381	88
19	0	8	8	3	1098	308	68
20	2.25	5.5	5.5	1.5	1104	387	92
21	1.5	5.5	5.5	1.5	1116	402	98
H2 effluent	0	0	0	0	380	475	98

ตารางที่ 2 ค่าทางสถิติของผลของกรดไขมันระเหยได้ต่อการผลิตมีเทน

Factor	Methane accumulation		Methane yield		Biodegradation efficiency	
	Coefficient estimate	Probability	Coefficient estimate	Probability	Coefficient estimate	Probability
Intercept	1053.5	-	378.4182	-	88.75592	-
A-Lactic acid	48	0.4138	-5	0.8238	-1	0.9072
B-Acetic acid	62	0.3001	-13	0.5674	-3	0.7279
C-Butyric acid	70.58824	0.0018*	-33.7059	0.0006*	-8.58824	0.0051*
D-Propionic acid	-8	0.8885	-32	0.1871	-10	0.2699
A2	-72.5	0.2457	-22.75	0.3441	-9.25	0.3173
B2	-16.5	0.2728	-2.5	0.6581	-1.25	0.5657
C2	37.5	0.5305	15	0.5236	5	0.5770
D2	-27.25	0.0933	-2.5	0.6581	-1.25	0.5657
AB	16.75	0.7763	8	0.7304	2	0.8214
AC	-19.75	0.1986	-3.25	0.5674	-2	0.3685
AD	184.1323	0.0201*	75.21232	0.0100*	26.82723	0.0910*
BC	20.13225	0.8389	15.21232	0.6973	2.827229	0.8495
BD	-171.868	0.0980*	-76.7877	0.0850*	-23.1728	0.0155*
CD	-87.8677	0.0898*	-22.7877	0.0633*	-11.1728	0.0463*

*significant at 90% level

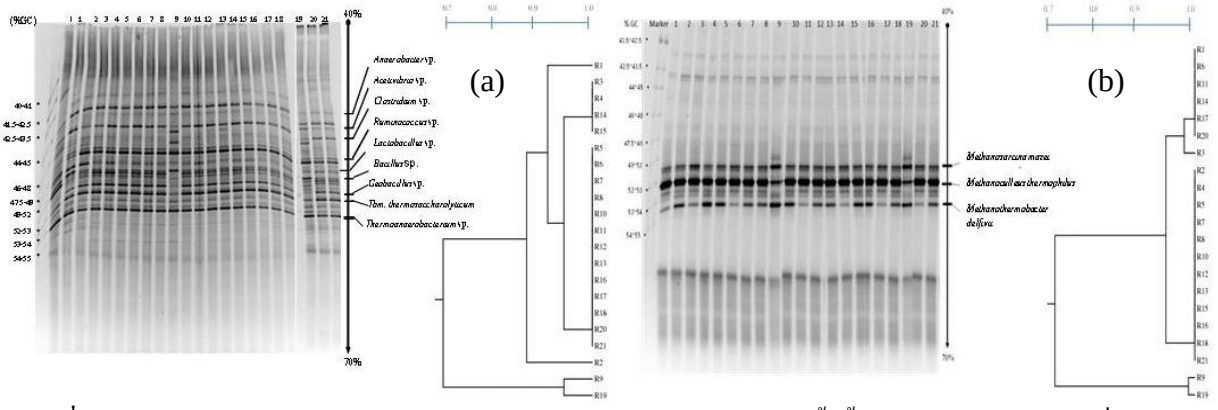


ภาพที่ 2 ความเข้มข้นของกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก ในน้ำทิ้งหลังกระบวนการหมักมีเทน (a) ประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพ (b)

ผลของกรดไขมันระเหยได้ต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์

จากภาพที่ 3 ความหลากหลายและปริมาณ methanogenic bacteria มีความเหมือนกันในทุกชุดการทดลองยกเว้นในชุดการทดลอง R1, R3, R4, R14, R15, R2, R9 และ R19 โดยในชุดการทดลอง R1, R3, R4, R14, R15 และ R2 มีโครงสร้าง

ประชากรจุลินทรีย์แตกต่างกับชุดการทดลองทั้งหมดแต่มีเทนสะสมและประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพแตกต่างกันเล็กน้อยกับชุดการทดลองทั้งหมด เนื่องจาก methanogenic bacteria มีการเปลี่ยนแปลงแต่สามารถปรับตัวได้เร็วในระหว่างการทดลอง ในขณะที่ชุดการทดลอง R9 และ R19 methanogenic bacteria ไม่สามารถปรับตัวได้เนื่องจากปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้สูงจึงไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่งผลให้ได้มีเทนสะสมต่ำ ปริมาณกรดอะซิติกและกรดแลคติกที่สูงส่งผลให้เกิดการสร้างมีเทนสูงขึ้น แต่ความเข้มข้นของกรดอื่นๆ (กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก) ที่สูง จะไปยับยั้งกระบวนการสร้างมีเทน DGGE profile แสดง thermophilic bacteria คือ *Anaerobacter* sp. *Acetivibrio* sp. *Clostridium* sp. *Ruminococcus* sp. *Lactobacillus* sp. *Bacillus* sp. *Geobacillus* sp. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum Thermoanaerobacterium* sp. และ *Clostridium* sp โดยแบคทีเรียสปีชีส์ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* และ *Thermoanaerobacterium* sp. เป็นประชากรกลุ่มเด่นในสภาวะปกติและไม่ปรากฏในสภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการผลิตมีเทน (ภาพที่ 4a) *Methanoculleus thermophilus Methanothermobacter delfuvii* และ *Methanosarcina mazei* เป็นประชากรอาเคียร์เด่นในการผลิตมีเทน ซึ่ง *Methanoculleus thermophiles* เป็นประชากรกลุ่มเด่นในสภาวะปกติและไม่ปรากฏในสภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการผลิตมีเทน (ภาพที่ 3b) จำนวนและความหลากหลายของ Methanogenic archaea มีความหลายคลึงกันในทุกชุดการทดลองยกเว้นในชุดการทดลอง R1 R6 R9 R11 R17 R19 และ R20 โดยในชุดการทดลอง R1, R6, R9, R11, และ R17 มีโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์แตกต่างกันเล็กน้อยกับชุดการทดลองทั้งหมด แต่มีเทนสะสมและประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพไม่แตกต่างกับชุดการทดลองทั้งหมด ในขณะที่ประชากรเด่นมีปริมาณต่ำในชุดการทดลอง R9 และ R19 สอดคล้องกับการผลิตมีเทนต่ำเช่นเดียวกันเนื่องจากประสิทธิภาพการย่อยสลายกรดไขมันระเหยได้ต่ำเนื่องจากปริมาณกรดไขมันระเหยได้ปริมาณสูง ปริมาณกรดอะซิติกและกรดแลคติกที่สูงส่งผลให้เกิดการสร้างมีเทนสูงขึ้น แต่ความเข้มข้นของกรดบิวทีริกและกรดโพรพิโอนิกที่สูง จะไปยับยั้งกระบวนการสร้างมีเทน โดยกรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้นสูง (8 g/l) ส่งผลยับยั้งการเจริญของ methanogenic archaea อย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 3 DGGE profiles ของแบคทีเรีย (a) และอาเคียร์ (B) จากการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังการผลิตไฮโดรเจนที่มีการเติมกรดไขมันระเหย (กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริก) ได้ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

สรุปผลการวิจัย

กรดแลคติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก เป็นผลิตภัณฑ์หลักในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ความเข้มข้น 3.95, 2.13, 0.25, 1.5 และ 0.99 g/l ผลได้มีเทนจากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ปริมาณสารอินทรีย์ 11.8

17.7 23.6 และ 29.5 gVS/l (คิดเป็นกรดไขมันระเหยได้เริ่มต้น 0.9 1.8 3.6 และ 4.7 g/l ตามลำดับ) เท่ากับ 510 467 428 และ 401 ml CH_4/g VS ผลได้มีเทนต่ำเนื่องจากปริมาณสารอินทรีย์สูงส่งผลต่อกระบวนการผลิตมีเทน กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดบิวทีริก เดี่ยวๆ ส่งผลกระทบเชิงบวก ในขณะที่กรดโพรพิโอนิกเดี่ยวๆ ส่งผลกระทบเชิงลบต่อกระบวนการ methanogenesis การผสมกันระหว่างกรดแลคติกและกรดอะซิติก กรดอะซิติกและกรดบิวทีริก และกรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก ส่งผลกระทบเชิงบวกต่อกระบวนการ methanogenesis อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.1$) ส่วนการผสมกันระหว่างกรดแลคติกและกรดบิวทีริก กรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริกและกรดโพรพิโอนิก ส่งผลกระทบเชิงลบต่อกระบวนการ methanogenesis อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.1$) กรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้นสูง (8 g/l) ยับยั้งกระบวนการผลิตมีเทน และเกิดการยับยั้งการผลิตมีเทนอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.1$) เมื่อเติมกรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก สภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตมีเทน คือ กรดแลคติก 2.88 g/l กรดอะซิติก 5.01 g/l กรดบิวทีริก 0.44 g/l และกรดโพรพิโอนิก 5.55 g/l โดยให้ผลได้มีเทนสูงสุดที่ 447 ml CH_4/gVS การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (DGGE) พบว่าคุณภาพของ methanogenic bacteria และ methanogenic archaea สอดคล้องกับผลได้มีเทน โดย *Methanoculleus thermophiles* และ *Methanosarcina mazei* เป็นแระชากรอาเคียร์เด่น ซึ่ง Methanoculleus thermophiles เป็นประชากรเด่นในสภาวะปกติและไม่ปรากฏในสภาวะที่เกิดการยับยั้งการผลิตมีเทน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ 2557 ประเภททุนวิจัยร่วมบัณฑิตศึกษา

เอกสารอ้างอิง

[1] Hallenbeck, P.C. and Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?. **Trends in Biotechnology**. 27(5), 287-297.

[2] Liu, Z., Zhang, C., Lu, Y., Wu, X., Wang, L., Wang, L., Han, B. and Xing, X.H. (2013). States and challenges for high-value biohythane production from waste biomass by dark fermentation technology. **Bioresource Technology**. 135, 292-303.

[3] Demirel, B. and Yenigun, O. (2002). Two-phase anaerobic digestion processes: A Review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 77, 743-755.

[4] APHA, AWWA. and WEF. (1998). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington DC : American Public Health Association.

[5] Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P. and van Lier, J.P. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. **Water Science and Technology**. 59, 927-934.

[6] Kongjan, P., O-Thong, S., Kotay, M., Min, B. and Angelidaki, I. (2010). Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture**. Biotechnology and Bioengineering**. 105, 899–908.

[7] Ren, N.Q., Li, J.Z., Li, B.K., Wang, Y. and Liu, S.R. (2006). Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. **International Journal of Hydrogen Energy**. 31, 2147-2157.