ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม — **สาขา**

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม — **ภาควิชา**

เรื่อง การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียเศษอาหาร

Isolation of Microorganism for Producing Hydrogen Gas from Food Wastewater

นามผู้วิจัย นางสาวนรีรัตน์ คำกล่อมใจ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภัทรา เพ่งธรรมกีรติ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์ประไพพิศ ชัยรัตนมโนกร, D.Eng.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จักรกฤษณ์ มหัจฉริยวงศ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียเศษอาหาร

Isolation of Microorganism for Producing Hydrogen Gas from Food Wastewater

โดย

นางสาวนรีรัตน์ คำกล่อมใจ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)
พ.ศ. 2552

นรีรัตน์ คำกล่อมใจ 2552: การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียเศษอาหาร ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม) สาขาวิชาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภัทรา เพ่งธรรมกีรติ, Ph.D. 102 หน้า

ก๊าซไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานจากน้ำมันเชื้อเพลิงได้เป็นอย่างดี การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพ สามารถใช้วัตถุดิบที่เป็นสารอินทรีย์หรือของเสียอินทรีย์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกากตะกอนน้ำเสีย และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียเศษอาหารโดยใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ ผลการศึกษาการปรับสภาพเบื้องต้นของกากตะกอนน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบ UASB พบว่า การปรับสภาพด้วยความร้อนสามารถยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทนได้ดีกว่าการปรับสภาพด้วยกรดและการไม่ปรับสภาพ การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีต่าง ๆ พบเชื้อเป็นจำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 3 ไอโซเลท คือ U1 U2 และ H3 โดยเชื้อ H3 ซึ่งเป็นเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด 53.73 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดไปทำการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี automatic product identification (API) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ตัวอย่าง H3 เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ โดยการหมักในน้ำเสียเศษอาหาร พบว่าการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร หมักในน้ำเสียเศษอาหาร 95 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียเศษอาหารเท่ากับ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนและผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 477.14 มิลลิลิตรต่อลิตร และ 1.80 มิลลิโมลต่อกรัมซีโอดี ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงว่าน้ำเสียเศษอาหารสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งนอกจากจะได้พลังงานทดแทนแล้ว ยังสามารถช่วยลดปริมาณน้ำเสียเศษอาหารที่อาจมีต่อสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Nareerut Kamglomjai 2009: Isolation of Microorganism for Producing Hydrogen Gas from Food Wastewater. Master of Science (Environmental Technology and Management), Major Field: Environmental Technology and Management, Department of Environmental Science. Thesis Advisor: Assistant Professor Patthra Pengthamkeerati, Ph.D. 102 pages.

Hydrogen gas is a promising alternative energy, which has a potential for substituting fossil fuels. Hydrogen gas can be produced from both organic substances and organic wastes by biological process. The objectives of this study were to isolate effectively hydrogen-producing microorganism strains obtained from wastewater sludge and to determine the optimum conditions for hydrogen production by the isolated microorganism. Results from pretreating UASB sludge showed that heat-shock pretreatment could inhibit activity of methanogen greater than the acid pretreatment or no pretreatment. There were ten isolated strains from the pretreated sludge, but only three isolated strains could produce hydrogen gas, which were labeled as U1, U2 and H3. In addition, H3 was a heat-shock pretreated microorganism that could produce a greatest hydrogen gas of 53.73 ml l^{-1} when compared to the other two strains. The H3 strain was then analyzed by the automatic product identification (API) method at 37 °C, which revealed that this H3 strain was classified as *Klebsiella pneumoniae*. The optimum conditions of this strain for hydrogen production by using food wastewater as a substrate, were inoculum size of 5 ml in food wastewater of 95 ml, the initial COD of 20,000 mg l^{-1}, the initial pH of 9 and incubation temperature at 37 °C for 48 hours. These conditions resulted in the highest hydrogen production of 477.14 ml l^{-1} or 1.80 mmol g COD^{-1}. This finding suggests that food wastewater can be used as a substrate for biohydrogen production. It is not only being an alternative source of energy, but also reducing food wastewater and its environmental consequences.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทรา เพ่งธรรมกีรติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์ ดร. ประไพพิศ ชัยรัตนมโนกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาเป็นอย่างสูง รวมทั้งพี่น้องในครอบครัวทุกคน ที่ให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน ตลอดเวลาที่กำลังศึกษาและทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง รวมทั้งกำลังใจที่ดีที่มีให้กันตลอดมา

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สัญญาเลขที่ MRG-WII515S020) ร่วมกับ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปี 2551 ความเห็นในรายงานผลการวิจัยเป็นของผู้รับทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป และทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KURDI) ปี 2552 ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ขอกราบขอบคุณ คุณพัทธนันท์ นาถพินิจ และเจ้าหน้าที่ในฝ่ายสิ่งแวดล้อมและเทคโนโลยี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ให้คำปรึกษาในการทำการวิจัย ตลอดจนการให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทำวิจัย และผู้ประกอบการในโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างน้ำเสียเศษอาหาร

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้กับข้าพเจ้า รวมทั้งความช่วยเหลือต่าง ๆ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมทุกท่าน ตลอดจนรุ่นพี่นิสิต เพื่อนนิสิต และน้อง ๆ ปริญญาโท ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจเสมอมา

นรีรัตน์ คำกล่อมใจ

ตุลาคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	35
อุปกรณ์	35
วิธีการ	37
ผลและวิจารณ์	46
สรุปและข้อเสนอแนะ	78
สรุป	78
ข้อเสนอแนะ	79
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	80
ภาคผนวก	90
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์	91
ภาคผนวก ข ข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางสถิติ	98
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	102

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	11
2	Cyanobacteria ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	12
3	คุณลักษณะของตัวอย่างเศษอาหารและกากตะกอนน้ำเสีย	34
4	ผลของการปรับสภาพของเชื้อผสมต่อปริมาตรก๊าซทั้งหมด เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน เปอร์เซ็นต์ก๊าซมีเทน และปริมาณก๊าซมีเทน ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.5 และ 5 มิลลิลิตร ต่อน้ำเสียเศษอาหาร 95 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง	47
5	ผลของการปรับสภาพต่อจำนวนเชื้อ ลักษณะของเชื้อ เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน และปริมาตรของก๊าซไฮโดรเจน	50
6	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและวิธีการปรับสภาพหัวเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความร้อน	52
7	ผลการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ตัวอย่าง H3 โดยวิธี API	55
8	ผลของอัตราส่วนปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อน้ำเสียเศษอาหารที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าพีเอชสุดท้าย ซีโอดีสุดท้าย ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน และปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ที่สภาวะศึกษาคือ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง	58
9	ผลของอัตราส่วนปริมาณเชื้อต่อน้ำเสียเศษอาหารที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้าย ที่สภาวะศึกษาคือ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง	59
10	ผลของพีเอชเริ่มต้นที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าพีเอชสุดท้าย ซีโอดีสุดท้าย ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน และปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง	61

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	ผลของพีเอชเริ่มต้นที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้าย ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง	63
12	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าพีเอชสุดท้าย ซีโอดีสุดท้าย ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน และปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง	64
13	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้าย ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง	65
14	ผลของปริมาณซีโอดีเริ่มต้นที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าพีเอชสุดท้าย ซีโอดีสุดท้าย ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน และปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง	67
15	ผลของปริมาณซีโอดีเริ่มต้นที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าความเข้มข้นกรดไขมันระเหยสุดท้าย ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง	68
16	ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการหมักที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าพีเอชสุดท้าย ซีโอดีสุดท้าย ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน และปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	70
17	ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการหมักที่แตกต่างกัน	74
18	การเปรียบเทียบผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	76

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก1	น้ำหนักตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ค่า MLSS และ MLVSS	96
ข1	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณเชื้อเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน	99
ข2	การทดสอบความแตกต่างรายคู่ด้วย LSD ของปริมาณเชื้อเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน	99
ข3	การวิเคราะห์ทางสถิติค่าพีเอชเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน	99
ข4	การทดสอบความแตกต่างรายคู่ด้วย LSD ของค่าพีเอชเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน	100
ข5	การวิเคราะห์ทางสถิติอุณหภูมิเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธี t-test	100
ข6	การวิเคราะห์ทางสถิติค่าซีโอดีเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน	100
ข7	การทดสอบความแตกต่างรายคู่ด้วย LSD ของค่าซีโอดีเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน	101
ข8	การวิเคราะห์ทางสถิติระยะเวลาที่ใช้ในการหมักกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน	101
ข9	การทดสอบความแตกต่างรายคู่ด้วย LSD ของระยะเวลาที่ใช้ในการหมักกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน	101

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเปรียบเทียบค่าพลังงานของเชื้อเพลิงไฮโดรเจนกับเชื้อเพลิงชนิดอื่น	7
2	วัตถุดิบในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	8
3	การผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดย Clostridial system	18
4	การผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดย *Escherichia coli* system	19
5	กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรท ภายใต้สภาวะการหมักที่มีหรือไม่มีออกซิเจน	25
6	กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบไม่ใช้แสง	27
7	ความสัมพันธ์ของการเกิดกรดไขมันระเหยและก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบไม่ใช้แสง	29
8	องค์ประกอบของมูลฝอยเทศบาลในเขตปริมณฑล (จังหวัดสมุทรปราการ นครปฐม สมุทรสาคร ปทุมธานี และนนทบุรี)	33
9	การ spread plate	39
10	การ streak plate ด้วยเทคนิค cross streak	40
11	เชื้อแบคทีเรียในอาหาร reinforced clostridial medium	41
12	ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียในน้ำเสียเศษอาหาร	42
13	การเก็บก๊าซด้วยวิธีการแทนที่น้ำ	45
14	ลักษณะของโคโลนีในจานเลี้ยงเชื้อบนอาหาร reinforced clostridial medium	53
15	การย้อมสีแกรมของเชื้อจุลินทรีย์ H3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบกำลังขยาย 1,000 เท่า	54
16	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาที่ใช้ในการหมักที่มีต่อค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายและปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	72

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียเศษอาหาร

Isolation of Microorganism for Producing Hydrogen Gas from Food Wastewater

คำนำ

ความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในปัจจุบันได้ก่อให้เกิดการขยายตัวในส่วนของภาคอุตสาหกรรม อีกทั้งการเพิ่มขึ้นของประชากรโลก ได้ส่งผลให้นานาประเทศต้องพึ่งพาน้ำมันเชื้อเพลิงมากขึ้น เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานทั้งการใช้งานในชีวิตประจำวันหรือภาคอุตสาหกรรม ประกอบกับราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกได้เพิ่มสูงขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นต้องหาแหล่งพลังงานทดแทนในประเทศ

พลังงานไฮโดรเจน (hydrogen energy) เป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานจากน้ำมันเชื้อเพลิงได้เป็นอย่างดี กล่าวคือ พลังงานไฮโดรเจนนี้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับการเผาไหม้ที่มีประสิทธิภาพสูง สะอาด และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เนื่องจากในกระบวนการออกซิไดซ์ระหว่างก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซออกซิเจนนั้น ได้เพียงน้ำและพลังงานความร้อนเป็นผลิตภัณฑ์เท่านั้น (Momirlan and Veziroglu, 1999) ด้วยเหตุนี้พลังงานไฮโดรเจนจึงไม่ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจกและไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ ทั้งนี้พลังงานไฮโดรเจนสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในครัวเรือนเช่นเดียวกับการใช้น้ำมันเชื้อเพลิง และสามารถนำไปใช้กับเซลล์เชื้อเพลิง (fuel cell) ในการผลิตไฟฟ้าได้ วิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถทำได้หลายวิธี เช่น กระบวนการเปลี่ยนรูปสารไฮโดรคาร์บอนด้วยไอน้ำ (steam reforming of hydrocarbons) อีเล็คโตไลซีสท์ด้วยน้ำ (electrolysis of water) ก๊าซซิฟิเคชั่น (gasification) เป็นต้น (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2550) สำหรับกระบวนการเปลี่ยนรูปสารไฮโดรคาร์บอนด้วยไอน้ำนั้น เป็นกระบวนการที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างไอน้ำทำปฏิกิริยากับก๊าซมีเทน เกิดเป็นก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งปัญหาหลักของกระบวนการนี้ คือ การปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณมาก ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจกที่สำคัญ (ธรรมนูญ, 2550) สำหรับกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในวิธีการอื่น ๆ ก่อให้เกิดปัญหามลพิษขึ้น เช่น เกิดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ และซัลเฟอร์ เป็นต้น (Haffman, 1935) นอกจากนี้กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนยังสามารถผลิตได้จากกระบวนการชีวภาพ โดยวิธี dark fermentation และ

photosynthesis ซึ่งวัตถุดิบที่ใช้เป็นสารอินทรีย์หรือของเสียอินทรีย์ เช่น เศษอาหาร โดยวิธีการผลิตนี้ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางด้านสิ่งแวดล้อม

ปัญหาขยะเศษอาหารปัจจุบันมีความสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมเช่นกัน เพราะขยะเศษอาหารเหล่านี้มีความชื้นสูง ถ้าปล่อยทิ้งไว้นานจะทำให้เกิดน้ำชะขยะ (leachate) ก่อให้เกิดกลิ่นรบกวน และเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรคชนิดต่าง ๆ (ปราโมทย์, 2549) โดยในกรุงเทพมหานครมีขยะเศษอาหารกว่า 3,134 ตันต่อวัน และในปริมณฑลมีกว่า 1,054 ตันต่อวัน เมื่อรวมขยะเศษอาหารทั้งประเทศไทยมีตัวเลขสูงถึง 10,056 ตันต่อวัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2541) ขยะเศษอาหารส่วนใหญ่มาจากโรงอาหาร ร้านอาหารหรือภัตตาคาร ซึ่งบางครั้งเศษอาหารเหล่านี้ถูกระบายลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติและเป็นสาเหตุหนึ่งของการทำให้เกิดน้ำเสียในแหล่งน้ำสาธารณะ ขยะเศษอาหารเหล่านี้สามารถนำมาผลิตเป็นก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ เนื่องจากมีสารอินทรีย์ในปริมาณสูง

จุลินทรีย์ที่จะนำมาเป็นหัวเชื้อในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน สามารถหาได้จากการนำเชื้อจุลินทรีย์จากระบบน้ำเสียชุมชนมาผ่านการบำบัดขั้นต้น (pretreatment) เช่น ผ่านการหมักแบบไร้อากาศแล้วนำไปต้มหรือปรับกรด (Lay *et al*., 1998; Kim *et al*., 2004) โดยตะกอนอินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียจะมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่หลายชนิด และบางชนิดสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ จากการศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจน พบว่า แบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาพไร้อากาศมีอยู่หลายกลุ่ม แบ่งตามกลไกทางชีวเคมีที่ใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบ่งได้ 3 ระบบ ได้แก่ Clostridial system, *Escherichia coli* system และ *Desulfovibrio desulfuricans* system ซึ่ง 2 ระบบแรกสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้อย่างมีนัยสำคัญ เช่น แบบ Clostridial system ให้ผลผลิตสูงสุดคือ 4 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ส่วนแบบ *E. coli* system ให้ผลผลิตได้น้อยกว่าคือได้ 2 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส แต่มีกลไกง่ายกว่าแบบแรก (เกรียงศักดิ์, 2547) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการผลิตพลังงานไฮโดรเจนด้วยวิธี biotechnology โดยใช้แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงหรือ microalgae ผลิตไฮโดรเจน ซึ่งใช้แสงอาทิตย์และน้ำหรืออินทรียวัตถุเป็นสารตั้งต้น แต่ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับการ นำไปใช้งานได้จริง ซึ่งเป็นพื้นฐานที่สำคัญ (Benemann, 1997; Levin *et al*., 2004; Nath and Das, 2004) ส่วนแบคทีเรียที่เจริญได้ภายใต้สภาวะไม่ใช้แสง ซึ่งใช้อินทรียวัตถุเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักนั้น โดยส่วนใหญ่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนต่ำ 10-20 เปอร์เซ็นต์ และมากที่สุดเกือบ 30 เปอร์เซ็นต์ (Das and Veziroglu, 2001; Van Ginkel and Logan, 2005)

สภาวะแวดล้อมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยจุลินทรีย์มีส่วนสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ โดยจากงานศึกษาของ สุขสมาน และ อลิศรา (2550) ที่ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำปะหลัง โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงพวก *Rhodospirillum rubrum* ผลการศึกษาพบว่า สภาวะพีเอชเริ่มต้นในกระบวนการหมักเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ และค่าพีเอชในระหว่างการหมักที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 6-7

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกากตะกอนน้ำเสีย

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียเศษอาหารโดยใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

การตรวจเอกสาร

1. ประเภทของพลังงาน

1.1 มาตรฐานสากลของโลก ได้จัดแบ่งการพัฒนาแหล่งทรัพยากรพลังงานไว้เป็น 2 ประเภท คือ (ธ. กสิกรไทย, 2525)

1) แหล่งทรัพยากรพลังงานตามแบบ (conventional energy resource) เป็นพลังงานที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานหลักของโลก มีการพัฒนามาเป็นเวลายาวนาน ด้วยการอาศัยความรู้ทางวิชาการและเทคโนโลยีที่ทันสมัยพัฒนานำมาใช้ให้เป็นประโยชน์ เช่น แหล่งพลังน้ำ แหล่งถ่านหิน แหล่งน้ำมันและก๊าซธรรมชาติ พลังงานนิวเคลียร์ ไม้ ฟืน แกลบ ชานอ้อย และผลิตภัณฑ์จากปิโตรเลียมบางชนิด เช่น น้ำมันเตา น้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน เป็นต้น

2) แหล่งทรัพยากรพลังงานนอกแบบ (non-conventional energy resource) เป็นพลังงานที่ยังไม่ได้รับการพัฒนาจนถึงขั้นที่นำมาใช้ประโยชน์ได้ในเชิงเศรษฐกิจ เนื่องจากความรู้และเทคโนโลยีในการพัฒนาแหล่งพลังงานนี้ยังมีข้อจำกัด พลังงานนอกแบบที่ได้รับความสนใจ ได้แก่ หินน้ำมัน ทรายน้ำมัน ก๊าซชีวภาพ เชื้อเพลิงแอลกอฮอล์ ก๊าซไฮโดรเจน พลังงานลม พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานความร้อนใต้พิภพ พลังงานจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม เป็นต้น

1.2 การจำแนกแหล่งพลังงานตามที่มาของพลังงาน ซึ่งจำแนกได้ 2 ประเภท ดังนี้ (คณะวิทยาศาสตร์ ม. ศรีนครินทรวิโรฒ, 2531)

1) พลังงานต้นกำเนิด (primary energy) เป็นพลังงานที่ได้จากแหล่งพลังงานธรรมชาติ ซึ่งได้แก่ น้ำ แสงแดด ลม น้ำมันดิบ ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ หินน้ำมัน ความร้อนใต้พิภพ แร่นิวเคลียร์ ไม้ฟืน แกลบจากการสีข้าวเปลือก ชานอ้อยจากการผลิตน้ำตาล ของเหลือทิ้งจากการใช้ในชีวิตประจำวัน ของเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นต้น

2) พลังงานแปรรูป (secondary energy) เป็นพลังงานที่ได้มาโดยการนำพลังงานต้นกำเนิดมาแปรรูปเพื่อใช้ประโยชน์ในลักษณะต่าง ๆ กันได้แก่ พลังงานไฟฟ้า พลังงานความร้อน ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมในส่วนที่ใช้เป็นเชื้อเพลิง ถ่านโค้ก ก๊าซชีวภาพ เป็นต้น

1.3 การจำแนกตามลักษณะการเกิดใหม่ของพลังงาน ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้ (คณะวิทยาศาสตร์ ม. ศรีนครินทรวิโรฒ, 2531)

1) พลังงานหมุนเวียน (renewable energy) เป็นพลังงานที่สามารถหมุนเวียนนำกลับมาใช้อีกได้ เช่น น้ำ แสงอาทิตย์ ลม มูลปศุสัตว์ ของเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นต้น

2) พลังงานไม่หมุนเวียน (non-renewable energy) เป็นพลังงานที่ไม่สามารถหมุนเวียนนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เช่น เชื้อเพลิงฟอสซิล แร่นิวเคลียร์ เป็นต้น

2. พลังงานไฮโดรเจนและคุณสมบัติ

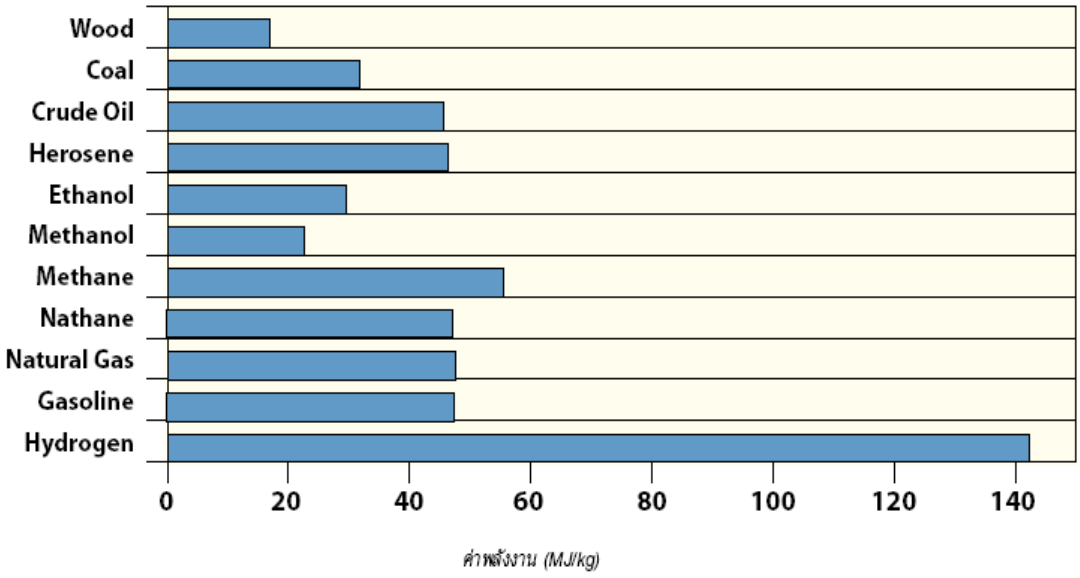
ไฮโดรเจนเป็นธาตุเคมีในตารางธาตุมีสัญลักษณ์ H และมีเลขอะตอมเท่ากับ 1 ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศมาตรฐาน ไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่โมเลกุลมี 2 อะตอม

พลังงานไฮโดรเจน (hydrogen energy) เป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานจากน้ำมันเชื้อเพลิงได้เป็นอย่างดี กล่าวคือ พลังงานไฮโดรเจนนี้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับการเผาไหม้ที่มีประสิทธิภาพสูง สะอาด และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เนื่องจากในกระบวนการออกซิไดซ์ระหว่างก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซออกซิเจนนั้นได้เพียงน้ำและพลังงานความร้อนเป็นผลิตภัณฑ์เท่านั้น (Momirlan and Veziroglu, 1999) ดังสมการที่ 1

$$2H_2\,(g) + O_2\,(g) \longrightarrow 2H_2O\,(l) + \text{energy} \qquad (1)$$

ด้วยเหตุนี้พลังงานไฮโดรเจนจึงไม่ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจกและไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ ทั้งนี้พลังงานไฮโดรเจนสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในครัวเรือนเช่นเดียวกับการใช้น้ำมันเชื้อเพลิง และสามารถนำไปใช้กับเซลล์เชื้อเพลิง (fuel cell) ในการผลิตไฟฟ้าได้

คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (2550) ให้ไว้คือ ไม่มีสีและไม่มีกลิ่น เป็นธาตุที่เบาและเล็กที่สุด เบากว่าอากาศ 14 เท่า น้ำหนัก 1 โมล เท่ากับ 2.02 กรัม ความหนาแน่น 0.089 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร จุดเดือดต่ำ -253 องศาเซลเซียส ติดไฟได้ง่าย ใช้พลังงานจุดไฟน้อย 0.02 เมกกะจูล มีช่วงการติดไฟกว้าง A/f ratio = 364 ถึง 5 ค่าพลังงานความร้อนเชื้อเพลิงประมาณ 142 เมกกะจูลต่อกิโลกรัม เป็นพลังงานที่มีประสิทธิภาพสูงเมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงชนิดอื่น ซึ่งสูงกว่าน้ำมันประมาณ 3 เท่า มากกว่าถ่านหินกว่า 4 เท่า (ภาพที่ 1) และเป็นการเผาไหม้ที่สะอาด

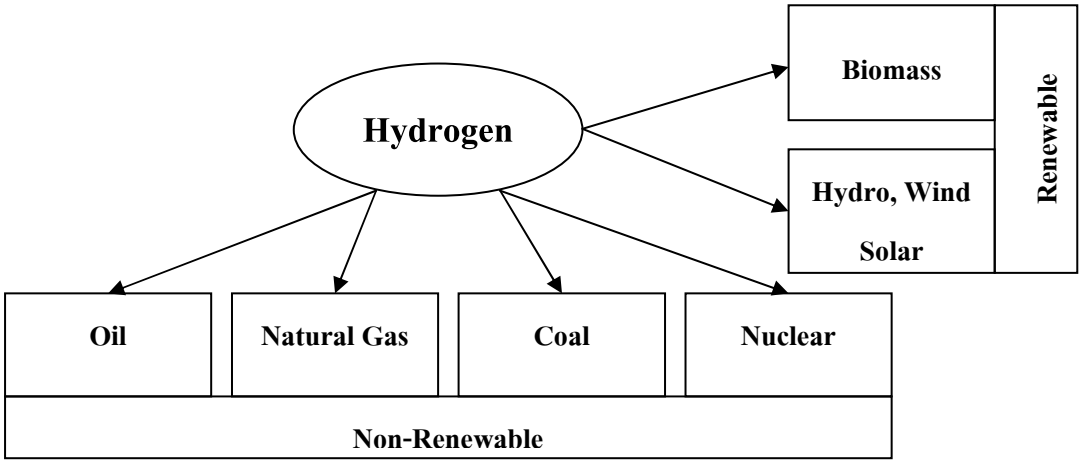


ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบค่าพลังงานของเชื้อเพลิงไฮโดรเจนกับเชื้อเพลิงชนิดอื่น

ที่มา: กระทรวงพลังงาน (2550)

3. กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลายชนิด โดยวัตถุดิบนี้มีทั้งที่เป็นวัตถุดิบหมุนเวียน และวัตถุดิบไม่หมุนเวียน การนำวัตถุดิบหมุนเวียนมาใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะช่วยลดการใช้วัตถุดิบที่ไม่หมุนเวียนได้ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 วัตถุดิบในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ที่มา: ปรับปรุงจาก กระทรวงพลังงาน (2550)

กระบวนการในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2550) ดังนี้

1) รีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (steam reforming) เป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการป้อนไอน้ำเข้าไปทำปฏิกิริยากับก๊าซมีเทนได้ก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นก๊าซผลิตภัณฑ์โดยเป็นปฏิกิริยาดูดความร้อน ดังสมการที่ 2

$$CH_4\,(g) + 2H_2O\,(l) \xrightarrow{\text{heat}} CO_2\,(g) + 4H_2\,(g) \qquad (2)$$

$$(\Delta H^{o}_{298} = 90.6\ \text{kJ/mol})$$

2) วิธีการสันดาปบางส่วน (partial oxidation) ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาคายความร้อนส่งผลให้มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างมาก ดังนั้นจึงเป็นการยากต่อการลดความร้อนที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากปฏิกิริยาได้อย่างปลอดภัย จึงทำให้กระบวนการนี้ยากต่อการควบคุม โดยแบ่งออกเป็น

• กระบวนการออกซิเดชันบางส่วนทางตรงแสดงด้วยสมการที่ 3

$$CH_4\,(g) + \tfrac{1}{2}\,O_2\,(g) \longrightarrow CO\,(g) + 2H_2\,(g) \qquad (3)$$

$$(\Delta H^{o}_{298} = -36\ \text{kJ/mol})$$

• กระบวนการออกซิเดชันบางส่วนทางอ้อมแสดงด้วยสมการที่ 4

$$CH_4\,(g) + 2O_2\,(g) \longrightarrow CO\,(g) + 2H_2O\,(l) + 2H_2\,(g) \qquad (4)$$
$$(\Delta H^{o}_{298} = -803\ kJ/mol)$$

3) รีฟอร์มมิ่งด้วยความร้อน (autothermal reforming) เป็นการรวมกันระหว่างปฏิกิริยาการเผาไหม้บางส่วน (partial oxidation) และปฏิกิริยารีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (steam reforming)

4) อีเล็คโตไลซีสท์ด้วยน้ำ (electrolysis of water) จะใช้พลังงานไฟฟ้าที่อาจได้มาจากพลังงานนิวเคลียร์หรือพลังงานหมุนเวียน เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงในสมการที่ 5

$$2H_2O\,(l) \xrightarrow{\text{electricity}} 2H_2\,(g) + O_2\,(g) \qquad (5)$$

5) ก๊าซซิฟิเคชั่น (gasification) เป็นการที่วัตถุดิบ เช่น ชีวมวลหรือถ่านหิน ถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซผสมระหว่างก๊าซไฮโดรเจน คาร์บอนมอนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และสารประกอบอื่น ๆ เช่น ชาร์ ทาร์ และฟีนอล โดยการให้ความร้อนภายใต้ความดันไอน้ำและมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ป้อนเข้า ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงในสมการที่ 6

$$C_6H_{12}O_6\,(aq) + O_2\,(g) + H_2O\,(l) \xrightarrow{\text{heat}} CO\,(g) + CO_2\,(g) + H_2\,(g) + \text{other species} \qquad (6)$$

6) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธี thermochemistry เป็นกระบวนการที่มีการพัฒนาการผลิตโดยการใช้สารประกอบปรอทโบรไมด์และแคลเซียมในกระบวนการผลิต ซึ่งสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 200-780 องศาเซลเซียส ขั้นตอนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนดังกล่าว เรียกว่า thermochemistry ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ พลังงานทั้งหมดถูกนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และผลผลิตที่ได้สามารถแยกออกได้ง่าย แต่ข้อเสียก็คือปัญหามลพิษจากการใช้สารประกอบโลหะหนักอันได้แก่ ปรอทและโบรไมด์

7) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (biological treatment) โดยอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งใช้วัตถุดิบเป็น

สารอินทรีย์หรือของเสียอินทรีย์ (จินตนา, 2543; Hillmer and Gest, 1977; Takahashi *et al*., 1979; Watanabe *et al*., 1980; Buranakarl *et al*., 1985; Sasikala *et al*., 1991; Miura *et al*., 1995; Fascetti *et al*., 1998; Nakada *et al*., 1999; Yetis *et al*., 2000; Barbosa *et al*., 2001; Zhu *et al*., 2002; Eroglu *et al*., 2004; Kim *et al*., 2004)

8) วิธีที่ดัดแปลงและพัฒนาอื่น ๆ เช่น อิเล็คโตรไลซิสที่อาศัยเซมิคอนดักเตอร์อิเลคโทรด (semiconductor electrode) ที่ใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ อิเลคโทรดที่ใช้เป็นชนิด titanium dioxide (TiO_2 electrode) ที่ต่อเข้ากับ platinum black electrode ผ่านวงจรไฟฟ้าภายนอก เมื่อ TiO_2 electrode ได้รับพลังงานแสงอาทิตย์ จะเกิดการเคลื่อนที่ของกระแสไฟฟ้าจาก platinum electrode ไปยัง TiO_2 electrode โดยอาศัยกระแสไฟฟ้าจากภายนอก เมื่อแยกโมเลกุลของน้ำไปเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนอะตอมแล้ว ไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่ platinum electrode และออกซิเจนอะตอมจะไปจับที่ TiO_2 electrode เป็นต้น

4. จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากชีวมวลนั้นมีทั้งพวกที่เป็น (1) โปรคาริโอต (prokaryote) เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เจริญภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (anoxygenic phototrophic bacteria) และ blue green bacteria และ (2) ยูคาริโอต (eukaryote) ได้แก่ พวกที่เป็นสาหร่ายสีเขียว (Tohru and Yasuo, 1989) แต่มักจะมีการศึกษาในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมากกว่ากลุ่มยูคาริโอต เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญและผลิตไฮโดรเจนได้โดยการใช้สารอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ น้ำตาล รวมทั้งน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรหลายประเภท เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง น้ำทิ้งจากโรงงานน้ำตาล และโรงงานผลิตสับปะรด เป็นต้น (Sasikala *et al*., 1992; Sigh *et al*., 1994)

นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน อาจแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดโฟโตโทรฟิค (phototrophic) และชนิดเคโมโทรฟิค (chemotrophic)

4.1 กลุ่มโฟโตโทรฟ (phototrophs)

4.1.1 สาหร่าย (algae)

สาหร่าย (algae) เป็นสิ่งมีชีวิตตั้งแต่ขนาดเล็ก ๆ เพียงเซลล์เดียวไปจนถึงขนาดใหญ่ ลอยเป็นแพอยู่ในน้ำทะเล อาจยาวเป็นร้อย ๆ ฟุต มีคลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุที่สำคัญ สามารถสังเคราะห์แสงเองได้ จึงดำรงชีวิตคล้ายพืช มีอยู่ทั่วไปทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย น้ำทะเล บนบก แม้กระทั่งในหิมะหรือน้ำพุร้อน ถ้ามีความชื้นและแสงสาหร่ายสามารถเจริญขึ้นได้ เนื่องจากคุณสมบัติที่สำคัญของสาหร่ายคือสามารถสังเคราะห์แสงได้ จึงให้ออกซิเจนแก่สิ่งแวดล้อม ในขณะเดียวกันสามารถใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ยุวดี, 2552) นอกจากนี้ได้มีการใช้สาหร่ายเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน สาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

สาหร่ายสีเขียว	ไดอะตอม	สาหร่ายสีแดง
Ankistrodesmus	*Nitzchia*	*Ceremium*
Chlamydononas		*Chrondrus*
Chlorella		*Corallina*
Codium		*Callithamnion*
Coelastrum		*Porphyridium*
Dunaliella		
Kirchneriella		
Scenedesmus		
Selenastrum		

ที่มา: ปรับปรุงจาก Kondratieva and Gogotov (1983); Zajic *et al*. (1978)

4.1.2 Oxygenic phototrophic bacteria

กลุ่มนี้ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรีย หรือแบคทีเรียสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green bacteria) ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็น oxygenic phototrophic prokaryote ที่ประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ และมีกระบวนการสังเคราะห์แสงและชนิดของคลอโรฟิลล์ในลักษณะเดียวกับสาหร่ายและพืชสีเขียว

ตารางที่ 2 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

Cyanobacteria		
Anabaena	*Lyngbya*	*Spirulina*
Aphanocapsa	*Mastigocladus*	*Stygonema*
Calothrix	*Microcystis*	*Synechococcus*
Chlorogloea	*Nostoc*	*Synechocystis*
Gloeobacter	*Oscillatoria*	*Tolypothrix*
Gloeocapsa	*Plectonema*	
Gloeothece	*Scytonema*	

ที่มา: ปรับปรุงจาก Kondratieva and Gogotov (1983); Zajic *et al*. (1978)

สมรักษ์ (2550) ศึกษาสาหร่ายพันธุ์ไทยพบว่าสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูง ต้นทุนต่ำ และผลพลอยได้คือใช้บำบัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรม สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็นพลังงานไฟฟ้าได้ เนื่องจากประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงจึงเลือกศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวและสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่พบในประเทศ สาหร่ายที่เลือกใช้ศึกษาคือสาหร่ายสายพันธุ์นอสต็อก 600 มิลลิลิตร เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกระบวนการที่เหมาะสม สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงถึง 50 มิลลิลิตร อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายจะต้องพัฒนาให้มีความเหมาะสม เนื่องจากหากปล่อยให้สาหร่ายผลิตออกซิเจนออกมามากเกินไป จะเกิดการยับยั้งการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาเทคนิคและหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ อาหารเลี้ยงสาหร่าย อุณหภูมิ และค่าพีเอช เบื้องต้น

ของการวิจัยสามารถพัฒนาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายให้ต้นทุนต่ำลงได้โดยเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำเสีย ซึ่งจากการศึกษาพบว่า น้ำเสียจากโรงงานน้ำตาลทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีและผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มาก ซึ่งผลพลอยได้ของการใช้น้ำเสียจากโรงงานน้ำตาลเป็นอาหารเลี้ยงสาหร่ายคือการบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยลงแหล่งน้ำสาธารณะ

4.1.3 Anoxygenic phototrophic bacteria

แบคทีเรียกลุ่ม anoxygenic phototrophic bacteria ประกอบด้วย 3 กลุ่ม คือ

(1) non-sulfur purple bacteria ได้แก่ *Athiorhodaceae* และ *Rhodospirillaceae*
(2) sulfur purple bacteria ได้แก่ *Chromatiaceae* และ *Thiorhodaceaes*
(3) green sulfur bacteria ได้แก่ *Chlorobiaceae* (Schlegel and Schneider, 1985)

กระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเหล่านี้มีรงควัตถุที่ต่างไปจากไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่ายและพืชสีเขียว คือเป็นแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (bacteriochlorophyll) และคาโรทีนอยด์ (carotenoid) กระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ และสามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์ (sulfide) ซัลเฟอร์ (sulfur) ไธโอซัลเฟต (thiosulfate) สารประกอบอินทรีย์ (organic compounds) หรือโมเลกุลไฮโดรเจน (molecular hydrogen) เป็นสารให้อิเล็กตรอน (electron donor) ได้

ข้อได้เปรียบของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เหนือกว่าไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่าย โดยสรุปคือ กระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ จึงทำให้ไม่มีออกซิเจนไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเหล่านี้มีความสามารถในการใช้สารอินทรีย์หลายชนิดเป็นสารให้อิเล็กตรอนได้ (Sasikala *et al*., 1992; Arik *et al*., 1995) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ทั้งภายใต้สภาวะที่มีแสงหรือไม่มีแสง โดยภายใต้สภาวะที่มีแสง แสงจะไปกระตุ้นแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนเพื่อไปสร้างสารให้พลังงานสูง (ATP) และเกิดการรีดิวซ์ NAD และเฟอร์รีดอกซินจากการใช้ ATP และภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทำให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ แต่ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอินทรีย์ที่เป็นสับสเตรต

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถใช้พลังงานแสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานในการสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ได้เช่นเดียวกับพืชสีเขียว แต่ต่างจากไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่าย และพืชสีเขียวที่ไม่สามารถใช้น้ำเป็นสารให้อิเล็กตรอนได้ กระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง แสดงได้ดังสมการที่ 7

$$CO_2\ (g) + 2H_2A \longrightarrow (CH_2O)\ (aq) + 2A\ (\text{or } A_2) + H_2O\ (l) \qquad (7)$$

เมื่อ A คือ สารประกอบอินทรีย์หรืออนินทรีย์ที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (สำหรับ purple non-sulfur bacteria) และสารอนินทรีย์ที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (สำหรับ purple sulfur และ green bacteria) กระบวนการสังเคราะห์แสงเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ซึ่งอิเล็กตรอนจะถูกถ่ายทอดจากสารให้อิเล็กตรอนไปยังคาร์บอนไดออกไซด์ โดยในพืชสีเขียวนั้นใช้น้ำเป็นสารให้อิเล็กตรอน แต่ในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงใช้สารประกอบที่มีซัลเฟอร์หรือกรดอินทรีย์เป็นสารให้อิเล็กตรอนและใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน โดยไม่มีการสร้างออกซิเจนในกระบวนการสังเคราะห์แสง

เอนไซม์ที่สำคัญในการเร่งกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนคือ เอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการผลิตหรือการนำไฮโดรเจนกลับไปใช้ในเซลล์คือ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสและ hydrogen uptake hydrogenase

สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอนหรือสารให้อิเล็กตรอน กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและไฮโดรจีเนส ตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ความเข้มของแสง พีเอช อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ค่ารีดอกซ์โพเทนเชียล (redox potential)

4.2 กลุ่มเคโมโทรฟ (chemotrophs)

4.2.1 แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic bacteria)

1) กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (strictly anaerobic bacteria) เช่น *Acetobacterium*, *Acetomicrobium*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanococcus*, *Mycoplasma*, *Ruminococcus*, *Sarcina* เป็นต้น (Kondratieva and Gogotov, 1983; Zajic *et al*., 1978)

2) กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic bacteria) เช่น *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Streptococcus* เป็นต้น (Kondratieva and Gogotov, 1983; Zajic *et al*., 1978)

4.2.2 แบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการออกซิเจน (aerobic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนบางชนิดที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในสภาพที่มีออกซิเจน ได้แก่ *Azomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Methylomonas*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* และ *Xanthobacter* เป็นต้น (Kondratieva and Gogotov, 1983; Zajic *et al*., 1978) พบว่า เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะเร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน กิจกรรมของเอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งได้ด้วยออกซิเจน ดังนั้นปฏิกิริยาที่เกิดควบคู่กันกับการตรึงไนโตรเจนคือปฏิกิริยา oxyhydrogen reaction โดยพบว่าใน *Azotobacter* จะมีเอนไซม์ membrane bound hydrogenase ทำหน้าที่เร่งกระบวนการนำไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสกลับเข้าสู่ห่วงโซ่การถ่ายทอดอิเล็กตรอนหรือลูกโซ่ของกระบวนการหายใจ (respiratory chain) เพื่อช่วยป้องกันการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากการทำลายของออกซิเจน

Rhizobium sp. มีเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน ซึ่งผลพลอยได้เป็นก๊าซไฮโดรเจน แต่แบคทีเรียชนิดนี้ไม่มีเอนไซม์ membrane bound hydrogenase ที่ป้องกันการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากการยับยั้งของออกซิเจน แต่มีสาร leghemoglobin ที่พบในปมรากพืชตระกูลถั่ว ในการป้องกันการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งสารนี้จะควบคุมปริมาณออกซิเจนไม่ให้มากเกินไปจนไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

4.2.3 สิ่งมีชีวิตขั้นสูง (high organisms)

สิ่งมีชีวิตขั้นสูง นอกจากจุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ เช่น Trichomonad บางชนิดที่อาศัยอยู่ในลำไส้หรือท่อของระบบสืบพันธุ์ มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Zajic *et al*., 1978) เช่น *Dasytricha ruminantium* และ *Isotricha* species เป็นต้น (Hillman *et al*., 1985)

5. แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic bacteria)

5.1 กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (strictly anaerobic bacteria)

จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะสามารถผลิตไพรูเวทที่เป็นตัวกลาง (intermediate) ในกระบวนการหมักได้ แล้วจึงย่อยสลายไพรูเวทต่อไปโดย phosphoroclastic cleavage ดังสมการที่ 8

$$CH_3COCOOH\ (aq) + H_3PO_4\ (aq) \longrightarrow CH_3COOPO_3H_2\ (aq) + CO_2\ (g) + H_2\ (g) \qquad (8)$$

ทำให้มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนระหว่างกระบวนการข้างต้นหรือที่เรียกว่ากระบวนการ oxidative decarboxylation ของไพรูเวท อิเล็กตรอนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะอยู่ในรูปก๊าซไฮโดรเจน การศึกษาใน *Clostridium pasteurianum* พบว่า สารเฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) เป็นสารตัวกลางในการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากไพรูเวทหรือไฮโดรซัลเฟต (hydrosulfate) ไปเป็นก๊าซไฮโดรเจน โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Gray and Gest, 1965)

ตัวอย่างงานศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการใช้กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจนเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน มีดังต่อไปนี้

Karube *et al*. (1982) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำตาลกลูโคสโดยกิจกรรมของ *Clostridium butyricum* ที่ถูกตรึงรูป (immobilized cell) ใน acetylcellulose filter ร่วมกับการใช้วุ้น พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและเปปโตน จะสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นก๊าซไฮโดรเจนได้ 45 เปอร์เซ็นต์

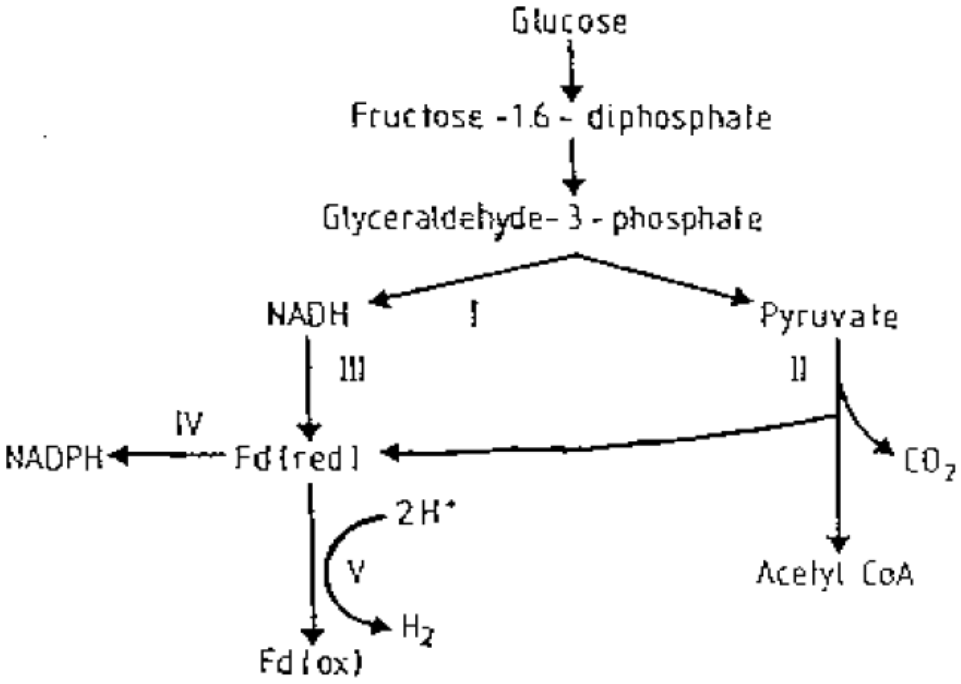
Miyake *et al*. (1984) เพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium butyricum* สายพันธุ์ IFO-13949 ร่วมกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodopseudomonas sp.* สายพันธุ์ RV ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของกลูโคส ภายใต้การให้แสง พบว่า *Clostridium butyricum* สามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นบิวทิเรต พร้อมกับผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยอาศัยการเร่งของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ในขณะเดียวกัน *Rhodopseudomonas sp.*สายพันธุ์ RV จะสร้างก๊าซไฮโดรเจนจากบิวทิเรตที่ถูกผลิตขึ้นโดยอาศัยการเร่งของเอนไซม์ไนโตรจีเนส เป็นต้น

Taguchi *et al*. (1994) ศึกษาการสะสมอะไมเลสและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *Clostridium beijerinckii* สายพันธุ์ AM 21B พบว่า เอนไซม์อะไมเลสถูกผลิตขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจาก 4 ชั่วโมง และผลิตได้สูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 12 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 6 และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ก๊าซไฮโดรเจน และเซลล์ คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอชเท่ากับ 6 และพบว่าอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส และพีเอชเท่ากับ 7

Evvyernie *et al*. (2000) รายงานถึงการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการใช้แบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน *Clostridium paraputrificum* M-21 (FERM P-16390) และใช้ N-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) เป็นแหล่งคาร์บอน อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส และมีอัตราการกวน 250 รอบต่อนาที สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 1.9 โมลไฮโดรเจนต่อโมล GlcNAc ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยอาศัยกระบวนการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic fermentation) แบ่งออกเป็น 2 ปฏิกิริยาชีวเคมี (biochemical reaction chain) คือ Clostridial system ดังภาพที่ 3 และ *Escherichia coli* system ดังภาพที่ 4 (Zajic *et al*., 1978; Brosseau and Zajic, 1982) โดยกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยปฏิกิริยาชีวเคมีแบบ Clostridial system พบได้ในแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน เช่น *Clostridium, Ruminococcus, Megasphaera* และ *Butyrivibrio* เป็นต้น โดยก๊าซไฮโดรเจนจะถูกผลิตผ่านทางเอนไซม์ H_2: ferredoxin oxidoreductase ดังสมการที่ 9

$$2H^+ + 2Fd\ (red) \longrightarrow 2Fd\ (ox) + 2H_2\ (g) \qquad (9)$$



ภาพที่ 3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดย Clostridial system

หมายเหตุ I. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,

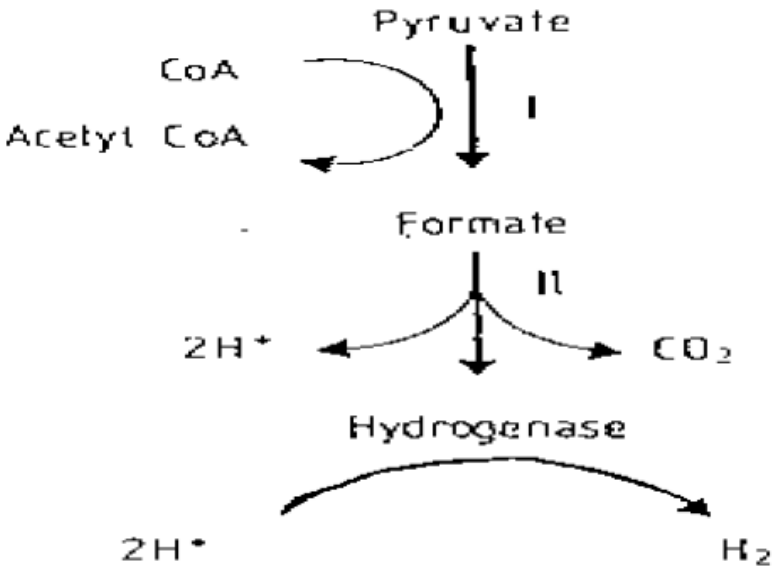
II. pyruvate ferredoxin oxidoreductase,

III. NAD: ferredoxin oxidoreductase,

IV. NADP: ferredoxin oxidoreductase,

V. H_2: ferredoxin oxidoreductase

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kim *et al*. (1984)



ภาพที่ 4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดย *Escherichia coli* system

หมายเหตุ I. pyruvate: formate lyase

II. formate dehydrogenase

ที่มา: Kosaric and Lyng (1996)

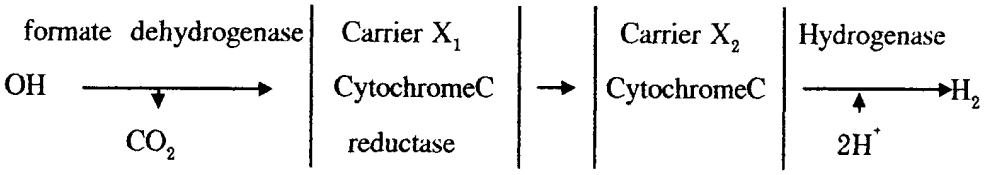
5.2 กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic bacteria)

จุลินทรีย์กลุ่มนี้สร้างพลังงานได้จากกระบวนการหายใจ (respiration) และสามารถสร้างพลังงานจากกระบวนการหมัก ซึ่งเป็นการสร้างพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจน โดยกระบวนการหายใจสามารถให้พลังงานมากกว่ากระบวนการหมักและทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้เร็วกว่า

จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะสามารถย่อยสารประกอบอินทรีย์ในกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ให้เกิดเป็นสารประกอบไพรูเวท ซึ่งจะถูกเมทาบอไลท์ต่อไปโดยปฏิกิริยา phosphoroclastic cleavage ดังสมการที่ 10

$$CH_3COCOOH\ (aq) + H_3PO_4\ (aq) \longrightarrow CH_3COOPO_3H_2\ (aq) + HCOOH\ (aq) \qquad (10)$$

ไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบ formate แล้วเปลี่ยนต่อไปเป็นก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยกระบวนการที่ไม่ใช้ออกซิเจน กระบวนการดังกล่าวจะถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ formic hydrogenase enzyme complex ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด คือ soluble formate dehydrogenase และไฮโดรจีเนส และยังมีสารอื่น ๆ ที่เป็น electron carrier ได้แก่ carrier X_1 และ carrier X_2 ดังสมการที่ 11 ทั้งนี้ carrier X_1 จะทำหน้าที่ของ cytochrome C reductase และ carrier X_2 คือ cytochrome C ที่มีรีดอกซ์โพเทนเชียลต่ำ ทำหน้าที่ในการถ่ายอิเล็กตรอนไปยังไฮโดรจีเนส โดยมี heme protein ทำหน้าที่เช่นเดียวกับเฟอร์รีดอกซิน ในกระบวนการของ *Clostridium* (Gray and Gest, 1965)



(11)

ตัวอย่างงานศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการใช้กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน มีดังต่อไปนี้

Weetall *et al.* (1981) ศึกษาเซลล์ของแบคทีเรีย *Rhodospirillum rubrum* และ *Klebsiella pneumoniae* ที่ถูกตรึงโดยการ entrap ในวุ้น พบว่าสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเด็กโทรสได้ปริมาณสูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดแยกจากกัน

Kumar and Vatsala (1989) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อ *Citrobacter freundii* ด้วยการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งให้พลังงาน เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า มีการผลิตก๊าซ 8.9 ลิตร ที่ประกอบด้วยก๊าซไฮโดรเจน 63 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนไดออกไซด์ 37 เปอร์เซ็นต์ จากกลูโคส 30.8 กรัม ในเวลา 11 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับ 1.286 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส

Ilgi and Fikret (2006) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพจากวัสดุเหลือใช้ โดยทำการคัดเลือกเชื้อ *Klebisalle oxytoca* HP1 จากน้ำพุร้อน และทำการหมักแบบไม่ใช้แสง ซึ่งผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อใช้กลูโคส 50 mM เป็นแหล่ง

คาร์บอน ได้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจน 1 โมลต่อโมลกลูโคส และเมื่อใช้ซูโครส 50 mM เป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจน 1.5 โมลต่อโมลซูโครส

Kaushik *et al*. (2008) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจน 2 ขั้นตอน คือ การหมักแบบไม่ใช้แสงโดยใช้เชื้อ *Enterobacter cloacae* DM11 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0±0.2 และขั้นที่สองคือทำการเปลี่ยนอะซิเตทไปเป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ใน photobioreactor โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ใช้คือ *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือ อุณหภูมิ 34±1 องศาเซลเซียส พีเอช 6.8±0.2 พบว่า ผลิตก๊าซไฮโดรเจนในขั้นตอนที่ 1 ได้เท่ากับ 3.31 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ส่วนขั้นตอนที่ 2 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ประมาณ 1.5-1.72 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกรดอะซิติก ซึ่งการทำ 2 ขั้นตอนนี้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงกว่าการทำขั้นตอนเดียว

Ken *et al*. (2008) ศึกษาการผลิต 2,3-butanediol เอทานอล และไฮโดรเจน โดยใช้เชื้อ *Klebsiella sp.* HE1 ซึ่งคัดเลือกได้จากกากตะกอนน้ำเสีย ใช้ sucrose based medium เป็นแหล่งอาหาร ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.3 6.4 และ 5.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของซูโครส 10 20 และ 30 กรัมซีโอดีต่อลิตร พบว่า สามารถผลิต 2,3-butanediol เอทานอล และไฮโดรเจน ได้สูงสุดคือ 0.59 0.81 และ 0.92 โมลต่อโมลซูโครส ตามลำดับ ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.3 และความเข้มข้นของซูโครส 30 กรัมซีโอดีต่อลิตร

Minnan *et al*. (2005) ศึกษาการคัดเลือกเชื้อ *Klebsiella oxytoca* HP1 จากน้ำพุร้อน และศึกษาคุณสมบัติการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้สภาวะต่าง ๆ ดังนี้ ความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 10 50 100 150 และ 200 mM ปรับพีเอชเป็น 5 6 7 และ 8 หมักที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของออกซิเจน 0 1 2.5 5.0 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1.0 โมลต่อโมลกลูโคส เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 50 mM ปรับพีเอชเป็น 7.0 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของออกซิเจนเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ และ cell density OD_{600} เท่ากับ 0.6

สำหรับกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยปฏิกิริยาแบบ *Escherichia coli* system (ภาพที่ 4) พบจุลินทรีย์ในกลุ่ม facultative anaerobe ได้แก่ แบคทีเรียในจีนัส Enterobacteriaceae ซึ่งในกระบวนการดังกล่าวจะมีการเปลี่ยนสารไพรูเวทไปเป็น acetyl CoA และ formate โดยเอนไซม์

formate lyase ดังสมการที่ 12 จากนั้น formate จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน โดยเอนไซม์ formate dehydrogenase และเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ตามลำดับ

$$\text{pyruvate} + \text{CoA} \longrightarrow \text{acetyl CoA} + \text{formate} \qquad (12)$$

ตัวอย่างงานศึกษาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก โดยใช้เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม facultative anaerobe คือ Chen *et al*. (2006) ศึกษาวิถีเมแทบอลิซึมของกลูโคส โดยเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* ภายใต้สภาวะ facultative anaerobic ผ่านวัฏจักร tricarboxylic acid (TCA) ผลิตภัณฑ์หลักจากจากกระบวนการหมัก คือ อะซิเตท เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน ขณะที่ $NADH_2$ และ ATP เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง

เมื่อกลูโคสได้รับพลังงาน ATP จะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวท และไพรูเวทจะถูกแยกออกเป็น 2 ทางเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน ไพรูเวทจะถูกย่อยสลายเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA ได้โดยถูกเร่งด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ pyruvate formate lyase (PFL) และ pyruvate dehydrogenase (PDH) ดังภาพที่ 5 จะเห็นว่ามีวิถีทางที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน 3 ทาง คือ

1) ส่วนของไพรูเวทถูกย่อยสลายเปลี่ยนไปเป็น acetyl-CoA ถูกเร่งโดยเอนไซม์ PFL เพื่อผลิตกรดฟอร์มิก นอกจากนี้เอนไซม์ formate hydrogenlyase และ membrane-bound multi-enzyme ซึ่งเป็นสับเซตของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จะทำให้กรดฟอร์มิกลดลง เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

2) เป็นกระบวนการย่อยสลายไพรูเวทด้วยเอนไซม์ pyruvate dehydrogenase (PDH) ซึ่งเป็นการเคลื่อนย้ายเฟอร์รีดอกซินและไฮโดรเจนอะตอม (H^+) ทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจน โดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและยังคงเหลืออิเล็กตรอนซึ่งส่งต่อไปยัง NAD^+ ทำให้เกิด $NADH_2$

3) ในส่วนของ $NADH_2$ จะถูกส่งผ่านไปยังไนโตรจีเนส ทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจน และส่วนที่เหลือถูกออกซิไดซ์โดยออกซิเจนอย่างสมบูรณ์ เพื่อสังเคราะห์ ATP ผ่านทางลูกโซ่ของกระบวนการหายใจบนพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*

ในขั้นที่ 2 และ 3 สันนิษฐานว่าอิเล็กตรอนถูกใช้เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน ดังนั้น 1 โมล ไฮโดรเจน เกิดขึ้นจากทางแยกของ 1 โมล ไพรูเวทเปลี่ยนไปเป็น acetyl-CoA ได้โดยถูกเร่งด้วย เอนไซม์ 2 ชนิด คือ pyruvate formate lyase (PFL) และ pyruvate dehydrogenase (PDH) สุดท้าย ATP และ $NADH_2$ จะถูกทำให้เกิดขึ้นในไกลโคไลซิส วิถีของอะซิเตท (acetate pathway) และ TCA cycle คือ ถูกส่งผ่านไปยังไนโตรจีเนส เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน (สมการที่ 13) 1 โมล ไฮโดรเจน เกิดขึ้นโดยการใช้ 1 โมล $NADH_2$ และ 4 โมล ATP

$$NADH_2 + 4ATP \longrightarrow H_2(g) + NAD^+ + 4ADP + 4Pi \quad (13)$$

ผลิตภัณฑ์หลักในวิถีเมแทบอลิซึมของกลูโคส โดยเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* สามารถอธิบายได้ดังนี้

1) formation of biomass (สมการที่ 14)

$$2C_6H_{12}O_6(aq) + 3NH_3/Y_{ATP} + 3MW\ ATP \longrightarrow 3C_4H_7O_2N + 6H_2O(l) \quad (14)$$

Y_{ATP} คือ energetic yield of biomass มีค่าอยู่ระหว่าง 8.4 และ 11.5 กรัมชีวมวลต่อโมล ATP มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 10.1 กรัมต่อโมล เขียนเป็นสมการใหม่ได้ดังสมการที่ 15

$$2C_6H_{12}O_6(aq) + 3NH_3(aq) + 30ATP \longrightarrow 3C_4H_7O_2N + 6H_2O(l) \quad (15)$$

2) formation of acetate (สมการที่ 16)

$$C_6H_{12}O_6(aq) + 2H_2O(l) \longrightarrow 2C_2H_4O_2(aq) + 2CO_2(g) + 2H_2(g) + 4ATP + 2NADH_2 \quad (16)$$

$NADH_2$ เกิดขึ้นในวิถีของอะซิเตท ซึ่งถูกออกซิไดซ์อย่างสมบูรณ์โดยออกซิเจน เพื่อสังเคราะห์ ATP ผ่านทางลูกโซ่ของกระบวนการหายใจบนพลาสมาเมมเบรน ของ *Klebsiella pneumoniae* การออกซิเดชันของ $NADH_2$ สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังสมการที่ 17

$$NADH_2 + 3ADP + 3Pi + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O(l) + 3ATP \quad (17)$$

3) formation of ethanol (สมการที่ 18)

$$C_6H_{12}O_6\,(aq) + 2NADH_2 \longrightarrow 2C_2H_6O\,(aq) + 2CO_2\,(g) + 2H_2\,(g) + 2ATP \qquad (18)$$

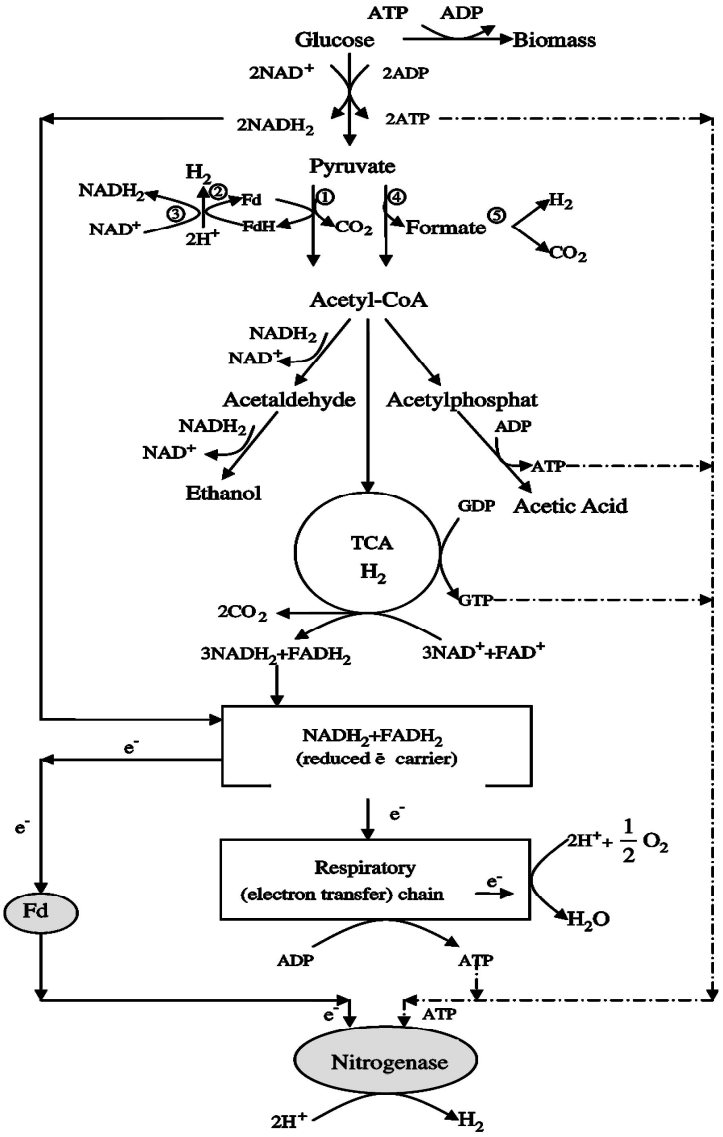
4) glucose metabolism in the TCA cycle pathway (สมการที่ 19)

$$C_6H_{12}O_6\,(aq) + 6H_2O\,(l) \longrightarrow 6CO_2\,(g) + 2H_2\,(g) + 2ATP + 2GTP + 8NADH_2 + 2FADH_2 \qquad (19)$$

ATP ถูกทำให้เกิดขึ้นโดยการ oxidative phosphorylation ของ $NADH_2$ เช่นเดียวกันกับ $FADH_2$ การออกซิเดชันของ $FADH_2$ สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังสมการที่ 20

$$FADH_2 + 2ADP + 2Pi + \tfrac{1}{2}\,O_2\,(g) \longrightarrow FAD^{+} + H_2O\,(l) + 2ATP \qquad (20)$$

การผลิตพลังงาน 1 โมลของ $FADH_2$ สามารถผลิต ATP ได้ 2 โมล และ 1 โมลของ $NADH_2$ สามารถผลิต ATP ได้ 3 โมล



ภาพที่ 5 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรท ภายใต้สภาวะการหมักที่มีหรือไม่มีออกซิเจน

หมายเหตุ 1. pyruvate dehydrogenase (PDH)

2. hydrogenase

3. NADH: ferredoxin oxidoreductase

4. pyruvate formate lyase (PFL)

5. formate hydrogenlyase

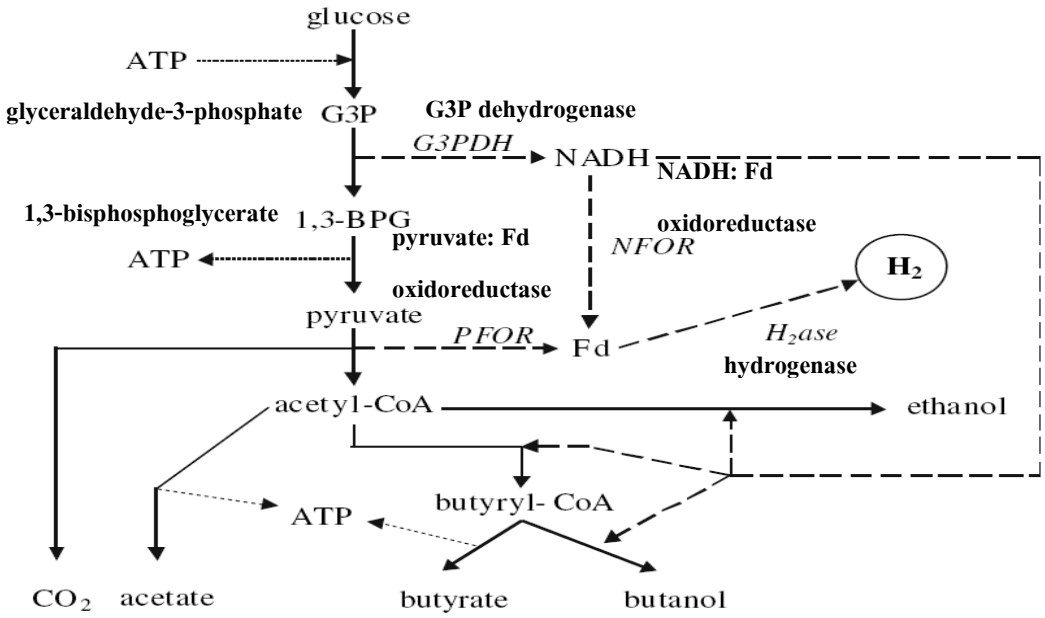
ที่มา: Chen *et al*. (2006)

นอกจากการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยปฏิกิริยาชีวเคมีแบบ Clostridial system และ *Escherichia coli* system แล้ว ยังพบปฏิกิริยาชีวเคมีที่ใช้ในผลิตก๊าซไฮโดรเจน ที่พบเฉพาะในแบคทีเรีย *Desulfovibrio desulfuricans* โดยไฮโดรเจนถูกสร้างจาก $Na_2S_2O_3$ ที่พบใน cytochrome C3 หรือ methyl viologen โดยการเร่งของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ของ *D. desulfuricans* ที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในระบบ Clostridial system แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาในเฟอร์รีดอกซินเหมือนใน Clostridial system และพบว่ามีการสร้าง formate ในระหว่างที่มีการย่อยสลายสารไพรูเวทคล้ายกับใน *Escherichia coli* system (Huang *et al*., 1985)

6. กระบวนการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน

กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งอาหาร แสดงด้วยภาพที่ 6 เมื่อกลูโคสได้รับพลังงาน ATP จะถูกเปลี่ยนเป็น glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) ซึ่งจะถูกเอนไซม์ G3P dehydrogenase ย่อยเพื่อผลิต nicotinamide-adenine (NADH) โดย NADH จะถูกเร่งด้วยเอนไซม์ NADH: Fd oxidoreductase (NFOR) เพื่อสร้างเฟอร์รีดอกซิน และ G3P จะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวท ส่วนเอนไซม์ pyruvate:Fd oxidoreductase (PFOR) จะย่อยไพรูเวทเพื่อสร้างเฟอร์รีดอกซิน ในขั้นตอนนี้ก๊าซไฮโดรเจนเกิดจากการย่อยเฟอร์รีดอกซินด้วยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และไพรูเวทถูกเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA โดย acetyl-CoA จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมันระเหย (volatile fatty acid: VFAs) (ภาพที่ 6) ซึ่งขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย (Kraemer and Bagley, 2007)

ในการหมักที่ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันระเหยบางชนิด จะไม่ได้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ร่วม ดังนั้นชนิดของกรดไขมันระเหยที่ได้จากการหมักจึงส่งผลต่ออัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจน



ภาพที่ 6 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบไม่ใช้แสง

ที่มา: Kraemer and Bagley (2007)

7. ความสัมพันธ์ของการเกิดกรดไขมันระเหยและก๊าซไฮโดรเจน

กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงจะผลิตกรดไขมันระเหยหลายชนิด โดยขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย วิถีสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน และสภาวะที่ใช้ในการหมัก การเกิดของกรดไขมันระเหยนั้นจะมีการใช้ NADH ดังนั้นในการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้น ชนิดของกรดไขมันระเหยจะต้องมีเฟอร์รีดอกซินเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักและใช้ NADH ไม่เกินจากที่กระบวนการหมักสร้างได้ เนื่องจากการหมักที่ใช้ NADH เพื่อสร้างกรดไขมันระเหยเกินกว่าที่กระบวนการหมักสร้างได้จะไปดึงก๊าซไฮโดรเจนมาใช้เพื่อสร้างกรดไขมันระเหยแทน NADH ดังนั้นในการหมักที่เกิดกรดไขมันระเหยบางชนิดจะส่งผลให้มีปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนลดลง (Ren *et al*., 2006) ตัวอย่างการเกิดของกรดไขมันระเหยที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดของก๊าซไฮโดรเจน 3 แบบ (ภาพที่ 7) คือ

1) การหมักที่เกิดกรดบิวทิริก ดังสมการที่ 21

$$C_6H_{12}O_6\,(aq) \longrightarrow CH_3CH_2CH_2COOH\,(aq) + 2H_2\,(g) + 2CO_2\,(g) \qquad (21)$$

ในการหมักที่เกิดกรดบิวทิริก 1 โมลจะให้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ร่วม 2 โมล จากเฟอร์รีดอกซินที่เกิดจากการย่อยของไพรูเวท

2) การหมักที่เกิดกรดอะซิติก ดังสมการที่ 22

$$C_6H_{12}O_6\,(aq) + 2H_2O\,(l) \longrightarrow 2CH_3COOH\,(aq) + 4H_2\,(g) + 2CO_2\,(g) \qquad (22)$$

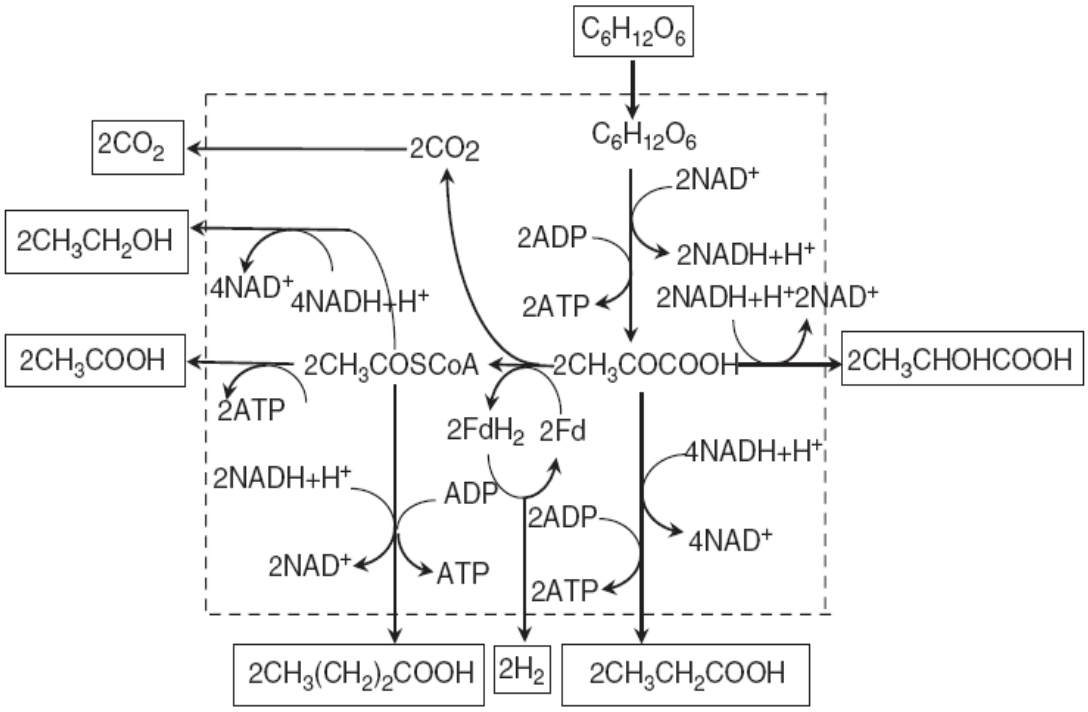
ในการหมักที่เกิดกรดอะซิติก 1 โมลจะให้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ร่วม 2 โมล จากเฟอร์รีดอกซินที่เกิดจากการย่อยของไพรูเวทและ NADH

3) การหมักที่เกิดกรดโพรไพโอนิก ดังสมการที่ 23

$$C_6H_{12}O_6\,(aq) + 2H_2\,(g) \longrightarrow 2CH_3CH_2COOH\,(aq) + 2H_2O\,(l) \qquad (23)$$

ในการหมักที่เกิดกรดโพรไพโอนิก 1 โมลจะใช้ไฮโดรเจนเป็นสารตั้งต้นในการผลิต 1 โมล เนื่องจากการหมักที่เกิดกรดโพรไพโอนิก 2 โมลใช้ NADH 4 โมล ขณะที่กระบวนการหมักผลิต NADH ได้ 2 โมล ดังนั้นจึงดึงไฮโดรเจนมาใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดโพรไพโอนิก

ดังนั้นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนให้ได้ปริมาณสูงจำเป็นต้องควบคุมให้เกิดปฏิกิริยาที่ผลิตกรดอะซิติกและกรดบิวทิริก ในขณะเดียวกันต้องยับยั้งปฏิกิริยาที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจน โดยต้องควบคุมไม่ให้มีปริมาณของกรดโพรไพโอนิกมากเกินไป และไม่ควรมีการผลิตก๊าซมีเทนร่วมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีหมักนี้มีความเป็นไปได้ในทางเทคนิคและมีความเหมาะสมอย่างมาก เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นก่อนการเกิดก๊าซมีเทนในกระบวนการหมักในสภาวะไร้อากาศ และสามารถใช้กับของเสียชนิดต่าง ๆ ได้ โดยไม่ต้องการแสงในการทำงาน ก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นประกอบด้วยก๊าซไฮโดรเจน 30-40 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 60-70 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ของการเกิดกรดไขมันระเหยและก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรทภายใต้สภาวะการหมักแบบไม่ใช้แสง

ที่มา: Ren *et al.* (2006)

8. การปรับสภาพ (pretreatment)

กระบวนการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะมีทั้งการใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์ (pure culture) และจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) แต่การใช้จุลินทรีย์ผสมเป็นวิธีที่นิยม เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์นั้นจะต้องทำการควบคุมไม่ให้เกิดการปนเปื้อน ซึ่งยุ่งยากในการปรับใช้งานจริง แต่การใช้จุลินทรีย์ผสมนั้นมีข้อจำกัดคือ มีจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทนรวมอยู่ด้วย และถ้ามีการผลิตก๊าซมีเทนซึ่งเป็นเหตุให้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ลดลง ดังนั้นในการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนจึงต้องทำการปรับสภาพก่อน ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ได้แก่

1) การใช้ความร้อน (heat-shock)

ความร้อนจะทำให้โปรตีนและส่วนประกอบภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เสียสภาพไป จุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่ม *Clostridium* ซึ่งมีสปอร์เป็นองค์ประกอบ

ภายในเซลล์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเชื้อแบคทีเรียจะอยู่ในรูปของสปอร์ แต่เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม สปอร์ของเชื้อแบคทีเรียจะงอกและเจริญเติบโตได้ใหม่ ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียที่มีสปอร์จึงทนต่อความร้อนได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทน การใช้ความร้อนมี 2 วิธี คือ (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544)

1.1) ความร้อนแห้ง (dry heat) ได้แก่ ความร้อนจากเปลวไฟโดยตรงหรือเผาไฟ หรือใช้ความร้อนแห้งที่ได้จากการแผ่รังสีความร้อน เช่น ในตู้อบไอร้อน (hot air oven)

1.2) ความร้อนชื้น (moist heat) ใช้ความร้อนฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในขณะที่มีความชื้นหรือน้ำอยู่ด้วย ได้แก่ การต้ม การนึ่ง การพาสเจอไรส์ การนึ่งโดยใช้ความดันไอน้ำโดยเครื่องมือที่เรียกว่า autoclave

2) การให้อากาศ (aeration)

จุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทนทั้งหมดเป็นกลุ่มที่ไม่ใช้อากาศ แต่จุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนบางกลุ่มเป็น facultative anaerobic bacteria จึงทนในสภาวะที่มีอากาศได้ดีกว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทน

3) การบำบัดด้วยกรดและด่าง (acid and base treatments)

จากเหตุผลที่จุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีสปอร์เป็นองค์ประกอบจึงส่งผลให้สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและด่างได้มากกว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทน

4) การใช้สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทน ได้แก่ สาร indopropane จะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ B_{12} ซึ่งเป็นตัว methyl group carrier และการยับยั้งด้วยสาร 2-bromoethanesulfonic acid (BESA) เนื่องจาก BESA มีลักษณะโครงสร้างเหมือน Co-enzyme-M ที่มีอยู่ในจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทน ดังนั้นการใช้สาร BESA จะเข้าไปยับยั้งไม่ให้เกิดการผลิตก๊าซมีเทนได้ อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีในระยะยาว อาจทำให้เชื้อแบคทีเรียปรับตัวและทนต่อสารเคมีนั้น ๆ ได้ ทำให้ต้องเพิ่มปริมาณในการใช้สารเคมี ซึ่งจะส่งผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้และเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วย (Khanal, 2008) และระดับ

ความเข้มข้นของ BESA ที่สูงกว่า 100 มิลลิโมล จะมีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรีย (Chenlin and Herbert, 2007)

5) การแช่แข็งและการเหวี่ยง (freezing and thawing)

นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -17 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และต่อจากนั้นนำไปเหวี่ยงในตู้บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Hung *et al.,* 1997)

9. ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

กระบวนการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน ต้องคำนึงถึงสภาวะที่เกี่ยวข้องกับการหมัก ซึ่งจะช่วยเพิ่มปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น โดยปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจน มีดังนี้

1) อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ เซลล์ของจุลินทรีย์ไม่มีกระบวนการที่ดีในการควบคุมการถ่ายเทเข้าออกของความร้อนของเซลล์ ดังนั้นอุณหภูมิภายนอกจึงมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ในระบบเมแทบอลิซึม ซึ่งหมายถึงการมีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544) การเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักจะช่วยส่งเสริมการผลิตก๊าซไฮโดรเจน การย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ 2 ช่วง คือ ช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ที่ทำงานในช่วงนี้เรียกว่า mesophilic bacteria และช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ที่ทำงานในช่วงนี้เรียกว่า thermophilic bacteria แต่การหมักอุณหภูมิที่สูงมีข้อเสียคือ thermophilic bacteria ทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ไม่ดีเท่า mesophilic bacteria

2) พีเอช (pH)

พีเอชเป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พีเอชที่ต่างกันจะทำให้เกิดการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต่างชนิดกัน ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนคือ 4.5-6.5

3) กรดไขมันระเหย

กรดไขมันระเหยแต่ละชนิดที่เกิดจากการหมักจะส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยการผลิตที่เกิด กรดบิวทิริกและกรดอะซิติก จะส่งเสริมการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระบบ ในขณะที่การผลิตกรดโพรไพโอนิก จะทำให้ก๊าซไฮโดรเจนในระบบลดลง

4) สารอาหาร

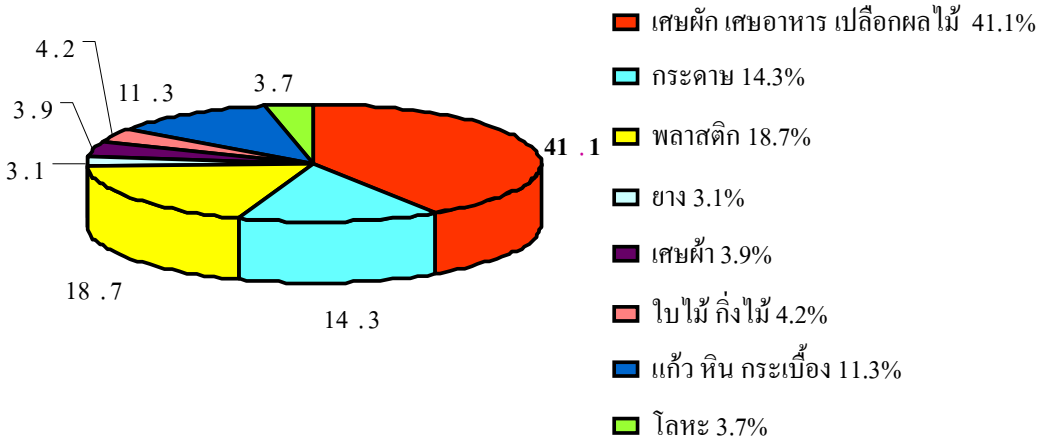
สารอาหารแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ สารอาหารหลัก เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส เป็นต้น และสารอาหารรอง เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และสังกะสี เป็นต้น อัตราส่วนไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในระบบไร้อากาศคือ อัตราส่วน BOD:N:P เป็น 100:1.1:2 (อาริยา, 2546) โดยจุลินทรีย์ใช้คาร์บอนเป็นตัวสังเคราะห์พลังงาน ใช้ไนโตรเจนในการสังเคราะห์โปรตีน และใช้ฟอสฟอรัสในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก

5) ระยะเวลาในการกักเก็บในระบบ (HRT)

เป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมประสิทธิภาพของระบบการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจน อัตราการย่อยสลายจะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการกักเก็บส่งผลให้มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มมากขึ้นจนถึงจุดสูงสุด จากนั้นเกิดการลดลง ทั้งนี้เกิดจากจุลินทรีย์กลุ่มผลิตก๊าซมีเทน (methanogen) ที่ใช้ไฮโดรเจนเกิดการเจริญขึ้นทำให้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนลดลง

10. ขยะเศษอาหาร (food waste)

สถานการณ์ปัจจุบันกรุงเทพมหานครมีขยะเศษอาหารกว่า 3,134 ตันต่อวัน และในปริมณฑลมีกว่า 1,054 ตันต่อวัน เมื่อรวมขยะเศษอาหารทั้งประเทศไทยมีตัวเลขสูงถึง 10,056 ตันต่อวัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2541) ตัวอย่างองค์ประกอบของขยะเศษอาหารแสดงดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 องค์ประกอบของมูลฝอยเทศบาลในเขตปริมณฑล (จังหวัดสมุทรปราการ นครปฐม สมุทรสาคร ปทุมธานี และนนทบุรี)

ที่มา: สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม กรมอนามัย (2544)

ขยะเศษอาหาร หมายถึง ขยะเศษอาหารที่เหลือทิ้งจากครัวเรือน จากอาหารที่เหลือจากการรับประทาน เช่น ข้าว แกงเผ็ด แกงจืด ผักทุกชนิด และเศษเปลือกผลไม้ ตลอดจนอินทรีย์สารที่ย่อยสลายได้ง่าย ซึ่งหากจัดการไม่ดีจะเป็นขยะที่เน่าเสีย ส่งกลิ่นรบกวน และเป็นที่สะสมของเชื้อโรค เพราะเป็นอินทรียวัตถุที่ย่อยสลายเน่าเปื่อยง่าย มีความชื้นสูง และส่งกลิ่นรบกวนได้รวดเร็ว เนื่องจากมีของแข็งระเหย (volatile solid) สูงประมาณ 85-95 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้น (moisture) ประมาณ 75-85 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงมีความยากลำบากในการบำบัด (Shin *et al.*, 2001) ขยะเศษอาหารส่วนใหญ่มาจากโรงอาหาร ร้านอาหารหรือภัตตาคาร ซึ่งบางครั้งขยะเศษอาหารเหล่านี้ถูกระบายลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติและเป็นสาเหตุหนึ่งของการทำให้เกิดน้ำเสียในแหล่งน้ำสาธารณะหรือกำจัดขยะเศษอาหารโดยวิธีเอาไปฝังกลบ ทำให้เกิดน้ำชะขยะ ขยะเศษอาหารเหล่านี้สามารถนำมาผลิตเป็นก๊าซไฮโดรเจนได้ ดังเช่น กระบวนการหมักแบบไร้อากาศ เนื่องจากมีสารอินทรีย์ในปริมาณสูง ซึ่งจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารได้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 คุณลักษณะของตัวอย่างเศษอาหารและกากตะกอนน้ำเสีย

พารามิเตอร์	หน่วย	เศษอาหาร	กากตะกอนน้ำเสีย
Total solids	%	15.9	5.0
Volatile solid	%	15.2	2.5
Total COD	g/l	158.4	31.9
Soluble COD	g/l	50.3	0.14
Total carbohydrate	g COD/l	84.9	5.0
Total protein	g COD/l	37.7	18.4
Total Kjeldahl nitrogen	g N/l	4.4	2.3
pH		4.6	7.5
Alkalinity	g $CaCO_3$/l	0.4	4.7

ที่มา: Kim *et al*. (2004)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือในการทดลอง
   1.1 เครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโตรโฟมิเตอร์ รุ่น GBC 932
   1.2 เครื่องวัดก๊าซ (gas chromatograph: GC) รุ่น Shimadzu GC-2014
   1.3 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น DENVER INSTRUMENT ULTRA BASIC
   1.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดจานเดียว
   1.5 เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)
   1.6 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
   1.7 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
   1.8 เครื่อง hot plate รุ่น VELP Scientifica
   1.9 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
   1.10 COD reactor ที่อุณหภูมิ 150 ± 2 °C
   1.11 เครื่อง centrifuse รุ่น Centurion 1000 Series
   1.12 เตาเผา
   1.13 เตาอบ (oven)
   1.14 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ พร้อมกล้องถ่ายภาพ

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์สำหรับเก็บก๊าซ
   2.1 ตู้เขี่ยเชื้อ
   2.2 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
   2.3 กระบอกตวงขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร
   2.4 หลอดทดลอง และหลอดทดลองฝาเกลียว พร้อมที่ใส่หลอดทดลอง
   2.5 บีกเกอร์ขนาด 50 100 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
   2.6 ขวดวัคซีน ขนาด 100 มิลลิลิตร
   2.7 จุกยางและฝาอะลูมิเนียม
   2.8 กระบอกฉีดยาแบบพลาสติก ขนาด 5 10 และ 50 มิลลิลิตร
   2.9 เข็มฉีดยา (Needle 25G ยาว 1 และ 1.5 นิ้ว)

2.10 spreader

2.11 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

2.12 laboratory sealing film (100 มิลลิเมตร X 40 เมตร)

2.13 ปิเปตและไมโครปิเปต

2.14 บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.15 จานเลี้ยงเชื้อ (petri dishes)

2.16 แท่งแก้วคนสารและช้อนตักสาร

2.17 ขวดน้ำเกลือ ขนาด 500 มิลลิลิตร

2.18 ลูกยาง

2.19 น้ำกลั่น

2.20 อะลูมิเนียมฟอยด์

2.21 ถุงพลาสติกและยาง

2.22 สำลีและกระดาษทิชชู

2.23 สารดูดอากาศ (gas pack)

2.24 กล่องหรือภาชนะที่ปิดสนิท (การศึกษานี้ใช้กล่อง Lock&Lock)

2.25 สไลด์ สำหรับย้อมแกรม

2.26 ชุดกรองสารตัวอย่างแบบสำเร็จรูป (syringe filter nylon 0.45 μm, 100 /PK)

2.27 ตะแกรงกรองน้ำเสียเศษอาหาร

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 Difco™ reinforced clostridial medium

3.2 agar powder

3.3 nutrient agar (NA)

4. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

4.1 เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

4.2 สี crystal violet

4.3 สี safanin O

4.4 สารละลายไอโอดีน

4.5 กรดซัลฟูริคเข้มข้น (conc. H_2SO_4)

4.6 phenanthroline

4.7 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)

4.8 โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$)

4.9 เมอคิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$)

4.10 ซิลเวอร์ซัลเฟต ($AgSO_4$)

4.11 เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$)

4.12 สารละลายกรดไฮโดรคอริก (HCl)

4.13 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

วิธีการ

1. ตัวอย่างน้ำเสียเศษอาหารและคุณลักษณะเบื้องต้น

น้ำเสียเศษอาหารที่ใช้ในงานศึกษานี้ได้จากโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทำการวิเคราะห์ค่าซีโอดี (chemical oxygen demand) โดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด และวัดค่าพีเอช ด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช

2. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากกากตะกอนน้ำเสียแบบไร้อากาศ ชนิด UASB ที่เก็บจากบริษัทผลิตเครื่องดื่ม และศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

งานศึกษานี้ใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์จากบริษัทผลิตเครื่องดื่ม โดยเชื้อจุลินทรีย์มีลักษณะเป็นเม็ดเกาะตัวกันเป็นก้อน (granule) และเป็นชั้นตะกอนแขวนลอย (sludge blanket) ปนกัน โดยเม็ดจุลินทรีย์มีขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร

2.1 การปรับสภาพของกากตะกอนน้ำเสีย

ตัวอย่างกากตะกอนน้ำเสียที่ใช้ในงานศึกษานี้จะถูกปรับสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ 3 วิธี คือ

1) ไม่ผ่านการปรับสภาพ

2) การปรับสภาพด้วยความร้อนโดยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที และตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3) การปรับสภาพด้วยกรดที่พีเอชเท่ากับ 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก

ก่อนการนำกากตะกอนน้ำเสียมาคัดแยกเชื้อ ให้นำกากตะกอนน้ำเสียหรือตะกอนจุลินทรีย์ซึ่งมีลักษณะเกาะตัวกันเป็นก้อนไปทำให้แตกตัวโดยใช้เครื่องกวนสารเป็นเวลา 15-20 นาที และบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจาง (dilution) ตะกอนจุลินทรีย์ในระดับ 10 100 1,000 และ 10,000 เท่า และนำไปคัดแยกเชื้อต่อไป

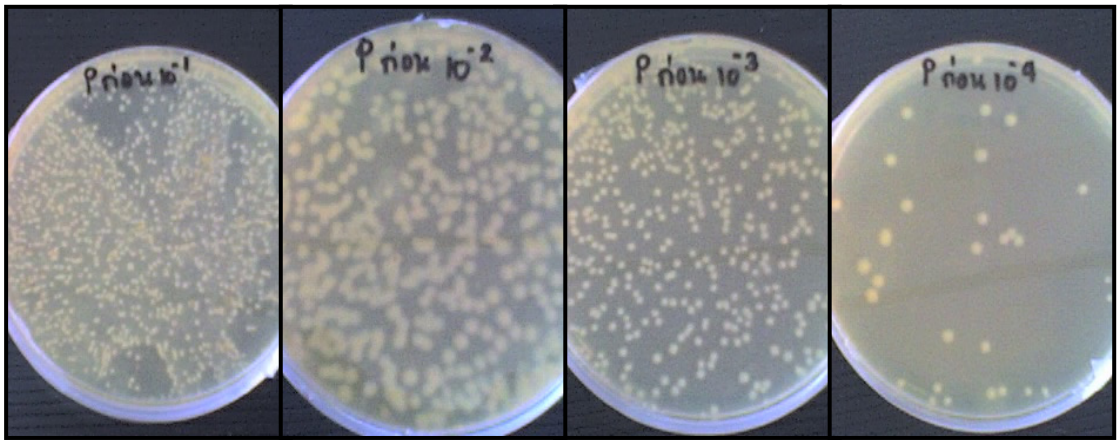
2.2 การทดสอบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อผสมที่ทำการปรับสภาพแล้ว

การทดสอบเชื้อผสมที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว โดยทำการทดสอบในน้ำเสียเศษอาหารที่ใส่ในขวดวัคซีนขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งใช้ปริมาณเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 3.5 มิลลิลิตร และปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร ต่อน้ำเสียเศษอาหาร 95 มิลลิลิตร ที่วัดความขุ่นของเชื้อด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร (optical density: OD_{600}) เจือจางเชื้อด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 0.5 ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ซีโอดีของน้ำเสียเศษอาหาร 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 7 อุณหภูมิในการหมัก 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นและนำไปวัดเปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

2.3 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากกากตะกอนน้ำเสียโดยวิธีการ spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ reinforced clostridial medium 38 กรัม ต่อ วุ้น 15 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.8 นำไปต้มจนวุ้นละลายหมด นำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้ออุ่น เทในจานเลี้ยงเชื้อ รอให้อาหารแข็ง ทำการคว่ำจานเลี้ยงเชื้อเพื่อไม่ให้ไอน้ำหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการ spread plate โดยใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อที่ทำการเจือจางแล้วมา 0.1 มิลลิลิตร ทำทุกการเจือจาง การเจือจางละ 2 ซ้ำ ใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้ spreader หมุนให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อเสร็จแล้วปิดรอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม laboratory sealing film (100 มิลลิเมตร X 40 เมตร) ทำการเขียนข้อมูลบนจานเลี้ยง

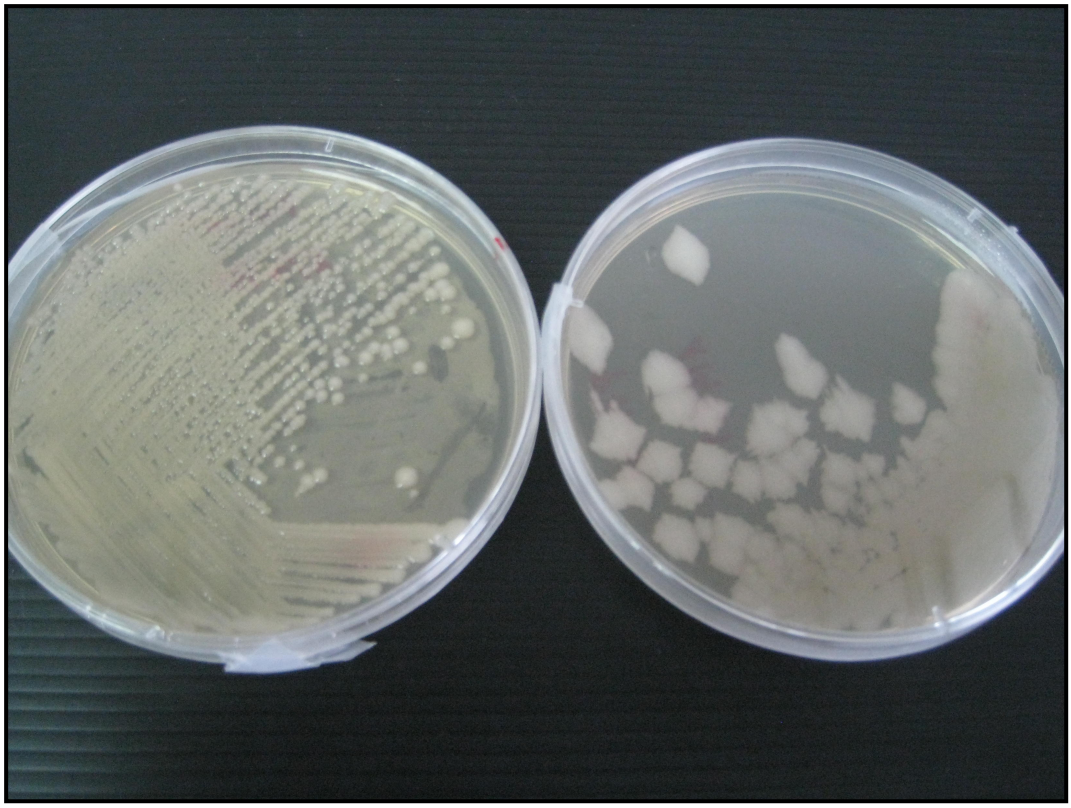
เชื้อ แล้วเก็บจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไว้ในระบบไร้ออกซิเจนโดยเก็บไว้ในกล่องหรือภาชนะปิดสนิทที่มีสารดูดอากาศ(gas pack) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะของเชื้อที่เกิดขึ้นในแต่ละจานเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 การ spread plate

2.4 การทำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

เมื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแล้วในข้อ 2.3 ทำการสังเกตลักษณะของเชื้อที่เกิดขึ้นในแต่ละจานเลี้ยงเชื้อ และคัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะแตกต่างกันในแต่ละจานเลี้ยงเชื้อ เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี streak plate ด้วยเทคนิค cross streak ซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ reinforced clostridial medium 38 กรัม ต่อ วุ้น 15 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.8 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแตะเชื้อเพียงเล็กน้อยจากจานเลี้ยงเชื้อในข้อ 2.3 มาทำการ streak plate ทำเชื้อละ 2 ซ้ำ เมื่อเสร็จแล้วปิดรอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม ทำการเขียนข้อมูลบนจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเก็บจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไว้ในระบบไร้ออกซิเจนโดยเก็บไว้ในกล่องหรือภาชนะปิดสนิทที่มีสารดูดอากาศ (gas pack) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตเชื้อที่ได้จะมีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ และนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ไปทดสอบการเกิดก๊าซไฮโดรเจนต่อไป (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 การ streak plate ด้วยเทคนิค cross streak

2.5 การทดสอบการเกิดก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่คัดแยกได้

เชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกได้ในข้อ 2.4 จะนำมาหมักในอาหาร reinforced clostridial medium 38 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.8 นำไปต้ม คนให้เข้ากัน เตรียมใส่ในขวดวัคซีนขนาด 100 มิลลิลิตร โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณ 90 มิลลิลิตร ปิดขวดวัคซีนด้วยจุกยางและฝาอะลูมิเนียม และนำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเลี้ยงเชื้ออุ่น ทำการเขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ จาก การ streak plate ในข้อ 2.4 ใส่ลงในหลอดน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 15 มิลลิลิตร ทำให้เชื้อเข้ากันกับน้ำกลั่นโดยการสั่นด้วยเครื่องผสมสาร และใช้เข็มฉีดยาแบบพลาสติกดูดเชื้อที่ใส่ในน้ำกลั่นขึ้นมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ทำในตู้เขี่ยเชื้อ) เขย่าให้เข้ากัน ทำการเขียนข้อมูลบนขวดวัคซีน แล้วนำขวดวัคซีนไปบ่มใน ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 11) จากนั้นทำการวัดปริมาตรก๊าซโดยใช้เข็มฉีดยาแบบพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร เจาะลงไปที่จุกยาง ถ้ามีก๊าซเกิดขึ้นก๊าซจะดันเข็มฉีดยาขึ้นมา อ่านค่า

ปริมาตรก๊าซที่ได้ ทำการเก็บตัวอย่างก๊าซโดยวิธีแทนที่น้ำในขวดวัคซีน 50 มิลลิลิตร และทำการวิเคราะห์ก๊าซที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ ส่วนขวดวัคซีนที่ไม่มีก๊าซหรือไม่มีก๊าซไฮโดรเจนให้นำไปฆ่าเชื้อโดยการนำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำไปทิ้ง

ภาพที่ 11 เชื้อแบคทีเรียในอาหาร reinforced clostridial medium

2.6 การเปรียบเทียบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่คัดเลือกได้

นำสารละลายเชื้อจากขวดวัคซีนที่มีก๊าซในข้อ 2.5 ไปวัดความขุ่นของเชื้อด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 แล้วดูดสารละลายเชื้อที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปใส่ในขวดวัคซีนที่มีอาหาร reinforced clostridial medium (เตรียมเหมือนข้อ 2.5) (ทำในตู้เขี่ยเชื้อ) เขย่าให้เข้ากัน ทำการเขียนข้อมูลบนขวดวัคซีน แล้วนำขวดวัคซีนไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นและนำไปวัดเปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ ทำการเปรียบเทียบเชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยเลือกเชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด เพื่อจัดจำแนกเชื้อต่อไป

3. การจัดจำแนกเชื้อ

เลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดจากข้อ 2.6 มาทำการ streak plate บนอาหาร reinforced clostridial medium อีกครั้ง เพื่อศึกษาลักษณะสีและความเรียบนูนของโคโลนี จากนั้นทำการย้อมสีแกรมแบบ gram's strain นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการติดสี ลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ และวิเคราะห์สายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้โดยใช้น้ำเสียเศษอาหารเป็นสับสเตรท

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดในข้อ 2.6 มาเพิ่มปริมาณเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ reinforced clostridial medium (เตรียมเหมือนข้อ 2.5) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดความขุ่นของเชื้อด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 และนำมาหมักในน้ำเสียเศษอาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยใส่น้ำเสียเศษอาหารที่ผ่านการกรองแล้วในขวดวัคซีน แล้วทำการปิดขวดวัคซีนด้วยจุกยางและฝาอะลูมิเนียม จากนั้นใส่สารละลายเชื้อและหมักในสภาวะต่าง ๆ ที่ศึกษา (ภาพที่ 12)

ภาพที่ 12 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียในน้ำเสียเศษอาหาร

4.1 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น

เติมสารละลายเชื้อที่วัดความขุ่นของเชื้อด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ในขวดวัคซีนขนาด 100 มิลลิลิตร โดยแปรค่าอัตราส่วนปริมาตรสารละลายเชื้อต่อน้ำเสียเศษอาหาร 5:95 10:90 15:85 20:80 25:75 และ 30:70 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร ใส่สารละลายเชื้อในขวดวัคซีนที่มีน้ำเสียเศษอาหารที่มีพีเอชเท่ากับ 7 (ปรับพีเอชของน้ำเสียเศษอาหารโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N) น้ำเสียเศษอาหารมีค่าซีโอดี 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้น เก็บก๊าซด้วยวิธีการแทนที่น้ำและนำไปวัดเปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

4.2 ผลของพีเอช

ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียเศษอาหารให้มีค่า 4 5 6 7 8 9 และ 10 น้ำเสียเศษอาหารมีค่าซีโอดี 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง โดยใส่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ผลิตก๊าซสูงสุดจากข้อ 4.1 และทำการวัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้น เก็บก๊าซด้วยวิธีการแทนที่น้ำและนำไปวัดเปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

4.3 ผลของอุณหภูมิ

หมักเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียเศษอาหารที่อุณหภูมิ 25 37 และ 50 องศาเซลเซียส น้ำเสียเศษอาหารมีค่าซีโอดี 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง โดยใช้สภาวะการหมักที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดจากผลการศึกษาข้างต้น (ปริมาณเชื้อเริ่มต้นและพีเอชเริ่มต้น) จากนั้นทำการวัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้น เก็บก๊าซด้วยวิธีการแทนที่น้ำและนำไปวัดเปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

4.4 ผลของปริมาณซีโอดี

ปรับค่าซีโอดีเริ่มต้นเป็น 8,000 15,000 20,000 25,000 และ 30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง โดยใช้สภาวะการหมักที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดจากผลการศึกษา

ข้างต้น (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น พีเอชเริ่มต้น และอุณหภูมิการหมัก) จากนั้นทำการวัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้น เก็บก๊าซด้วยวิธีการแทนที่น้ำและนำไปวัดเปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

4.5 ผลของระยะเวลาในการหมัก

หมักเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียเศษอาหารที่ระยะเวลา 6 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง โดยใช้สภาวะการหมักที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดจากผลการศึกษาข้างต้น (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น พีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิการหมัก และปริมาณซีโอดีเริ่มต้น) จากนั้นทำการวัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้น เก็บก๊าซด้วยวิธีการแทนที่น้ำและนำไปวัดเปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

5. การเก็บข้อมูล

5.1 ทำการเก็บก๊าซที่ได้ด้วยวิธีการแทนที่น้ำในขวดวัคซีน 50 มิลลิลิตร (ภาพที่ 13) โดยปรับพีเอชของน้ำกลั่นให้เป็น 2 เพื่อไม่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ละลายน้ำ และนำไปวิเคราะห์ก๊าซด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

5.2 วัดค่าพีเอชของน้ำเสียเศษอาหารที่ผ่านการหมักแล้ว ด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช

5.3 เก็บตัวอย่างน้ำเสียเศษอาหารที่ผ่านการหมักแล้วปริมาณ 20 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยง 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บน้ำใสนำไปวิเคราะห์ค่าซีโอดี โดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด

5.4 เก็บตัวอย่างน้ำเสียเศษอาหารที่ผ่านการหมักแล้วปริมาณ 20 มิลลิลิตร มาทำการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหย โดยนำตัวอย่างมาตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยง 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บน้ำใสในขวดวัคซีนขนาด 50 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ ให้ทำการเจือจางตัวอย่าง 10 เท่า แล้วทำการกรองผ่านชุดกรองสารตัวอย่างแบบสำเร็จรูป (syringe filter)

ภาพที่ 13 การเก็บก๊าซด้วยวิธีการแทนที่น้ำ

6. วิเคราะห์ และสรุปผลการศึกษา โดยประเมินศักยภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของจุลินทรีย์จากน้ำเสียเศษอาหาร

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยวิธีวิธี t-test และ least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และจัดทำรายงาน

7. ระยะเวลาในการทำวิจัย

เริ่มตั้งแต่ เดือนกันยายน พ.ศ. 2551 จนถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2552

8. สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย บางเขน กรุงเทพมหานคร

ผลและวิจารณ์

1. คุณลักษณะบางประการของน้ำเสียเศษอาหารและการประเมินการใช้เป็นแหล่งอาหารในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

น้ำเสียเศษอาหารที่เก็บจากโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีค่าพีเอชประมาณ 3.1-3.5 และมีค่าซีโอดีประมาณ 61,290-64,470 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยน้ำเสียเศษอาหารส่วนใหญ่จะเป็นจำพวกน้ำก๋วยเตี๋ยวและมีน้ำข้าวราดแกงปนอยู่บ้าง จึงทำให้มีค่าพีเอชและซีโอดีถือว่าต่ำ เนื่องจากการปรุงน้ำก๋วยเตี๋ยว เมื่อเทียบกับที่อื่น ๆ เช่น น้ำเสียเศษอาหารที่โรงอาหารสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มีค่าพีเอชประมาณ 4.0-4.3 และมีค่าซีโอดีประมาณ 100,000-120,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากการทดลองเบื้องต้นของผู้ศึกษา) เพราะน้ำเสียเศษอาหารส่วนใหญ่จะเป็นน้ำข้าวราดแกงและน้ำก๋วยเตี๋ยวปนอยู่บ้าง จึงทำให้น้ำเสียเศษอาหารที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยมีความเข้มข้นมากกว่า

การเลือกแหล่งของวัตถุดิบเพื่อใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้น ต้องคำนึงถึงปริมาณของวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ ความสะดวกในการนำมาใช้ประโยชน์ และเชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ง่าย ซึ่งน้ำเสียเศษอาหารมีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นสับสเตรทในการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน เพราะน้ำเสียเศษอาหารนี้มีสารอินทรีย์ในปริมาณสูง จุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารได้ และสามารถหาได้ง่าย พบได้ทั่วไป เช่น โรงอาหาร ร้านอาหาร เป็นต้น ซึ่งน้ำเสียเศษอาหารในปัจจุบันมีปริมาณมากและยังไม่มีการจัดการที่ดีพอ (สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม กรมอนามัย, 2544) ทำให้บางแหล่งต้องระบายลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นหากนำน้ำเสียเศษอาหารมาใช้เป็นแหล่งผลิตพลังงานทดแทน เป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการจัดการน้ำเสียเศษอาหาร

2. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากกากตะกอนน้ำเสียแบบไร้อากาศ ชนิด UASB ที่เก็บจากบริษัทผลิตเครื่องดื่ม และศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

2.1 การปรับสภาพของกากตะกอนน้ำเสียและการทดสอบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อผสมที่ทำการปรับสภาพแล้ว

การหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนต้องทำการปรับสภาพกากตะกอนน้ำเสียก่อนการหมัก เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทนและส่งเสริมการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน การทดลองนี้ศึกษาการปรับสภาพของกากตะกอนน้ำเสีย 3 วิธี คือ ไม่ผ่านการปรับสภาพ การปรับสภาพด้วยความร้อนโดยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที และการปรับสภาพด้วยกรดที่พีเอชเท่ากับ 4.5 ผลจากการทดสอบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อผสมที่ทำการปรับสภาพแล้วแสดงดังตารางที่ 4 โดยการใช้ปริมาณเชื้อ 1.5 และ 5 มิลลิลิตร ต่อน้ำเสียเสียอาหาร 95 มิลลิลิตร มีแนวโน้มไปทางเดียวกัน คือ เชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพพบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากที่สุด แต่ยังพบก๊าซมีเทนเกิดขึ้นมากที่สุดด้วย เนื่องจากการไม่ปรับสภาพจะมีกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทนอาศัยอยู่ จึงทำให้เกิดก๊าซมีเทนค่อนข้างสูง ส่วนการปรับสภาพด้วยความร้อนและการปรับสภาพด้วยกรดผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลงตามลำดับ นอกจากนี้การปรับสภาพด้วยความร้อนนั้นไม่พบการเกิดก๊าซมีเทนหรือพบเป็นปริมาณน้อยตามแต่ปริมาณเชื้อที่ใช้ ในขณะที่การปรับสภาพด้วยกรดยังพบว่าผลิตก๊าซมีเทน แต่อยู่ในปริมาณที่ต่ำกว่าการไม่ปรับสภาพ ดังนั้นผลการทดลองนี้แสดงว่าการปรับสภาพด้วยความร้อนสามารถยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทนได้ดีที่สุด โดยเฉพาะที่การใช้ปริมาณเชื้อที่ 5 มิลลิลิตร การปรับสภาพด้วยกรดให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ใกล้เคียงกับชุดไม่ปรับสภาพ

ตารางที่ 4 ผลของการปรับสภาพของเชื้อผสมต่อปริมาตรก๊าซทั้งหมด เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน เปอร์เซ็นต์ก๊าซมีเทน และปริมาณก๊าซมีเทน ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.5 และ 5 มิลลิลิตร ต่อน้ำเสียเสียอาหาร 95 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

การปรับสภาพ	ปริมาตรก๊าซทั้งหมด (มล.)	เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (มล./ล.)	เปอร์เซ็นต์ก๊าซมีเทน	ปริมาณก๊าซมีเทน (มล./ล.)
• ปริมาณเชื้อ 1.5 มล.					
ไม่ปรับสภาพ	62.5	66.01	412.53	0.76	4.72
ปรับสภาพด้วยความร้อน	37.0	56.98	210.83	0	0
ปรับสภาพด้วยกรด	32.5	60.71	197.29	0.60	1.93

ตารางที่ 4 (ต่อ)

การปรับสภาพ	ปริมาตรก๊าซทั้งหมด (มล.)	เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (มล./ล.)	เปอร์เซ็นต์ก๊าซมีเทน	ปริมาณก๊าซมีเทน (มล./ล.)
• ปริมาณเชื้อ 5 มล.					
ไม่ปรับสภาพ	89.0	67.24	598.44	1.85	16.42
ปรับสภาพด้วยความร้อน	88.0	66.71	587.05	0.01	0.04
ปรับสภาพด้วยกรด	86.0	66.21	569.41	0.65	5.55

2.2 การปรับสภาพของกากตะกอนน้ำเสีย การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย และการทดสอบการเกิดก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่คัดแยกได้

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากกากตะกอนน้ำเสียโดยวิธีการ spread plate และทำให้บริสุทธิ์โดยการ streak plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ reinforced clostridial medium ผสมวุ้น และทำการทดสอบการเกิดก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่คัดแยกได้ในขวดวัคซีนที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ reinforced clostridial medium โดยใส่สารละลายเชื้อที่วัดความขุ่นของเชื้อด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5

สารละลายเชื้อที่วัดความขุ่นของเชื้อด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ทำให้มีน้ำหนักของตะกอนจุลินทรีย์ ซึ่งวัดในรูปของตะกอนแขวนลอย (MLSS) เท่ากับ 65 กรัมต่อลิตร และตะกอนแขวนลอยระเหย (MLVSS) เท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร เมื่อนำ MLVSS/MLSS มีค่าเท่ากับ 0.69 กรัมต่อลิตร (69 เปอร์เซ็นต์) ใกล้เคียงกับการทดลองของ Minnan *et al*. (2005) ใช้เชื้อที่วัดความขุ่นของเชื้อด้วยค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.6 เมื่อนำ MLVSS/MLSS มีค่าเท่ากับ 0.6 กรัมต่อลิตร (60 เปอร์เซ็นต์) และ Li *et al*. (2007) ใช้เชื้อที่มีค่า MLVSS/MLSS เท่ากับ 0.71 กรัมต่อลิตร (71 เปอร์เซ็นต์) ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกากน้ำตาล ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองนี้

ผลการปรับสภาพกากตะกอนน้ำเสียด้วยความร้อน การปรับด้วยกรด และไม่ปรับสภาพ แสดงดังตารางที่ 5 พบว่า ตัวอย่างกากตะกอนน้ำเสียที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนพบเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ reinforced clostridial medium ผสมวุ้น ทั้งหมด 3 ไอโซเลท โดยจุลินทรีย์ที่พบสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 1 ไอโซเลท และมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 53.73 มิลลิลิตรต่อลิตร รองลงมาคือกากตะกอนน้ำเสียที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพพบเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ reinforced clostridial medium ผสมวุ้น ทั้งหมด 3 ไอโซเลท โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่พบสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 2 ไอโซเลท และผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เท่ากับ 41.19 และ 43.98 มิลลิลิตรต่อลิตร ส่วนการปรับสภาพด้วยกรดที่พีเอช 4.5 พบเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ reinforced clostridial medium ผสมวุ้น ทั้งหมด 4 ไอโซเลท และไม่พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ตารางที่ 5 ผลของการปรับสภาพต่อจำนวนเชื้อ ลักษณะของเชื้อ เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน และปริมาตรของก๊าซไฮโดรเจน

การปรับสภาพ	พบเชื้อ (ไอโซเลท)	ลักษณะของเชื้อ	ตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน	ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน (มล.)	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (มล./ล.)
ไม่ทำการปรับสภาพ	3	1. เมือกขาวเหนียวเล็กน้อย โคโลนีใหญ่ ขอบเรียบ	U1	25.35	16.25	41.19
		2. ไม่เป็นเมือกเหนียว มีสีขาว โคโลนีขนาดกลาง ขอบเรียบ	U2	23.46	18.75	43.98
		2. เมือกสีส้มอ่อนเหนียว โคโลนีเล็ก นูนขึ้นมาเล็กน้อย กลม	U3	ไม่พบก๊าซ	-	-
ปรับสภาพด้วยความร้อน 100 องศาเซลเซียส 20 นาที	3	1. เมือกสีส้มอ่อนเหนียว โคโลนีขนาดกลาง	H1	ไม่พบก๊าซ	-	-
		2. ไม่เป็นเมือกเหนียว มีสีขาว โคโลนีเล็ก	H2	ไม่พบก๊าซ	-	-
		3. เมือกขาวเหนียวมาก โคโลนีใหญ่ กลม ขอบเรียบ	H3	26.21	20.50	53.73
ปรับสภาพด้วยกรดที่พีเอช 4.5	4	1. เมือกขาว โคโลนีเล็กมาก ขอบหยัก	A1	ไม่พบก๊าซ	-	-
		2. ผิวหน้าด้าน มีสีขาว โคโลนีเล็ก ขอบหยัก	A2	ไม่พบก๊าซ	-	-
		3. ผิวหน้าด้าน มีสีขาว โคโลนีขนาดกลาง ขอบเป็นแฉก	A3	ไม่พบก๊าซ	-	-
		4. เมือกขาว กลม โคโลนีเล็ก	A4	ไม่พบก๊าซ	-	-

สาเหตุที่การปรับสภาพด้วยความร้อนทำให้คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้คือ ความร้อนจะยับยั้งการทำงานและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่มีสปอร์ ซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทน ในขณะที่จุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะทนความร้อนได้มากกว่า จึงสามารถทำงานได้ดีภายหลังการปรับสภาพเชื้อด้วยความร้อนแล้ว (Hawkes *et al*., 2002) ส่วนการปรับสภาพด้วยกรดนั้นอาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน ทำให้ไม่พบจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Venkata *et al.* (2006) ที่ศึกษาการปรับสภาพก่อนการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียชนิด UASB และทำการปรับสภาพกากตะกอนด้วยวิธีต่าง ๆ 7 วิธี ได้แก่ (1) ปรับพีเอชเท่ากับ 3 (2) ปรับสภาพด้วยความร้อน (3) ปรับสภาพโดยใช้สารเคมี (4) ปรับพีเอชเท่ากับ 3 ร่วมกับการปรับสภาพด้วยความร้อน (5) ปรับสภาพโดยใช้สารเคมีร่วมกับการปรับสภาพด้วยความร้อน (6) ปรับพีเอชเท่ากับ 3 ร่วมกับการปรับสภาพโดยใช้สารเคมี และ (7) ปรับพีเอชเท่ากับ 3 ร่วมกับการปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมกับการปรับสภาพโดยใช้สารเคมี ผลการทดลองพบว่า การปรับพีเอชเท่ากับ 3 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้น้อยที่สุด คือ 0.0079 มิลลิโมลต่อกรัมซีโอดี และการปรับสภาพโดยใช้สารเคมีสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากที่สุด คือ 0.0317 มิลลิโมลต่อกรัมซีโอดี

อย่างไรก็ตามการปรับสภาพกากตะกอนน้ำเสียด้วยสภาวะกรดที่มากเกินไป ทำให้เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถทนอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมและทำให้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ลดลง (ดวงพร, 2545) ดังนั้นอาจเป็นสาเหตุที่ไม่พบจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะนี้ และจากการทดลองไม่ผ่านการปรับสภาพทำให้คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ยาก เนื่องจากมีความหลากหลายของกลุ่มจุลินทรีย์สูง หากทำการปรับสภาพกากตะกอนน้ำเสียด้วยความร้อนก่อนทำการหมักนั้นสามารถทำให้คัดแยกเชื้อได้ง่ายขึ้นและได้เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนตามต้องการ

การทดลองโดยส่วนมากแล้วจะนิยมใช้วิธีการปรับสภาพด้วยความร้อน เพราะว่าเป็นวิธีที่ง่าย ไม่สิ้นเปลืองสารเคมี ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน และยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทน งานวิจัยที่เกี่ยวข้องจำนวนมากนิยมใช้วิธีการปรับสภาพกากตะกอนน้ำเสียหรือหัวเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความร้อนก่อนนำมาหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและวิธีการปรับสภาพหัวเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความร้อน

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	วิธีการปรับสภาพหัวเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความร้อน
ไพจิตรา (2552)	คัดแยกเชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที
Datar *et al.* (2007)	อบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
Han and Shin (2004)	ต้มหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศเป็นเวลา 15 นาที
Kim *et al.* (2004) Kim and Shin (2004) และ Kim and Shin (2008)	ปรับสภาพกากตะกอนน้ำเสียด้วยความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
Lo *et al.* (2008)	ปรับสภาพด้วยความร้อน โดยการต้มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
Wang *et al.* (2003)	ปรับสภาพด้วยความร้อนโดยการสเตอริไลส์ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

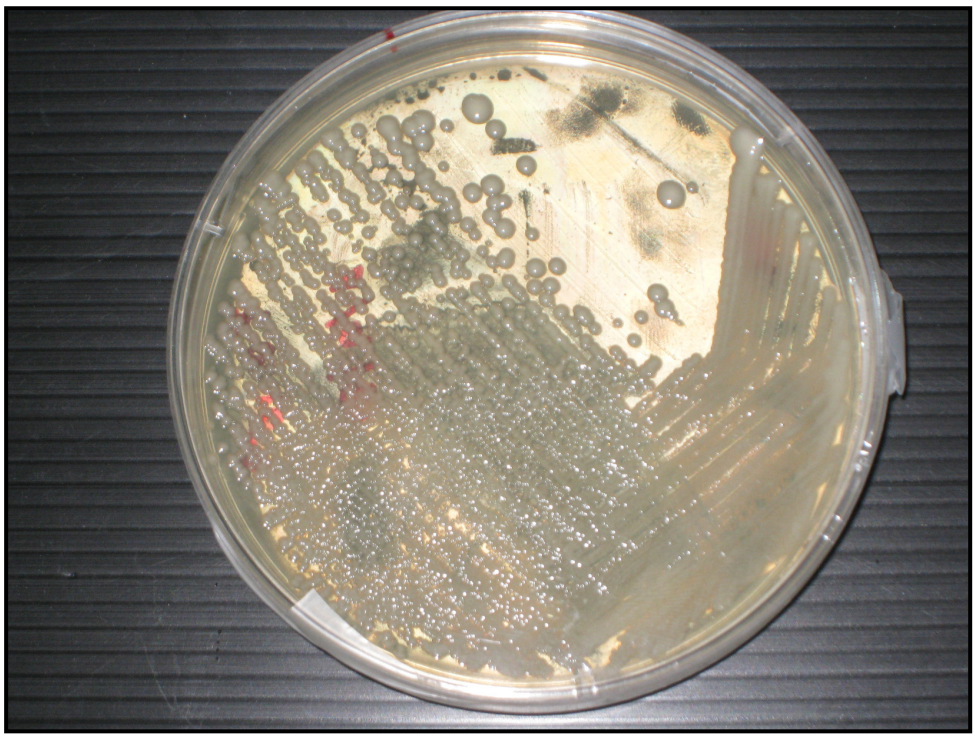
2.3 การเปรียบเทียบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่คัดเลือกได้

การเปรียบเทียบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ reinforced clostridial medium แสดงตารางที่ 5 โดยเชื้อจุลินทรีย์ตัวอย่าง H3 มีความสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด 53.73 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งได้จากการปรับสภาพด้วยความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ไปจัดจำแนกชนิดต่อไป

3. การจำแนกชนิดเชื้อจุลินทรีย์

3.1 การศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ H3

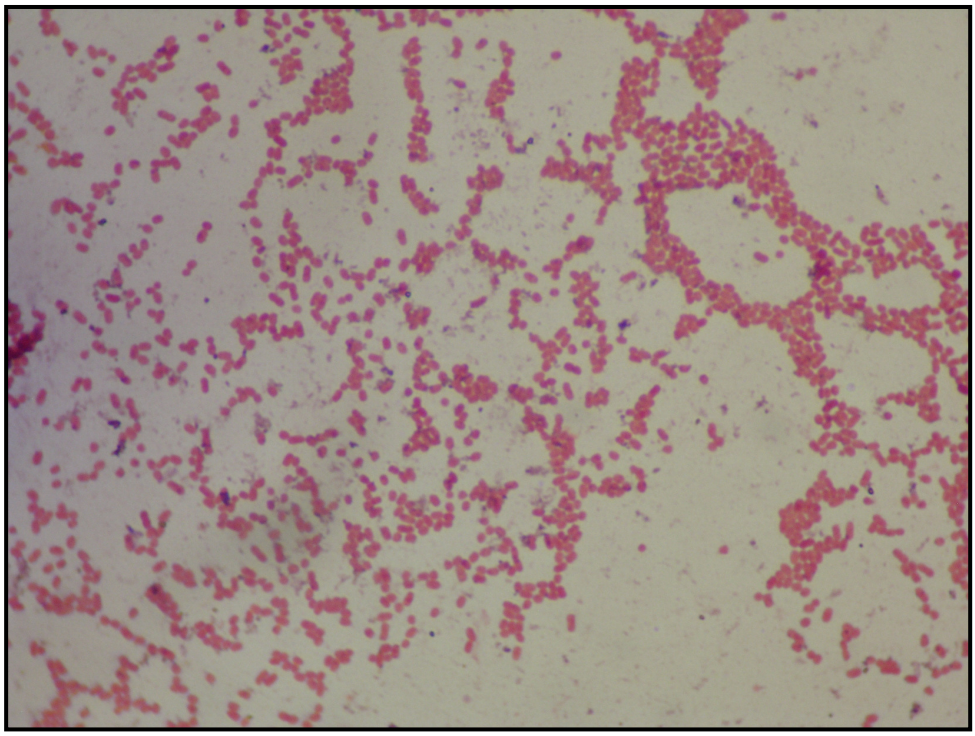
เมื่อสังเกตลักษณะของเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ พบว่า โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือกเหนียวมาก มีสีขาว โคโลนีใหญ่ กลม ขอบเรียบ (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 ลักษณะของโคโลนีในจานเลี้ยงเชื้อบนอาหาร reinforced clostridial medium

3.2 การศึกษาการย้อมแกรมของเชื้อจุลินทรีย์ H3

เมื่อทำการย้อมสีแกรม และนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบกำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ H3 เป็นเชื้อแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมแกรมติดสีแดง แกรมลบ (gram negative) มีการเรียงตัวเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 การย้อมสีแกรมของเชื้อจุลินทรีย์ H3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.3 การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย H3

ผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่พบโดยวิธี automatic product identification (API) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง H3 เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* (ตารางที่ 7) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจนและสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (nitrogen-fixing bacterium) (Chen *et al*., 2006) ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรงยาวประมาณ 1-2 ไมโครเมตร กว้าง 0.5-0.8 ไมโครเมตร สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้ เป็นเชื้อที่ไม่เคลื่อนที่และยังสามารถสร้างแคปซูลได้ จึงทำให้โคโลนีเป็นเมือก แคปซูลจะสร้างได้มากเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตมาก โคโลนีที่มีเมือกมากจะมีสีขาวปนเทา เชื้อชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 12-43 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส) เชื้อชนิดนี้ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยความร้อน 55 องศาเซลเซียส ภายใน 30 นาที และสามารถทนความแห้งได้เป็นเวลาหลาย ๆ เดือน

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ตัวอย่าง H3 โดยวิธี API (ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551)

Characteristics	Reaction
Gram reaction	-ve
β-galactosidase production (ortho-nitro-phenyl- β-D-galactopyranoside)	+
Arginine dihydrolase production	-
Lysine decarboxylase production	+
Ornithine decarboxylase production	-
Citrate utilization	+
H_2S production	-
Urease production	+
Tryptophane deaminase production	-
Indole production of tryptophane	-
Acetoin production	+
Hydrolysis of gelatin	-
Fermentation or oxidation of :	
- Glucose	+
- Mannital	+
- Inositol	+
- Sorbitol	+
- Rhamnose	+
- Sucrose	+
- Melibiose	+
- Amygdalin	+
- Arabinose	+
Cytochrome oxidase	-

หมายเหตุ -ve = gram negative bacteria

\+ = positive reaction

\- = negative reaction

การจำแนกโดยอาศัยหลักการทางวิทยาศาสตร์ (scientific classification) ของเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae*

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gamma Proteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Klebsiella*

Species: *K. pneumoniae*

เชื้อตัวอย่าง H3 เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Klebsiella pneumonia* ที่พบว่าสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Weetall *et al*. (1981) ที่ใช้เซลล์ของแบคทีเรีย *Rhodospirillum rubrum* และ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี dextrose พบว่า เชื้อทั้งสองสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Ilgi and Fikret (2006) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพจากวัสดุเหลือใช้ โดยคัดเลือกเชื้อ *Klebisalle oxytoca* HP1 จากน้ำพุร้อน และหมักแบบไม่ใช้แสง ซึ่งผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด 1 โมลต่อโมลกลูโคส เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ 1.5 โมลต่อโมลซูโครส เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Wu *et al*. (2008) ที่ศึกษาการผลิต 2,3-butanediol เอทานอลและไฮโดรเจน โดยใช้เชื้อ *Klebsiella sp.* HE1 ที่คัดเลือกได้จากกากตะกอนน้ำเสียชุมชน ใช้ sucrose based medium เป็นแหล่งอาหาร พบว่า สามารถผลิต 2,3-butanediol เอทานอล และไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 0.59 0.81 และ 0.92 โมลต่อโมลซูโครสตามลำดับ และ Chen *et al*. (2006) ที่ศึกษากลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพ จากเชื้อ 2 สายพันธุ์ คือ *Clostridium butyricum* และ *Klebsiella pneumoniae* พบว่า เชื้อ *Clostridium butyricum* ในสภาวะไร้อากาศ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เท่ากับ 3.26 โมลต่อโมล เมื่อสัดส่วนห้าในเจ็ดของ acetyl-CoA เข้าไปสู่วิถีของอะซิเตท ซึ่งมากกว่า *Klebsiella pneumoniae* ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 2.86 โมลต่อโมลกลูโคส เมื่อ acetyl-CoA เปลี่ยนรูปไปเป็นอะซิเตท และในสภาวะอากาศน้อย (microaerobic) *Klebsiella pneumoniae* บนอาหารกลูโคสสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เท่ากับ 6.68 โมลต่อโมล เมื่อ acetyl-CoA เข้าไปสู่วัฏจักร tricarboxylic acid (TCA)

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้โดยใช้น้ำเสียเศษอาหารเป็นสับสเตรท

4.1 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณน้ำเสียเศษอาหาร

ผลของอัตราส่วนปริมาตรระหว่างสารละลายเชื้อต่อน้ำเสียเศษอาหาร (5:95 10:90 15:85 20:80 25:75 และ 30:70 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร) ต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แสดงดังตารางที่ 8 ผลการศึกษาพบว่า การใช้อัตราส่วนปริมาตรระหว่างสารละลายเชื้อต่อน้ำเสียเศษอาหารเป็น 5:95 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด คือ 37.69 มิลลิลิตรต่อลิตร และมีความแตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณการใช้เชื้อเริ่มต้นอื่น ๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ การใช้อัตราส่วนปริมาตรระหว่างสารละลายเชื้อต่อน้ำเสียเศษอาหารเป็น 10:90 15:85 25:75 30:70 และ 20:80 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 31.11 27.87 27.60 27.24 และ 26.56 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การแปรค่าอัตราส่วนปริมาตรระหว่างสารละลายเชื้อต่อน้ำเสียเศษอาหารให้ค่าพีเอชสุดท้ายของสภาวะหมักที่ใกล้เคียงกันในช่วง 4.10-4.36 โดยการเพิ่มอัตราส่วนของสารละลายเชื้อต่อน้ำเสียจะเพิ่มค่าพีเอชสุดท้ายเล็กน้อย

การใช้อัตราส่วนปริมาตรระหว่างสารละลายเชื้อต่อน้ำเสียเศษอาหารเป็น 5:95 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดีและความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่สูงสุด และมีค่าพีเอชที่ต่ำสุดด้วย (ตารางที่ 8) อีกทั้งยังมีค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายภายหลังการหมักที่สูงสุด (ตารางที่ 9) โดยผลที่ได้นี้อาจเป็นเพราะที่อัตราส่วนเชื้อต่อน้ำเสียเศษอาหารนี้มีปริมาณสารอินทรีย์ที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และอัตราการย่อยสลายอาหารจะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ จนครบเวลาที่ศึกษา (24 ชั่วโมง) ซึ่งเชื้อสามารถย่อยน้ำเสียเศษอาหารแล้วได้เป็นน้ำตาล โดยกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยน้ำเสียเศษอาหารเป็นสารให้อิเล็กตรอนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจเป็นกรดอินทรีย์ เนื่องจากพีเอชมีค่าลดลงเป็นกรด แต่ถ้าหากค่าพีเอชลดลงต่ำกว่า 4 จะส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเชื้อแบคทีเรียและทำให้ไม่เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ส่วนการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในการหมักเพิ่มขึ้นและน้ำเสียเศษอาหารน้อยลงนั้น ทำให้มีปริมาณสารอาหารที่จำกัดต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และอัตราการย่อยสลายสารอาหารจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในปริมาณที่จำกัด ด้วยเหตุนี้ เมื่อใช้ปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายและความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลง

ตารางที่ 8 ผลของอัตราส่วนปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อน้ำเสียเศษอาหารที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าพีเอชสุดท้าย ซีโอดีสุดท้าย ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน และปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ที่สภาวะศึกษาคือ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อ (มล.)	พีเอชสุดท้าย	ซีโอดีสุดท้าย (มก./ล.)	ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน (มล.)	เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (มล./ล.)
5	4.10	9,152	54.24	13.50	27.92	37.69 a
10	4.14	10,736	46.32	14.25	21.83	31.11 b
15	4.12	11,440	42.80	13.75	20.27	27.87 b
20	4.17	11,088	44.56	14.00	18.97	26.56 b
25	4.25	10,560	47.20	13.00	21.23	27.60 b
30	4.36	9,856	50.72	11.75	23.18	27.24 b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (LSD)

ตารางที่ 9 ผลของอัตราส่วนปริมาณเชื้อต่อน้ำเสียเศษอาหารที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้าย ที่สภาวะศึกษาคือ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อ (มล.)	กรดไขมันระเหยเริ่มต้น (มก./ล.) *			กรดไขมันระเหยสุดท้าย (มก./ล.)		
	อะซิติก	โพรไพโอนิก	บิวทิริก	อะซิติก	โพรไพโอนิก	บิวทิริก
5	1,444.80	851.80	907.60	2,429.50	1,205.40	1,162.35
10	1,444.80	851.80	907.60	1,799.65	633.60	517.55
15	1,444.80	851.80	907.60	1,778.20	528.60	288.70
20	1,444.80	851.80	907.60	1,618.25	439.50	279.80
25	1,444.80	851.80	907.60	1,652.35	505.10	240.55
30	1,444.80	851.80	907.60	1,713.10	279.45	77.25

หมายเหตุ * คือ ค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยเริ่มต้นของน้ำเสียเศษอาหาร โดยไม่รวมปริมาณเชื้อ

ดังนั้นในการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน จึงควรเลือกใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมกับสับสเตรท ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องของ Guo *et al.* (2008) ที่ศึกษาถึงการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกากตะกอนน้ำเสีย โดยทำการหมักเชื้อผสมและใช้กากตะกอนน้ำเสียเป็นสับสเตรทในขวดวัคซีนขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับอัตราส่วนปริมาตรระหว่างสารละลายเชื้อต่อสับสเตรทเป็น 5:100 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้การใช้ปริมาณเชื้อต่อสับสเตรทในปริมาณมากหรือน้อยอาจขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่ใช้ วิธีการหมัก และคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ในการทดลองด้วย เช่นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องของ Wu *et al.* (2008) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยทำการทดลองหมักไฮโดรเจนแบบกะ (batch H_2 fermentation) ในถังหมัก 2.5 ลิตร ซึ่งใช้ปริมาณเชื้อ *Klebsiella sp.* HE1 30 มิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,500 มิลลิลิตร ทำให้มีอัตราส่วนปริมาตรระหว่างสารละลายเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5:250 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นการทดลองที่ใช้เชื้อปริมาณน้อยและอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมาก และการศึกษาของ Wang *et al.* (2003) ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกากตะกอนน้ำเสีย โดยทำการหมักเชื้อ *Clostridium bifermentans* และใช้กากตะกอนน้ำเสียเป็นสับสเตรทในขวดวัคซีนขนาด 125 มิลลิลิตร ปรับอัตราส่วนปริมาตร

ระหว่างสารละลายเชื้อต่อสับสเตรทเป็น 5:45 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นการทดลองที่ใช้สับสเตรทน้อย เนื่องจากกากตะกอนน้ำเสียที่ใช้เป็นสับสเตรทมีค่าซีโอดีค่อนข้างสูง

4.2 ผลของพีเอช

ผลของพีเอชต่อปริมาณการเกิดก๊าซไฮโดรเจน ทำการศึกษาโดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียเศษอาหารเป็น 4 5 6 7 8 9 และ 10 ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร หมักในน้ำเสียเศษอาหารที่มีค่าซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า เมื่อใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกัน จะส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่แตกต่างกันและมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10) เมื่อใช้ค่าพีเอชของน้ำเสียเศษอาหารเริ่มต้นที่ 9 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด คือ 277.61 มิลลิลิตรต่อลิตร รองลงมาคือ พีเอช 8 พีเอช 7 และพีเอช 6 ที่ก๊าซไฮโดรเจนผลิตได้เท่ากับ 173.74 101.40 และ 68.05 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียเศษอาหารที่ 4 5 และ 10 ไม่พบการเกิดก๊าซไฮโดรเจน

ค่าพีเอชเป็นปัจจัยที่มีผลต่อโปรตีน ประจุของกรดะมิโน polypeptide chain และมีอิทธิพลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน โดยปกติเอนไซม์ซึ่งมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ จะหยุดกิจกรรมที่ค่าพีเอชต่ำมากหรือสูงมาก เพราะที่สภาวะเช่นนี้จะทำให้เอนไซม์และสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลาย (ดวงพร, 2545) เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจึงสามารถเจริญเติบโตในช่วงพีเอชช่วงหนึ่ง ส่วนใหญ่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วงพีเอช 5-10 เนื่องจากเป็นช่วงพีเอชในสภาพแวดล้อมทั่วไปตามธรรมชาติ ในการทดลองนี้ค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 4 และ 5 ไม่พบการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เพราะในกระบวนการหมักจะเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชอย่างรวดเร็ว ทำให้ค่าพีเอชยิ่งลดต่ำลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์และยับยั้งการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ส่วนค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 9 มีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีและความสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด เพราะหลังจากผ่านการหมักแล้วค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 5.13 ซึ่งเป็นสภาวะกรดอ่อน จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์ยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้

ตารางที่ 10 ผลของพีเอชเริ่มต้นที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าพีเอชสุดท้าย ซีโอดีสุดท้าย ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน และปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

พีเอชเริ่มต้น	พีเอชสุดท้าย	ซีโอดีสุดท้าย (มก./ล.)	ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน (มล.)	เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (มล./ล.)
4	3.99	10,560	47.20	0	NA	NA
5	4.14	9,856	50.72	0	NA	NA
6	4.27	9,856	50.72	16.50	41.21	68.05 c
7	4.24	6,688	66.56	20.50	49.50	101.40 c
8	4.29	7,216	63.92	29.50	58.81	173.74 b
9	5.13	6,160	69.20	45.00	61.94	277.61 a
10	9.11	14,960	25.20	0	NA	NA

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (LSD)

NA (not analyzed) คือ ไม่ได้ทำการตรวจวัด เนื่องจากไม่มีปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน

ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Kim and Shin (2008) ที่ศึกษาผลของการปรับสภาวะของเศษอาหารให้เป็นเบสก่อนการหมัก โดยใช้เชื้อผสม ภายใต้การทดลองแบบกะ พบว่า การปรับค่าพีเอชเป็น 12.5 ส่งเสริมการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด 24.5±0.7 มิลลิลิตรต่อกรัมของแข็งระเหย ที่ระยะเวลาเก็บกัก (HRT) 30 ชั่วโมง ทั้งนี้เป็นเพราะการปรับเบสจะลดจุลินทรีย์ประจำถิ่นในน้ำเสียเศษอาหาร ส่งผลให้เชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนทำงานได้ดียิ่งขึ้น ส่วนการปรับกรดให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 2 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้น้อยกว่าการปรับเบสเท่ากับ 4.8 ±1.4 มิลลิลิตรต่อกรัมของแข็งระเหย ที่ระยะเวลาเก็บกักเท่ากัน โดยสอดคล้องกับการศึกษานี้คือ การปรับกรดจะเกิดก๊าซไฮโดรเจนได้น้อยหรือไม่เกิดเลย ส่วนการปรับค่าพีเอชเพิ่มขึ้นส่งผลให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น และค่าพีเอชที่ 10 ไม่พบการเกิดก๊าซไฮโดรเจน เนื่องจากค่าพีเอชสูงเกินไป และความเป็น

เบสที่มากไปนี้จะทำลายเซลล์ของเชื้อ จึงส่งผลให้ไม่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Liu and Shen (2004) ที่ศึกษาผลของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากแป้งโดยใช้เชื้อแบคทีเรียผสม ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ตัวเด่นที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนคือ *Clostridium pasteurianum* และศึกษาการปรับค่าพีเอชของแป้งเริ่มต้นเป็น 4 5 6 7 8 และ 9 พบว่า การปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของแป้งเป็น 8 เชื้อแบคทีเรียมีความสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 120 มิลลิลิตรต่อกรัมแป้ง และค่าพีเอชเริ่มต้นของแป้งเป็น 7 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เท่ากับ 103 มิลลิลิตรต่อกรัมแป้ง ซึ่งผลการศึกษาที่เกี่ยวข้องมีความใกล้เคียงกับการศึกษานี้คือ การปรับเบสสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด อาจแตกต่างกันคือ การใช้เชื้อที่แตกต่างกันจึงทำให้ความทนทานต่อค่าพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกัน

ผลของพีเอชเริ่มต้นที่มีต่อค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้าย แสดงในตารางที่ 11 โดยพบว่า การปรับค่าพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 4-8 ทำให้ค่าพีเอชสุดท้ายมีแนวโน้มใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 10) และการปรับพีเอชเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้นส่งเสริมการผลิตกรดไขมันระเหย โดยค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นด้วย ส่วนการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียเศษอาหารเท่ากับ 9 จะให้พีเอชสุดท้ายลดลงอยู่ที่ 5.13 ซึ่งยังไม่ถึงจุดที่ยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ แสดงว่าที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 นี้ อาจจะยังสามารถให้ก๊าซไฮโดรเจนได้ต่อไปหากเพิ่มเวลาการหมัก และยังพบว่ามีค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายสูงสุด มีความสัมพันธ์กับปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่สูงสุดด้วย ทั้งนี้การปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียเท่ากับ 10 เป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน โดยพบว่าให้ค่าพีเอชสุดท้ายอยู่ที่ 9.11 และยังพบว่าค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายลดลงอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบจากค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยเริ่มต้น อีกทั้งไม่พบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วย

ตารางที่ 11 ผลของพีเอชเริ่มต้นที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้าย ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

พีเอชเริ่มต้น	กรดไขมันระเหยเริ่มต้น (มก./ล.) *			กรดไขมันระเหยสุดท้าย (มก./ล.)		
	อะซิติก	โพรไพโอนิก	บิวทิริก	อะซิติก	โพรไพโอนิก	บิวทิริก
4	941.80	108.60	23.00	296.85	35.10	5.95
5	835.50	98.00	15.80	389.90	57.85	16.05
6	895.60	106.80	35.40	2,100.30	1,169.30	1,123.30
7	972.20	189.40	57.90	2,498.00	1,245.55	1,182.80
8	1,167.00	156.30	45.50	3,422.20	1,637.35	1,491.60
9	1,171.30	123.90	57.20	4,461.95	1,873.35	1,550.20
10	1,019.50	231.20	43.60	295.60	39.65	7.10

หมายเหตุ * คือ ค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยเริ่มต้นของน้ำเสียเศษอาหาร โดยไม่รวมปริมาณเชื้อ ที่พีเอชต่างกัน

ดังนั้นการปรับค่าพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม จะช่วยส่งเสริมการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในกระบวนการหมักได้ และค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อแบคทีเรีย สับสเตรท และสภาวะที่ใช้ในการหมัก โดยผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 มีความเหมาะสมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* และใช้น้ำเสียเศษอาหารเป็นสับสเตรท

4.3 ผลของอุณหภูมิ

ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณการเกิดก๊าซไฮโดรเจน ทำการศึกษาโดยหมักที่อุณหภูมิ 25 37 และ 50 องศาเซลเซียส ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร หมักในน้ำเสียเศษอาหารที่มีค่าซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 หมักเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิต่างกัน ส่งผลให้มีความสามารถในการ

ผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12) โดยการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีและมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด คือ 56.99 เปอร์เซ็นต์ และ 223.23 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ สอดคล้องกับค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายที่มากที่สุดและพีเอชสุดท้ายลดลงมากที่สุด (ตารางที่ 13) รองลงมาคือ การหมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีและมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน 36.64 เปอร์เซ็นต์ และ 90.75 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการหมักที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี 7.57 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการเกิดก๊าซไฮโดรเจน สอดคล้องกับค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายมีค่าลดลงจากความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยเริ่มต้นและพีเอชสุดท้ายลดลงเพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 12 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าพีเอชสุดท้าย ซีโอดีสุดท้าย ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน และปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (°ซ)	พีเอช สุดท้าย	ซีโอดี สุดท้าย (มก./ล.)	ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน (มล.)	เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (มล./ล.)
25	5.35	12,672	36.64	21	43.40	90.75 b
37	4.44	8,602	56.99	41	54.45	223.23 a
50	8.02	18,486	7.57	0	NA	NA

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (LSD)

NA (not analyzed) คือ ไม่ได้ทำการตรวจวัด เนื่องจากไม่มีปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน

ตารางที่ 13 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้าย ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 ซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (°ซ)	กรดไขมันระเหยเริ่มต้น (มก./ล.) *			กรดไขมันระเหยสุดท้าย (มก./ล.)		
	อะซิติก	โพรไพโอนิก	บิวทิริก	อะซิติก	โพรไพโอนิก	บิวทิริก
25	818.60	56	14	2,294.35	912.85	886.50
37	818.60	56	14	4,014.60	1,714.05	1,479.10
50	818.60	56	14	171.85	11.70	0.40

หมายเหตุ * คือ ค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยเริ่มต้นของน้ำเสียเศษอาหาร โดยไม่รวมปริมาณเชื้อ

อุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาชีวเคมีภายในเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้ได้กิจกรรมสูงสุด และอุณหภูมิที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด (ดวงพร, 2545) การทดลองนี้สาเหตุที่การหมักที่อุณหภูมิเท่ากับ 37 และ 25 องศาเซลเซียส ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ เนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophillic bacteria) ซึ่งทนอุณหภูมิอยู่ในช่วงระหว่าง 12-43 องศาเซลเซียส และเชื้อนี้จะถูกยับยั้งด้วยความร้อน 55 องศาเซลเซียส ภายใน 30 นาที จึงเป็นเหตุให้ไม่พบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ในการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องของ Wu *et al*. (2008) ที่ศึกษาการผลิต 2,3-butanediol เอทานอล และไฮโดรเจน จากเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella sp.* HE1 ที่คัดเลือกได้จากกากตะกอนน้ำเสียชุมชน ในสภาวะอุณหภูมิการหมัก 37 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถผลิต 2,3-butanediol เอทานอล และไฮโดรเจน ได้สูงสุดคือ 0.59 0.81 และ 0.92 โมลต่อโมลซูโครส Menzel *et al*. (1997) ศึกษาการผลิต 1,3-propanediol จากเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* โดยหมักในอาหารกลีเซอรอลอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส Li *et al*. (2008) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ใช้เชื้อผสมหมักในเศษอาหารและกากตะกอนน้ำเสีย ทำการหมักโดยการเขย่า 120 rpm ที่ 36 องศาเซลเซียส Datar *et al*. (2007) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยการหมักในถัง

ปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส Guo *et al*. (2008) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ใช้เชื้อผสมหมักในกากตะกอนน้ำเสีย สภาวะอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการทดลองในขวดวัคซีน ขนาด 250 มิลลิลิตร Kim and Shin (2008) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพที่ใช้เชื้อผสมหมักในเศษอาหารและกากตะกอนน้ำเสีย ทำการหมักโดยการเขย่า 100 rpm ที่ 35 องศาเซลเซียส Minnan *et al*. (2005) ศึกษาการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Klebisalle oxytoca* HP1 จากน้ำพุร้อน เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณเชื้อในขวดวัคซีนโดยหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และทำการหมักในถังปฏิกรณ์ 40 ลิตร ที่ควบคุมอุณหภูมิในระบบเป็น 38 องศาเซลเซียส การศึกษาของไพจิตรา (2551) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ใช้เชื้อ *Klebsiella sp.* หมักในน้ำกากส่า สภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 35 และ 55 องศาเซลเซียส พบว่า การใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส Lo *et al*. (2008) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อที่แตกต่างกัน โดยการหมักในน้ำเสียสังเคราะห์ที่เติมซูโครสและไซโลส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส Kaushik *et al*. (2008) ศึกษากระบวนการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกทำการหมักแบบไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และขั้นตอนที่สองใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส Liu *et al*. (2008) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพเพื่อประยุกต์ใช้ในปัจจุบัน ทำการหมักโดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophillic bacteria)

อย่างไรก็ตามการศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพ เช่น วิธีการหมักแบบไร้อากาศ โดยอาจใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมหรือเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละการทดลอง งานวิจัยที่เกี่ยวข้องจำนวนมากศึกษาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักอยู่ในช่วงระหว่าง 35-38 องศาเซลเซียส และในการทดลองนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส

4.4 ผลของปริมาณซีโอดี

ผลของปริมาณซีโอดีที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ทำการศึกษาโดยแปรค่าปริมาณซีโอดีเริ่มต้นเท่ากับ 8,000 15,000 20,000 25,000 และ 30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า น้ำเสียเศษอาหารที่มีค่าซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด คือ 223.23 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยผลที่ได้มีความแตกต่างกับปริมาณ

ซีโอดีเริ่มต้นอื่น ๆ ทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14) รองลงมาคือซีโอดีเริ่มต้น 15,000 และ 8,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 138.31 และ 119.18 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ สอดคล้องกับค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายที่เพิ่มขึ้นเมื่อปรับปริมาณซีโอดีเริ่มต้นเพิ่มขึ้นเป็น 8,000 15,000 และ 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 15) ส่วนค่าพีเอชสุดท้ายมีแนวโน้มที่ลดลงมาก และเมื่อปรับปริมาณซีโอดีเริ่มต้นเป็น 25,000 และ 30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบการเกิดก๊าซไฮโดรเจน สอดคล้องกับค่าพีเอชสุดท้ายมีแนวโน้มลดลงเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายมีค่าลดลงมากจากค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยเริ่มต้น

ตารางที่ 14 ผลของปริมาณซีโอดีเริ่มต้นที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าพีเอชสุดท้าย ซีโอดีสุดท้าย ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน และปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

ซีโอดีเริ่มต้น (มก./ล.)	พีเอชสุดท้าย	ซีโอดีสุดท้าย (มก./ล.)	ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน (มล.)	เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (มล./ล.)
8,000	4.99	5,280	34.00	28.00	42.14	119.18 b
15,000	5.10	8,821.5	41.19	29.50	46.93	138.31 b
20,000	4.44	8,602	56.99	41.00	54.45	223.23 a
25,000	8.81	18,374	26.50	0	NA	NA
30,000	8.98	27,580	8.07	0	NA	NA

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (LSD)

NA (not analyzed) คือ ไม่ได้ทำการตรวจวัด เนื่องจากไม่มีปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน

ตารางที่ 15 ผลของปริมาณซีโอดีเริ่มต้นที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าความเข้มข้นกรดไขมันระเหยสุดท้าย ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

ซีโอดีเริ่มต้น	กรดไขมันระเหยเริ่มต้น (มก./ล.) *			กรดไขมันระเหยสุดท้าย (มก./ล.)		
(มก./ล.)	อะซิติก	โพรไพโอนิก	บิวทิริก	อะซิติก	โพรไพโอนิก	บิวทิริก
8,000	423.60	65.30	18.40	2,588.60	1,305.25	1,116.35
15,000	531.90	53.90	12.70	3,087.55	1,427.15	1,233.40
20,000	818.60	56.00	14.00	4,014.60	1,714.05	1,479.10
25,000	882.70	62.50	34.00	354.40	73.10	0
30,000	1156.6	67.90	14.10	454.50	72.70	5.90

หมายเหตุ * คือ ค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยเริ่มต้นของน้ำเสียเศษอาหาร โดยไม่รวมปริมาณเชื้อ ที่ซีโอดีเริ่มต้นต่างกัน

ค่าซีโอดีเป็นพารามิเตอร์ในการวัดความสกปรกของน้ำเสีย โดยคิดเปรียบเทียบในรูปของปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ในน้ำเสียให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งบ่งชี้ระดับสารอินทรีย์ในน้ำเสียเศษอาหาร ประกอบด้วยธาตุที่สำคัญ คือ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน ในการศึกษานี้ใช้น้ำเสียเศษอาหารที่มีค่าซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องของ Lo *et al*. (2008) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อที่แตกต่างกัน โดยการหมักในน้ำเสียสังเคราะห์ที่เติมซูโครสและไซโลส ใช้ปริมาณซีโอดีเริ่มต้นเท่ากับ 20,000 มิลลิกรัมซีโอดีต่อลิตร ไพจิตรา (2551) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อ *Klebsiella sp*. ที่หมักในน้ำกากส่า ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณซีโอดีของน้ำกากส่าเท่ากับ 24,600 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง รองลงมาคือ น้ำกากส่าที่มีซีโอดี 16,400 32,800 และ 8,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 30 28.56 และ 26.13 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ Wang *et al*. (2003) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากตะกอนน้ำเสีย ใช้ปริมาณซีโอดีเริ่มต้นเท่ากับ 24,800 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งในการศึกษานี้ปริมาณซีโอดี 25,000 และ 30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบการเกิดก๊าซไฮโดรเจน อาจเนื่องมาจากในน้ำเสียเศษอาหารมีคาร์บอนที่สูงเกินไปและมีไนโตรเจนน้อย ทำให้ไนโตรเจนมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งใน

สภาวะนี้จะส่งผลต่อกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ จึงทำให้ไม่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Lin and Lay, 2004) และในการทดลองนี้ไม่ได้มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มในน้ำเสียเศษอาหาร จึงทำให้มีแหล่งของไนโตรเจนที่ต่ำ เสนีย์ (2551) รายงานว่าอัตราส่วน COD:N:P ที่เชื้อจุลินทรีย์ใช้ในการสร้างเซลล์นั้น ต้องมีอัตราส่วนไม่ต่ำกว่า 100:1.1:0.2 โดยจุลินทรีย์จะใช้คาร์บอนเป็นตัวสังเคราะห์พลังงาน ไนโตรเจนในการสังเคราะห์โปรตีน และฟอสฟอรัสในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการหมักที่ 24 ชั่วโมง น้อยเกินไป หากเพิ่มระยะเวลาในการหมักมากขึ้น เมื่อปริมาณซีโอดีเป็น 25,000 และ 30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้น สอดคล้องกับการวิจัยของ บุษวรรณ (2551) ศึกษาถึงการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียยูเอเอสบีที่เหมาะสมสำหรับบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสุรา โดยใช้ปริมาณซีโอดีเริ่มต้น 99,456 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การใช้ระยะเวลาในการกักเก็บน้ำเสีย 15 วัน จะเกิดการลดลงของสารอินทรีย์มากที่สุด 4.30 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ใช้สับสเตรทต่างกันจะใช้ปริมาณซีโอดีเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ซึ่งการใช้ปริมาณซีโอดีเริ่มต้นมากหรือน้อยควรคำนึงถึง เชื้อจุลินทรีย์ ปริมาณของเชื้อ และคุณสมบัติของสับสเตรทนั้น ๆ สอดคล้องกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องของ Li *et al*. (2007) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกากน้ำตาล ในระบบ anaerobic baffled reactor (ABR) โดยใช้ซีโอดีเริ่มต้นเท่ากับ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 32.51 ลิตรต่อวัน และ Venkata *et al*. (2008) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพ โดยใช้น้ำเสียจากโรงผลิตนม (dairy wastewater) ที่มีค่าซีโอดี 10,400 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้นการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นจำเป็นต้องใช้ปริมาณซีโอดีเริ่มต้นที่เหมาะสม ถ้าในน้ำเสียนั้นมีสารพิษหรือสารยับยั้งปฏิกิริยาที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเชื้อแบคทีเรีย จำเป็นต้องลดระดับความเข้มข้นของน้ำเสียลง จนอยู่ในระดับที่ไม่เกิดผลกระทบมากนัก (เสนีย์, 2551) และจากการทดลองผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียเศษอาหารโดยเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* นี้ควรใช้ปริมาณซีโอดีเริ่มต้นเป็น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.5 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก

ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการหมักที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ทำการศึกษาเวลาที่ใช้ในการหมัก 6 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และปริมาณซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาพบว่า ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด 477.14 มิลลิลิตรต่อลิตร รองลงมาคือ ระยะเวลาในการหมัก 72 96 24 12 และ 6 ชั่วโมง ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 473.44 411.60 265.66 184.46 และ 53.62 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ โดยผลที่ได้มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16)

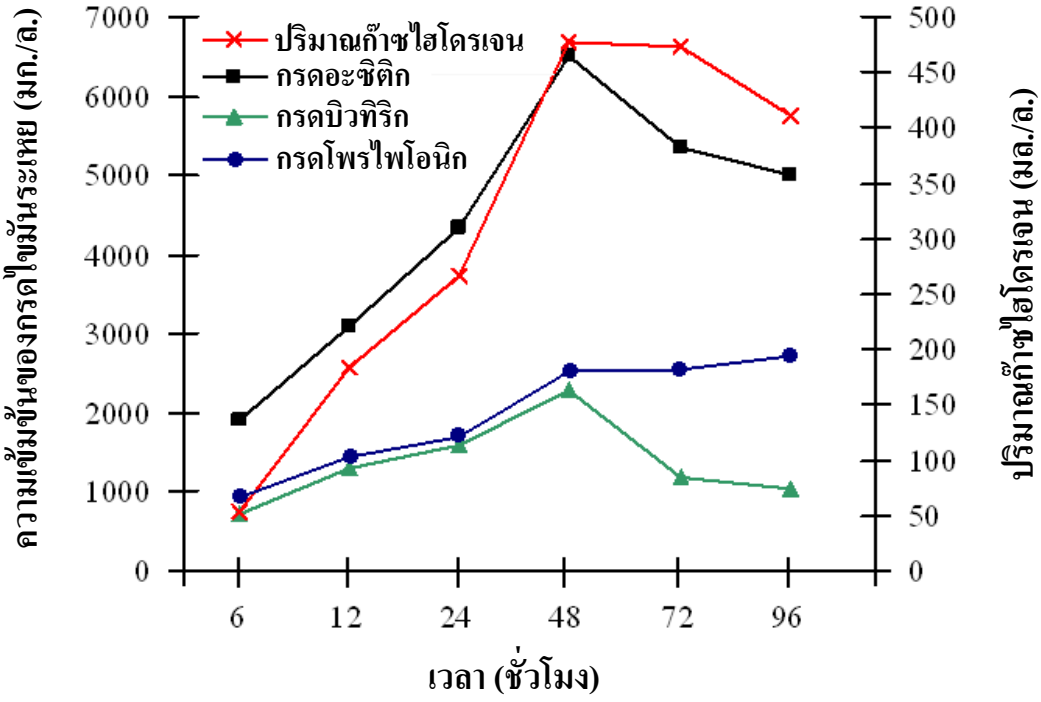
ตารางที่ 16 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการหมักที่มีต่อค่าเฉลี่ยค่าพีเอชสุดท้าย ซีโอดีสุดท้าย ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน เปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจน และปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช สุดท้าย	ซีโอดี สุดท้าย (มก./ล.)	ประสิทธิภาพ ในการกำจัด ซีโอดี (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาตร ก๊าซ ไฮโดรเจน (มล.)	เปอร์เซ็นต์ ก๊าซ ไฮโดรเจน	ปริมาณ ก๊าซ ไฮโดรเจน (มล./ล.)
6	5.05	13,024	34.88	12	44.68	53.62 e
12	4.81	11,264	43.68	31.50	58.56	184.46 d
24	5.13	7,631	61.85	43	61.94	265.66 c
48	4.56	7,565	62.18	73	65.35	477.14 a
72	5.06	8,413	57.94	72	65.74	473.44 a
96	5.12	12,320	38.40	71	58.05	411.60 b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (LSD)

ผลการศึกษาพบว่าระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นส่งผลให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นตาม จนถึงระยะเวลาที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด ต่อมาเริ่มผลิตก๊าซคงที่และลดลงตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากระยะเวลาการหมักที่มากเกินไป ทำให้อาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เริ่มหยุดการทำงานและเริ่มตาย ส่วนระยะเวลาการหมักหลัง 48 ชั่วโมง จะผลิตก๊าซไฮโดรเจนน้อยลง เพราะก๊าซไฮโดรเจนถูกดึงไปใช้ในการผลิตกรดโพรไพโอนิก โดยในการหมักที่เกิดกรดโพรไพโอนิก 1 โมล จะใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นสารตั้งต้นในการผลิต 1 โมล เนื่องจากการหมักที่เกิดกรดโพรไพโอนิก 2 โมล ใช้ NADH 4 โมล ขณะที่กระบวนการหมักผลิต NADH ได้ 2 โมล ดังนั้นจึงดึงก๊าซไฮโดรเจนมาใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดโพรไพโอนิก (Ren *et al*., 2006)

ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการหมักที่มีต่อค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้าย แสดงดังภาพที่ 16 พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ค่าพีเอชสุดท้ายมีแนวโน้มลดลงใกล้เคียงกัน ส่วนค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการหมักเพิ่มขึ้น ส่วนระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก 72 และ 96 ชั่วโมง ค่าพีเอชสุดท้ายมีแนวโน้มลดลงใกล้เคียงกัน ส่วนค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายมีแนวโน้มที่ลดลง สาเหตุที่ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก 72 และ 96 ชั่วโมง มีค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายและปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ลดลงนั้น เนื่องจากก๊าซไฮโดรเจนถูกดึงไปใช้ในการผลิตกรดโพรไพโอนิก แสดงดังภาพที่ 16 พบว่า กรดอะซิติกและกรดบิวทิริกมีแนวโน้มที่ลดลง ส่วนกรดโพรไพโอนิกมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 16 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาที่ใช้ในการหมักที่มีต่อค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยสุดท้ายและปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ที่สภาวะศึกษาคือ ปริมาณเชื้อ 5 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนให้ได้ปริมาณสูงจำเป็นต้องควบคุมให้เกิดปฏิกิริยาที่ผลิตกรดอะซิติกและกรดบิวทิริก ซึ่งขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ในขณะเดียวกันต้องยับยั้งปฏิกิริยาที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจน โดยต้องควบคุมไม่ให้มีปริมาณของกรดโพรไพโอนิกมากเกินไป และไม่ควรมีการผลิตก๊าซมีเทนร่วมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

5. ผลของค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยต่อสภาวะการหมัก

ผลของค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยต่อสภาวะการหมักที่ศึกษา พบว่า ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนและค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ ถ้าผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง ค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยจะมีแนวโน้มที่สูงด้วย และค่าพีเอชในการหมักลดลง เมื่อมีการสะสมความเข้มข้นของกรดไขมันระเหย โดยค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยจะมีกรดบิวทิริกและกรดอะซิติกเป็นองค์ประกอบหลักที่ทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนมาก (Han and Shin, 2004) ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษา

สภาวะการหมักต่าง ๆ และทำการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหย พบว่า มีปริมาณของกรดอะซิติกมากที่สุด เป็นการหมักชนิดกรดอะซิติก (acetic type) ซึ่งในกระบวนการผลิตกรดอะซิติกจะสัมพันธ์กับการเกิดก๊าซไฮโดรเจน เพราะการผลิตกรดอะซิติก 2 โมล จะทำให้เกิดไฮโดรเจน 4 โมล รองลงมาเป็นการผลิตกรดโพรไพโอนิกและกรดบิวทิริก งานวิจัยนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Liu and Shen (2004) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากแป้ง โดยใช้แบคทีเรียแบบไม่ใช้อากาศ พบว่า ค่าความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยที่ได้มีกรดอะซิติกเป็นองค์ประกอบหลัก และ Sompong *et al.*(2007) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้ระบบการผลิตแบบกะ (batch reactor) ทำการทดลอง 45 วัน พบว่า ในวันที่ 1-4 ของการเดินระบบจะเกิดกรดอะซิติกมากที่สุด ส่วนวันที่ 5 เป็นต้นไปจะเกิดกรดบิวทิริกเพิ่มขึ้นมากกว่ากรดอะซิติก

ในกระบวนการหมักที่ทำให้มีปริมาณของกรดอะซิติกมากที่สุด เนื่องมาจากกลไกการเกิดก๊าซไฮโดรเจนของ *Klebsiella pneumoniae* โดยสัดส่วนห้าในเจ็ดของ acetyl-CoA จะเปลี่ยนรูปไปเป็นอะซิเตท และสัดส่วนสองในเจ็ดของ acetyl-CoA จะเข้าไปสู่วัฏจักร tricarboxylic acid (TCA) (Chen *et al*., 2006) สอดคล้องกับการทดลองของ Wen *et al*. (2009) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้เชื้อผสมในการหมัก พบว่า มีกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก เพราะมีปริมาณกรดอะซิติกสูง และปริมาณกรดบิวทิริกต่ำ ทำให้สัดส่วนของกรดบิวทาริกต่อกรดอะซิติกมีค่าที่ต่ำเช่นเดียวกับการศึกษานี้

6. ผลของปริมาณก๊าซไฮโดรเจนต่อค่าซีโอดีที่กำจัดได้

ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องจำนวนมากใช้สภาวะในกระบวนการหมักที่เหมือนกัน แต่ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกัน เนื่องจากสับสเตรทและเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษามีความแตกต่างกันถึงแม้ว่าใช้ปริมาณเชื้อเท่ากัน จากเหตุผลดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุให้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นในการหมักแต่ละสภาวะการศึกษาแตกต่างกัน ในการศึกษานี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณการเกิดก๊าซไฮโดรเจน มีหน่วยเป็นมิลลิลิตรต่อลิตร ต่อค่าซีโอดีที่กำจัดได้มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร จะได้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจน มีหน่วยเป็นมิลลิโมลต่อกรัมซีโอดีที่กำจัดได้ (ตารางที่ 17) เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตารางที่ 17 ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการหมักที่แตกต่างกัน

สภาวะการหมัก	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (มล./ล.)	ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจน (มิลลิโมล/กรัมซีโอดีที่กำจัดได้)
1. ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (มล.)		
5	37.60	0.19
10	31.11	0.14
15	27.80	0.13
20	26.50	0.13
25	27.60	0.16
30	27.24	0.18
2. พีเอชเริ่มต้น		
4	NA	NA
5	NA	NA
6	68.05	0.32
7	101.40	0.36
8	173.74	0.64
9	277.61	0.94
10	NA	NA
3. อุณหภูมิ (°ซ)		
25	90.75	0.58
37	223.23	0.92
50	NA	NA

ตารางที่ 17 (ต่อ)

สภาวะการหมัก	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (มล./ล.)	ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจน (มิลลิโมล/กรัมซีโอดีที่กำจัดได้)
4. ปริมาณซีโอดีเริ่มต้น (มก./ล.)		
8,000	119.18	0.82
15,000	138.31	0.79
20,000	223.23	0.92
25,000	NA	NA
30,000	NA	NA
5. เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)		
6	53.62	0.36
12	184.46	0.99
24	265.66	1.01
48	477.14	1.80
72	473.44	1.92
96	411.60	2.52

หมายเหตุ NA (not analyzed) คือ ไม่ได้ทำการตรวจวัด เนื่องจากไม่มีปริมาตรก๊าซไฮโดรเจน

ผลของปริมาณก๊าซไฮโดรเจนต่อค่าซีโอดีที่กำจัดได้ พบว่า ในสภาวะที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 อุณหภูมิในการหมัก 37 องศาเซลเซียส ปริมาณซีโอดี 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 477.14 มิลลิลิตรต่อลิตร และผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 1.80 มิลลิโมลต่อกรัมซีโอดีที่กำจัดได้ นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาการหมัก 72 และ 96 ชั่วโมง มีผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากกว่าระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากค่าซีโอดีสุดท้ายที่ระยะเวลาการหมัก 72 และ 96 ชั่วโมง มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 16) เพราะในสภาวะการหมักที่นานเกินไปนี้ ทำให้มีปริมาณอาหารที่จำกัด ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียเริ่มหยุดทำงานและเริ่มตาย ซึ่งอยู่ในระยะ death phase

คืออัตราการตายสูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวน จึงทำให้เกิดการย่อยสลายตัวเองของเชื้อแบคทีเรีย (autolysis) และเซลล์เกิดการแตกตัว (cell lysis) แล้วปลดปล่อยสารที่ละลายได้กลับคืนสู่น้ำเสียเศษอาหาร จึงทำให้ค่าซีโอดีสุดท้ายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนของงานวิจัยนี้กับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่า ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนของงานวิจัยนี้มีความใกล้เคียงกันกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 การเปรียบเทียบผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	สับสเตรท	เชื้อจุลินทรีย์	สภาวะการหมัก	ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจน (มิลลิโมลต่อกรัมซีโอดี)
ไพจิตรา (2551)	น้ำกากส่า	*Klebsiella sp.*	1) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 20 มิลลิลิตร หมักในน้ำกากส่า 70 มิลลิลิตร 2) ปริมาณซีโอดีเริ่มต้น 24,600 มิลลิกรัมต่อลิตร 3) อัตราส่วน COD:N:P เท่ากับ 100:5:1 โดยใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน 4) ใช้ก๊าซอาร์กอนไล่อากาศในขวดก่อนการหมัก 5) พีเอชเท่ากับ 7 6) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	1.50
Venkata *et al*. (2007)	น้ำเสียจากโรงผลิตนม (dairy wastewater)	เชื้อผสมจากระบบ UASB ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน	1) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 30 มิลลิลิตร หมักในน้ำเสียจากโรงผลิตนม 170 มิลลิลิตร 2) ปริมาณซีโอดีเริ่มต้น 10,400 มิลลิกรัมต่อลิตร 3) พีเอชเท่ากับ 6.3 4) อุณหภูมิ 29±2 องศาเซลเซียส	0.12

ตารางที่ 18 (ต่อ)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	สับสเตรท	เชื้อจุลินทรีย์	สภาวะการหมัก	ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจน (มิลลิโมลต่อกรัมซีโอดี)
Wang *et al*. (2003)	กากตะกอนน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการแช่แข็งแล้วนำไปเหวี่ยงและการสเตอริไลส์	*Clostridium bifermentans*	1) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร หมักในกากตะกอนน้ำเสีย 45 มิลลิลิตร 2) ปริมาณซีโอดีเริ่มต้น 24,800 มิลลิกรัมต่อลิตร 3) พีเอชเท่ากับ 6.4 4) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	1.50-2.10
งานศึกษานี้	น้ำเสียเศษอาหาร	*Klebsiella pneumoniae*	1) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร หมักในน้ำเสียเศษอาหาร 95 มิลลิลิตร 2) ปริมาณซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 3) พีเอชเท่ากับ 9 4) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5) ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	1.80

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

น้ำเสียเศษอาหารเป็นของเสียชนิดหนึ่งที่มีปริมาณมาก สามารถหาได้ง่าย และมีความสะดวกในการนำมาใช้ประโยชน์ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีการจัดการที่เหมาะสม น้ำเสียเศษอาหารเหล่านี้มีปริมาณสารอินทรีย์ที่สูง ดังนั้นหากนำมาใช้เป็นสับสเตรทของจุลินทรีย์เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน เป็นแนวทางที่เหมาะสมอย่างยิ่งเพื่อลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

ผลการศึกษาการปรับสภาพกากตะกอนน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบ UASB โดยใช้เชื้อผสม พบว่า การปรับสภาพด้วยความร้อนสามารถยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทนได้ดีกว่าการไม่ปรับสภาพและการปรับสภาพด้วยกรด ส่วนผลการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีต่าง ๆ พบเชื้อจุลินทรีย์เป็นจำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 3 ไอโซเลท คือ U1 U2 และ H3 เมื่อทดสอบและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสามไอโซเลท พบว่า เชื้อ H3 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน โดยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด 53.73 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดไปทำการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี automatic product identification (API) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ตัวอย่าง H3 เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ โดยการหมักในน้ำเสียเศษอาหาร พบว่า การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร หมักในน้ำเสียเศษอาหาร 95 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณซีโอดีเริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำเสียเศษอาหารเท่ากับ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนและผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 477.14 มิลลิลิตรต่อลิตร และ 1.80 มิลลิโมลต่อกรัมซีโอดี ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* ในน้ำเสียเศษอาหาร

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการทดสอบความเป็นไปได้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียเศษอาหาร โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ คือ เชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียประเภทที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน ซึ่งการนำน้ำเสียเศษอาหารมาใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นเป็นการนำของเสียมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และช่วยจัดการน้ำเสียเศษอาหารที่ยังไม่มีการจัดการที่เหมาะสม ในงานวิจัยนี้เป็นการทดลองเบื้องต้น ควรมีการศึกษาปัจจัยอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น ค่า C/N ratio และระยะเวลาในการเก็บกัก (HRT) เป็นต้น เพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับระบบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ใหญ่ขึ้น เช่น ระดับต้นแบบ (pilot scale)

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. 2541. **บทสรุปสำหรับผู้บริหาร แผนการศึกษาแนวทางในการลดมลพิษโดยการพัฒนาของเสียหรือวัสดุเหลือใช้นำกลับมาใช้ใหม่.** เล่มที่2/3. กรมควบคุมมลพิษ, กรุงเทพฯ.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2550. **โครงการพัฒนาสาธิตการผลิตและการจัดเก็บไฮโดรเจน.** แหล่งที่มา: http://www.dede.go.th/dede/fileadmin/upload/cc/Hydrogen_Final_Report.pdf, 7 กรกฎาคม 2550.

กระทรวงพลังงาน. 2552. **ไฮโดรเจน พลังงานสมบูรณ์แบบ.** แหล่งที่มา: http://www.energy.go.th/moen/upload/File/AlternativeEnergy/Hydrogen/6_7.pdf, 25 สิงหาคม 2552.

เกรียงศักดิ์ เลิศประภามงคล. 2547. **Biohydrogen พลังงานสะอาดจากเทคโนโลยีชีวภาพ (ตอนที่ 2 การใช้ประโยชน์จากน้ำเสีย).** แหล่งที่มา: http://www.thaiscience.com, 19 มิถุนายน 2550.

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 2531. **พลังงาน**. ห้างหุ้นส่วนจำกัดอักษรเจริญทัศน์ (แผนกการพิมพ์), กรุงเทพฯ.

จินตนา ชอบวิจักษณ์. 2543. **การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงด้วยแป้งมันสำปะหลัง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงพร คันธโชติ. 2545. **นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

ธนาคารกสิกรไทย. 2525. **น้ำมันและพลังงาน**. (ม.ป.ท.), กรุงเทพฯ.

บุษวรรณ สุตรธาดา. 2551. **การเลือกดัชนีการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียยูเอเอสบีที่เหมาะสมสำหรับบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสุรา.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราโมทย์ ศิริโรจน์. 2549. **พลังงานจากเศษอาหารมก.เอามาวิจัยผลิตก๊าซขึ้น.** แหล่งที่มา: http://www.thairath.co.th, 19 มิถุนายน 2550.

ไพจิตรา กระแจเหิน, ตุลวิทย์ สถาปนจารุ และ ประไพพิศ ชัยรัตนมโนกร. 2551. การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำกากส่าด้วยกระบวนการหมักทางชีวภาพ, น. 297-306. *ใน* **รายงานการประชุมทางวิชาการสิ่งแวดล้อมนเรศวร ครั้งที่ 4.** มหาวิทยาลัยนเรศวร, พะเยา.

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2544. **จุลชีววิทยาปฏิบัติการ.** พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์เจ้าพระยาระบบการพิมพ์ จำกัด. กรุงเทพฯ.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2552. เรื่องดี ๆ ของสาหร่าย. **Interesting articles.** แหล่งที่มา: http://www.sa.ac.th/biodiversity/contents/articles/uvadee2/u2_01.html, 12 กันยายน 2552.

สมรักษ์ รอดเจริญ. 2550. **มก.ปลูกสาหร่ายผลิตไฮโดรเจนพลังงานสะอาดต้นทุนต่ำกว่าปิโตรเลียม.** หนังสือพิมพ์คมชัดลึก. 24 กันยายน 2550.

สุขสมาน สังโยคะ และ อลิศรา เรืองแสง. 2550. **ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำปะหลังโดยกลุ่มจุลินทรีย์และเชื้อ *Rhospirillum rubrum*.** แหล่งที่มา: http://www.energy-based.nrct.go.th, 7 กรกฎาคม 2550.

สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม กรมอนามัย. 2544. **การจัดการมูลฝอยของเทศบาลในประเทศไทย : สถานการณ์ในปัจจุบันและทิศทางในอนาคต.** โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เสนีย์ กาญจนวงศ์. 2551. **ทฤษฎีการบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจน**. คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

อาริยา วิรัชวรกุล. 2546. **การผลิตก๊าซชีวภาพจากเศษอาหารโดยกระบวนการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบสองขั้นตอน.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Arik, T., U. Gunduz., M. Yucel., V. Sedirogh and I. Erglu. 1995. Photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. **International Journal of Hydrogen Energy.** 20: 2417-2426.

Barbosa, M.J., J.M.S. Rocha., J. Tramper and R.H. Wijffels. 2001. Acetate as a carbon for hydrogen production by photosynthetic bacteria. **Journal of Biotechnology.** 85: 25-33.

Benemann, J. 1997. Feasibility analysis of photobiological hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy.** 22: 979-987.

Bothe, H. 1982. Hydrogen production by algae, pp. 65-70. *In* H. Mislin and R. Bachofen, eds. **New Trends in Research and Utilization of Solar Energy through Biological Systems.** Birkhauser Verlag, Basel.

Brosseau, C.R. and J.E. Zajic. 1982. Biotechnology. **Bioengineering.** 24: 1469.

Buranakarl, L., C.Y. Fan., K. Ito and H. Takahashi. 1985. Production of Molecular Hydrogen by Photosynthetic Bacteria with Raw Starch. **Agricultural Biology and Chemistry.** 49: 3339-3341.

Chen, X., Y. Sun, Z. Xiu, X. Li and D. Zhang. 2006. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy.** 31: 539-549.

Chenlin, L. and H.P. Herbert. 2007. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Environmental Science and Technology.** 37: 1-39.

Datar, R., J. Huang, P.C. Maness, A. Mohagheghi, S. Czernik and E. Chornet. 2007. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. **International Journal of Hydrogen Energy.** 32: 932-939.

Das, D. and T.N. Veziroglu. 2001. Hydrogen production by biological process: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy.** 26: 13-28.

Eroglu, E., U. Gunduz, M. Yucel, L. Turker and I. Eroglu. 2004. Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. **International Journal of Hydrogen Energy.** 29: 163-171.

Evvyernie, D., S. Yamazaki, K. Morimoto, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka and K Ohmiya. 2000. Hydrogen Gas Production from N-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) by *Clostridium paraputrificum*. **Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in Tropics.** 14: 114 -119.

Fascetti, E., E.D. Addario, O. Todini and A. Robertiello. 1998. Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. **International Journal of Hydrogen Energy.** 23: 753-760.

Gray, C.T. and H. Gest. 1965. Biological formation of molecular hydrogen. **Science.** 148: 186-192.

Guo, L., X.M. Li, X. Bo, Q. Yang, G.M. Zeng, D.X. Liao and J.J. Liu. 2008. Impact of sterilization and ultrasonication pretreatment on hydrogen production using waste sludge. **Bioresource Technology.** 99: 3651–3658.

Han, S.K. and H.S. Shin. 2004. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. **International Journal of Hydrogen Energy.** 29: 569-577.

Hawkes, F.R., R. Dinsdale, D.L. Hawkes and I. Hussy. 2002. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. **International Journal of Hydrogen Energy.** 27: 1339-1347.

Hillman, K., D. Lioyd, R.I. Scott and A.G. Williams. 1985. **Special Publisher Society General for Microbiology.** 14: 271.

Hillmer, P. and H. Gest. 1977. H_2 metabolism in photosynthetic bacterium *Rhodopseudomons capsulata*: H_2 production by growing cultures. **Journal of Bacteriology.** 129: 724-731.

Huang, S.D., C.K. Secor, R. Ascione and R.M. Zweig. 1985. **International Journal of Hydrogen Energy.** 10: 227.

Ilgi, K.K. and K. Fikret. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology.** 38: 569-582.

Karube, I., N. Urano, T. Mutsunaga and S. Suzuki. 1982. Hydrogen production from glucose by immobilized growing cells of *Clostridium butyricum*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology.** 16: 5-9.

Kaushik, N., M. Manoj, K. Anish and D. Debabrata. 2008. Kinetics of two-stage fermentation process for the production of hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy.** 33: 1195-1203.

Khanal, S.K. 2008. **Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production.** John Sons Inc., New York.

Kim, B.H., P. Bellows., R. Datta and J.G. Zeikus. 1984. **Applied and Environmental Microbiology.** 48: 764.

Kim, S., S. Han and H. Shin. 2004. Feasibility of Biohydrogen Production by Anaerobic Co-Digestion of Food Waste and Sewage Sludge. **International Journal of Hydrogen Energy** 29:1607-1616.

Kim, S.H. and H.S. Shin. 2008. Effects of base-pretreatment on continuous enriched culture for hydrogen production from food waste. **International Journal of Hydrogen Energy.** 33: 5266-5274.

Kondratieva, E.N. and I.N. Gogotov. 1983. Production of molecular hydrogen in microorganisms. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology.** 28: 139-191.

Kosaric, N. and R.P. Lyng. 1996. Microbial Production of Hydrogen, pp. 101-134. *In* H.J. Rehm and G. Reed, eds. **Biotechnology.** 2nd ed., VCH Publishers Inc., New York.

Kraemer, J.T. and D.M. Bagley. 2007. Improving the yield from fermentative hydrogen production. **Biotechnology Letters.** 29: 685-695.

Kumar, G.R. and T. M. Vatsala. 1989. Hydrogen production from glucose by *Citrobacter freundii*. **Indian Journal of Experimental-Biology.** 27(9): 824-825.

Lay, J., Y. Lee and T. Noike. 1998. Feasibility of Biological Hydrogen Production from Organic Fraction of Municipal Solid Waste. **Water Research.** 33(11): 2579-2586.

Levin, D.B., L. Pitt and M. Love. 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy.** 29: 173-185.

Li, M., Y. Zhao, Q. Guo, X. Qian and D. Niu. 2008. Bio-hydrogen production from food waste and sewage sludge in the presence of aged refuse excavated from refuse landfill. **Renewable Energy.** 33: 2573-2579.

Li, J., B. Lib, G. Zhua, N. Rena, L. Boa and J. Hea. 2007. Hydrogen production from diluted molasses by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR). **International Journal of Hydrogen Energy.** 32: 3274-3283.

Lin, C.Y. and C.H. Lay. 2004. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative H_2 production by Mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy.** 29: 41-45.

Liu, G. and J. Shen. 2004. Effects of Culture and Medium Conditions on Hydrogen Production from Starch Using Anaerobic Bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** 98: 251-256.

Liu, X., N. Ren, F. Song, C. Yang and A. Wang. 2008. Recent advances in fermentative biohydrogen production. **Progress in Natural Science.** 18: 253-258.

Lo, Y.C., W.M. Chen, C.H. Hung, S.D. Chen and J.S. Chang. 2008. Dark H_2 fermentation from sucrose and xylose using H_2-producing indigenous bacteria: Feasibility and kinetic studies. **Water Research.** 42: 827-842.

Menzel, K., A.P. Zeng, and W.D. Deckwer. 1997. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. **Enzyme and Microbial Technology.** 20: 82-86.

Minnan, L., H. Jinli, W. Xiaobin, X. Huijuan, C. Jinzao, L. Chuannan, Z. Fengzhang and X. Liangshu. 2005. Isolation and characterization of a high H_2-producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring. **Research in Microbiology.** 156: 76-81.

Miura, Y., T. Akano., K. Fukatsu., H. Miyasaka., T. Mizoguchi., K. Yagi., I. Maeda., Y. Ikuta and H. Matsumoto. 1995. Hydrogen production by photosynthetic microorganisms. **Energy Conversion and Management.** 36: 903-906.

Miyake, J., X.Y. Mao and S. Kawamura. 1984. Photoproduction of hydrogen from glucose by a co-culture of photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum.* **Journal of Fermentation Technology.** 62(6): 531-535.

Momirlan, M. and T.N. Veziroglu. 1999. Recent directions of world hydrogen production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** 3: 219-231.

Nakada, E., S. Nishikata, Y. Asada and J. Miyake. 1999. Photosynthetic bacterial hydrogen production combined with a fuel cell. **International Journal of Hydrogen Energy.** 24: 1053-1057.

Nath, K. and D. Das. 2004. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 65: 520-529.

Ren, N., B. Li, J. Li, Y. Wang and S. Liu. 2006. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. **International Journal of Hydrogen Energy.** 31: 2147-2157.

Sasikala, K., C.V. Ramana and P.R. Rao. 1991. Environmental regulation for optimal biomass yield and photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. **International Journal of Hydrogen Energy.** 27: 1303-1308.

Sasikala, K., C.V. Romana and P.R. Rao. 1992. Photoproduction of hydrogen from the wastewater of distillery by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. **International Journal of Hydrogen Energy.** 17: 23-27.

Schlegel, H.G. and K. Schneider. 1985. Microbial metabolism of hydrogen. *In* M. Moo-Young, eds. pp. 439-457. Pergamon Press, Oxford.

Sigh, S., S. Srivastava and K. Pandey. 1994. Hydrogen production by *Rhodopseudomonas sp.* at the expense of vegetable starch, sugarcane juice and whey. **International Journal of Hydrogen Energy.** 19: 437-440.

Sompong, O.T., P. Poonsuk, I. Nugul, D. Srisuda and B. Nils-Kare. 2007. Improvement of biohydrogen production and treatment efficiency on palm oil mill effluent with nutrient supplementation at thermophilic condition using an anaerobic sequencing batch reactor. **Enzyme and Microbial Technology.** 41: 583-590.

Taguchi, F., N. Mizukami, K. Hasegawa, T. Saito-Taki and M. Morimoto. 1994. Effect of amylase accumulation on hydrogen production by *Clostridium beijerinckii* strain AM 21B. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 77(5): 565-567.

Takahashi, H., K. Watanabe, J.S. Kim, K. Ito, L. Buranakarl and T. Kampee. 1979. Production of hydrogen by Photosynthetic Bacteria Isolated from Thailand. International Center of Cooperative Research and development in Microbial Engineering. **ICME. Annual Reports.** 2: 314.

Tohru, K. and I. Yasuo. 1989. **Biomass Handbook.** Gordon and Breach Science Publishers, New York.

Van Ginkel, S.W. and B. Logan. 2005. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. **Water Research.** 39: 3819-3826.

Venkata Mohan, S., V. Lalit Babu and P.N. Sarma. 2008. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. **Bioresource Technology.** 99: 59-67.

Wang, C.C., C.W. Chang, C.P. Chu, D.J. Lee, B.-V. Chang and C.S. Liao. 2003. Production hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. **Journal of Biotechnology.** 102: 83-92.

Watanabe, K., J.S. Kim, T. Kampee, L. Buranakarl and H. Takahashi. 1980. Production of Hydrogen by photosynthetic Bacteria from Thailand. **Microbial Utilization of Renewable Resources.** 1: 181-185.

Weetall, H.H., B.P. Sharma and C.C. Detar. 1981. Photometabolic production of hydrogen from organic substrates by free and immobilized mixed cultures of *Rhodospirillum rubrum* and *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology and Bioengineering.** 23: 605-614.

Wen, C., S. Sung and S. Chen. 2009. Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing betch reactor : pH and cyclic duration effects. **International Journal of Hydrogen Energy.** 34 : 227-234.

Wu, K.J., D.S. Ganesh, C.L. Yung, M.C. Wen, J.T. Ze, C.C. Ming, C.T. Ben, S. Ay and S.C. Jo. 2008. Simultaneous production of 2,3-butanediol, ethanol and hydrogen with a *Klebsiella sp.* strain isolated from sewage sludge. **Bioresource Technology.** 99: 7966-7970.

Yetis, M., U. Gunduz, I. Eroglu, M. Yucel and L. Turker. 2000. Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. **International Journal of Hydrogen Energy.** 25: 1035-1041.

Zajic, J.E., N. Kosaric and J.D. Brosseau. 1978. Microbial production of hydrogen. **Advances in Biochemical Engineering.** 9: 57-109.

Zhu, H., S. Ueda, Y. Asada and J. Miyake. 2002. Hydrogen production as a novel process of wastewater treatment-studies on tofu wastewater with entrapped *R.. sphaeroides* and mutagenesis. **International Journal of Hydrogen Energy.** 27: 1349-1357.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ค่าซีโอดี โดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด

1.1 การเตรียมสารเคมี

1) สารละลาย digestion reagent

$K_2Cr_2O_7$ (0.2 N): ละลาย $K_2Cr_2O_7$ 10.216 กรัม (ที่ผ่านการอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) ใน conc. H_2SO_4 167 มิลลิลิตร เติม $HgSO_4$ ลงไป 33.3 กรัม เจือจางในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

2) กรด sulfuric เข้มข้นที่ผสม $AgSO_4$ (sulfuric acid reagent)

ละลาย $AgSO_4$ 22 กรัม ใน conc. H_2SO_4 ซึ่งมีน้ำหนัก 4.09 กิโลกรัม แล้วตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน เพื่อให้ละลาย

3) phenanthroline indicator

ละลาย phenanthroline 1.48 กรัม กับ $FeSO_4.7H_2O$ 0.7 กรัม ในน้ำกลั่น และเจือจางจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

4) สารละลายมาตรฐาน ferrous ammonium sulfate (FAS) 0.025 N

ละลาย $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$ 9.8 กรัม ใน conc. H_2SO_4 20 มิลลิลิตร และเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

หาความเข้มข้นของ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 0.025 Nโดยไตเตรทกับ $K_2Cr_2O_7$ 0.2 N: ปิเปต $K_2Cr_2O_7$ 0.2 N 25 มิลลิลิตร เติม conc. H_2SO_4- $AgSO_4$ 20 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ หยด phenanthroline indicator จำนวน 2-3 หยด นำไปไตเตรทกับ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 0.025 N สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียวและเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติ

$$\text{Normality } Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 = \frac{\text{มล. } K_2Cr_2O_7 \times 0.2\ N}{\text{มล. } Fe(NH_4)_2(SO_4)_2}$$

1.2 วิธีวิเคราะห์ค่าซีโอดี

$K_2Cr_2O_7$ 1.5 มิลลิลิตร + sample 2.5 มิลลิลิตร + conc. H_2SO_4- $AgSO_4$ 3.5 มิลลิลิตร

↓ เขย่า

digest ที่ 150 ± 2 °ซ 2 ชั่วโมง

↓ ทิ้งให้เย็น

เทใส่ขวดรูปชมพู่ และ rinse ด้วยน้ำกลั่น 2-3 รอบ

↓ หยด indicator

ไตเตรทกับ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ จากสีเหลืองไตเตรทให้เป็นสีแดงอิฐ

1.3 การคำนวณ

$$\text{ค่าซีโอดี (มก./ล.)} = \frac{(A-B) \times C \times 8{,}000 \times D}{2.5}$$

A = ค่าการไตเตรทของ blank

B = ค่าการไตเตรทของ sample

C = ค่าความเข้มข้นของ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ (normality)

D = ค่าการเจือจางของสารตัวอย่าง (dilution of sample)

2. การวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนโดยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

1) เก็บตัวอย่างก๊าซโดยวิธีแทนที่น้ำในขวดวัคซีนขนาด 50 มิลลิลิตร โดยปรับพีเอชของน้ำกลั่นให้เท่ากับ 2 เพื่อไม่ให้คาร์บอนไดออกไซด์ละลายน้ำ

2) ดูดตัวอย่างก๊าซปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรจากขวดวัคซีนขนาด 50 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์โดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

2.2 การวิเคราะห์โดยปริมาณก๊าซไฮโดรเจนเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ Shimadzu รุ่น GC-2014 ที่มีเครื่องตรวจวัด (detector) แบบ thermal conductivity detector (TCD)

2.2.1 ใช้คอลัมน์ molecular sieve 5A

2.2.2 ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็น carrier gas

2.2.3 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจน

1) อุณหภูมิของคอลัมน์ 130 องศาเซลเซียส

2) อุณหภูมิของ injection port 150 องศาเซลเซียส

3) อุณหภูมิของเครื่องตรวจวัด (detector) 230 องศาเซลเซียส

4) อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียม 50 มิลลิลิตรต่อนาที

3. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันระเหยโดยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

1) เก็บตัวอย่างน้ำเสียเศษอาหารที่ผ่านการหมักแล้วปริมาณ 40 มิลลิลิตร โดยนำตัวอย่างมาตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยง 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บน้ำใสในขวดวัคซีนขนาด 50 มิลลิลิตร ก่อนนำมาวิเคราะห์ ให้ทำการเจือจางตัวอย่าง 10 เท่า แล้วทำการกรองผ่านชุดกรองสารตัวอย่างแบบสำเร็จรูป

2) ดูดตัวอย่างน้ำเสียปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์โดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

3.2 การวิเคราะห์กรดไขมันระเหยโดยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ Shimadzu รุ่น GC-2014 ที่มีเครื่องตรวจวัด (detector) แบบ flame ionization detector (FID)

3.2.1 ใช้คอลัมน์ FFAP + H_3PO_4 (0.3+0.3%) Graphite C

3.2.2 ใช้ก๊าซฮีเลียม เป็น carrier gas

3.2.3 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจน

1) อุณหภูมิของคอลัมน์ 220 องศาเซลเซียส

2) อุณหภูมิของ injection port 260 องศาเซลเซียส

3) อุณหภูมิของเครื่องตรวจวัด (detector) 260 องศาเซลเซียส

4) อัตราการไหลของก๊าซ 40 มิลลิลิตรต่อนาที

4. วิธีการย้อมแกรม ด้วยเทคนิค gram's strain (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544)

4.1 ทำความสะอาดสไลด์และเช็ดให้แห้ง

4.2 เตรียมรอยสเมียร์ และตรึงตัวเซลล์ด้วยการผ่านเปลวไฟ (ระวังเซลล์จะแตก) การตรึงเซลล์จะช่วยให้เซลล์แห้งติดกับแผ่นกระจกสไลด์

4.3 หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที

4.4 เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์ และทิ้งไว้นาน 1 นาที

4.5 เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้เกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบา ๆ

4.6 ซับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยการหยดสี safranin O ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที

4.7 เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งให้แห้ง

4.8 นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

5. วิธีการวิเคราะห์ตะกอนจุลินทรีย์ ซึ่งวัดในรูปของตะกอนแขวนลอย (MLSS) และตะกอนแขวนลอยระเหย (MLVSS)

5.1 การดำเนินการวิเคราะห์

1) อบถ้วยกระเบื้องให้แห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดสิกเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก

2) เมื่ออบถ้วยกระเบื้องแล้วนำตัวอย่างสารละลายเชื้อที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในถ้วยกระเบื้อง ทำการชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดสิกเคเตอร์ และชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่

3) ของแข็งที่ได้นี้สามารถนำไปวิเคราะห์หาส่วนที่ระเหยที่ 550 องศาเซลเซียส โดยให้เผาถ้วยกระเบื้องที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในเตาเผา จากนั้นปล่อยให้เย็นในเดสิกเคเตอร์และชั่งน้ำหนัก

ตารางผนวกที่ ก1 น้ำหนักตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ค่า MLSS และ MLVSS

ค่าการคำนวณ	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม) ซ้ำที่ 1	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม) ซ้ำที่ 2
A	27.33	28.33
B	27.27	28.26
C	27.29	28.28

5.2 การคำนวณ

$$MLSS = \frac{(A - B)}{D}$$

เมื่อ MLSS = ตะกอนแขวนลอย (กรัม/ลิตร)

A = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องและของแข็งที่ผ่านการอบ 103-105 องศาเซลเซียส, กรัม

B = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้อง, กรัม

D = ปริมาตรน้ำตัวอย่างที่ใช้, ลิตร

$$MLVSS = \frac{(A - B) - (C - B)}{D}$$

เมื่อ MLVSS = ตะกอนแขวนลอยระเหย (กรัม/ลิตร)

A = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้อง และของแข็งที่ผ่านการอบ103-105 องศาเซลเซียส, กรัม

B = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้อง, กรัม

C = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้อง และของแข็งที่ผ่านการเผา 550 องศาเซลเซียส, กรัม

D = ปริมาตรน้ำตัวอย่างที่ใช้, ลิตร

ภาคผนวก ข

ข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ข1 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณเชื้อเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

แหล่งความแปรปรวน	SS	df	MS	F-test	p-value
ระหว่างกลุ่ม	182.068	5	36.414	5.590	.029
ภายในกลุ่ม	39.087	6	6.515		
รวม	221.155	11			

ตารางผนวกที่ ข2 การทดสอบความแตกต่างรายคู่ด้วย LSD ของปริมาณเชื้อเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

ปริมาณเชื้อ	5	10	15	20	25
10	6.665*				
15	9.910*				
20	11.195*				
25	10.285*				
30	10.495*				

หมายเหตุ * มีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ตารางผนวกที่ ข3 การวิเคราะห์ทางสถิติค่าพีเอชเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

แหล่งความแปรปรวน	SS	df	MS	F-test	p-value
ระหว่างกลุ่ม	51635.375	3	17211.792	53.276	.001
ภายในกลุ่ม	1292.282	4	323.070		
รวม	52927.657	7			

ตารางผนวกที่ ข4 การทดสอบความแตกต่างรายคู่ด้วย LSD ของค่าพีเอชเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

พีเอช	6	7	8	9
7				
8	-105.695*	-72.345*		
9	-209.560*	-176.210*	-103.865*	

หมายเหตุ * มีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ตารางผนวกที่ ข5 การวิเคราะห์ทางสถิติอุณหภูมิเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธี t-test

อุณหภูมิ	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	t-test	df	p-value
25	90.75	14.581	-11.722	2	.007
37	223.23	6.540			

หมายเหตุ * มีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ตารางผนวกที่ ข6 การวิเคราะห์ทางสถิติค่าซีโอดีเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

แหล่งความแปรปรวน	SS	df	MS	F-test	p-value
ระหว่างกลุ่ม	12268.487	2	6134.243	12.078	.037
ภายในกลุ่ม	1523.714	3	507.905		
รวม	13792.200	5			

ตารางผนวกที่ ข7 การทดสอบความแตกต่างรายคู่ด้วย LSD ของค่าซีโอดีเริ่มต้นกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

ปริมาณซีโอดี	8,000	15,000	20,000
15,000	-84.914*		
20,000	-104.049*		

หมายเหตุ * มีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ตารางผนวกที่ ข8 การวิเคราะห์ทางสถิติระยะเวลาที่ใช้ในการหมักกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

แหล่งความแปรปรวน	SS	df	MS	F-test	p-value
ระหว่างกลุ่ม	296845.564	5	59369.113	100.820	.000
ภายในกลุ่ม	3533.174	6	588.862		
รวม	300378.738	11			

ตารางผนวกที่ ข9 การทดสอบความแตกต่างรายคู่ด้วย LSD ของระยะเวลาที่ใช้ในการหมักกับค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

ระยะเวลาในการหมัก	6	12	24	48	72
12	-130.840*				
24	-212.040*	-81.200*			
48	-423.520*	-292.680*	-211.480*		
72	-419.825*	-288.985*	-207.785*		
96	-357.975*	-227.135*	-145.935*	65.545*	61.850*

หมายเหตุ * มีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวนรีรัตน์ คำกล่อมใจ
เกิดวันที่	28 สิงหาคม 2528
สถานที่เกิด	จังหวัดอุดรธานี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ทรัพยากรเกษตรชีวภาพ) เกียรตินิยมอันดับ 1 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนอุดหนุนจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปี 2551 และทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KURDI) ปี 2552