บทที่ 3
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 น้ำเสีย

น้ำเสียจากถังสร้างกรด (acidification tank) ที่ผ่านการบำบัดแบบไร้อากาศก่อนเข้าถัง upflow anaerobic sludge blanket (UASB) จากกระบวนการบำบัดน้ำเสียบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

ในการทดลองใช้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากตะกอนในระบบ Sequencing batch activated sludge reactors (SBRs) ช่วงตกตะกอนจุลินทรีย์ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (Growth medium; GM1) ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) NH_4Cl_2 0.180, KH_2PO_4 0.052, K_2HPO_4 0.067, $MgSO_4$ 0.50 และ mineral solution 1 มิลลิลิตร ซึ่ง mineral solution ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) $CoCl_2.6H_2O$ 0.008, $CaCl_2$ 0.010, $MnCl_2.2H_2O$ 0.0003, $FeCl_3$ 0.010, H_3BO_3 0.004, $NaMoO_4.2H_2O$ 0.002, $CuSO_4.5H_2O$ 0.002, $ZnSO_4.7H_2O$ 0.002 และ $NiCl_2.6H_2O$ 0.002 ใช้ $NaCH_3COO.3H_2O$ 30 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน (Kumar *et al.*, 2004)

3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 ปริมาณกรดไขมัน

วิเคราะห์ปริมาณกรดโดยใช้ GC-FID โดยเก็บตัวอย่างของเหลว นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว 1 มิลลิลิตร นำมาเติม 3-M phosphoric 1 มิลลิลิตร และ 4-Methyl-n-valeric acid 1 มิลลิลิตร (internal standard) และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ 15000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 1 นาที และนำส่วนใสมาฉีดเข้า GC ซึ่งใช้ capillary column (Stabilwax-DA, model Restek 06313) โดยกำหนดสภาวะของ GC ดังนี้ ความดันอากาศภายในเครื่อง 50 psi, ความดันของก๊าซ helium 60 psi และ ความดันของไฮโดรเจน 40 psi ตั้งค่าของ Oven temperature = 50°ซ, Inlet temperature= 230°ซ, Det temperature = 250 °ซ, Ramp = 20 °ซ/นาที, H_2 flow = 40 มล./นาที, Air flow=400 มล./นาที, He flow=179 มล./นาที และใช้สารละลาย

กรดไขมันผสม เพื่อเป็นสารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันในตัวอย่าง สาร ละลายกรดไขมันผสมประกอบด้วย กรดฟอร์มิก, กรดอะซิติก, กรดโพรพิโอนิก, กรดไอโซบิวทิริก, กรดไอโซวาเลริก, กรดไอโซคาโพรอิก และกรดเฮปทาโนอิก (ดัดแปลงจาก Thanakoses *et al.*, 2003)

3.2.2 ค่าซีโอดี (COD Cell Test, MERCK)

นำตัวอย่างน้ำเสีย 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดวัดค่า COD (COD Cell Test, MERCK) ผสมกับสาร A 2.2 ml และ B 1.8 ml เขย่าให้สารเคมีกับน้ำเสียตัวอย่างผสมกัน ใส่หลอดวัดค่า COD ในเครื่อง Termoreactor ที่อุณหภูมิ 148 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นโดยไม่ให้โดนแสง นำหลอดไปวัดค่า COD ด้วยเครื่องวัดค่า COD (MERCK) อ่านค่าที่ได้แล้วนำไปคำนวณหาค่า COD (APHA, AWWA and WPCF, 2001)

3.2.3 ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl method

นำตัวอย่างน้ำเสียที่ผ่านการหมุนเหวี่ยง 15 มิลลิลิตร ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 800 มิลลิลิตร ใส่สารผสม $CuSO_4$ และ K_2SO_4 ปริมาณ 5 กรัม เติมกรดซัลฟูริก 20 มิลลิลิตร ย่อยในเตาย่อย ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส 30 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 380 องศาเซลเซียส 60 นาที จนได้สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรและนำมากลั่นในอุปกรณ์กลั่น นำขวดรูปชมพูขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก (เข้มข้นร้อยละ 4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรที่มีการเติมอินดิเคเตอร์แล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ ดูดตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในช่องตัวอย่าง และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป 20 มิลลิลิตร กลั่นประมาณ 10 นาที และไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดกำมะถันที่มีความเข้มข้น 0.2 N จนสีของสารละลายเป็นสีม่วง นำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณไนโตรเจน (APHA, AWWA and WPCF, 2001)

3.2.4 ปริมาณฟอสเฟต (Ascorbic Acid Method)

นำตัวอย่างน้ำเสียที่ผ่านการหมุนเหวี่ยง 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมฟีนอล์ฟทาลีน 1 หยด ถ้าเกิดสีแดงให้หยด 5 N H_2SO_4 ลงไปจนกระทั่งสีแดงหายไปจึงเติมน้ำยารวม 8 มิลลิลิตร (ภาคผนวก) เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 – 30 นาที เพื่อให้เกิดสีก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน (APHA, AWWA and WPCF, 2001)

3.2.5 ปริมาณเซลล์

วัดปริมาณเซลล์ของเชื้อโดยใช้วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น นำเซลล์ใส่ในจานเพาะเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส อบจนแห้งและน้ำหนักคงที่ (Jung *et al.*, 2000)

3.2.6 การทดสอบกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการผลิต PHA โดยใช้ sudan black B

นำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ มาเกลี่ยในอาหารวุ้นสังเคราะห์ (GM1 agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มจนเกิดเป็นโคโลนี นำโคโลนีที่ได้มาเกลี่ยในสไลด์ที่สะอาด รอให้แห้ง นำมาผ่านไฟ แล้วย้อมสีด้วย sudan black B (เตรียมจากผง sudan black B 0.3 กรัมในเอทิลแอลกอฮอล์ (70%) 100 มิลลิลิตร) ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5-10 นาที ล้างให้น้ำไหลผ่าน และทำให้สไลด์แห้ง หยด xylene และหยด safranine ทิ้งไว้ 5-10 นาที ล้างให้น้ำไหลผ่านและรอให้แห้ง นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ จุลินทรีย์ที่มีการผลิตลิพิดภายในเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็น PHA โดยจะติดสีดำของ sudan black B (Burdon, 1946)

3.2.7 ปริมาณ PHA ในเซลล์จุลินทรีย์

- การวิเคราะห์ด้วยวิธี Gravimetric method

ทำการวิเคราะห์โดยการเติม sodium dodecyl sulfate (SDS) 1% (w/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชเป็น 10 ลงในเซลล์ที่ผ่านการวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง และบ่มบนเครื่องเขย่า (orbital shaker) เป็นระยะเวลา 60 นาทีด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส แล้วเจือจางให้ได้ 5 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีและล้างด้วย deionized water ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอะซีโตน 5 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำส่วนของตะกอนมาล้างด้วยเอทธานอลบริสุทธิ์ 99.8% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำตะกอนสุดท้ายไปอบแห้งที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้น้ำหนักคงที่ (ดัดแปลงจาก Grothe and Chisti, 2000) และทำ Negative control เพื่อดูประสิทธิภาพการสกัด PHA ด้วยวิธีนี้ โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง มาเลี้ยงในอาหาร NB (Nutrient broth) ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่ส่งเสริมการผลิต PHA

- การวิเคราะห์โดยใช้ GC-FID

ทำการวิเคราะห์หา PHA โดยการเติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตรและสารละลายเมทานอล-ซัลฟูริก (85:15) 1 มิลลิลิตร ลงใน PHA ที่ผ่านการสกัดด้วยวิธี Gravimetric method นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อเปลี่ยนกรดไขมันให้กลายเป็นเมธิลเอสเทอร์ ตั้งตัวอย่างให้เย็นในอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เพื่อแยกชั้นของคลอโรฟอร์มและสารละลายเมทานอล-ซัลฟูริก แล้วนำส่วนของคลอโรฟอร์มไปวิเคราะห์ด้วย GC-FID ซึ่งใช้ capillary column (Stabilwax-DA, model Restek 06313) กำหนดอุณหภูมิของ injector และ detector เป็น 250°ซ โดย

กำหนดโปรแกรมอุณหภูมิของ oven ไว้ที่ 80°ซ เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 200°ซ ด้วยอัตรา 7°ซ/min และใช้สาร PHA จาก Aldrich (USA) เป็นสารมาตรฐานที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบชนิดของ PHA (ดัดแปลงจาก Ganzeveld *et al.*, 1999)

3.2.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analytical of varience) โปรแกรม SPSS 16.0

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การศึกษาลักษณะของน้ำเสีย

ศึกษาลักษณะของน้ำเสียจากถังสร้างกรดที่ผ่านการบำบัดแบบไร้อากาศก่อนเข้าถัง upflow anaerobic sludge blanket (UASB) จากกระบวนการบำบัดน้ำเสียบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) โดยทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

- ค่าพีเอชโดย พีเอชมิเตอร์
- ค่าซีโอดี (COD Cell Test, MERCK)
- ชนิดและปริมาณของกรดระเหย โดยใช้ GC-FID (ดัดแปลงจาก Thanakoses *et al.*, 2003)
- ปริมาณไนโตรเจน โดยวิธี Kjeldahl method (APHA, AWWA and WPCF, 2001)
- ปริมาณฟอสเฟต โดยวิธี Ascorbic Acid method (APHA, AWWA and WPCF, 2001)

3.3.2 การศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิต PHA ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบ SBR ในอาหารสังเคราะห์

นำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียระบบ SBR มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ GM1 ที่มีการเติมกรดอะซิติก 1 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (ผ่านการฆ่าเชื้อ) เพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA โดยใช้สลัดจ์ 430 กรัม/ลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (Yu, 2001) ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์โดยวิธีการหาน้ำหนักวัตถุแห้ง เพื่อดูการเจริญของจุลินทรีย์

หลังจากนั้นนำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์มาทดสอบการผลิต PHA โดยทำการทดลองเปรียบเทียบอัตราการเขย่า เพื่อดูสภาวะการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHA โดยเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเสียที่ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นในข้อ 3.31 ที่ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยเติมกรดโพรพิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอชให้

เป็น 7 และผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการศึกษาผลของอัตราการเขย่าโดยการเลี้ยงแบบวางนิ่ง เปรียบเทียบกับการเขย่าที่ 50, 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ในรูปของน้ำหนักวัตถุแห้ง และปริมาณ PHA ที่ผลิตได้ด้วยวิธี Gravimetric method (ดัดแปลงจาก Grothe and Chisti, 2000)

3.3.3 การศึกษาการแยกเชื้อที่สามารถผลิต PHA จากกลุ่มจุลินทรีย์จากระบบ SBR

3.3.3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต PHA จากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์

นำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากระบบ SBR ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นให้ผลิต PHA (enrichment technique) ในอาหารสังเคราะห์ GM1 ที่มีการเติมกรดอะซิติก 30 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเจือจาง (10^{-2}-10^{-8}) และเกลี่ยในอาหารวุ้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบสี, รูปร่าง, ส่วนเส้นขอบของโคโลนีที่ได้ ทำการเกลี่ยซ้ำจนได้โคโลนีเดี่ยวๆ และทดสอบการผลิต PHA โดยใช้ sudan black B (Burdon, 1946)

3.3.3.2 เทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกได้ ด้วยเทคนิค 16s rDNA

วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยนำสายพันธุ์ที่ต้องการศึกษาไปเลี้ยงใน GM medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้มีการเจริญอยู่ในระยะกลางของ log phase จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงและนำเซลล์ที่ตกตะกอนไปสกัด DNA และใช้ไพรเมอร์ (primer) UFUL (5'-GCCTAACACATGCAAGTCGA-3') และ 536R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3') โดยใช้สภาวะในการเพิ่มจำนวนคือ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 60 วินาที, annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 120 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 1 รอบ ที่ 48 องศาเซลเซียส 60 วินาที และที่ 72 องศาเซลเซียส 300 วินาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนไปหาลำดับโดยใช้ cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer) และ electrophoresis DNA sequencing นำข้อมูลลำดับ 16S rDNA มาเปรียบเทียบกับลำดับของจุลินทรีย์ใน Gene Bank (Nation Center for Biotechnology Information, 2008) ส่งวิเคราะห์ที่หน่วยเครื่องมือกลาง (Central Instrument Facility; CIF) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3.3.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHA จากน้ำเสียโดยแบคทีเรียที่แยกได้ในขวดรูปชมพู่

3.3.4.1 การเตรียมเชื้อสำหรับเป็นเชื้อเริ่มต้น

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.3.3 มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ GM1 ที่มีการเติมกรดอะซิติก 30 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน (ผ่านการฆ่าเชื้อ) โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (Yu, 2001) ในอุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง เพื่อดูการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ เลือกเวลาในการเลี้ยงที่ได้กลุ่มเชื้อที่มีการเจริญในช่วงกลางของ log phase วัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตร-โฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยเจือจางเชื้อด้วยอาหารเหลวสูตร GM1 เพื่อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 แล้วใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น (Shimisu *et al.*, 1990)

3.3.4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHA ได้สูง

นำน้ำเสียที่ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของน้ำเสียเบื้องต้นในข้อ 3.3.1 ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยเติมกรดโพรพิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน (เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มสร้างโคพอลิเมอร์) ปรับพีเอชให้เป็น 7 นำน้ำเสียที่เตรียมไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาใช้เลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.3.3 โดยใช้ปริมาตรเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10% เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวัดพีเอช วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์โดยวิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHA ที่ผลิตได้ ด้วยวิธี Gravimetric method (ดัดแปลงจาก Grothe and Chisti, 2000) เก็บตัวอย่างก่อนและสิ้นสุดการหมักนำมาปั่นเหวี่ยง แล้วนำส่วนใสมาวิเคราะห์หา Soluble COD และปริมาณกรดระเหยง่าย คำนวณหาร้อยละของการลดลงของสารอินทรีย์ และเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ให้ปริมาณ PHA มากที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.4.3 ผลของอัตราการเขย่า

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการผลิต PHA มากที่สุด จากข้อ 3.3.4.2 มาศึกษาผลของอัตราการเขย่า โดยเปรียบเทียบการเขย่าที่ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2 เลือกสภาวะที่ให้ปริมาณ PHA มากที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.4.4 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุด จากข้อ 3.3.4.3 มาใช้ศึกษาผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น โดยศึกษาการเติมเชื้อเริ่มต้นที่ 5%, 10% และ 20% ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2 เลือกสภาวะที่ให้ปริมาณ PHA มากที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.4.5 ผลของการเติมกรดโพรพิโอนิกและวาเลอริก

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุด จากข้อ 3.3.4.4 มาใช้ศึกษาผลของชนิดของการเติมกรดโพรพิโอนิกและวาเลอริก โดยศึกษาการเติมกรดโพรพิโอนิก และกรดวาเลอริกอย่างละ 60 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับการใช้กรดทั้งสองชนิดร่วมกัน อย่างละ 50% เพื่อส่งเสริมการสร้างโคพอลิเมอร์ ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2 เลือกสภาวะที่ให้ปริมาณ PHA มากที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.4.6 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยการเติมกรดอินทรีย์ที่ให้การผลิต PHA สูงสุด จากข้อ 3.3.4.5 ที่ความเข้มข้น 0, 30, 60, 100, 140 และ 180 มิลลิโมลาร์ และคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2 เลือกสภาวะที่ให้ปริมาณ PHA มากที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.4.7 ผลของพีเอชเริ่มต้น

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุด จากข้อ 3.3.4.6 มาใช้ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นที่ 6, 6.5, 7 และ 8 ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2 เลือกสภาวะที่ให้ปริมาณ PHA มากที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.4.8 ผลของการฆ่าเชื้อน้ำเสีย

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุด จากข้อ 3.3.4.7 มาใช้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการไม่ฆ่าเชื้อและฆ่าเชื้อน้ำเสียที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2 เลือกสภาวะที่ให้ปริมาณ PHA มากที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.5 การศึกษาการผลิต PHA จากน้ำเสียโดยการเติมแบคทีเรียผสมในถังปฏิกรณ์

3.3.5.1 การศึกษาการผลิต PHA แบบเติมอาหารครั้งเดียว

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุดจากข้อ 3.3.4 ทำการหมักในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร ปริมาตรการใช้งาน 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการศึกษาสภาวะในการหมัก คือ ไม่ให้อากาศ (0 vvm) และให้อากาศที่ 0.5 และ 1 vvm ที่แต่ละอัตราการกวน 2 ระดับคือ

การกวนที่ 100 และ 200 รอบต่อนาที (ทั้งหมด 6 ชุดการทดลอง) ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2 เลือกสภาวะที่ให้ปริมาณ PHA มากที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.5.2 การศึกษาการผลิต PHA แบบกึ่งต่อเนื่อง

เลือกสภาวะที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุดจากข้อ 3.3.5.1 สภาวะอื่นๆเช่นเดียวกับข้อ 3.3.5.1 เมื่อเวลาที่มีการสะสม PHA สูงที่สุดในข้อ 3.3.5.1 ให้มีการถ่ายน้ำหมักออก 50% และเติมอาหารใหม่ 50% ทำการทดลองต่ออีก 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2

3.3.6 การศึกษาองค์ประกอบหน่วยย่อยของ PHA ด้วย GC-FID

3.3.6.1 การสกัดและตกตะกอน PHA

นำเซลล์จากข้อ 3.3.5 มาสกัดและตกตะกอน PHA โดยการเติม sodium dodecyl sulfate (SDS) 1% w/v ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชเป็น 10 ลงในเซลล์ที่ผ่านการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งและบ่มบนเครื่องเขย่า (orbital shaker) เป็นระยะเวลา 60 นาทีด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส แล้วเจือจางให้ได้ 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีและล้างด้วย deionized water ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอะซีโตน 5 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำส่วนของตะกอนมาล้างด้วยเอทธานอลบริสุทธิ์ 99.8% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำตะกอนสุดท้ายไปบ่มแห้งที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Grothe and Chisti, 2000)

3.3.6.2 การวิเคราะห์หาหน่วยย่อยของพอลิเมอร์

วิเคราะห์หาองค์ประกอบของสาร PHA เพื่อหาสัดส่วนระหว่าง HB และ HV โดยใช้ Gas chromatography โดยการเตรียมเมธิลเอสเทอร์ของพอลิเมอร์ด้วยการนำพอลิเมอร์ 4-10 มิลลิกรัม จากข้อ 3.3.6.1 ละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟูริก-เมทานอล (15:85) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อทำการเปลี่ยนกรดไขมันให้กลายเป็นเมธิลเอสเทอร์แล้ววิเคราะห์ด้วยการใช้ GC-FID ซึ่งใช้ capillary column (Stabilwax-DA, model Restek 06313) กำหนดอุณหภูมิของ injector และ detector เป็น 250°ซ โดยกำหนดโปรแกรมอุณหภูมิของ oven ไว้ที่ 80°ซ เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้น

เป็น 200°ซ ด้วยอัตรา 7°ซ/min และใช้สาร PHA จาก Aldrich (USA) เป็นสารมาตรฐานที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบชนิดของ PHA (ดัดแปลงจาก Ganzeveld *et al.*, 1999)

3.3.7 การศึกษาการผลิต PHA เชิงเศรษฐศาสตร์

คำนวณหาอัตราการผลิตของ PHA และคำนวณต้นทุนคงที่ทั้งหมดและต้นทุนแปรผันทั้งหมดจาก การผลิต PHA ที่ได้จากข้อ 3.3.5 หลังจากนั้นนำมาคำนวณระยะเวลาคืนทุน โดย

$$\text{ระยะเวลาคืนทุน (เดือน)} = \frac{\text{ต้นทุนคงที่ทั้งหมด (บาท)}}{\text{รายได้ทั้งหมด (บาท/เดือน)- ต้นทุนแปรผันทั้งหมด (บาท/เดือน)}}$$

โดยที่

ต้นทุนคงที่ทั้งหมด = ค่าใช้จ่ายที่จ่ายเพียงครั้งเดียวในช่วงแรกของการติดตั้งระบบ เช่น ค่าก่อสร้างถังหมักและค่าอุปกรณ์ต่างๆ

ต้นทุนแปรผันทั้งหมด = ค่าใช้จ่ายที่ต้องจ่ายตลอดช่วงเวลาที่เดินระบบ เช่น ค่าไฟฟ้า ค่าซ่อมบำรุง ค่าวัตถุดิบ เป็นต้น

รายได้ทั้งหมด = อัตราการผลิตของ PHA คูณด้วยราคาของ PHA