การผลิตไบโอไฮโดรเจนจากแบคทีเรียที่แยกได้จาก วัสดุเหลือทิ้งทางชีวภาพ

PRODUCTION OF BIOHYDROGEN FROM BACTERIA ISOLATED FROM BIOLOGICAL WASTE MATERIALS

วารุณี บัวลา

WARUNEE BUALA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2551

KMITL-2008-SC-M-016-124

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตไบโอไฮโดรเจนจากแบคทีเรียที่แยกได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางชีวภาพ

PRODUCTION OF BIOHYDROGEN FROM BACTERIA ISOLATED FROM BIOLOGICAL WASTE MATERIALS

T081361

วารุณี บัวลา

WARUNEE BUALA

เลขหมู่..............
เลขทะเบียน 81361
วัน,เดือน,ปี 11 มิ.ย. 2551

.b..........................
.i..........................

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2551

KMITL-2008-SC-M-016-124

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวน ... นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา ... อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF BIOHYDROGEN FROM BACTERIA ISOLATED FROM BIOLOGICAL WASTE MATERIALS

WARUNEE BUALA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2008

KMITL-2008-SC-M-016-124

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2008

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไบโอไฮโดรเจนจากแบคทีเรียที่แยกได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางชีวภาพ Production of Biohydrogen from Bacteria Isolated from Biological Waste Materials
ชื่อนักศึกษา	นางสาววารุณี บัวลา
รหัสประจำตัว	48068101
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมีสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.สุวรรณี จรรยาพูน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ชลอ	จารุสุทธิรักษ์	
ดร.สุวรรณี	จรรยาพูน	
ผศ.ดร.สรัญญา	พันธุ์พฤกษ์	
ศ.ดร.อรัญ	อินเจริญศักดิ์	
ผศ.พิสมัย	ชัยรัตน์อุทัย	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 24 เมษายน 2551 เวลา 14.00-16.00 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ห้อง 603

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.รวีวรรณ ชินะตระกูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่....29.....เดือน....กรกฎาคม....พ.ศ. 2551...

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไบโอไฮโดรเจนจากแบคทีเรียที่แยกได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางชีวภาพ
นักศึกษา	นางสาววารุณี บัวลา
รหัสประจำตัว	48068101
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมีสิ่งแวดล้อม
พ.ศ.	2551
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร. สุวรรณี จรรยาพูน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากวัสดุเหลือทิ้งภายในประเทศ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ขั้นตอน คือ 1) แยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะไม่ใช้อากาศจากวัสดุเหลือทิ้ง 3 แหล่ง ได้แก่ สลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน น้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะชุมชน และปุ๋ยคอกมูลวัว 2) คัดเชื้อที่แยกได้ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดในอาหาร RCM และสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน 3) วิเคราะห์ชนิดของเชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดโดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA 4) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน ด้วยวิธีการหมักแบบไม่ใช้อากาศ 5) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้กับเชื้อ *Clostridium butyricum* ผลการศึกษาพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ 6 ไอโซเลท (S1-S6) ที่แยกได้จากสลัดจ์สามารถผลิตก๊าซได้ โดยไอโซเลท S3 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในอาหาร RCM และสลัดจ์ พบว่าในอาหาร RCM ไอโซเลท S3 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 1.92±0.10 โมลก๊าซไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ซึ่งมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนน้อยกว่าเชื้อ *C. butyricum* ประมาณ 3.7 เท่า จากผลการจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าไอโซเลท S3 เป็นเชื้อ *Escherichia coli* ส่วนผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสลัดจ์ของ *E. coli* (S3) พบว่าที่ความเข้มข้นสลัดจ์ 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.0 และหัวเชื้อ (OD_{600} เท่ากับ 0.8) 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรสลัดจ์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด โดยมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 9.45±0.81 มิลลิโมลก๊าซไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดี ซึ่งประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อ *E. coli* (S3) สูงกว่าเชื้อ *C. butyricum* ประมาณ 1.7 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : ไบโอไฮโดรเจน, ปุ๋ยคอกมูลวัว, *E. coli*, น้ำชะขยะ, สลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน

Thesis Title	Production of Biohydrogen from Bacteria Isolated from Biological Waste Materials
Student	Miss Warunee Buala
Student ID.	48068101
Degree	Master of Science
Program	Environmental Chemistry
Year	2008
Thesis Advisor	Dr. Suwannee Junyapoon
Thesis Co-Advisor	Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch

ABSTRACT

This research studied feasibility of hydrogen gas production from sewage sludge using microbial strains isolated from waste materials in Thailand. The experiment was divided into 5 steps: 1) isolate of hydrogen producing microbial strains under anaerobic condition from three sources of waste materials i.e. sewage sludge, leachate and cow dung compost 2) select microbial strains producing maximum yield of hydrogen in RCM medium and sewage sludge 3) identify type of the isolated strains using 16S ribosomal DNA technique 4) study optimum conditions for producing hydrogen by the obtained strain under anaerobic fermentation 5) compare efficiency of hydrogen production of the isolated strain and *Clostridium butyricum*. The results showed that 6 isolates (S1-S6) isolated from sewage sludge could produce gas. The S3 isolate could produce maximal amount of hydrogen in both RCM and sewage sludge. In RCM, the S3 isolate produced maximal hydrogen yield of 1.92±0.10 mol-H_2/mol-glucose. The amount of hydrogen produced by the S3 isolate was less than that of *C. butyricum* about 3.7 times. The S3 strain was identified as *Escherichia coli* using 16S rDNA sequence analysis. It was found that optimum conditions for producing hydrogen from sewage sludge of *E. coli* (S3) were an initial sewage sludge concentration of 20,000 mg/L, pH 6.0 and an initial inoculum concentration (at OD_{600} = 0.8) of 10% (v/v). Under these conditions, the *E. coli* (S3) produced hydrogen yield of 9.45±0.81 mmol-H_2/ g COD which is higher than of that of a pure culture of *C. butyricum* about 1.7 times.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords: biohydrogen, cow dung compost, *E. coli*, leachate, sewage sludge,

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือจากผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (วท.) ที่สนับสนุนทุนวิจัยภายใต้โครงการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรมโครงการสนับสนุนทุนนักวิจัยใหม่

ขอขอบพระคุณ ดร. สุวรรณี จรรยาพูน อาจารย์ภาควิชาเคมีและ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาอย่างใกล้ชิด และเสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา รวมทั้งตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ชลอ จารุสุทธิรักษ์ และ ผศ. พิสมัย ชัยรัตน์อุทัย อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือแนะนำ และช่วยตรวจสอบเพิ่มความสมบูรณ์ให้กับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำ และเสนอแนะแนวทางแก้ปัญหาของวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณโรงควบคุมคุณภาพน้ำดินแดง กรุงเทพฯ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างสลัดจ์

ขอขอบพระคุณ ศูนย์กำจัดขยะ จ. นนทบุรี ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างน้ำชะขยะ

ขอขอบพระคุณ นายสม อู่เงิน จ. ฉะเชิงเทรา ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างปุ๋ยคอกมูลวัว

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ภาควิชาเคมี และภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความร่วมมือ และอำนวยความสะดวก ในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว รวมทั้งเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดในการทำวิทยานิพนธ์

นางสาววารุณี บัวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	XI
สารบัญรูป	XV
สัญลักษณ์และคำย่อ	XIX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ความสำคัญของพลังงานไฮโดรเจน	5
2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน	6
2.2.1 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูง	6
2.2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ไฟฟ้าเคมี	7
2.2.3 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพ	8
2.2.3.1 วิธี Direct biophotolysis	8
2.2.3.2 วิธี Indirect biophotolysis	9
2.2.3.3 วิธี Biological water-gas shift reaction	10
2.2.3.4 วิธี Photo-fermentation	10
2.2.3.5 วิธี Dark-fermentation	11
2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	13
2.3.1 จุลินทรีย์กลุ่มเคโมโทรฟ	13
2.3.1.1 แบคทีเรียกลุ่มไม่ต้องการออกซิเจน	13
2.3.1.2 แบคทีเรียกลุ่มต้องการออกซิเจน	18

เอกสารนี้เป็นเอกสาร[illegible]การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้ง[illegible]เจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.2 จุลินทรีย์กลุ่มโฟโตโทรฟ	24
2.4 แหล่งที่มาของจุลินทรีย์	25
2.4.1 สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน	25
2.4.2 น้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะมูลฝอยชุมชน	26
2.4.3 ปุ๋ยคอกมูลวัว	28
2.5 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะที่ไม่ใช้อากาศ	28
2.5.1 ไฮโดรไลซีส	28
2.5.2 อะซิโดเจเนซีส	30
2.5.3 อะซิโตเจเนซีส	31
2.6 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	33
2.6.1 เอนไซม์ไนโตรจีเนส	34
2.6.2 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส	35
2.7 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน	36
2.7.1 พีเอช	36
2.7.2 อุณหภูมิ	36
2.7.3 ความเป็นด่าง	37
2.7.4 สารอาหาร	37
2.7.5 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น	37
2.7.6 กรดไขมันระเหยง่าย	38
2.7.7 สารพิษ	38
2.8 สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสีย	40
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	42
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	46
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	46
3.1.1 อุปกรณ์	46
3.1.2 สารเคมี	47
3.1.3 ก๊าซต่าง ๆ	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ถ้าอ้างอิงโดยห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ........ 49

3.1.5 แหล่งจุลินทรีย์. 49

3.1.6 ถังหมักก๊าซไฮโดรเจน........ 50

3.2 ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง........ 51

3.2.1 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากวัสดุเหลือทิ้งทางชีวภาพและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์........ 53

3.2.1.1 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากวัสดุเหลือทิ้งทางชีวภาพ........ 53

3.2.1.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่ง........ 54

3.2.2 การคัดเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด........ 56

3.2.2.1 การศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่ง โดยใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร........ 56

3.2.2.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่ง โดยใช้สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนเป็นแหล่งอาหาร........ 59

3.2.3 การจำแนกเชื้อโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA.... 61

3.2.3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย........ 61

3.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส........ 62

3.2.3.3 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส........ 63

3.2.3.4 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์........ 64

3.2.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA........ 64

3.2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร........ 65

3.2.4.1 การศึกษาผลของพีเอชของสลัดจ์เริ่มต้น........ 65

3.2.4.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้น........ 66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวน… ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้ง… ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.4.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น................ 67

3.2.5 การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนระหว่างเชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ได้จากการทดลองกับเชื้อ *C. butyricum*.. 69

3.2.5.1 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ได้จากการทดลองกับเชื้อ *C. butyricum* โดยใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร..................... 69

3.2.5.2 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ได้จากการทดลองกับเชื้อ *C. butyricum* โดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร…....................... 69

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.. 73

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากวัสดุเหลือทิ้ง... 73

4.2 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่งและการศึกษาลักษณะของเชื้อเบื้องต้น.. 73

4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่ง โดยใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร.. 75

4.3.1 อัตราการผลิตก๊าซ.. 75

4.3.2 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์.. 77

4.3.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ............................ 79

4.3.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการหมัก... 80

4.3.5 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ต่อโมลกลูโคส..................................... 82

4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่งโดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร.. 84

4.4.1 อัตราการผลิตก๊าซ.. 84

4.4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์.. 85

4.4.3 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ... 86

4.4.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการหมัก... 87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4.5 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ต่อกรัมซีโอดี.. 89

4.5 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA.. 91

4.5.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท S2, S3 และ S6...... 91

4.5.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส... 92

4.5.3 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อไอโซเลท S2, S3 และ S6.. 93

4.6 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร.. 93

4.6.1 ผลของพีเอชของสลัดจ์เริ่มต้นต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.......................... 93

4.6.2 ผลของความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้นต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน............... 95

4.6.3 ผลของความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.... 96

4.7 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนระหว่างเชื้อไอโซเลท S3 กับเชื้อ *C. butyricum* 97

4.7.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของชื้อไอโซเลท S3 เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร......... 98

4.7.1.1 อัตราการผลิตก๊าซ.. 98

4.7.1.2 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์.. 100

4.7.1.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ................ 101

4.7.1.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการหมัก.. 102

4.7.1.5 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ต่อโมลกลูโคส............................... 103

4.7.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร........... 105

4.7.2.1 อัตราการผลิตก๊าซ.. 105

4.7.2.2 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์.. 107

4.7.2.3 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ....................................... 108

4.7.2.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการหมัก.. 109

4.7.2.5 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ต่อกรัมซีโอดี................................ 110

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.7.2.6 ปริมาณกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก.......... 114

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.......... 117

5.1 สรุปผลการวิจัย.......... 117

5.2 ข้อเสนอแนะ.......... 118

เอกสารอ้างอิง.......... 119

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการตรวจวิเคราะห์เชื้อ.......... 127

ก 1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.......... 128

ก 1.1 วิธีการเตรียมอาหารแข็ง Reinforced Clostridium Agar (RCA) จากอาหารเหลว RCM.......... 128

ก 2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยเทคนิค Spread plate.......... 129

ก 3 การแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยเทคนิค Streak plate.......... 129

ก 4 การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์.......... 130

ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์.......... 132

ข 1 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi Nelson's method 133

ภาคผนวก ค ผลการทดลอง.......... 135

ค 1 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่แยกได้ จาก 3 แหล่งโดยใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร.......... 136

ค 2 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่แยกได้ จาก 3 แหล่ง โดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร.......... 159

ค 3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สลัดจ์ เป็นแหล่งอาหาร.......... 172

ค 3.1 ผลการศึกษาพีเอชของสลัดจ์เริ่มต้น.......... 172

ค 3.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้น.......... 178

ค 3.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น.......... 181

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ค 4 ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้โดย
ใช้สภาวะเหมาะสมที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับเชื้อ *C. butyricum*......... 187

ภาคผนวก ง ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.. 197

ประวัติผู้เขียน.. 207

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ค่าพลังงานที่ได้จากการเผาไหม้เชื้อเพลิงชนิดต่าง ๆ 6

2.2 จุลินทรีย์ในกลุ่มเคโมโทรฟที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน แหล่งกำเนิด และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ 19

2.3 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในแต่ละกระบวนการย่อยสลายแบบไม่มีออกซิเจน 30

2.4 วิธีการผลิตหัวเชื้อโดยการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม methanogenic bacteria 33

2.5 คุณสมบัติของเอนไซม์ไนโตรจีเนส และเอนไซม์ไฮโดรจีเนส 34

2.6 ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ 36

2.7 ความเข้มข้นที่กระตุ้นและยับยั้งของแคตไอออนโลหะเบา 38

2.8 แคตไอออนเพิ่มความเป็นพิษและแคตไอออนลดความเป็นพิษ 39

2.9 ความเข้มข้นของโลหะหนักที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียในสภาวะการย่อยสลายแบบไม่มีออกซิเจน 40

2.10 คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของสลัดจ์ที่ไม่ผ่านการบำบัดและสลัดจ์ที่ถูกย่อยสลาย 41

3.1 พารามิเตอร์และวิธีการวิเคราะห์ 57

3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง Gas Chromatograph - Thermal Conductivity Detector 58

3.3 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส. 63

3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... 64

3.5 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดอินทรีย์โดยวิธีการสกัดด้วย SPME และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph - Mass Spectrometer 72

4.1 จำนวนไอโซเลทจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากวัสดุเหลือทิ้ง 3 แหล่ง 73

4.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทเมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร 83

4.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทเมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร 90

4.4 อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อไอโซเลท S3 ปริมาณต่าง ๆ........ 97

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร 105

4.6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร 112

4.7 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 กับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ 113

4.8 ปริมาณกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 114

4.9 สารอินทรีย์ที่พบในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน 116

ก 1 สูตรอาหาร Reinforced Clostridial Media (RCM) และ Reinforced Clostridium agar (RCA) 128

ข 1 ปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ 134

ค 1.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร 136

ค 1.2 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์โดยวัดค่าความขุ่นของเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำหมักที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร 143

ค 1.3 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำหมักวัดโดยเทคนิค spread plate เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร 146

ค 1.4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร 148

ค 1.5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสในตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร 150

ค 1.6 ความเข้มข้นกลูโคสที่ได้จากการคำนวณในสมการจากกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส 153

ค 1.7 การเปลี่ยนแปลงพีเอชที่ช่วงเวลาต่างๆ เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร 156

ค 1.8 พื้นที่ใต้กราฟของก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐานความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่ปริมาตรต่าง ๆ 156

ค 1.9 จำนวนโมลของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นต่อจำนวนโมลของกลูโคสที่ถูกใช้ไป 158

ค 2.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่างๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร 159

เอกสารนี้เป็นเอกสาร...ใช้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด...ที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ค 2.2 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำหมักเมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร.................................... 165

ค 2.3 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีในน้ำหมักเมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร…................................ 168

ค 2.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชที่ช่วงเวลาต่างๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร.......................... 170

ค 2.5 ความเข้มข้นกลูโคสที่ถูกย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ…...................... 171

ค 3.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่างๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร..................... 172

ค 3.2 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้นต่าง ๆ... 178

ค 3.3 ปริมาตรก๊าซสะสมของการเติมหัวเชื้อที่ปริมาตรต่างๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร..... 181

ค 4.1 ปริมาตรก๊าซสะสมของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร…... 187

ค 4.2 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำหมักเมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหารของเชื้อไอโซเลท S3..... 189

ค 4.3 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีในน้ำหมักของเชื้อไอโซเลท S3 และ *C. butyricum* เมื่อใช้ สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร….. 190

ค 4.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชที่ช่วงเวลาต่างๆ ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร.. 191

ค 4.5 จำนวนโมลของก๊าซไฮโดรเจนและค่าซีโอดีที่ถูกย่อยสลายของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร…... 192

ค 4.6 ความเข้มข้นของสารละลายกรดอะซิติก.. 193

ค 4.7 ความเข้มข้นของสารละลายกรดโปรปิโอนิก.. 193

ค 4.8 ความเข้มข้นของสารละลายกรดบิวทิริก.. 194

ค 4.9 พื้นที่ใต้กราฟ ที่ได้จากการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ในน้ำหมัก ด้วย GC-MS …................. 195

ค 4.10 ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ในน้ำหมัก.. 196

ง 1 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของอัตราการผลิตก๊าซของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร.............. 198

ง 2 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่าง การหมัก เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร.. 200

ง 3 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของ อัตราการผลิตก๊าซของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร...................... 202

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ง 4 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่างการหมัก เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร 204

ง 5 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร 205

ง 6 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร 206

ง 7 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของปริมาตรก๊าซไฮโดรเจนสะสมของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร 206

ง 8 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของอัตราการผลิตก๊าซของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร 206

ง 9 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร 206

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยผ่านกระบวนการ steam reforming ของก๊าซธรรมชาติ...... 7

2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า...... 8

2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธี Direct biophotolysis...... 9

2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธี Indirect biophotolysis...... 10

2.5 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธี Photo-fermentation...... 11

2.6 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธี Dark fermentation...... 12

2.7 กราฟการสะสมของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สมการ Modified Gompertz...... 13

2.8 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดย *C. butyricum* จากกลูโคส.... 14

2.9 การผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนโดย *Escherichia coli* system...... 16

2.10 วิถีเมตาบอลิซึมของกลูโคสของ *Klebsiella pneumoniae* ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน...... 17

2.11 วิถีการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย...... 25

2.12 การผลิตก๊าซและน้ำชะขยะที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในหลุมฝังกลบ...... 26

2.13 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไร้อากาศ...... 29

2.14 ผลของความดันของไฮโดรเจนต่อวิถีเมตาบอลิซึมการออกซิเดชันของ NADH...... 31

2.15 การย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไม่มีออกซิเจนและสัดส่วนของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น...... 32

2.16 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่าย...... 35

2.17 กลไกการบำบัดสลัดจ์และปริมาณน้ำที่มีในสลัดจ์ในแต่ละขั้นตอน...... 42

3.1 แหล่งจุลินทรีย์และการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 แหล่ง...... 50

3.2 การหมักก๊าซไฮโดรเจนและการเก็บก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้หลักการแทนที่น้ำ...... 51

3.3 แผนภูมิขั้นตอนการทดลอง...... 52

3.4 ภาชนะมีฝาปิดที่ใช้แทน Anaerobic jar...... 53

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.5 แผนภูมิการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากวัสดุเหลือทิ้งและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์.................... 55

3.6 แผนภูมิการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อาหาร RCM เป็นแหล่งอาหาร.. 59

3.7 แผนภูมิการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร... 61

3.8 แผนภูมิการศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน... 66

3.9 แผนภูมิการศึกษาผลของความเข้มข้นของสลัดจ์ต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.................... 67

3.10 แผนภูมิการศึกษาผลของความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน..... 68

3.11 แผนภูมิการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. butyricum*.. 71

4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซของเชื้อที่ได้จากการคัดแยกในอาหาร RCM... 74

4.2 ลักษณะเซลล์จุลินทรีย์และการติดสีแกรมลบของเชื้อไอโซเลท S3 ที่คัดแยกได้จากสลัดจ์... 74

4.3 ปริมาตรก๊าซสะสมของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร........................ 75

4.4 โครมาโตรแกรมก๊าซไฮโดรเจนที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-TCD... 76

4.5 อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร........... 77

4.6 การเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในช่วงการหมักที่เวลาต่างๆ โดยวิธีการวัด OD_{600} เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร... 78

4.7 การเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในช่วงเวลาหมักต่างๆ โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร... 79

4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาหมักต่างๆ ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร.. 80

4.9 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่างการหมักเมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร... 81

4.10 ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่างการหมักเมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร.. 82

4.11 ปริมาตรก๊าซสะสมของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร.................... 84

4.12 อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร.......... 85

เอกสารนี้เป็นเอ... ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณี... ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.13 การเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในช่วงเวลาหมักต่าง ๆ โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร.. 86

4.14 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในช่วงเวลาหมักต่างๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร.. 87

4.15 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่างการหมัก เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร.. 88

4.16 ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่างการหมัก เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร.. 89

4.17 จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท S2, S3 และ S6 จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์.. 91

4.18 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA.. 92

4.19 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาด 600 คู่เบสของเชื้อไอโซเลท S2, S3 และ S6.. 94

4.20 ผลของพีเอชเริ่มต้นของสลัดจ์ต่อการผลิตก๊าซ.. 95

4.21 ผลของความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้นต่อการผลิตก๊าซ.. 95

4.22 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อไอโซเลท S3 ต่อการผลิตก๊าซ.. 96

4.23 ปริมาตรก๊าซสะสมของเชื้อไอโซเลท S3 เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. butyricum*.. 98

4.24 อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร.. 99

4.25 การเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในช่วงการหมักที่เวลาต่างๆ โดยวิธีการวัด OD_{600} เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร.. 100

4.26 การเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S3 ในช่วงเวลาหมักต่างๆ โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร.. 101

4.27 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาหมักต่างๆ ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร.. 102

4.28 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในระหว่างการหมักเมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร.. 103

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.29 ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในระหว่างการหมัก เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร...... 104

4.30 ปริมาตรก๊าซสะสมของเชื้อไอโซเลท S3 และ *C. butyricum* ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร...... 106

4.31 อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S3 เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร...... 107

4.32 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S3 ในช่วงเวลาหมักต่างๆ โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร...... 108

4.33 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในช่วงเวลาหมักต่างๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร...... 109

4.34 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในช่วงเวลาการหมักที่เวลาต่างๆ ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในช่วงเวลาหมักต่างๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร...... 110

4.35 ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในระหว่างการหมัก เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร...... 111

4.36 โครมาโตแกรมกรดอินทรีย์ที่วิเคราะห์ด้วย SPME-GC-MS...... 115

ค 1.1 กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน...... 149

ค 1.2 กราฟของก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน...... 157

ค 4.1 กราฟสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติก...... 193

ค 4.2 กราฟสารละลายมาตรฐานกรดโปรปิโอนิก...... 194

ค 4.3 กราฟสารละลายมาตรฐานกรดกรดบิวทิริก...... 195

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัญลักษณ์และคำย่อ

SS (Suspended solid)	ของแข็งแขวนลอย
VSS (Volatile suspended solid)	ของแข็งแขวนลอยระเหยง่าย
MLSS (Mixed liquor suspended solid)	ของแข็งแขวนลอยในน้ำตะกอน
COD (Chemical oxygen demand)	ปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยวิธีการทางเคมี
VFA (Volatile fatty acid)	กรดไขมันระเหยง่าย
SPME (Solid phase microextraction)	การสกัดด้วยเฟสของแข็ง
GC-TCD	เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์
GC-MS	เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-แมสสเปคโตรโฟโตมิเตอร์
BESA (Bromoethanesulfonic acid)	กรดโบรโมอีเทนซัลโฟนิก
MJ/kg	เมกะจูลต่อกิโลกรัม
kJ/ mol	กิโลจูลต่อโมล
mM	มิลลิโมลาร์
% v/v	เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร
% w/v	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
S.D. (Standard deviation)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
n.d.. (Not detected	ตรวจไม่พบ
O	ค่า Outliner
$^{\circ}C$	องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมีการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล ได้แก่ น้ำมันปิโตรเลียม ถ่านหิน เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญเป็นจำนวนมาก ก่อให้เกิดปัญหาการขาดแคลนพลังงานและปัญหาสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปรากฏการณ์โลกร้อน และการเกิดฝนกรด ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อเพลิงจากฟอสซิลจัดเป็นเชื้อเพลิงที่ไม่สามารถสร้างขึ้นใหม่ได้ (non-renewable energy) และเมื่อเผาไหม้จะทำให้เกิดมลพิษทางอากาศ ได้แก่ ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ก๊าซไนโตรเจนออกไซด์ (NO_x) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และฝุ่นละออง ออกสู่บรรยากาศ (Kapdan and Kargi, 2006) จากปัญหาดังกล่าวจึงมีการศึกษาหาพลังงานทดแทนในรูปแบบใหม่ๆ ที่เป็นพลังงานสะอาดและสามารถสร้างขึ้นใหม่ (clean and renewable energy) เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการดำรงชีวิต โดยที่ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

ก๊าซไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากก๊าซไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่สะอาด ไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในขณะเผาไหม้ และมีพลังงานสูงถึง 122 กิโลจูลต่อกรัม หรือสูงกว่า 2.75 เท่าของเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอนทั่วไป (Kapdan and Kargi, 2006) การผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 วิธี คือ 1) กระบวนการที่ใช้อุณหภูมิสูง (Thermo processes) 2) กระบวนการทางไฟฟ้าเคมี (Electrochemical processes) และ 3) กระบวนการทางชีวภาพ (Biological processes) (http://www.hydrogenassociation.org) ปัจจุบันการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกน้ำด้วยไฟฟ้าเป็นวิธีที่สามารถผลิตพลังงานให้เพียงพอแก่ความต้องการของอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการผลิตค่อนข้างสูงและต้องอาศัยพลังงานไฟฟ้าที่ผลิตได้จากเชื้อเพลิงฟอสซิล ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่มีอยู่จำกัดและคาดว่าจะหมดไปในอนาคตอันใกล้ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนในโลกนี้มากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ ยังต้องอาศัยเชื้อเพลิงฟอสซิล (Wunschiers and Lindblad, 2002) ดังนั้น ก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ในปัจจุบัน จึงยังไม่จัดเป็นพลังงานทดแทนที่สะอาดอย่างแท้จริง

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้จุลินทรีย์หรือไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) เป็นการเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้เป็นก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้จุลินทรีย์ จึงจัดว่าเป็นพลังงานทดแทนที่สะอาดที่สามารถสร้างขึ้นใหม่ได้ ซึ่งจุลินทรีย์สามารถใช้สารอินทรีย์ที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากครัวเรือน อุตสาหกรรม หรือเกษตรกรรม ได้แก่ เศษอาหาร กากตะกอนน้ำเสียชุมชน เปลือกสับปะรด กากน้ำตาล แป้ง เป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ดังนั้น วิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนี้

นอกจากจะให้พลังงานทดแทนที่สะอาดและสร้างขึ้นใหม่ได้ ยังเป็นการใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งซึ่งช่วยลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกทางหนึ่งด้วย

การผลิตไบโอไฮโดรเจนทางชีวภาพสามารถแบ่งออกเป็น 5 วิธี คือ 1) Direct biophotolysis 2) Indirect biophotolysis 3) Biological water-gas shift reaction 4) Photo-fermentation และ 5) Dark-fermentation (Levin *et al.*, 2004) ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อจำกัด ข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป แต่วิธี Dark-fermentation ซึ่งเป็นกระบวนการหมักของเชื้อแบคทีเรียไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) และจุลสาหร่าย (microalgae) บางชนิดที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ถังหมักใช้พื้นที่น้อย และการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศมีผลกระทบต่อวิธีนี้น้อยกว่าวิธีอื่นๆ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะผลิตเป็นการค้า (Fan *et al.*, 2006; Kumar and Das, 2000; Ueno *et al.*, 1996) กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการนี้ ได้แก่ จุลินทรีย์ในสกุล Bacillaceae เช่น *Bacillus coagulans*, จุลินทรีย์ในสายพันธุ์ Clostridium เช่น *Clostridium butyricum*, *Clostridium thermolacticum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium paraputrificum* M-21, *Clostridium bifermentants* จุลินทรีย์ในสกุล Enterobactericeae เช่น *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* ITT-BY 08 จุลินทรีย์ในสกุล Klebsiellaceae เช่น *Klebsiella oxytoca* HP1 เป็นต้น (Nandi and Sengupta, 1998) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ส่วนใหญ่จะพบในตะกอนน้ำเสีย น้ำชะขยะ ปุ๋ยคอกมูลวัว ดิน ปุ๋ยหมัก เป็นต้น

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพในการผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการหมักแบบไม่ใช้อากาศ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากวัสดุเหลือทิ้งทางชีวภาพในประเทศไทย 3 แหล่ง ได้แก่ สลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน น้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะชุมชน และปุ๋ยคอกมูลวัว โดยใช้สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ พีเอชเริ่มต้นของสลัดจ์ ความเข้มข้นเริ่มต้นของสลัดจ์ และจำนวนเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น อัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสลัดจ์ และปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ เปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อ *Clostridium butyricum*

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. แยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากวัสดุเหลือทิ้ง 3 แหล่ง ได้แก่ สลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน น้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะชุมชน และปุ๋ยคอกมูลวัว

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไบโอไฮโดรเจนจากสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง โดยใช้เชื้อแบคทีเรียจากแหล่งที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น คือทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดที่คัดแยกได้กับเชื้อแบคทีเรีย *C. butyricum*

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การทดลองแบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน คือ

1. แยกเชื้อแบคทีเรียจากวัสดุเหลือทิ้ง 3 แหล่ง ได้แก่ สลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน น้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะชุมชน และปุ๋ยคอกมูลวัว โดยผ่านการบำบัดเบื้องต้น (pretreatment) ด้วยการอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกเชื้อและทำให้เชื้อบริสุทธิ์

2. คัดเลือกเชื้อที่แยกได้ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในอาหาร RCM และสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน จากนั้นเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

3. จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูง 3 ไอโซเลท ไปศึกษาชนิดของเชื้อด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดที่แยกได้ ด้วยวิธีการหมักแบบไม่ใช้อากาศในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้สลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนเป็นอาหารของเชื้อจุลินทรีย์

4.1 Pretreatment เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ในสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน โดยการนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ พีเอชเริ่มต้นของสลัดจ์ ความเข้มข้นเริ่มต้นของสลัดจ์ ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อแบคทีเรีย และปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้

5. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้กับเชื้อ *C. butyricum* โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง โดยวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ ความบริสุทธิ์ของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยใช้ GC-TCD และสารมัธยันต์ (intermediate) ที่ผลิตขึ้นในสลัดจ์ระหว่างการย่อยสลายสลัดจ์โดยใช้ SPME และ GC-MS

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่แยกได้จากวัสดุเหลือทิ้งซึ่งเป็นแหล่งเชื้อจุลินทรีย์ในท้องถิ่น

2 ได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอไฮโดรเจนจากสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสีย

ชุมชนโดยแบคทีเรียที่แยกได้ด้วยวิธีกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศ

3. เป็นการใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้ง และลดปริมาณของเหลือทิ้งจากกระบวนการบำบัดน้ำเสียชุมชน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของพลังงานไฮโดรเจน

พลังงานเป็นสิ่งจำเป็นในการประกอบกิจกรรมเกี่ยวกับการดำรงชีวิตของมนุษย์ การขยายตัวทางเศรษฐกิจและการเพิ่มจำนวนประชากร มีผลทำให้ความต้องการพลังงานเพิ่มขึ้น แหล่งพลังงานที่สำคัญในปัจจุบันได้จากเชื้อเพลิงฟอสซิล ได้แก่ น้ำมันปิโตรเลียม ถ่านหิน จัดเป็นพลังงานที่ไม่สามารถสร้างขึ้นใหม่ได้ (non-renewable energy) ซึ่งพลังงานเหล่านี้เป็นพลังงานที่มีอยู่จำกัดและคาดว่าจะหมดไปในอนาคตอันใกล้ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปรากฏการณ์โลกร้อน และการเกิดฝนกรด เนื่องจากเมื่อเผาไหม้เชื้อเพลิงจากฟอสซิลจะปล่อยก๊าซที่เป็นมลพิษทางอากาศ ได้แก่ ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ก๊าซไนโตรเจนออกไซด์ (NO_x) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ออกสู่บรรยากาศ (Kapdan and Kargi, 2006) ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษา แหล่งพลังงานทดแทนที่สามารถสร้างขึ้นใหม่และเป็นพลังงานที่สะอาด (clean energy) เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิลในอนาคต ตัวอย่างพลังงานทดแทน ได้แก่ พลังงานจากน้ำ พลังงานจากแสงอาทิตย์ พลังงานจากลม รวมถึงพลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งพลังงานไฮโดรเจนกำลังได้รับความสนใจอย่างมากทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนในอนาคต (ประวิช, 2548) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากของเหลือทิ้งอุตสาหกรรมและชุมชน (Lay *et al.*, 1999; Evvyernie *et al.*, 2001; Yokoi *et al.*, 2001; Yokoi *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2006) เศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (Fan *et al.*, 2006) และพืชผลทางการเกษตร (Martines-Perez *et al.*, 2007) เป็นต้น

ก๊าซไฮโดรเจนเป็นพลังงานหมุนเวียน (Renewable energy) ที่สะอาด ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น เมื่อเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนจะได้พลังงานและน้ำเท่านั้น ไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นก๊าซเรือนกระจก นอกจากนี้ยังมีค่าพลังงานสูงกว่าพลังงานจากเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ ที่มีการใช้ในปัจจุบัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ค่าพลังงานที่ได้จากการเผาไหม้เชื้อเพลิงชนิดต่างๆ (ดัดแปลงจาก http://www.techno.msu.ac.th/bt/pdfdocxls/b.doc)

ประเภทของเชื้อเพลิง	ค่าพลังงานต่อหน่วยน้ำหนัก (เมกะจูลต่อกิโลกรัม)
ก๊าซไฮโดรเจน	120
ไฮโดรเจนเหลว	120
ถ่านหินแอนทราไซด์	15-19
ถ่านหินซับบีทูมินัส	27-30
ก๊าซธรรมชาติ	33-50
เบนซิน	40-43
น้ำมันปิโตรเลียม	42-45
ดีเซล	42.8
ไบโอดีเซล	37
เอทานอล	21
ถ่านไหม้	30
วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	10-17
ไม้	15

2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน

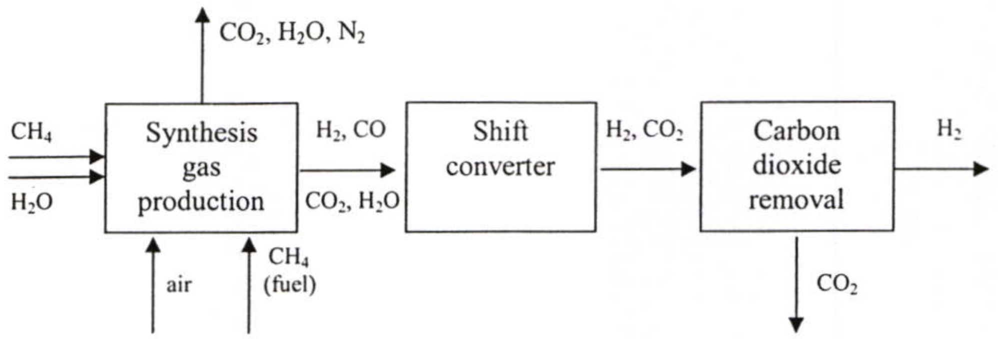
กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยทั่วไปสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธี (http://www.hydrogenassociation.org)

2.2.1 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูง (Thermo Processes)

เป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากก๊าซมีเทน (CH_4) หรืออาจใช้ไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ ซึ่งทำปฏิกิริยากับน้ำที่อยู่ในรูปไอน้ำ (H_2O) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง เรียกว่า กระบวนการ steam reforming เกิดเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และก๊าซไฮโดรเจน (H_2) (รูปที่ 2.1)

ข้อเสียของกระบวนการดังกล่าว คือ ก่อให้เกิดมลพิษ เนื่องจากมีสารตกค้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เผาไหม้ไม่สมบูรณ์ เช่น ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ซัลเฟอร์ และโพลีอะโรมาติคไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัย ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



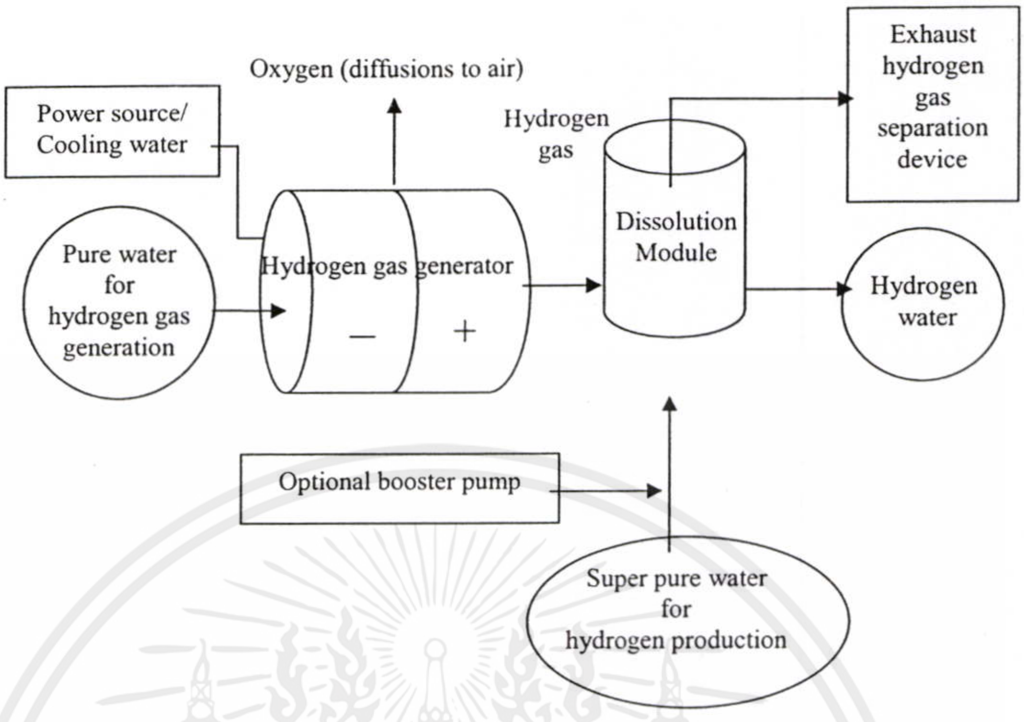
รูปที่ 2.1 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยผ่านกระบวนการ steam reforming ของก๊าซธรรมชาติ (Granovskii *et al.*, 2006)

2.2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ไฟฟ้าเคมี (Electrochemical processes)

เป็นวิธีการใช้กระแสไฟฟ้าในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ ใช้กระแสไฟฟ้าแยกโมเลกุลของน้ำโดยตรง (รูปที่ 2.2) โดยผ่านกระแสไฟฟ้าทางอิเล็กโทรดที่จุ่มในน้ำที่เพิ่มคุณสมบัติการนำไฟฟ้าโดยการเติมสารอิเล็กโตรไลต์ ได้แก่ กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียส จะได้ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ที่มีความบริสุทธิ์สูง และก๊าซออกซิเจน (O_2) โดยไฮโดรเจนอะตอมจะเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วบวก (รูปที่ 2.2) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ต้องการกระแสไฟฟ้าถึง 90 กิโลวัตต์ จึงจะผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 1,000 ลูกบาศก์ฟุต

ข้อเสียของวิธีนี้ คือ ต้องใช้กระแสไฟฟ้าจำนวนมากและมีการสูญเสียพลังงานไฟฟ้าในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำ และจะต้องใช้สภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียสเพื่อแยกโมเลกุลของน้ำให้ได้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนอะตอม ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการผลิตค่อนข้างสูง เนื่องจากต้องใช้พลังงานในการแยกก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำมากกว่าพลังงานที่จะได้จากการเผาไหม้เชื้อเพลิงไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (http://www.chlorine-eng.co.jp/.../puretron/img/p10.gif)

2.2.3 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพ (Biological Processes)

เป็นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้จุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้เป็นก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากวิธีการทางชีวภาพอาจเรียกว่าไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) การผลิตไบโอไฮโดรเจนเป็นวิธีที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากโดยสามารถแบ่งกระบวนการผลิตออกเป็น 5 วิธี (Levin *et al*., 2004) ดังนี้

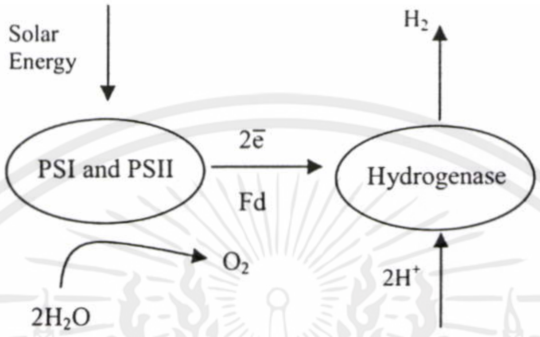
2.2.3.1 วิธี Direct biophotolysis

เป็นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้จุลสาหร่าย (microalgae) ซึ่งจุลสาหร่ายประกอบด้วยสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียที่มีการใช้พลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน และใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศเป็นแหล่งคาร์บอน จึงทำให้ช่วยลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจกในบรรยากาศ โดยจุลสาหร่ายจะสังเคราะห์เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ในขณะเดียวกันที่ระบบแสงที่ 1 (photosystem I, PSI) และระบบแสงที่ 2 (photosystem II, PSII) เมื่อมีแสงอาทิตย์ น้ำจะเกิดการแตกตัวกลายเป็นโปรตรอน อิเล็กตรอน และก๊าซออกซิเจน (ปฏิกิริยา 2.1) โดยอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านจากเฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin, Fd) (รูปที่ 2.3) (Ni *et al*., 2006) เพื่อไปใช้ในการรีดิวซ์โปรตอนไปเป็นก๊าซไฮโดรเจน ดังปฏิกิริยา 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$2\,H_2O\,(l) \xrightarrow{\text{แสงอาทิตย์}} O_2\,(g) + 4\,H^+ + 4\,e^- \qquad (2.1)$$

$$2\,H^+ + 2e^- \xrightarrow{\text{ไฮโดรจีเนส}} H_2\,(g) \qquad (2.2)$$



รูปที่ 2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธี Direct biophotolysis (Ni *et al.*, 2006)

ปริมาณก๊าซออกซิเจนที่เกิดจากการสังเคราะห์แสงจะมีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังนั้น จึงต้องรักษาปริมาณออกซิเจนให้น้อยกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ (Hallenbeck and Benemann, 2002) อย่างไรก็ตาม ก๊าซออกซิเจนยังเป็นก๊าซที่จำเป็นในกระบวนการหายใจของจุลินทรีย์จึงต้องมีก๊าซออกซิเจนในกระบวนการผลิตก๊าซด้วยวิธีนี้ ดังนั้น การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีนี้จึงมีประสิทธิภาพต่ำ

2.2.3.2 วิธี Indirect biophotolysis

เป็นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน (รูปที่ 2.4) คือ ขั้นตอนที่ 1 เพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีอากาศ ไซยาโนแบคทีเรียจะเกิดการสังเคราะห์แสงได้ออกซิเจน (ปฏิกิริยา 2.3) เซลล์เจริญเติบโตและมีเซลล์เพิ่มขึ้น หลังจากนั้น ขั้นตอนที่ 2 นำเซลล์เข้าสู่สภาวะที่ไม่มีอากาศ ขั้นตอนนี้จะเป็นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักในสภาวะไม่มีแสง จะได้ไฮโดรเจน 4 โมลต่อโมลกลูโคส และกรดอะซิติก 2 โมลต่อโมลกลูโคส (ปฏิกิริยา 2.4) และกรดอะซิติก 2 โมลต่อโมลกลูโคสสามารถเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนได้อีก 8 โมล (ปฏิกิริยา 2.5) ปฏิกิริยารวมของการเกิดก๊าซไฮโดรเจนจากกลูโคสแสดงดังปฏิกิริยา 2.6 (Ni *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ยังอยู่ในขั้นวิจัยและพัฒนาในระดับห้องปฏิบัติการ (Yokoi *et al.*, 2002; Tanisho and Ishiwata, 1995)

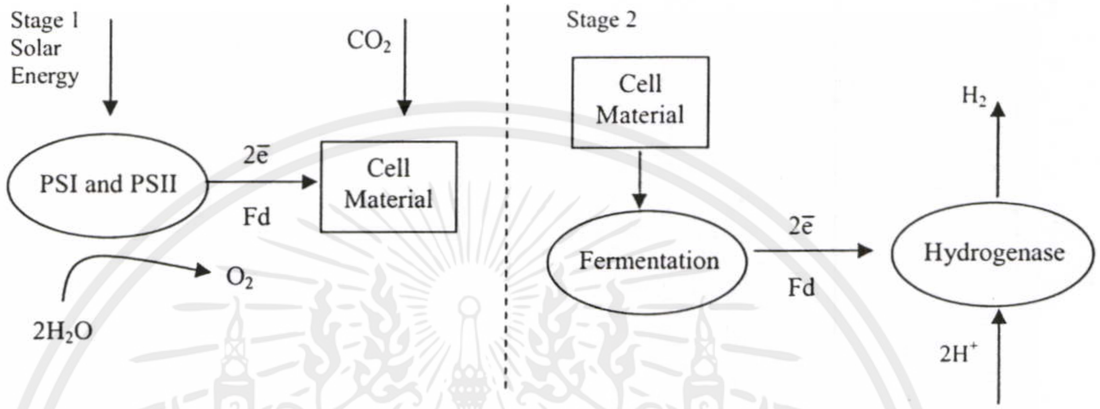
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$6\,H_2O + 6\,CO_2 \xrightarrow{\text{แสงอาทิตย์}} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \qquad (2.3)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O \longrightarrow 4\,H_2 + 2\,CH_3COOH + 2\,CO_2 \qquad (2.4)$$

$$2\,CH_3COOH + 4\,H_2O \longrightarrow 8\,H_2 + 4\,CO_2 \qquad (2.5)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,H_2O \longrightarrow 12\,H_2 + 6\,CO_2 \qquad (2.6)$$



รูปที่ 2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธี Indirect biophotolysis (Ni *et al.*, 2006)

2.2.3.3 วิธี Biological water-gas shift reaction

เป็นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ photoheterotrophic bacteria ที่สามารถเจริญได้ในที่มีแสง และใช้คาร์บอนมอนอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของคาร์บอน-มอนอกไซด์ เพื่อสร้าง ATP ควบคู่กับการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของน้ำ ไปเป็นก๊าซไฮโดรเจน ดังปฏิกิริยา 2.7 (Yokoi *et al.*, 2001)

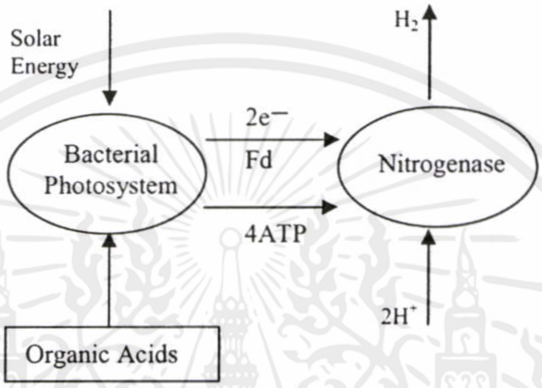
$$CO + H_2O \rightleftharpoons CO_2 + H_2 \qquad \Delta G^0 = -20.1\ \text{kJ/ mol} \qquad (2.7)$$

Photoheterotrophic bacteria ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีนี้ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Rubrivax rubrum*, *R. gelatinosus* และ *Rhodospirillum rubrum* และแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Carboxydothermus hydrogenoformans* (Soboh *et al.*, 2002) อย่างไรก็ตาม การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้ยังอยู่ในขั้นวิจัยและพัฒนาในระดับห้องปฏิบัติการ

2.2.3.4 วิธี Photo-fermentation

เป็นการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่ม photosynthetic bacteria ซึ่งมีการใช้เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ร่วมกับแสงอาทิตย์ในการย่อยสลายกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดแลคติก และกรดบิวทิริก และชีวมวลให้กลายเป็นก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะไม่ใช้อากาศ

โดยมีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนผ่านเฟอร์รีดอกซิน ไปสู่เอนไซม์ไนโตรจีเนส (รูปที่ 2.5) (Kapdan and Kargi, 2006) นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยจำนวนมากที่นำจุลินทรีย์กลุ่มนี้มาผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมและการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน (Kim *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อเสียคือ การใช้เอนไซม์ไนโตรจีเนสต้องการพลังงานสูง ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นก๊าซไฮโดรเจนต่ำ และต้องใช้พื้นที่ของถังหมักมากสำหรับการหมักในสภาวะมีแสงและไม่ใช้อากาศ



รูปที่ 2.5 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธี Photo-fermentation (Ni *et al.*, 2006)

2.2.3.5 วิธี Dark-fermentation

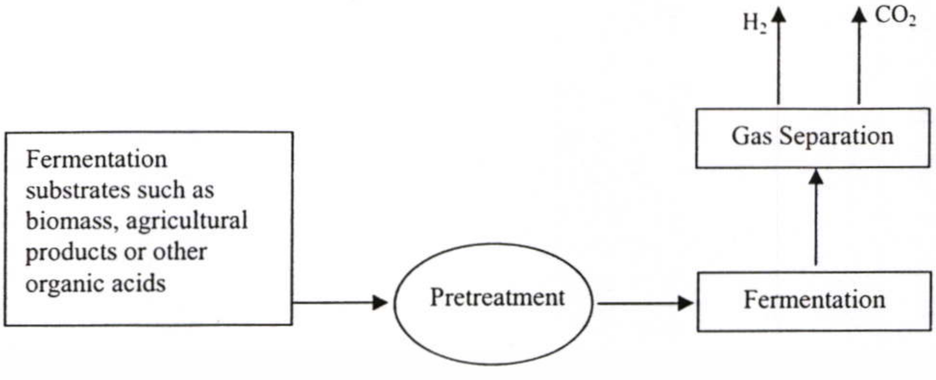
เป็นกระบวนการหมักของ anaerobic bacteria และจุลสาหร่ายบางชนิดที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะที่ไม่มีแสง ดังแสดงในปฏิกิริยา 2.8 หรือปฏิกิริยา 2.9 ผลิตภัณฑ์ของกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงจะแตกต่างจากกระบวนการหมักโดยใช้แสง คือ ได้ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (รูปที่ 2.6) ส่วนวิธีการหมักโดยใช้แสง จะได้ก๊าซไฮโดรเจนอย่างเดียว

$$C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O \longrightarrow 2\,CH_3COOH + 4\,H_2 + 2\,CO_2 \qquad (2.8)$$

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 4\,H_2 + 2\,CO_2 \qquad (2.9)$$

วิธีนี้ได้มีผู้สนใจศึกษาอย่างแพร่หลาย (Kumar and Das, 2000; Fan *et al.*, 2006; Ueno *et al.*, 1996) เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง ถังหมักใช้พื้นที่น้อย และการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศมีผลกระทบต่อวิธีนี้น้อยกว่าวิธีอื่นๆ ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะผลิตในเชิงการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธี Dark fermentation (Ni *et al.*, 2006)

ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ Dark-fermentation สามารถคำนวณโดยใช้สมการ Modified Gompertz ดังปฏิกิริยา 2.10 (Lay *et al.*, 1997; Lay and Noike, 1999; Lay, 2001; Van Ginkel *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002) ซึ่งค่าคงที่จลนพลศาสตร์ (H_{max}, R_{max} และ λ) หาได้จากการนำข้อมูลมา plot กราฟ ดังรูปที่ 2.7

สมการ Modified Gompertz

$$H = H_{\max} \exp\left\{-\exp\left(\frac{R_{\max} \cdot e}{H_{\max}}(\lambda - t) + 1\right)\right\} \qquad (2.10)$$

เมื่อ H = ปริมาตรสะสมของก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น (มิลลิลิตร)

$H_{\max}$ = ปริมาตรของไฮโดรเจนที่ถูกผลิตได้สูงสุด (มิลลิลิตร)

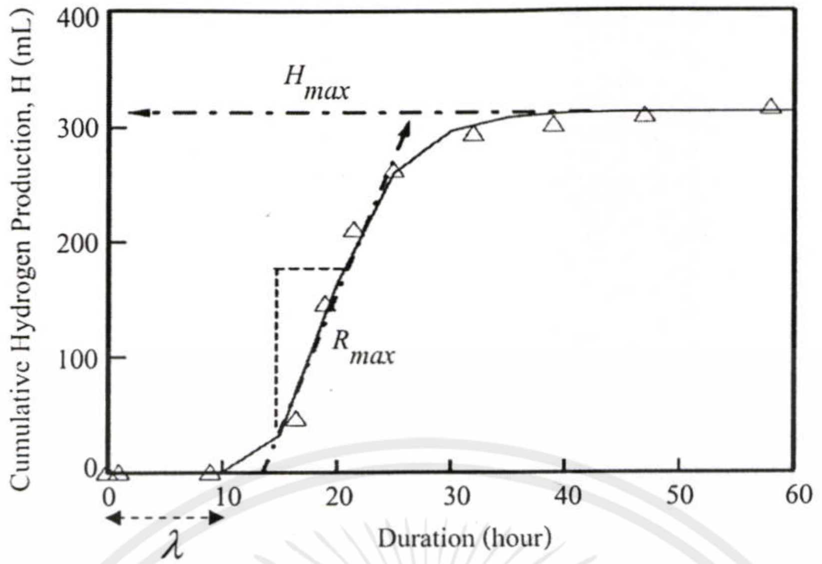
$R_{\max}$ = อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)

λ = เวลาของระยะการปรับตัว (lag phase time) (ชั่วโมง)

t = เวลาที่ใช่บ่ม (ชั่วโมง)

e = 2.71828

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 กราฟการสะสมของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สมการ Modified Gompertz (Khanal *et al*., 2004)

2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถแบ่งเป็นกลุ่มตามแหล่งพลังงานเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้สารเคมีเป็นแหล่งพลังงานเรียกว่าจุลินทรีย์กลุ่มเคโมโทรฟ (chemotroph) และกลุ่มที่ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน เรียกว่า จุลินทรีย์กลุ่มโฟโตโทรฟ (phototroph)

2.3.1 จุลินทรีย์กลุ่มเคโมโทรฟ

เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องใช้อินทรียสารและอนินทรียสารเป็นแหล่งพลังงาน สามารถแบ่งตามความต้องการออกซิเจนออกเป็น 2 กลุ่มคือ

2.3.1.1 แบคทีเรียกลุ่มไม่ต้องการออกซิเจน (Anaerobic bacteria)

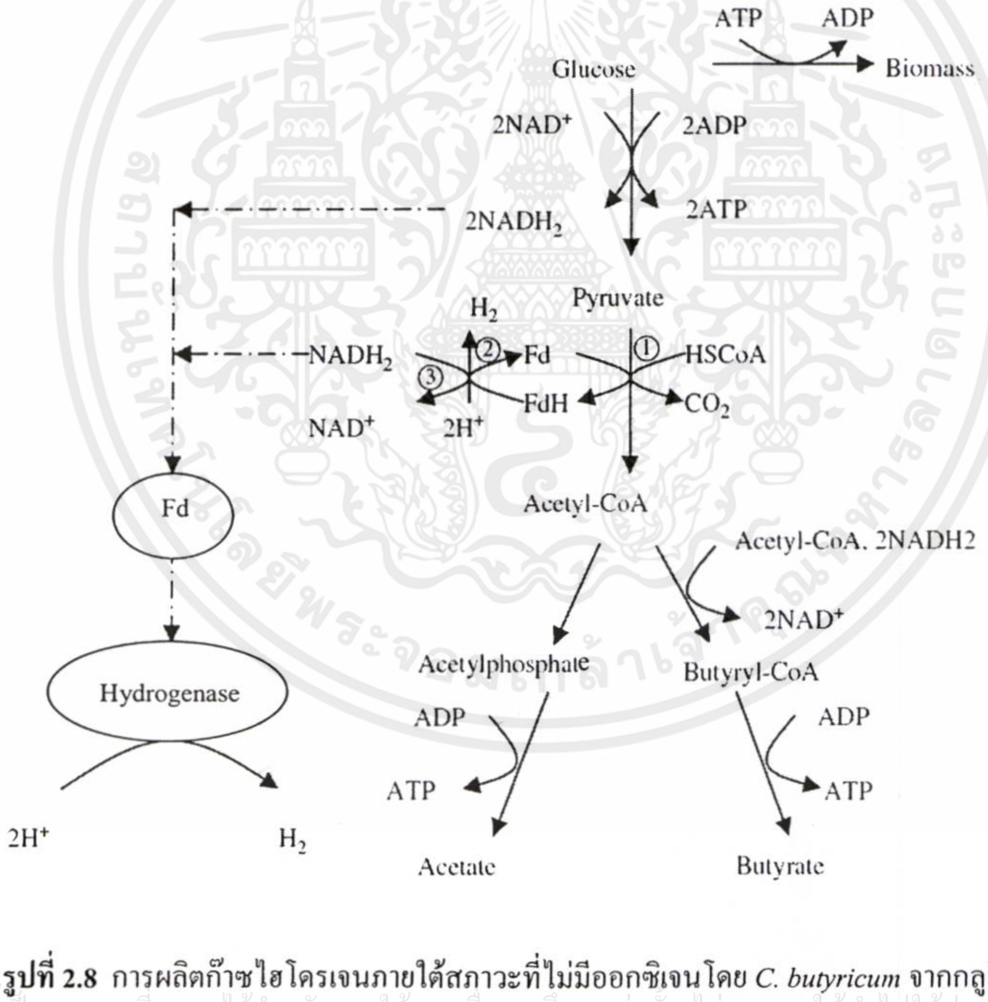
สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยวิธี Dark fermentation ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็น

1) แบคทีเรียกลุ่ม Obligate anaerobic bacteria

เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีเฉพาะในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียในกลุ่มนี้ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Clostridium* sp., *Desulfovibrio* sp., *Methanobacterium* sp., *Methanosarcina* sp., *Methanococcus* sp. เป็นต้น (Nandi and Sengupta, 1998) เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม obligate anaerobe ที่ประสิทธิภาพสูงในการผลิตไฮโดรเจน คือ แบคทีเรียจีนัส *Clostridium* sp. (Fang *et al*., 2002) เมื่อคำนวณจากปริมาณสารสัมพันธ์ (stoichiometry) พบว่าเชื้อ *Clostridium* sp. สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด คือ 4 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส (Valdez-Vazquez *et al*., 2005) (ปฏิกิริยา 2.8) ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียจีนัสอื่น เช่น *Klebsiella* sp. และ *Enterobacter* sp.

สามารถผลิตไฮโดรเจนได้น้อยกว่า *Clostridium* sp. (Nandi and Sengupta, 1998) และสปีชีส์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน คือ *Clostridium butyricum* (Yokoi *et al.*, 1998) นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัยที่พบว่า *Clostridium acetobutyricum* สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงเช่นกัน (Yokoi *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตาม เชื้อ *Clostridium* sp. มีข้อเสีย คือ เป็นเชื้อที่เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน แต่สภาวะดังกล่าวทำได้ยาก

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนจะผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านปฏิกิริยาชีวเคมีแบบ *Clostridium* system (รูปที่ 2.8) โดยก๊าซไฮโดรเจนจะถูกผลิตผ่านทางเอนไซม์ไฮโดรเจิเนส ดังปฏิกิริยา 2.11 ซึ่งเกิดจากคาร์โบไฮเดรตที่ถูกหมักจะกลายเป็นอะซิเตต, บิวไทเรต และก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักนี้เมื่อมี $NADH_2$ และ ATP เกิดขึ้นจากกระบวนการทางชีวภาพ จะมีอะซิเตตและบิวไทเรตเป็นผลิตภัณฑ์หลัก



รูปที่ 2.8 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดย *C. butyricum* จากกลูโคส โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง คือ ① Pyruvate : ferredoxin oxidoreductase (PFOR), ② Hydrogenase, ③ NADH : ferredoxin oxidoreductase (Chen *et al.*, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$2\,H^{+} + 2\,Fd\,(red) \longrightarrow 2\,Fd\,(ox) + 2\,H_2 \qquad (2.11)$$

2) แบคทีเรียกลุ่ม Facultative anaerobic bacteria

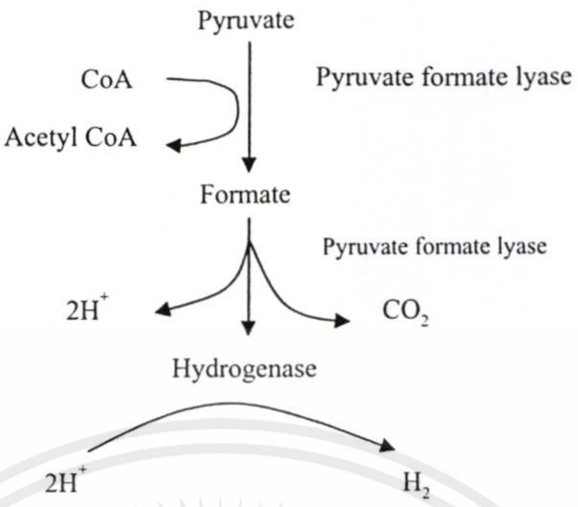
เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียในกลุ่มนี้ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Bacillus* sp. เป็นต้น (Nandi and Sengupta, 1998; Kumar and Das, 2000; Chittibabu *et al.*, 2006; Kotay and Das, 2007) แบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 2.86 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส และยังสามารถตรึงไนโตรเจนได้ด้วย (Chen *et al.*, 2006)

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobe นี้ จะผลิตผ่านปฏิกิริยาชีวเคมีแบบ *Escherichia coli* system ดังรูปที่ 2.9 ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงไพรูเวท (pyruvate) ไปเป็นอะซีทิลโคเอ (acetyl CoA) และฟอร์เมท (formate) ดังปฏิกิริยา (2.12) จากนั้นฟอร์เมทจะถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และโปรตอน โดยเอนไซม์ไพรูเวทฟอร์เมทไลเอส (Pyruvate formatelyase, PFL) ซึ่งโปรตอนจะถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังปฏิกิริยา (2.13) นอกจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะไม่มีออกซิเจนอย่างเดียวแล้ว ยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนได้ ดังกลไกในรูปที่ 2.10 โดยกลูโคสที่เกิดการย่อยสลายแล้วสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 3 เมตาบอลิซึม ได้แก่ 1) กลูโคสที่ถูกย่อยสลายจะได้ไพรูเวท ซึ่งจะถูกเปลี่ยนอะซิทิลโคเอด้วยเอนไซม์ไพรูเวทฟอร์เมทไลเอส ซึ่งจะได้ฟอร์เมทเป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยมีเอนไซม์ฟอร์เมทไฮโดรเจนไลเอส (Formate hydrogenlyase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 2) อิเล็กตรอนที่ได้จากการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นอะซิทิลโคเอ จะถ่ายทอดผ่านเฟอร์รีดอกซิน และถูกส่งต่อไปเพื่อรีดิวซ์โปรตอนกลายเป็นก๊าซไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังปฏิกิริยา 2.12 และ 2.13

$$CH_3COCOOH + H\,CoA \longrightarrow CH_3COCoA + HCOOH \qquad (2.12)$$

$$HCOOH \longrightarrow H_2 + CO_2 \qquad (2.13)$$

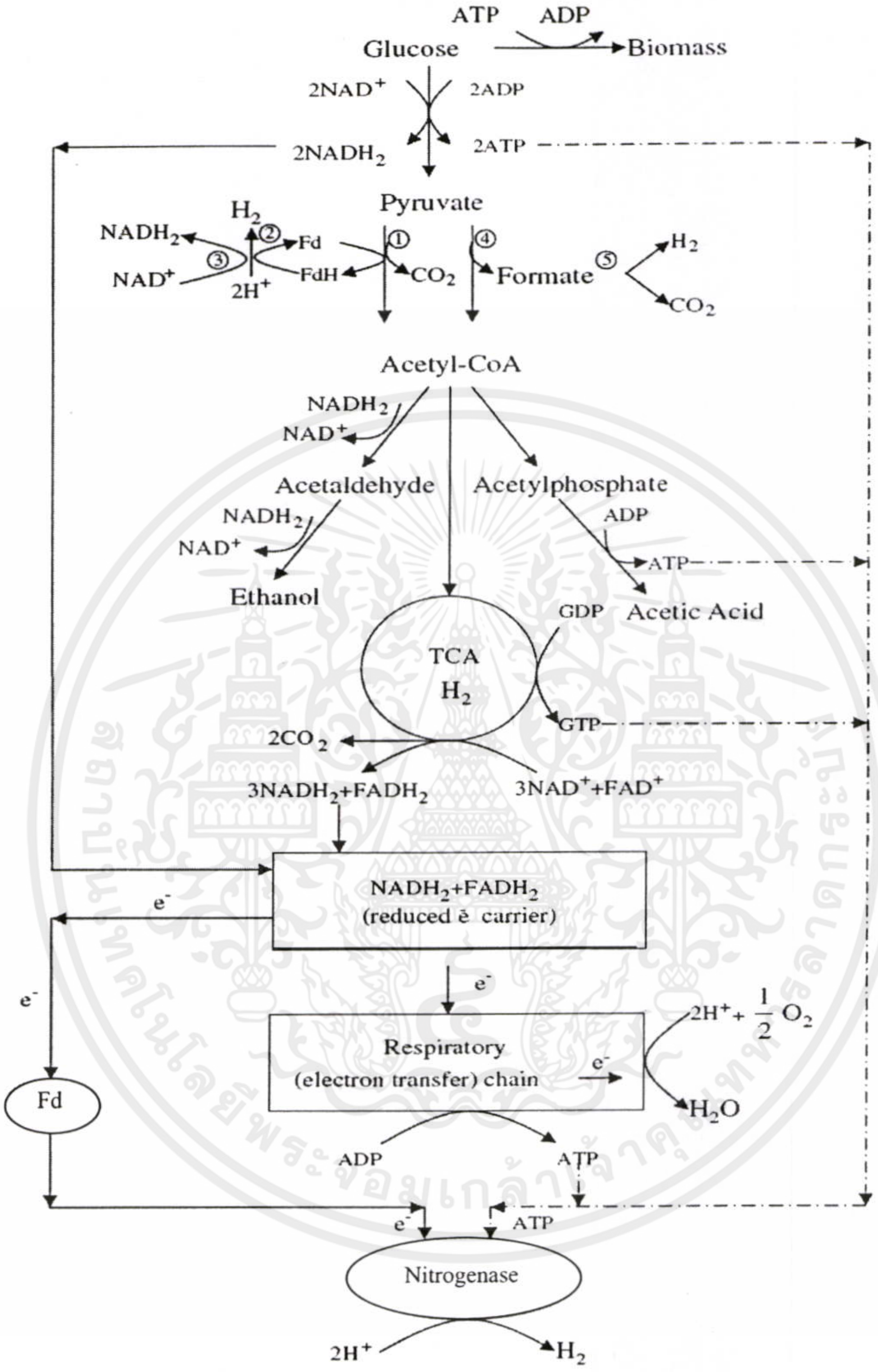
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 การผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนโดย *Escherichia coli* system (ดัดแปลงจาก Kosaric and Lyng, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2.10 วิถีเมตาบอลิซึมของกลูโคสของ *Klebsiella pneumoniae* ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนโดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ ① Pyruvate dehydrogenase (PDH), ② Hydrogenase, ③ NADH : ferredoxin oxidoreductase, ④ Pyruvate formatelyase (PFL), ⑤ Formate hydrogenlyase (Chen *et al.*, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

81361

2.3.1.2 แบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการออกซิเจน (Aerobic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนบางชนิดมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจน ได้แก่ *Azomonas* sp., *Azotobacter* sp., *Methylomonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp. และ *Xanthobacter* sp. เป็นต้น (Kondratieva and Gogotov, 1983; Zajic *et al*., 1978) มีรายงานว่าเอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นตัวคะตะไลส์ในปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกยับยั้งด้วยออกซิเจน ซึ่งออกซิเจนเกิดขึ้นในปฏิกิริยาที่เกิดควบคู่กับการตรึงไนโตรเจน โดยพบว่าในเชื้อ *Azotobacter* sp. ซึ่งมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่เมมเบรน (membrane bound hydrogenase) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวคะตะไลส์ในการนำออกซิเจนที่ผลิตได้โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสกลับเข้าสู่กระบวนการหายใจ (respiratory chain) เพื่อช่วยป้องกันการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

ใน *Rhizobium* sp. มีเอนไซม์ไนโตรจีเนสทำหน้าที่เป็นตัวคะตะไลส์ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนซึ่งจะให้ผลพลอยได้เป็นก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้ไม่มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่เมมเบรนที่ช่วยป้องกันการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากออกซิเจน แต่ในปมรากพืชตระกูลถั่วซึ่งเป็นที่อยู่ของ *Rhizobium* sp. ยังมีโมเลกุลของเลกเฮโมโกลบิน (leghaemoglobin) เป็นตัวนำออกซิเจนกลับเข้าสู่กระบวนการหายใจแทนเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่เมมเบรนที่พบใน *Azotobacter* sp.

ตารางที่ 2.2 แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน แหล่งกำเนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกลุ่มเคโมโทรฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ในกลุ่มเคโมโทรฟที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน แหล่งกำเนิด และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

แหล่งกำเนิด	ชนิดจุลินทรีย์	สารตั้งต้น	อุณหภูมิ (° ซ.)	พีเอชเริ่มต้น	ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด	ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้	เอกสารอ้างอิง
ดินทางการเกษตร	เชื้อผสม	กลูโคส	30	5.5	-	2.7 ml-H_2/min	2.8 mol-H_2/mol- glucose	Van Ginkel and Logan (2005)
ธัญพืช	เชื้อผสม *C. pasteurianum* (dominant)	ซูโครส	35	7.4-7.6	-	236.5 ml-H_2/L.h	2.73 mol-H_2/mol-sucrose	Zhang *et al.* (2005)
ปุ๋ยหมัก	เชื้อผสม	ซูโครส	37±1	5.5-6.0	214.0 ml-H_2/g-COD	-	-	Khanal *et al.* (2004)
		แป้ง	37±1	5.5-6.0	125.0 ml-H_2/g-COD	-	-	
ปุ๋ยคอมมูลวัว	เชื้อผสม *Clostridium* sp. (dominant)	ซูโครส 4.0 ± 0.5 g/l	36±1	5.4±0.2	90 ml-H_2/g-sucrose	5.5 ml-H_2/h	-	Fan *et al.* (2004)
น้ำพุร้อน	*Klebsiella oxytoca* HP1	กลูโคส	37	7	9.6 mmol-H_2/g-dw.h	87.5 ml-H_2/ L.h	1 mol-H_2/mol-glucose	Minnan *et al.* (2005)
		ซูโครส	37	7	15.2 mmol-H_2/g-dw.h	350.0 ml-H_2/ L.h	3.6 mol-H_2/mol-sucrose	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ในกลุ่มเคโมโทรฟที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน แหล่งกำเนิด และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (ต่อ)

แหล่งกำเนิด	ชนิดจุลินทรีย์	สารตั้งต้น	อุณหภูมิ (° ซ.)	พีเอช เริ่มต้น	ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด	ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้	เอกสารอ้างอิง
เชื้อบริสุทธิ์	*Escherichia* coli BL-21	กลูโคส	37±1	6.0	66 mmol-H_2/ L.h	-	3.12 mol-H_2/mol- glucose	Chittibabu *et al.* (2006)
	C. butyricum + *Enterobacter. aerogenes* HO-39	ของเสียจากโรงงานแป้ง	37	5.25	-	171 ml-H_2/ L.h	2.7 mol-H_2/mol- glucose	Yokoi *et al.* (2002)
	Rhodobacter sp. + *C. butyricum* + *E. aerogenes* HO-39		35	7.5	-	112 ml-H_2/ L.h	4.5 mol-H_2/mol-glucose	
	C. paraputrificum M-21	เซลลูไบโอส	45	6.0	80 mmol-H_2/ L medium	-	1.4 mol-H_2/mol-glucose	Evvyernie *et al.* (2001)
	C. butyricum + *E. aerogenes*	มันเทศและแป้งที่เหลือทิ้ง	37	5.25	-	-	2.4 mol-H_2/mol-glucose	Yokoi *et al.* (2001)
	C. butyricum + *E. aerogenes*+ *Rhodobacter* sp.		37	7.5	-	-	4.6 mol-H_2/mol-glucose	
	E. cloacae IIT-BT 08	กลูโคส	36	6.0	75.60 mmol-H_2/ L.h	447 ml-H_2/ L.h	2.2 mol-H_2/mol-glucose	Kumar *et al.* (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ในกลุ่มเคโมโทรฟที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน แหล่งกำเนิด และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (ต่อ)

แหล่งกำเนิด	ชนิดจุลินทรีย์	สารตั้งต้น	อุณหภูมิ (^{o} ซ.)	พีเอช เริ่มต้น	ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด	ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้	เอกสารอ้างอิง
เชื้อบริสุทธิ์	*E. cloacae* IIT-BT 08	ซูโครส	36	6.0	-	660 ml-H_2/ L.h	6 mol-H_2/mol-sucrose	Kumar *et al.* (2000)
		เซลลูไบโอส	36	6.0	-	650 ml-H_2/ L.h	5.4 mol-H_2/mol-cellobiose	
	C. butyricum + *E. aerogenes*	กลูโคส	36	5.2	-	1.3 L-H_2/ L.h	2.6 mol-H_2/mol-glucose	Yokoi *et al.* (1998)
	E. aerogenes strain E.82005	กากน้ำตาล	36	6.0	13 mmol-H_2/ L.h	-	3.5 mol-H_2/mol-sugar	Tanisho and Ishiwata (1995)
สลัดจ์จากถังย่อยไร้อากาศ	*Bacillus coagulans* IIT-BT S1	กลูโคส	37	6.5	-	-	2.28 mol-H_2/mol-sugar	Kotay and Das (2007)
	C. butyricum CGS5	ซูโครส	37	5.5	214 ml-H_2/g-cell.h.	163 ml-H_2/ L.h	2.78 mol-H_2/mol-sucrose	Chen *et al.* (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ในกลุ่มเคโมโทรฟที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน แหล่งกำเนิด และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (ต่อ)

แหล่งกำเนิด	ชนิดจุลินทรีย์	สารตั้งต้น	อุณหภูมิ (°ซ.)	พีเอช เริ่มต้น	ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด	ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้	เอกสารอ้างอิง
สลัดจ์จากถังย่อยไร้อากาศ	เชื้อผสม	สารอินทรีย์จากขยะชุมชน	37	5.5	165 Nml-H_2/g VS	-	-	Valdez-Vazquez *et al.* (2005)
			55	6.4	360 Nml-H_2/g VS	-	-	
	เชื้อผสม	เศษอาหาร	35	6	121.6 ml-H_2/ g-carbohydrate-COD	-	-	Kim *et al.* (2004)
		สลัดจ์	35	6	32.6 ml-H_2/ g-carbohydrate-COD	-	-	
		เศษอาหาร+ สลัดจ์ (87:13)	35	6	122.9 ml-H_2/ g-carbohydrate-COD	111.2 ml-H_2/g-VSS.h	-	
สลัดจ์จากบ่อไม่เติมอากาศของระบบบำบัดน้ำเสียน้ำมันปาล์ม	เชื้อผสม	กลูโคส	50	without pH control (pH ≈ 4)	-	0.137 L- H_2/ L.h	2.1 mol-H_2/mol-glucose	Morimoto *et al.* (2004)
ปลวก	*Clostridium* sp. strain no. 2	เซลลูไบโอส	36	6.8	-	17.9 mmol-H_2/.h	17.1 mol-H_2/g- substrate	Taguchi *et al.* (1996)
		กลูโคส	36	6.8	-	16.3 mmol-H_2/.h	16.2 mol-H_2/g-substrate	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ในกลุ่มเคโมโทรฟที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน แหล่งกำเนิด และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (ต่อ)

แหล่งกำเนิด	ชนิดจุลินทรีย์	สารตั้งต้น	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ ซ.)	พีเอช เริ่มต้น	ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด	ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้	เอกสารอ้างอิง
สลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง	เชื้อผสม	ซูโครส	37	7.5	-	745±37 ml-H_2/ L.h	2.46±0.13 mol-H_2/mol-sucrose	Wang *et al.* (2006)
		เปลือกสับปะรด	37	7.5	-	383±16 ml-H_2/ L.h	5.92±0.32 mol-H_2/g-COD	
	เชื้อผสม *C. pasteurianum* (dominant)	ซูโครส	35	6.55	-	-	3.43 mol-H_2/mol-sucrose	Lin and Lay (2005)
	เชื้อผสม *C. pasteurianum* (dominant)	ซูโครส	35±1	6.8±0.2	-	270 ml-H_2/ L.d	4.8 mol-H_2/mol-sucrose	Lin and Lay (2004)
สลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง	เชื้อผสม	สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสีย	35	6.4	-	-	0.9 mmol-H_2/g-dried solids	Wang *et al.* (2003)
			35	6.4	-	-	2.1 mmol-H_2/g-COD	

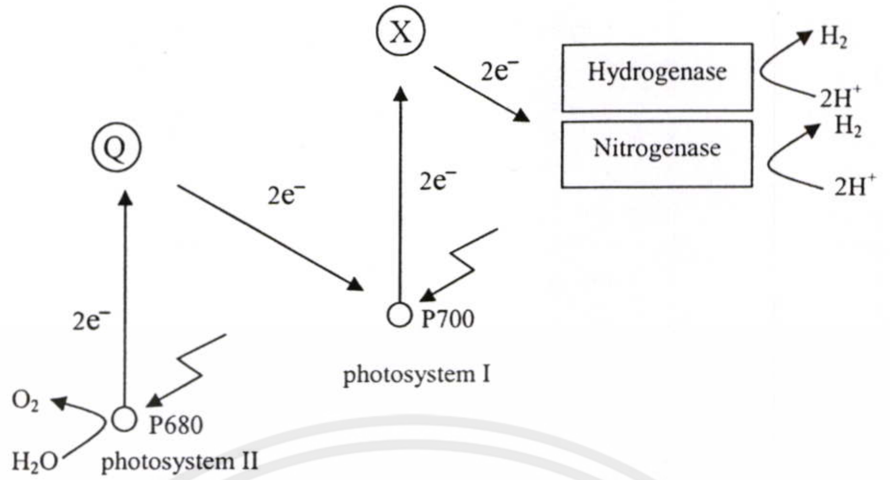
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

2.3.2 จุลินทรีย์กลุ่มโฟโตโทรฟ

เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงาน จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนในกลุ่มโฟโตโทรฟ ได้แก่ สาหร่าย ไซยาโนแบคทีเรีย (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) และแบคทีเรียสังเคราะห์แสง มีหลักการทำงาน คือ สาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียจะผลิตก๊าซไฮโดรเจน (รูปที่ 2.11) โดยอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านระบบแสง 2 ระบบ คือ ระบบแสงที่ 1 ที่ดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร (P700) และระบบแสงที่ 2 ที่ดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร (P680) ไปยังตัวพาอิเล็กตรอน (electron carrier, x) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบที่เมมเบรน (membrane bound iron sulfur protein) โดยตัวพาอิเล็กตรอนจะถ่ายอิเล็กตรอนให้กับเฟอร์รีดอกซิน จากนั้นเฟอร์รีดอกซินจะถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์เฟอร์รีดอกซินออกซิโด-รีดักเทส (ferredoxin oxidoreductase) ในกระบวนการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส (nitrate reductase) สำหรับปฏิกิริยาไนเตรทรีดักชันและไทโอซัลโฟเนทรีดักเทส (thiosulfonate reductase) และซัลเฟทรีดักชัน ส่วนก๊าซไฮโดรเจนจะถูกผลิตผ่านทางเอนไซม์เฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส โดยอิเล็กตรอนที่ถูกใช้ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นได้มาจากกระบวนการแตกตัวของโมเลกุลน้ำในระบบแสงที่ 2 และการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่สะสมภายในเซลล์ โดยอิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงที่ 1 ซึ่งสาหร่ายสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยมีเฟอร์รีดอกซินเป็นตัวพาอิเล็กตรอนไปสู่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่จะผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) ผ่านทางเอนไซม์ไนโตรจีเนส

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยคือ 1) Non-sulfur purple ได้แก่ *Athiorhodaceae* sp. และ *Rhodospirillaceae* sp. 2) Sulfur purple bacteria ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceae* sp. และ (3 Green sulfur bacteria ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp. โดยกระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียเหล่านี้มีรงควัตถุที่ต่างไปจากไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่าย และพืชสีเขียว คือ มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์) bacteriochlorophyll) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) กระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ และสามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์) sulfide), ซัลเฟอร์ (sulfur), ไทโอซัลเฟต) thiosulfate), สารประกอบอินทรีย์ (organic compounds) หรือโมเลกุลไฮโดรเจนเป็นสารให้อิเล็กตรอนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 วิถีการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย (http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php)

หมายเหตุ : X = electron carrier

Q = substance of unknown nature although not a cytochrome

2.4 แหล่งที่มาของจุลินทรีย์

ในวิทยานิพนธ์นี้ ได้สนใจศึกษาแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน 3 แหล่ง ได้แก่ สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน น้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะมูลฝอยชุมชน และปุ๋ยคอกมูลวัว

2.4.1 สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน

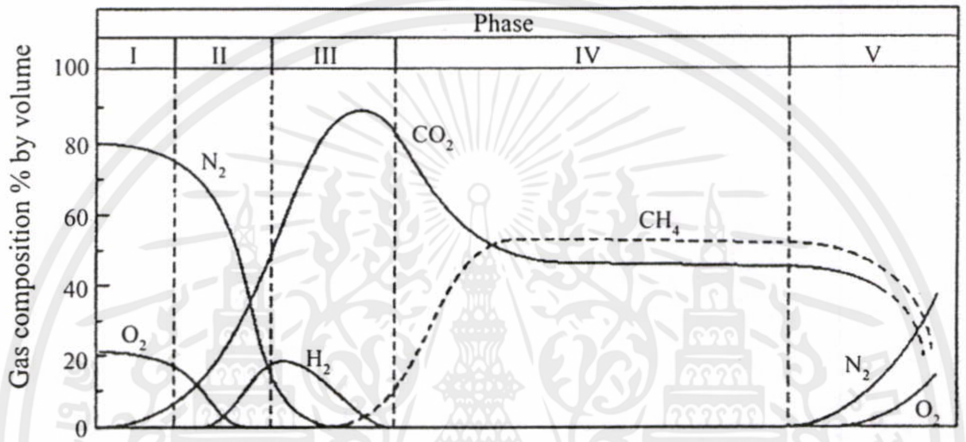
สลัดจ์เป็นตะกอนที่ได้จากกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (activated sludge) ในการบำบัดขั้นตอนนี้สารอินทรีย์จะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์กลายเป็นก๊าซต่างๆ ได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจน ดังนั้น สลัดจ์จึงเป็นที่สะสมของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมเป็นแหล่งจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ Wang *et al.* (2003) นำสลัดจ์ไปผ่านการบำบัดเบื้องต้นด้วยวิธีการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และทำการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้เชื้อ *Clostridium bifermentant* ซึ่ง Kim *et al.* (2004); Chen *et al.* (2005); Lin and Lay (2005) และ Mu *et al.* (2006) ได้นำสลัดจ์มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที, 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งการบำบัดเบื้องต้นด้วยวิธีการให้ความร้อนนี้เป็นการคัดเลือกเชื้อที่สร้างสปอร์และเป็นการกำจัดเชื้อกลุ่มเมทาโนเจนออกจากสลัดจ์ ส่วน Wang *et al.* (2006) นำสลัดจ์มาบำบัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

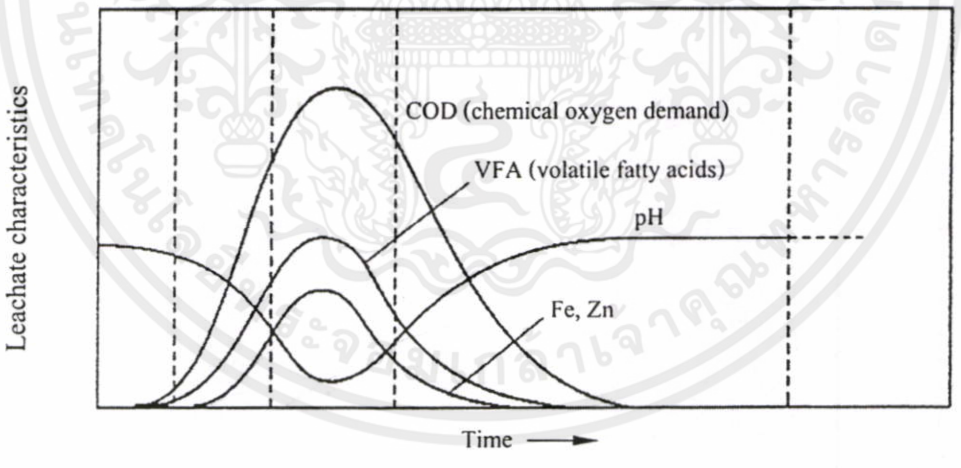
เบื้องต้นด้วยวิธีปรับให้อยู่ในสภาวะกรดและเบส (พีเอช 3 และ 10) ซึ่งวิธีบำบัดนี้เป็นการกำจัดเชื้อกลุ่มเมทาโนเจนเช่นกัน และนำมาเลี้ยงในถังหมักแบบต่อเนื่องที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.4.2 น้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะมูลฝอยชุมชน

น้ำชะขยะเกิดจากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ต่างๆ ในหลุมฝังกลบ ซึ่งกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในหลุมฝังกลบแบ่งออกเป็น 5 ระยะ (รูปที่ 2.12)



(ก)



(ข)

รูปที่ 2.12 การผลิตก๊าซและน้ำชะขยะที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในหลุมฝังกลบ โดย (ก) คือ องค์ประกอบก๊าซ (ข) คือ คุณลักษณะของน้ำชะขยะ (Tchobanoglous and O Leary, 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในระยะที่ 1 ในหลุมฝังกลบยังมีอากาศอยู่เนื่องจากขยะเก็บกักอากาศไว้ จุลินทรีย์ในระยะนี้เป็นพวกใช้อากาศทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ให้มีขนาดเล็กลงและเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนได-ออกไซด์ และน้ำ ดังปฏิกิริยา 2.14 เรียกระยะนี้ว่า adjustment phase

$$\text{ของเสียอินทรีย์} \xrightarrow{\text{ย่อยสลาย}} CO_2\,(g) + H_2O \qquad (2.14)$$

ส่วนในระยะที่ 2 อากาศในหลุมฝังกลบเริ่มหมดลง เริ่มมีกลุ่มจุลินทรีย์ย่อยสลายแบบไม่ใช้อากาศเพิ่มมากขึ้น ในระยะนี้จะใช้ไนเตรทและซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ทำให้เกิดก๊าซไนโตรเจน น้ำ ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และออกซิเจน ดังปฏิกิริยา 2.15-2.16 เรียกระยะนี้ว่า transition phase

$$2\,NO_3^- + 6\,H_2\,(g) \longrightarrow N_2\,(g) + 6\,H_2O \qquad (2.15)$$

$$SO_4^{2-} + H_2\,(g) \longrightarrow H_2S\,(g) + 2\,O_2\,(g) \qquad (2.16)$$

ระยะที่ 3 เป็นระยะที่ย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไม่ใช้อากาศ มีการเกิดกรดอินทรีย์และก๊าซไฮโดรเจน ในระยะนี้เรียกว่า acid phase สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ ไฮโดรไลซีส (hydrolysis) อะซิโดเจเนซีส (acidogenesis) และอะซิโตเจเนซีส (acetogenesis) โดยขั้นตอนไฮโดรไลซีสเป็นการย่อยสลายโมเลกุลใหญ่ให้ได้โมเลกุลเล็กลง ดังปฏิกิริยา 2.17-2.19 ส่วนอะซิโด-เจเนซีสจะทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ได้หลังจากกระบวนการไฮโดรไลซีส จะได้กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดไขมัน คีโตนและแอลกอฮอล์ ดังปฏิกิริยา 2.20 จากนั้น สารที่ได้ในขั้นนี้ ยกเว้นกรดฟอร์มิกและกรดอะซิติก จะถูกย่อยโดยแบคทีเรียอะซิโตเจนิก (acetogenic bacteria) กลายเป็นกรดอะซิติก ดังปฏิกิริยา 2.21 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในระยะนี้คือ facultative และ obligate anaerobic bacteria เรียกว่า non-methanogenic bacteria น้ำชะขยะในระยะนี้จะมีพีเอช ≤ 5 มีค่า BOD และ COD สูง

$$\text{ไขมัน} \longrightarrow \text{กรดไขมันสายยาว} \qquad (2.17)$$

$$\text{โปรตีน} \longrightarrow \text{เปปไทด์สายสั้น + กรดอะมิโน} \qquad (2.18)$$

$$\text{โพลีแซคคาไรด์} \longrightarrow \text{โมโนแซคคาไรด์ + ไดแซคคาไรด์} \qquad (2.19)$$

$$(C_6H_{12}O_6)_n + H_2O \longrightarrow H(CH_2)_nCOOH + 8\,H_2\,(g) + CO_2\,(g) \qquad (2.20)$$

$$H(CH_2)_nCOOH \longrightarrow CH_3COOH + H_2\,(g) + CO_2\,(g) \qquad (2.21)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในระยะที่ 4 กรดอะซิติก และก๊าซไฮโดรเจนถูก methanogenic bacteria ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซมีเทน ทำให้เกิดก๊าซมีเทนขึ้นดังปฏิกิริยา 2.22 และ 2.23 ในขณะเดียวกันกรดอินทรีย์เริ่มลดลง ทำให้ค่าพีเอชเริ่มเพิ่มขึ้นเป็น 6.8-8 ระยะนี้เรียกว่า methane fermentation phase และในระยะสุดท้ายเรียกว่า maturation phase เป็นระยะที่สารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเริ่มหมดไป เหลือเฉพาะส่วนที่ย่อยสลายยาก ได้แก่ กรดฮิวมิวมิกและกรดฟิววิก จากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในหลุมฝังกลบ พบว่าในระยะที่ 3 จุลินทรีย์ในหลุมฝังกลบสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน จึงมีนักวิจัยมากมายใช้จุลินทรีย์จากหลุมฝังกลบในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Shin *et al.*, 2007)

$$CH_3COOH \longrightarrow CH_4\,(g) + CO_2\,(g) \quad (2.22)$$

$$4\,H_2\,(g) + CO_2\,(g) \longrightarrow CH_4\,(g) + 2\,H_2O \quad (2.23)$$

2.4.3 ปุ๋ยคอกมูลวัว

ปุ๋ยคอกมูลวัวเป็นเศษจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ในมูลสัตว์ พวกสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น วัว ควาย แกะ ซึ่งสัตว์เหล่านี้กินหญ้า ซึ่งมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก โดยสัตว์เหล่านี้มีอวัยวะที่เรียกว่า rumen ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส โดยการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่ม rumen bacteria ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียจะทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ให้มีโมเลกุลเล็กลง เป็นพวกกรดอินทรีย์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน งานวิจัยที่ใช้ปุ๋ยคอกมูลวัวมาเป็นแหล่งเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ Fan *et al.* (2004) และ Fan *et al.* (2006) และเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในปุ๋ยคอกคือ กลุ่ม *Clostridium* sp. ซึ่งเป็นกลุ่มที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงกว่าเชื้อกลุ่มอื่นๆ

2.5 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะที่ไม่ใช้อากาศ (มั่นสิน, 2542)

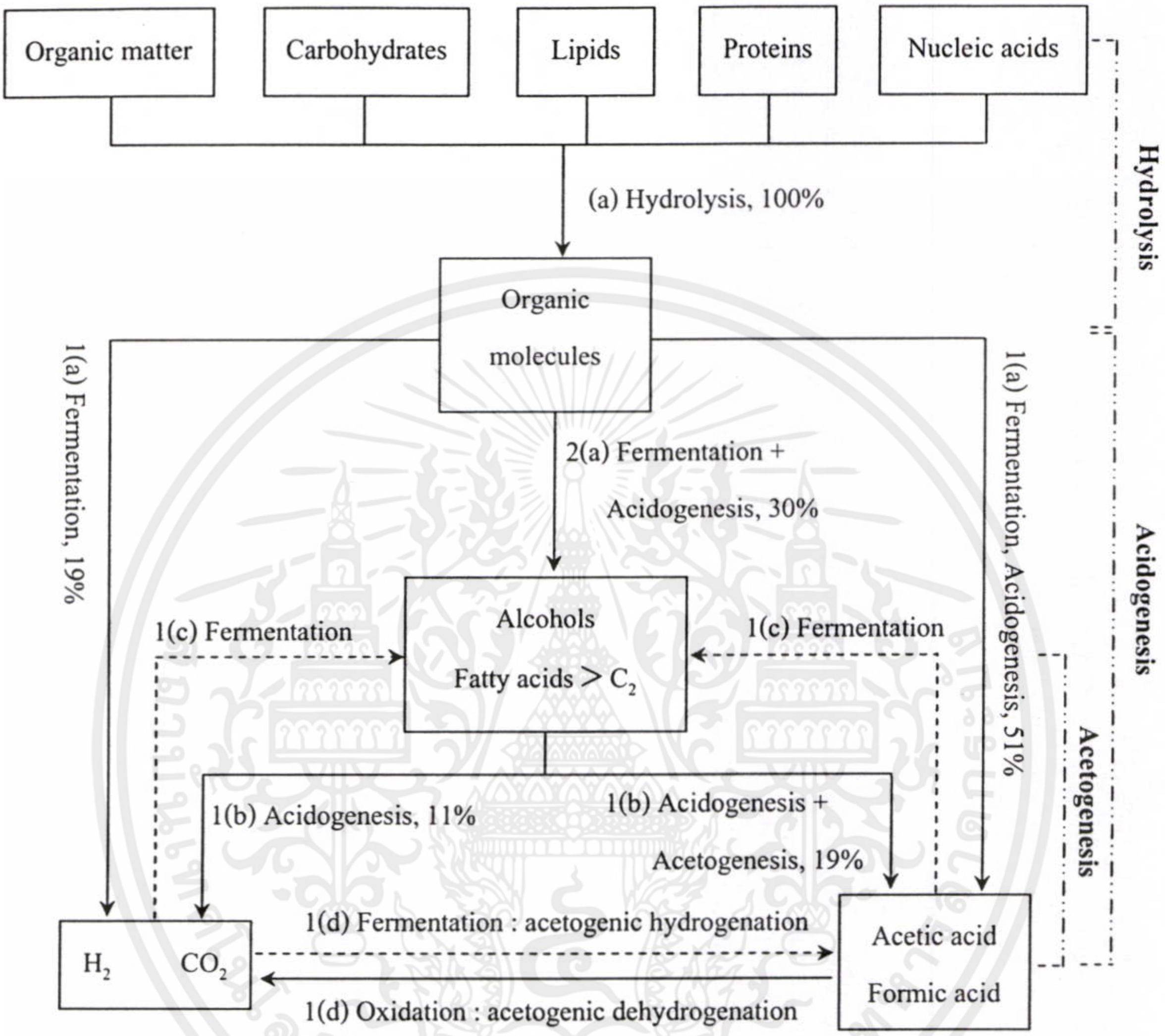
ก๊าซไฮโดรเจนเกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ Fermentative bacteria, H_2 - producing acetogenic bacteria และแบคทีเรียกลุ่ม H_2-consuming acetogenic bacteria (homoacetogenic bacteria) แสดงกระบวนการในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ประกอบด้วย ไฮโดรไลซีส, การหมัก, อะซิโดเจเนซีส และอะซิโตเจเนซีส ดังแสดงในรูปที่ 2.13 และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการ แสดงในตารางที่ 2.3

2.5.1 ไฮโดรไลซีส (Hydrolysis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการไฮโดรไลซีส เป็นกระบวนการแตกสลายพอลิเมอร์ เกิดจากแบคทีเรียที่ผลิตกรด (acid production bacteria) ปล่อยเอนไซม์ (external enzyme) ออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มี

โมเลกุลใหญ่ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ให้มีขนาดเล็กลง เช่น น้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโน และกรดไขมัน ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำ ทำให้สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ง่าย



รูปที่ 2.13 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไร้อากาศ (ดัดแปลงจาก Aiyuk *et al.*, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในแต่ละกระบวนการย่อยสลายแบบไม่มีออกซิเจน (ดัดแปลงจาก Angenent *et al.*, 2004)

กระบวนการ	ปฏิกิริยา	ลำดับ
การหมักให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนและกรดอะซิติก	$C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O \rightleftharpoons 4\,H_2\,(g) + 2\,CH_3COOH + 2\,CO_2\,(g)$	1(a)
การหมักให้เกิดกรดบิวทิริก	$C_6H_{12}O_6 \rightleftharpoons 2\,H_2\,(g) + CH_3CH_2CH_2COOH + 2\,CO_2\,(g)$	2(a)
การหมักให้เกิดเอทานอล	$C_6H_{12}O_6 \rightleftharpoons 2\,CH_3CH_2OH + 2\,CO_2\,(g)$	2(a)
การผลิตกรดโปรปิโอนิก	$C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2\,(g) \rightleftharpoons 2\,CH_3CH_2COOH + 2\,H_2O$	2(a)
การเกิดออกซิเดชันของกรดโปรปิโอนิก	$CH_3CH_2COOH + 2\,H_2O \rightleftharpoons CH_3COOH + 3\,H_2\,(g) + CO_2\,(g)$	1(b)
การเกิดออกซิเดชันของกรดบิวทิริก	$CH_3CH_2CH_2COOH + 2\,H_2O \rightleftharpoons 2\,CH_3COOH + 2\,H_2\,(g)$	1(b)
การผลิตเอทานอล	$CH_3COOH + H_2\,(g) \rightleftharpoons CH_3CH_2OH + H_2O$	1(c)
การเกิดออกซิเดชันของกรดอะซิติก	$CH_3COOH + 2\,H_2O \rightleftharpoons 4\,H_2\,(g) + 2\,CO_2\,(g)$	1(d)

2.5.2 อะซิโดเจเนซีส (Acidogenesis)

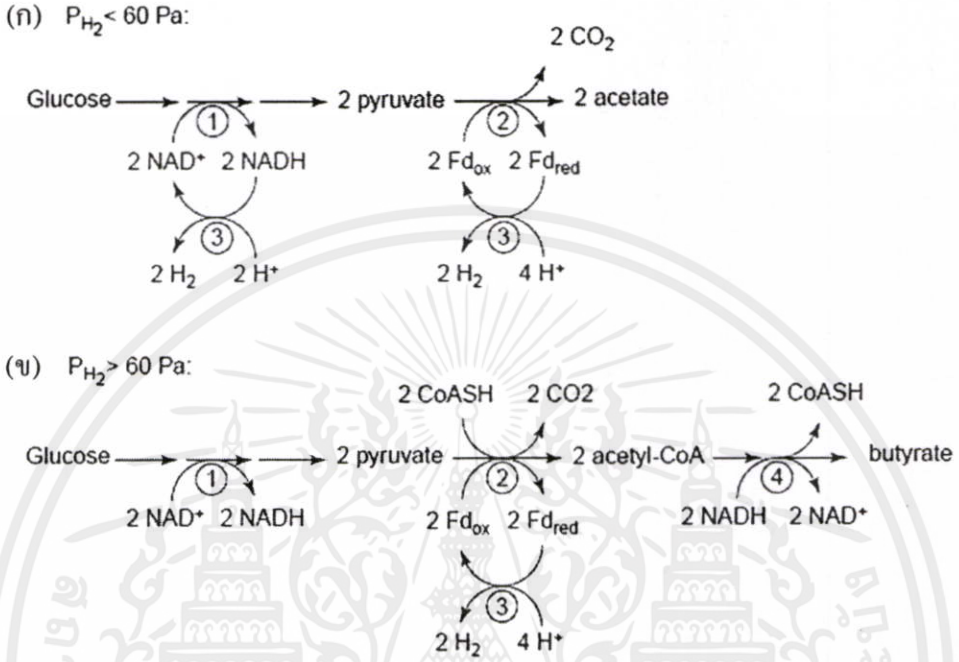
สารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำจากกระบวนการไฮโดรไลซีส จะเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในกระบวนการหมักของแบคทีเรียที่สามารถเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative bacteria) ซึ่งผลผลิตสุดท้ายจะได้กรดอินทรีย์ระเหยง่าย โดยมีโมเลกุลคาร์บอนไม่เกิน 5 ตัว เช่น กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) กรดบิวทิริก (butyric acid) กรดวาเลอริก (valeric acid) กรดอะซิติก (acetic acid) ขั้นตอนนี้นอกจากจะผลิตกรดอินทรีย์ต่างๆ แล้วยังเกิดก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ดังปฏิกิริยา 2.24 โดยทั่วไปแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนจะผลิตกรดอินทรีย์ แต่แบคทีเรียที่ผลิตกรดอินทรีย์อาจไม่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนก็ได้

$$C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O \longrightarrow 2\,CH_3COOH + 2\,CO_2\,(g) + 4\,H_2\,(g) \qquad (2.24)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการนี้ จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นและความดันของไฮโดรเจน (รูปที่ 2.14) ถ้าความดันของไฮโดรเจนต่ำกว่า 60 ปาสคาล (Pa) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะ

เป็นกรดอะซิติก ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ แต่ถ้าความดันของไฮโดรเจนสูงกว่า 60 ปาสคาล ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นกรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก ไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ (Angenent *et al.*, 2004)



รูปที่ 2.14 ผลของความดันของไฮโดรเจนต่อวิถีเมตาบอลิซึมการออกซิเดชันของ NADH เมื่อ (ก) คือ ความดันของไฮโดรเจนต่ำกว่า 60 ปาสคาล (ข) คือ ความดันของไฮโดรเจนสูงกว่า 60 ปาสคาล (Angenent *et al.*, 2004)

1 = glycolysis pathway หรือ Embden- Meyerhof pathway

2 = oxidative decarboxylation โดยเอนไซม์ pyruvate:ferredoxin oxidoreductase

3 = การผลิตไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ hydrogenase

4 = การผลิต butyrate

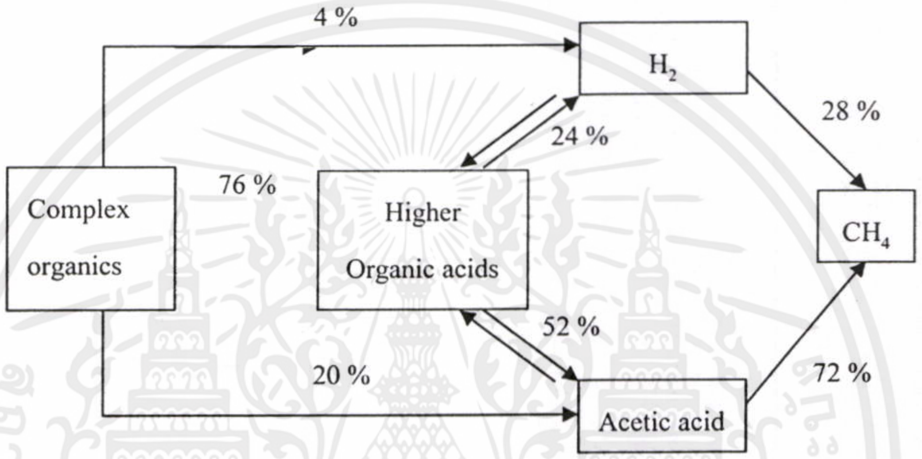
2.5.3 อะซิโตเจเนซีส (Acetogenesis)

กรดระเหยง่ายที่เกิดขึ้นจากกระบวนการอะซิโดเจเนซีสจะถูกแบคทีเรียกลุ่มอะซีโตเจนิก (acetogenic bacteria) และแบคทีเรียผลิตไฮโดรเจน (hydrogen production bacteria) เปลี่ยนให้เป็นอาะซิเตต ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการหลีกเลี่ยงการสะสมของกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนในปริมาณสูงดังแสดงในปฏิกิริยา 2.25 และ 2.26 ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นเฉพาะในสภาวะความดันของไฮโดรเจนต่ำเท่านั้น (Angenent *et al.*, 2004)

$$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \longrightarrow CH_3COOH + CO_2(g) + 3H_2(g) \quad (2.25)$$

$$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \longrightarrow 2CH_3COOH + 2H_2(g) \quad (2.26)$$

กรดอะซิติกและก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทนโดย methanogenic bacteria (รูปที่ 2.15) ทำให้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนลดลง ดังนั้น เมื่อต้องการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจึงต้องมีการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม methanogenic bacteria ซึ่งวิธีการยับยั้งเชื้อกลุ่มนี้มีหลายวิธี ดังนี้



รูปที่ 2.15 การย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไม่มีออกซิเจนและสัดส่วนของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Metcalf & Eddy, 2004)

1) วิธีการเติมสารยับยั้งการทำงานของเชื้อกลุ่ม methanogens สารที่นิยมใช้ เช่น 2 bromoethanesulfonic acid (BESA), acetylene และ iodopropane (Oremland, 1988; Sparling *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2003; Zhu and Beland, 2006) โดยมีข้อจำกัดของแต่ละสาร ได้แก่ iodopropane จะขัดขวางการทำงานเอนไซม์ B12 (B_{12} enzymes) ของเชื้อกลุ่ม methanogens (Kenealy and Zeikus, 1981) ส่วน BESA และ acetylene เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายสับสเตรต จะไปแย่งจับที่บริเวณเร่งของโคเอนไซม์เอ็ม (co-enzyme M) ของเชื้อกลุ่ม methanogens ทำให้เกิดการแข่งขันระหว่างสาร BESA และ acetylene (ตัวยับยั้ง) กับสับสเตรต ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้จึงตาย ซึ่ง BESA จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อกลุ่ม methanogens เท่านั้น แต่สาร acetylene จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนตัวอื่นด้วย (Brouzes and Knowles, 1971)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) การใช้ความร้อน (heat shock) การอบที่อุณหภูมิในช่วง 80-104 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-120 นาที สามารถยับยั้งเชื้อกลุ่ม methanogens ได้ ซึ่งอุณหภูมิและเวลาในการอบจะขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ เช่น ถ้าเป็นดิน (Iyer *et al.*, 2004) ปุ๋ยหมัก (Khanal *et al.*, 2004) และปุ๋ย

คอกมูลวัว (Fan *et al.*, 2004) ใช้การอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนสลัดจ์จากระบบย่อยแบบไร้อากาศ อบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Kim *et al.*, 2004) (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 วิธีการผลิตหัวเชื้อโดยการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม methanogenic bacteria

วิธี	ประเภทวัตถุดิบ	สภาวะ	เอกสารอ้างอิง
Acidic pH (3-4)	สลัดจ์	24 ชม.	Chang *et al.* (2002)
Heating	สลัดจ์	85 °ซ. เวลา 1 ชม.	Mu *et al.* (2006)
	สลัดจ์	80 °ซ. เวลา 30 นาที	Chen *et al.* (2005)
	สลัดจ์	100 °ซ. เวลา 45 นาที	Lin and Lay , (2004) Lin and Lay , (2005)
	Cracked cereals	100 °ซ. 30 นาที	Zhang *et al.* (2005)
	ปุ๋ยคอกมูลวัว	100–105 °ซ. เวลา 2 ชม.	Fan *et al.* (2004)
	สลัดจ์	100 °ซ. 15 นาที	Han and Shin, (2004)
	ดิน ปุ๋ยหมัก	105 °ซ. เวลา 2 ชม.	Iyer *et al.* (2004), Khanal *et al.* (2004)
	สลัดจ์	90 °ซ. เวลา 10 นาที	Kim *et al.* (2004)
Sterilizing และ adding BESA	สลัดจ์	121 °ซ. เวลา 30 นาที และเติม 100 mM BESA	Wang *et al.* (2003)

3) วิธีการปรับสภาวะพีเอชให้เหมาะสม โดยมีรายงานว่า เชื้อกลุ่ม methanogens นั้นเจริญได้ดีในช่วงพีเอชประมาณ 7-8 แต่เชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนเจริญได้ในช่วงพีเอชประมาณ 4-7 (Oremland, 1988)

4) การทำให้เซลล์แตกโดยวิธี ultrasonication โดยใช้ความถี่เสียงของเครื่อง ultrasonic ในการทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตก

5) การทำให้เซลล์แตกโดยวิธี freezing และ thawing โดยใช้ความเย็นจัดและการทำให้ละลายอย่างรวดเร็ว จนมีผลทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตก

2.6 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ไนโตรจีเนส และเอนไซม์ไฮโดรจีเนส คุณสมบัติของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 คุณสมบัติของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (ดัดแปลงจาก Koku *et al.*, 2002)

คุณสมบัติ	เอนไซม์ไนโตรจีเนส	เอนไซม์ไฮโดรจีเนส
1. สับสเตรต	สารให้พลังงานสูง (ATP) โปรตอน (H^+) หรือ ก๊าซไนโตรเจน (N_2), อิเล็กตรอน	ก๊าซไฮโดรเจน (H_2)
2. ผลิตภัณฑ์	ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) หรือ แอมโมเนียม (NH_4^+)	สารให้พลังงานสูง (ATP), โปรตอน (H^+), อิเล็กตรอน
3. จำนวนโปรตอน	2 (Mo-Fe และ Fe)	1 (Fe)
4. โลหะที่เป็นองค์ประกอบ	Mo และ Fe	Ni, Fe และ S
5. อุณหภูมิที่เหมาะสม	30 องศาเซลเซียส (*A. vinelandii)*	55 องศาเซลเซียส *(R. rubrum)* 70 องศาเซลเซียส *(R. capsulatus)*
6. พีเอชที่เหมาะสม	7.1- 7.3 *(A. vinelandii)*	6.5-7.5 (*R. sulfidophilus)*
7. ตัวยับยั้ง (inhibitor)	ก๊าซไนโตรเจน (สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน) แอมโมเนีย (NH_4^+), ออกซิเจน (O_2), อัตราส่วนระหว่างไนโตรเจนต่อคาร์บอนสูง	ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO), EDTA, ออกซิเจน (O_2), สารประกอบอินทรีย์
8. ตัวกระตุ้น (stimulator)	แสง	ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) (*R. sphaeroides)*, ไม่มีสารประกอบอินทรีย์ (*R. rubrum, R. capsulatus)*
9. ชนิดของปฏิกิริยา	ปฏิกิริยาไปข้างหน้า	ปฏิกิริยาผันกลับได้

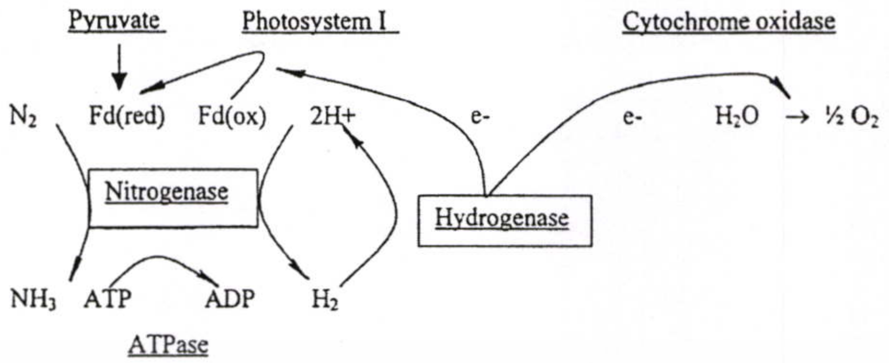
2.6.1 เอนไซม์ไนโตรจีเนส

เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนีย โดยกระบวนการตรึงไนโตรเจน ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซไนโตรเจน แสดงดังปฏิกิริยา 2.27

$$8\,H^+ + N_2\,(g) + 8\,e^- \longrightarrow 2\,NH_3 + H_2\,(g) \qquad (2.27)$$

เอนไซม์ชนิดนี้ใช้อิเล็กตรอนและ ATP ในการรีดิวซ์ไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียและรีดิวซ์โปรตอนเป็นก๊าซไฮโดรเจนจากเฟอร์รีดอกซิน ดังรูปที่ 2.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.16 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่าย (Smith *et al.*, 1992)

2.6.2 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสประกอบด้วย เหล็ก (iron) และ ซัลเฟอร์ (sulfer) บางครั้งอาจพบนิกเกิล (nickel) โดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase) และเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) (Ni *et al.*, 2006)

2.6.2.1 เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส อาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ไฮโดรจีเนสที่เมมเบรน ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีหน้าที่เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาที่มีการใช้ก๊าซไฮโดรเจน ดังปฏิกิริยา 2.28

$$H_2\,(g) \xrightarrow{\text{อัพเทคไฮโดรจีเนส}} 2\,H^+ + 2\,e^- \qquad (2.28)$$

2.6.2.2 เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส

เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาที่มีทั้งการผลิตและการใช้ก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ดังปฏิกิริยา 2.29

$$H_2\,(g) \xrightleftharpoons{\text{รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส}} 2\,H^+ + 2\,e^- \qquad (2.29)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน

2.7.1 พีเอช (pH)

พีเอชเป็นปัจจัยที่สำคัญของกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในช่วงพีเอชที่กว้าง คือ พีเอช 4-7 (Kumar and Das, 2000) อย่างไรก็ตาม ช่วงพีเอชที่เหมาะสมที่แบคทีเรียสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงอยู่ในช่วง 5.5-6.7 (Van Ginkel *et al*., 2001; Fang and Liu, 2002; Hawkes *et al*., 2002; Lin and Lay, 2005) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วงต่างๆ แสดงในตารางที่ 2.6 ปฏิกิริยาการเกิดก๊าซไฮโดรเจนจะเกิดกรดอินทรีย์เพิ่มมากขึ้น จึงจำเป็นต้องเติมบัฟเฟอร์ลงในอาหาร

ตารางที่ 2.6 ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

ชนิดของเชื้อ	พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม	พีเอชควบคุมที่เหมาะสม	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เอกสารอ้างอิง
C. butyricum CGS5	-	5.5	37	Chen *et al*. (2005)
E. cloacae IIT-BT 08	-	5.0 - 6.0	36	Kumar and Das, (2000)
E. aerogenes E.82005	-	6.0	36	Tanisho and Ishiwata, (1995)
B. coagulans IIT-BT S1	6.5	-	37	Kotay and Das, (2007)
E. coli BL-21	6.0	-	37	Chittibabu *et al*. (2006)
K. oxytoca HP1	7.0	-	38	Minnan *et al*. 2005
C. pasteurianum	7.4 - 7.6	-	35	Zhang *et al*. (2005)

2.7.2 อุณหภูมิ (Temperature)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ในอาหารขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ในการควบคุมระบบ โดยทั่วไป แบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนมี 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิปานกลาง

(mesophilic bacteria) ซึ่งทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) ซึ่งทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส อัตราเร็วของปฏิกิริยาและประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน mesophilic bacteria จะดีกว่า thermophilic bacteria เนื่องจาก thermophilic bacteria ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้น้อยกว่า mesophilic bacteria ดังนั้น การควบคุมระบบจึงมีความเสี่ยงต่อการล้มเหลวของระบบสูง และยังสิ้นเปลืองพลังงานในการควบคุมอุณหภูมิของระบบอีกด้วย ตัวอย่าง mesophilic bacteria ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนแสดงดังตารางที่ 2.6

2.7.3 ความเป็นด่าง (Alkalinity)

หมายถึงความสามารถของน้ำในการรับอนุภาคโปรตอน (อยู่ในรูปมิลลิกรัมต่อลิตรของ $CaCO_3$) สภาพด่างในน้ำส่วนใหญ่มาจากไบคาร์บอเนต คาร์บอเนต และไฮดรอกไซด์ จำนวนอนุมูลเหล่านี้จะมากหรือน้อยขึ้นกับค่าพีเอช ถ้าในระบบมีค่าความเป็นด่างสูงแสดงว่าระบบหมักสามารถรักษาสภาพพีเอช (buffer capacity) ให้คงอยู่ได้นาน เมื่อปริมาณของกรดเพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามหากระบบมีค่าความเป็นด่างต่ำแสดงว่ามีการสะสมของกรดอินทรีย์ค่อนข้างสูง เนื่องจากภายในระบบจะเกิดความเป็นกรดได้ง่ายทำให้ระบบล้มเหลว

2.7.4 สารอาหาร (Nutrients)

ธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ มี 2 ชนิด คือสารอาหารหลักซึ่งได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส กำมะถัน และสารอาหารรอง ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม สังกะสี แมงกานีส ทองแดง โคบอลต์ เหล็ก นิกเกิล โดยแบคทีเรียต้องการคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ในการสังเคราะห์พลังงาน โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ซึ่งปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่จุลินทรีย์ต้องการนั้นต้องมีอัตราส่วน BOD : N : P เท่ากับ 100 : 1.1 : 0.2 ดังนั้น ในการควบคุมสภาวะให้เหมาะสมจึงต้องใส่สารอาหารให้เพียงพอแก่ความต้องการของจุลินทรีย์ ส่วนสารอาหารรองจุลินทรีย์ต้องการน้อยมาก

2.7.5 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น

ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นมีผลต่ออัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจน กล่าวคือ ถ้ามีเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นในการหมักน้อย จะต้องใช้เวลานานในการเกิดก๊าซไฮโดรเจน แต่ถ้ามีเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นในการหมักมากเกินไป จะทำให้จุลินทรีย์นำแหล่งคาร์บอนไปผลิตเซลล์จุลินทรีย์มากกว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจน จากการศึกษาพบว่า ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม คือ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรของจุลินทรีย์ต่อปริมาตรอาหาร (Kotay and Das, 2007; Wang *et al.*, 2003)

เอกสารนี้เผยแพร่เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.6 กรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acids)

ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน จะมีแบคทีเรียอยู่ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มย่อยสลายสารอินทรีย์แล้วให้กรดอินทรีย์ระเหยง่าย และกลุ่มที่ใช้กรดอินทรีย์เหล่านี้เป็นอาหารเกิดเป็นก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ (รูปที่ 2.13) โดยทั่วไปในกระบวนการหมักจะมีการสร้างกรดอินทรีย์ระเหยง่ายมากกว่าการใช้กรดอินทรีย์ระเหยง่าย เกิดการสะสมของกรดอินทรีย์ในช่วงแรก ค่าความเป็นด่างของระบบจะลดลงจนกระทั่งหมด ทำให้พีเอช ลดลง แต่ถ้ายังคงมีการสะสมกรดต่อไป ค่าพีเอชจะลดลงเรื่อยๆ จนทำให้ระบบล้มเหลวได้

2.7.7 สารพิษ (Toxic substances)

สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์เกือบทุกชนิด ถ้ามีปริมาณมากเกินไปในการหมักก็จะเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ได้ ตัวอย่างของสารพิษ ได้แก่

2.7.7.1 แคตไอออนของโลหะเบา

แคตไอออนของโลหะ ได้แก่ โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์หรือการเติมสารเคมีเพื่อปรับพีเอชในระบบ ซึ่งจะมีพิษต่อจุลินทรีย์ โดยความเป็นพิษของสารเหล่านี้เป็นปฏิกิริยาที่ซับซ้อนและขึ้นอยู่กับปริมาณของแคตไอออนว่ามีมากน้อยเพียงไร ดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ความเข้มข้นที่กระตุ้นและยับยั้งของแคตไอออน โลหะเบา (McCarty, 1964)

แคตไอออน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	กระตุ้น	เริ่มยับยั้ง	ยับยั้งอย่างรุนแรง
โซเดียม	100-200	3,500-5,500	8,000
โพแทสเซียม	200-400	2,500-4,500	12,000
แคลเซียม	100-200	2,500-4,500	8,000
แมกนีเซียม	75-150	1,000-1,500	3,000

ความเป็นพิษของแคตไอออนแต่ละชนิดจะรุนแรงไม่เท่ากัน โดยความเป็นพิษของแคตไอออนจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีวาเลนซี่เพิ่มขึ้น แคตไอออนที่มีวาเลนซี่เท่ากับ 1 จะมีพิษต่อแบคทีเรียน้อยกว่า แคตไอออนที่มีวาเลนซี่เท่ากับ 2 นั่นคือพิษของ แคลเซียม และ แมกนีเซียม จะมากกว่าพิษของโซเดียมและโพแทสเซียมถึง 10 เท่า (McCarty, 1964)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ความเป็นพิษของแคตไอออนสามารถลดลงได้ เมื่อมีแคตไอออนซึ่งมีพิษต่อแบคทีเรียมากกว่า 1 ชนิด ในบางครั้งทำปฏิกิริยากันและลดความเป็นพิษลง เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

antagonism ในทางตรงกันข้าม ความเป็นพิษของแคตไอออนอาจเพิ่มความรุนแรงขึ้นเมื่อมีแคตไอออนอีกชนิดมาเพิ่ม ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า synergism ดังแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 แคตไอออนเพิ่มความเป็นพิษและแคตไอออนลดความเป็นพิษ (EPA, 1979)

แคตไอออน	เพิ่มความเป็นพิษ	ลดความเป็นพิษ
แอมโมเนียไนโตรเจน	แคลเซียม, แมกนีเซียม, โพแทสเซียม	โซเดียม
แคลเซียม	แอมโมเนียไนโตรเจน, แมกนีเซียม	โซเดียม, โพแทสเซียม
แมกนีเซียม	แอมโมเนียไนโตรเจน, แมกนีเซียม	โซเดียม, โพแทสเซียม
โพแทสเซียม	-	โซเดียม, โพแทสเซียม
โซเดียม	แอมโมเนียไนโตรเจน, แมกนีเซียม, แคลเซียม	โพแทสเซียม

2.7.7.2 ก๊าซบางชนิด

1) แอมโมเนีย เป็นสารที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน เช่น โปรตีนถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียไนโตรเจน ซึ่งอาจอยู่ในรูปของแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) หรือก๊าซแอมโนเนีย (NH_3) ดังปฏิกิริยา 2.30 ซึ่งแอมโมเนียจะมีผลกระทบต่อแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนน้อยกว่าแบคทีเรียที่สร้างมีเทน (methanogenic bacteria)

$$NH_3\,(g) + H_2O \rightleftharpoons NH_4^+ + OH^- \qquad (2.30)$$

ถ้าพีเอชต่ำกว่า 7.2 จะมี NH_4^+ มากกว่า แต่ถ้าพีเอชสูงกว่า 7.2 จะมี NH_3 มากกว่า ซึ่ง NH_3 จะยับยั้งการทำงานและมีพิษต่อจุลินทรีย์มากกว่า NH_4^+ โดย NH_3 จะเป็นพิษเมื่อมีความเข้มข้นมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน NH_4^+ จะเป็นพิษเมื่อมีความเข้มข้นมากกว่า 7,000-9,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (EPA, 1985)

2) ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นสารที่เกิดจากการย่อยสลายซัลเฟตหรือการย่อยโปรตีนซัลไฟด์ที่ละลายน้ำเท่านั้น ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นพิษเพราะสามารถเข้าสู่เซลล์ โดยจะมีความเป็นพิษที่ความเข้มข้นมากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (EPA, 1978)

2.7.7.3 โลหะหนัก

โลหะหนักบางชนิดเป็นพิษต่อแบคทีเรีย ซึ่งความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียดังแสดงในตารางที่ 2.9 ความเป็นพิษของไอออนโลหะหนักเหล่านี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายน้ำของเกลือของโลหะหนักและความเข้มข้นของไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มีอยู่ เพราะไฮโดรเจนซัลไฟด์จะรวมตัวกับโลหะหนักเกิดเป็นเกลือซัลไฟด์ซึ่งไม่ละลายน้ำและตกตะกอน ทำให้พิษของโลหะหนัก

ลดลง การเติมเกลือซัลไฟด์หรือเกลือซัลเฟตลงไปในถังหมัก จะเป็นการเพิ่มไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้กับระบบได้ เนื่องจากเกลือซัลไฟด์หรือเกลือซัลเฟตจะถูกรีดิวซ์กลายเป็นไฮโดรเจนซัลไฟด์ภายใต้ สภาวะไม่มีออกซิเจนได้ (Hayes and Theis, 1978)

ตารางที่ 2.9 ความเข้มข้นของโลหะหนักที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียในสภาวะการย่อยสลายแบบไม่มีออกซิเจน (Hayes and Theis, 1978)

โลหะหนัก	**ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)**		
	ยับยั้งการทำงาน	**เป็นพิษ**	**หยุดการทำงาน**
โครเมียม (Cr^{3+})	130	260	<200
โครเมียม (Cr^{6+})	110	420	<180
ทองแดง	40	70	<50
นิเกิล	10	30	>30
แคดเมียม	-	>20	>10
ตะกั่ว	340	>340	>250
สังกะสี	400	600	<1700

2.8 สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสีย

สลัดจ์เป็นตะกอนชีวภาพที่ได้จากกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (activated sludge) มีน้ำเป็นองค์ประกอบถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (Okamoto *et al.*, 2000; Logan *et al.*, 2002) ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งมีการนำสลัดจ์กลับไปใช้ในระบบอีกครั้ง ส่วนที่เหลือจะถูกกำจัดโดยผ่านเครื่องรีดตะกอน มีการเติมสารเคมีป้องกันการเกิดกลิ่นเหม็น และปรับเสถียร ฆ่าเชื้อโรค (รูปที่ 2.17) ซึ่งกระบวนการบำบัดนี้ ต้องผ่านขั้นตอนมากมาย และใช้สารเคมีเป็นจำนวนมาก ทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูง

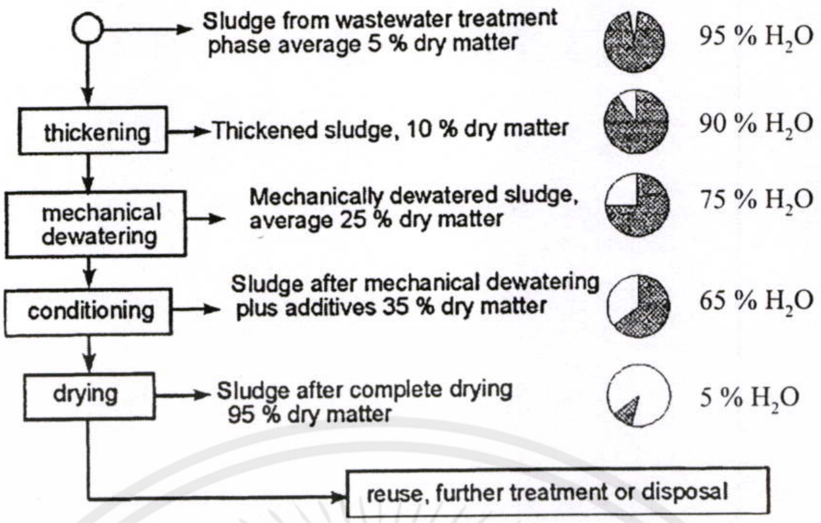
ดังนั้น การนำสลัดจ์มาใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน นอกจากจะเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการบำบัดสลัดจ์แล้ว ยังได้พลังงานมาใช้ให้เกิดประโยชน์ เนื่องจากสลัดจ์ประกอบด้วยสารอินทรีย์ต่างๆ (ตารางที่ 2.10) ซึ่งจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.10 คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของสลัดจ์ที่ไม่ผ่านการบำบัดและสลัดจ์ที่ถูกย่อยสลาย (ดัดแปลงจาก Metcalf and Eddy, 1991)

คุณสมบัติสลัดจ์	**สลัดจ์ที่ไม่ผ่านบำบัด**		**สลัดจ์ที่ผ่านการย่อย**		**ช่วงกระตุ้น**
	ค่าที่พบทั่วไป	**ค่าเฉลี่ย**	**ค่าที่พบทั่วไป**	**ค่าเฉลี่ย**	**(activity range)**
ปริมาณของแข็งแห้งทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)	2.0-8.0	5.0	6.0-12.0	10.0	0.83-1.16
ของแข็งระเหยทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)	60-80	65	30-60	40	59-88
ไขมันและน้ำมัน					
-อีเทอร์ที่ละลายน้ำได้ (เปอร์เซ็นต์)	6-30	-	5-20	18	-
- อีเทอร์ที่สกัดออกมา (เปอร์เซ็นต์)	7-35	-	-	-	5-12
โปรตีน (เปอร์เซ็นต์)	20-30	25	15-20	18	32-41
ไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)	1.5-4	2.5	1.6-6.0	3.0	2.4-5.0
ฟอสฟอรัส (เปอร์เซ็นต์)	0.8-2.8	1.6	1.5-4.0	2.5	2.8-11.0
ด่าง (เปอร์เซ็นต์)	0-1	0.4	0.0-3.0	1.0	0.5-0.7
เซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)	8.0-15.0	10.0	8.0-15.0	10.0	-
เหล็ก (เปอร์เซ็นต์)	2.0-4.0	2.5	3.0-8.0	4.0	-
ซิลิกา (เปอร์เซ็นต์)	15.0-20.0	-	10.0-20.0	-	-
ความเป็นด่าง (มิลลิกรัมต่อลิตรของ $CaCO_3$)	500-1,500	600	2,500-3,500	3,000	580-1,100
กรดอินทรีย์ (มิลลิกรัมต่อลิตรของกรดอะซิติก)	200-2,000	500	100-600	200	1,100-1,700
ปริมาณพลังงานทั้งหมด	10,000-12,500	11,000	4,000-6,000	200	8,000-10,000
พีเอช	5.0-8.0	6.0	6.5-7.5	7.0	6.5-8.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.17 กลไกการบำบัดสลัดจ์และปริมาณน้ำที่มีในสลัดจ์ในแต่ละขั้นตอน (Manzel, 1989)

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Sparling *et al.* (1997) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อแบคทีเรียไม่ใช้อากาศที่แยกได้จากปุ๋ยหมัก ในการแยกเชื้อใช้สารยับยั้งการทำงาน co-enzyme M ของแบคทีเรียกลุ่ม methanogens ได้แก่ BESA (2-bromoethanosulfonic acid) เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ และ acetylene 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าสารเหล่านี้เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายสับสเตรต จึงไปแย่งจับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ co-enzyme M ทำให้เกิดการแข่งขันระหว่างสาร BESA และ acetylene (ตัวยับยั้ง) กับสับสเตรต มีผลให้เอนไซม์ของแบคทีเรียกลุ่ม methanogens ไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงตาย นอกจากนี้ยังพบว่าสาร BESA สามารถยับยั้งเอนไซม์เฉพาะเชื้อกลุ่ม methanogens ส่วน acetylene นั้นนอกจากจะยับยั้งเอนไซม์ของเชื้อกลุ่ม methanogens แล้วยังยับยั้งเอนไซม์เชื้อแบคทีเรียไม่ใช้อากาศตัวอื่นด้วย (Brouzes *et al.*, 1971) จากการศึกษาได้เชื้อ *Clostridium thermocellum* (DMS 123) ที่เป็นเชื้อเด่นในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน และใช้เยื่อกระดาษเป็นแหล่งคาร์บอน สภาวะที่ใช้ในการควบคุม คือ พีเอช 6.9 และ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากผลการศึกษาพบว่าสาร BESA และ acetylene มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อกลุ่ม methanogens ได้ใกล้เคียงกัน

Tanisho *et al.* (1995) ศึกษาผลการกำจัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้เชื้อ *Enterobacter aerogenes* st. E.82005 และใช้กากน้ำตาลเป็นสารอาหาร ในสภาวะการหมักควบคุมอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.0 โดยเก็บก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีการแทนที่น้ำในกระบอกตวง ที่มีการเติม NaOH 25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลงไปในน้ำเพื่อดักจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังปฏิกิริยา 2.31 และ 2.32

$$CO_2\,(g) + NaOH \longrightarrow NaHCO_3 \quad (2.31)$$

$$NaHCO_3 + NaOH \longrightarrow Na_2CO_3 + H_2O \quad (2.32)$$

จากผลการทดลองพบว่า การกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์สามารถเพิ่มความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ถึง 2 เท่า นั่นคือ ถ้าไม่มีการดักก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะให้ผลผลิต 0.5 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส แต่ถ้ามีการดักก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 1 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส

Kumar *et al.* (2000) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อ *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 โดยใช้สารอาหาร 3 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส และเซลลูไบโอส ตัวแปรที่ศึกษา พีเอชเริ่มต้น (4-8) แหล่งคาร์บอน (กลูโคสและซูโครส) และอุณหภูมิ (15-36 องศาเซลเซียส) โดยในระบบการหมักจะดักก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วย NaOH 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและเก็บก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแทนที่น้ำที่มีการเติม NaCl 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรจากการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ ที่พีเอชเริ่มต้น 6.0 และ อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุด คือ 29.63 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อกรัมเซลล์แห้งต่อชั่วโมง จะได้ 2.2 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส, 6 โมลไฮโดรเจนต่อโมลซูโครส และ 5.4 โมลไฮโดรเจนต่อโมลเซลลูไบโอส

Ranalli *et al.* (2000) ศึกษาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากน้ำเสียของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนในบ่อเติมอากาศ พบว่า เชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *E. coli*

Evvyernie *et al.* (2001) ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยการใช้แบคทีเรีย *Clostridium paraputrificum* M-21 และใช้ N-acetyl-v-glucosamine (GlcNAc) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 และควบคุมอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 2.2 โมลไฮโดรเจนต่อโมล GlcNAc ซูโครส ภายใต้สภาวะไร้อากาศและไม่มีแสง

Wang *et al.* (2003) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้เชื้อ *Clostridium bifermentans* ที่แยกได้จากสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งในการคัดแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์นั้นใช้วิธีบำบัดเบื้องต้นด้วยการ sterilize ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยวิธีเติม BESA 100 มิลลิโมลาร์ และใช้สลัดจ์เป็นวัตถุดิบในการหมัก โดยศึกษาสลัดจ์ที่มีการบำบัดเบื้องต้นเปรียบเทียบกับสลัดจ์ที่ไม่ผ่านการบำบัด โดยใช้วิธีการบำบัดสลัดจ์เบื้องต้น 5 วิธี ได้แก่ 1) ultrasonic ที่ความถี่เสียง 20 kHz เป็นเวลา 30 นาที 2) ปรับให้อยู่ในสภาวะกรด (acid) ที่พีเอช 3 เป็นเวลา 10 นาที 3) sterilize ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที 4) เติม BESA เข้มข้น 1 โมลาร์ และ 5) Freeze และ thaw โดยทำให้แข็งที่อุณหภูมิ -17 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าสลัดจ์ที่ผ่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การบำบัดสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าสลัดจ์ที่ไม่ผ่านการบำบัดถึง 1.5-2.5 เท่า จากวิธีการบำบัดดังกล่าวนี้สามารถยับยั้งการผลิตก๊าซมีเทนจากมากไปน้อยโดยเรียงลำดับน้อยดังนี้ sterilize, acid/BESA, Freeze และ thaw, ultrasonic และสลัดที่ไม่ผ่านการบำบัด ตามลำดับ

Chen *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรีย *C. butyricum* CGS5 ที่แยกได้จากสลัดจ์ที่ถูกย่อยในสภาวะไม่มีออกซิเจน นำสลัดจ์มาบำบัดเบื้องต้นโดยอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตัวแปรที่ศึกษาคือ พีเอช 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 และทำการหมักในสภาวะความเข้มข้นซูโครส 20 กรัมซีโอดีต่อลิตร และควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่า ที่พีเอชเท่ากับ 5.5 จะผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด 2.78 โมลไฮโดรเจนต่อโมลซูโครส แต่ที่พีเอช 6.0 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด 209 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมที่พีเอชเริ่มต้น 7.5 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 0.61 โมลไฮโดรเจนต่อโมลซูโคส และให้อัตราการผลิตไฮโดรเจน 146 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง

Minnan *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* HP1 ที่แยกได้จากน้ำพุร้อน โดยใช้ความเข้มข้นของแบคทีเรีย OD_{600} เท่ากับ 0.6 ตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น พีเอช ควบคุมอุณหภูมิ พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นของกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ โดยควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่พีเอช 7.0 และ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน เท่ากับ 9.62 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อกรัมเซลล์แห้งต่อชั่วโมง โดยผลิตไฮโดรเจนได้ 1 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ 87.5 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง

Jalal *et al.* (2006) ศึกษาจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสีย โดยใช้อาหาร brain heart agar (BHA) จุลิทรีย์ที่พบ ได้แก่ แบคทีเรียรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก (gram-positive bacillus, GPB), แบคทีเรียรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมลบ (gram-negative bacillus, GNB), แบคทีเรียรูปร่างเป็นกลม ติดสีแกรมบวก (gram-positive cocci, GPC) และแบคทีเรียรูปร่างเป็นกลม ติดสีแกรมลบ (gram-negative cocci, GNC) ซึ่งส่วนใหญ่พบแบคทีเรียรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมลบ

Zhu and Beland (2006) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้เชื้อผสมจากสลัดจ์ที่ย่อยแบบไม่ใช้อากาศ และใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการบำบัดสลัดจ์เบื้องต้นเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม methanogens 6 วิธี ได้แก่ 1) ให้ความร้อน (heat-shock) เป็นเวลา 20 นาที, 2) เติมอากาศ (aeration) 30 นาที, 3) ปรับให้อยู่ในสภาวะกรด (acid) พีเอช 3 เป็นเวลา 30 นาที, 4) ปรับให้อยู่ในสภาวะเบส (base) พีเอช 10 เป็นเวลา 30 นาที, 5) เติม BESA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที และ 6) เติม iodopropane 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลาเวลา 30 นาที จากการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม methanogens ซึ่งเป็นกลุ่ม Obligate anaerobic bacteria เจริญได้ในช่วงพีเอช 7-8 แต่เชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนเจริญได้ในช่วงพีเอชกว้างกว่านั้น จากผลการทดลองพบว่าการบำบัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบื้องต้นด้วยวิธีให้ความร้อนและปรับให้อยู่ในสภาวะกรดสามารถยับยั้งเชื้อกลุ่ม methanogens ได้สมบูรณ์ แต่ก็มีบางส่วนที่ไปยับยั้งการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ส่วนวิธีเติมเบสและวิธีเติมอากาศนั้นจะยับยั้งเชื้อกลุ่ม methanogens ได้ไม่สมบูรณ์ และวิธีเติมเบสมีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเล็กน้อย แต่วิธีเติมอากาศไม่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน วิธีการบำบัดสลัดจ์ที่ดีที่สุด คือ วิธีเติม BESA และ iodopropane ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อกลุ่ม methanogens ได้สมบูรณ์และไม่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

Kotay and Das (2007) ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อ *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 ที่คัดแยกเชื้อจากตะกอนน้ำเสีย ตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ อุณหภูมิ (28-40 องศาเซลเซียส), พีเอชเริ่มต้น (5.5-9.0), ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (0.5-2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร), ปริมาตรและอายุของหัวเชื้อ (2-20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และ 10-18 ชั่วโมง) และศึกษาชนิดของสารตั้งต้น (กลูโคส, มอลโตส, ซูโครส, ไซโลส, แลคโตส, แป้ง, แมนโนส และกลีเซอรอล) โดยทดลองในถังหมักขนาด 500 มิลลิลิตร ก๊าซที่ออกจากถังหมักจะผ่านถังที่สารละลาย KOH 40 เปอร์เซ็นต์ เพื่อดักจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังปฏิกิริยา 2.33 และ 2.34 และวัดปริมาตรก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการแทนที่น้ำ

$$CO_2\,(g) + KOH \longrightarrow KHCO_3 \qquad (2.33)$$

$$KHCO_3 + KOH \longrightarrow K_2CO_3 + H_2O \qquad (2.34)$$

จากผลการทดลอง พบว่า ที่สภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นของกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, พีเอช 6.5, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, อายุของหัวเชื้อ 14 ชั่วโมง, ปริมาตรของหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด คือ 2.28 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส และเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถใช้ มอลโตส, ซูโครส, ไซโลส, แลคโตส, แป้ง, แมนโนส และกลีเซอรอล เป็นแหล่งอาหารในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เฟลมไอออไนเซชันดีเทคเตอร์และเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (GC-FID/TCD) รุ่น CP-3800 บริษัท Varian Analytical Instrument, ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (GC) รุ่น 6830 N และแมสสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (MS) รุ่น 5973N บริษัท Agilent Technologies, ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. Solid Phase Microextraction (SPME) Fiber รุ่น StableFlex™ PDME/DVB ขนาด 65 μm ยี่ห้อ Supelco บริษัท Cecombination, ประเทศไทย
4. คอลัมน์ GC รุ่น Plot Fused Silica coating Molecular sieve 5A บริษัท Varian Analytical Instruments, ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. คอลัมน์ GC รุ่น DB-FFAP บริษัท J&W Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV 1601 บริษัท Shimadzu, ประเทศญี่ปุ่น
7. ตู้อบ (Oven) รุ่น ISOTEMP บริษัท Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น Plus II บริษัท Gallenkamp, ประเทศอังกฤษ
9. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น HS123 บริษัท International Scientific Supply HS123, ประเทศไทย
10. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รุ่น PT 203 บริษัท Every Digital Industrial Microprocessor Based Controllers, ประเทศอิตาลี
11. เตาเผา รุ่น JP 87 บริษัท Carbolite, ประเทศอังกฤษ
12. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น Tomy SS 325 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, ประเทศญี่ปุ่น
13. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น Memmert บริษัท Denver Instrument 215, ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น UFX-DX บริษัท Olympus, ประเทศญี่ปุ่น
15. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น B-3100S บริษัท Sartorius, ประเทศไทย
16. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น 2842 บริษัท Sartorius, ประเทศไทย

17. เครื่องผสมสาร (Vortex) รุ่น Genies 2 บริษัท Scientific Industries Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. เครื่องผสมสาร (Vortex) รุ่น Genies 2 บริษัท Scientific Industries Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. คิวเวต (Semimicro rectangular 10 mm) บริษัท Hellma, ประเทศสหรัฐอเมริกา
20. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) รุ่น DNA Thermal Cycler 480 บริษัท Perkin Elmer, ประเทศสหรัฐอเมริกา
21. เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (Power supply) รุ่น Bio-Rad 1000 บริษัท Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipment) รุ่น GNA 100 บริษัท Pharmacia Biotech, ประเทศสวีเดน
23. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermoblock) รุ่น TDB-120 บริษัท Biosan, ประเทศเยอรมัน
24. ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (Gel documentation) รุ่น BTS-20-M บริษัท Syngene, ประเทศเยอรมัน
25. ไมโครปิเปต (Micropipette)
26. ขวดดูแลน (Duran Bottle) ขนาด 1 ลิตร
27. เครื่องแก้วต่างๆ (Glasswares)

3.1.2 สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4 acid, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
2. กรดฟอสฟอริกเข้มข้น (conc. H_3PO_4, AR grade) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
3. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
4. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3, AR grade) บริษัท Nacalai Tesque, ประเทศญี่ปุ่น
5. โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$, AR grade) บริษัท Nacalai Tesque, ประเทศญี่ปุ่น
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
7. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2HPO_4.7H_2O$, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
8. โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
9. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
10. โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (KHP, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
11. ไดโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ... นำไปใช้

12. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
13. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
14. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$, AR grade) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech, ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
16. เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_2.6H_2O$, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
17. เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
18. เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
19. ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
20. เมอร์คิวริคซัลเฟต ($HgSO_4$, AR grade) บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
21. โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) 10 เปอร์เซ็นต์
22. โซเดียมอะซีเตต (Sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2
23 คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) (Chloroform : Isoamylalcohol)
24. บัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA 10 เท่า (Tris-HCl 0.89 โมลาร์, Boric acid 0.89 โมลาร์, EDTA 0.02 โมลาร์)
25. บัฟเฟอร์ Tris-EDTA พีเอช 7.5 (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์)
26. ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) (Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol)
27. ฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (TE saturated phenol)
28. เอทานอล (Ethanol) 99 เปอร์เซ็นต์ (C_2H_5OH, AR grade) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
29. เอทานอล (Ethanol) 70 เปอร์เซ็นต์
30. ไลโซไซม์ (Lysozyme)
31. เอนไซม์ RNase บริษัท Promega, ประเทศสหรัฐอเมริกา
32. น้ำตาลกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$, AR grade) บริษัท Ajax Finechem, ออสเตรเลีย
33. Agar (AR grade) บริษัท Himedia, ประเทศอินเดีย
34. อะกาโรส (Agarose) บริษัท BioWhittaker Molecular Application, ประเทศสหรัฐอเมริกา
35. เจลสตาร์ (Gelstar) บริษัท BioWhittaker Molecular Application, ประเทศสหรัฐอเมริกา
36. ชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล บริษัท Qiagen, ประเทศเยอรมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

37. ดีเอ็นเอมาตรฐาน แลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (ขนาด 125, 564, 2,027, 2,322, 4,361, 6,557, 9,416 และ 23,130 คู่เบส) บริษัท Promega, ประเทศสหรัฐอเมริกา
38. ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder (ขนาด 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000 และ 1,500 คู่เบส) บริษัท Promega, ประเทศสหรัฐอเมริกา
39. สีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye) (ซูโครสหรือกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์, โบรโม-ฟีนอลบลู 0.25 เปอร์เซ็นต์, บัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA 1 เท่า)

3.1.3 ก๊าซต่างๆ

1. ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน (3 % purity balance helium) บริษัท Thai Industrial Gases Public Co., Ltd., ประเทศไทย
2. ก๊าซฮีเลียม (99.999 % purity) บริษัท Thai Industrial Gases Public Co., Ltd., ประเทศไทย
3. ก๊าซไนโตรเจน (99.99 % purity) บริษัท Praxair Co., Ltd., ประเทศเกาหลี

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสำเร็จรูป Reinforced Clostridial Media (RCM, AR grade) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
2. อาหารสำเร็จรูป Reinforced Clostridium Agar (RCA, AR grade) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
3. สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนของโรงควบคุมคุณภาพน้ำดินแดง กรุงเทพ ฯ, ประเทศไทย

3.1.5 แหล่งจุลินทรีย์

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากวัสดุเหลือทิ้ง 3 แหล่ง (รูปที่ 3.1) ได้แก่

1. สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนของโรงควบคุมคุณภาพน้ำดินแดง กรุงเทพฯ
2. น้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบของศูนย์กำจัดขยะ จ. นนทบุรี
3. ปุ๋ยคอกมูลวัวจากฟาร์มวัวของ นายสม อู่เงิน จ. ฉะเชิงเทรา

นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้ใช้เชื้อ *C. butyricum* TISTR 1032 จากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนกับเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 2 3

รูปที่ 3.1 แหล่งจุลินทรีย์และการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 แหล่ง โดยหมายเลข 1 คือ สลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน, หมายเลข 2 คือ น้ำชะขยะ และหมายเลข 3 คือ ปุ๋ยคอกมูลวัว

3.1.6 ถังหมักก๊าซไฮโดรเจน

3.1.6.1 ส่วนประกอบของชุดถังหมัก

ถังหมักที่ใช้ในการศึกษาเป็นถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 ถังหมัก

ใช้ขวดดูแลน ขนาด 1 ลิตร ด้านบนปิดด้วยจุกยางซิลิโคนที่เจาะรู 2 รู เพื่อใส่ท่อนำก๊าซ โดยท่อที่หนึ่งจะจุ่มลงไปในสารละลาย จากนั้นพ่นก๊าซไนโตรเจนลงไปในถังหมักประมาณ 10 นาที เพื่อไล่ก๊าซออกซิเจน หลังจากไล่ก๊าซออกซิเจนแล้ว จะปิดวาล์วท่อที่ 1 เพื่อให้เป็นระบบไร้ออกซิเจน นอกจากนี้ ท่อที่ 1 ยังใช้สำหรับเก็บตัวอย่างอาหารไปวิเคราะห์ ส่วนท่อที่ 2 จะอยู่เหนือสารละลายใช้เป็นทางออกของก๊าซที่ได้จากการหมัก

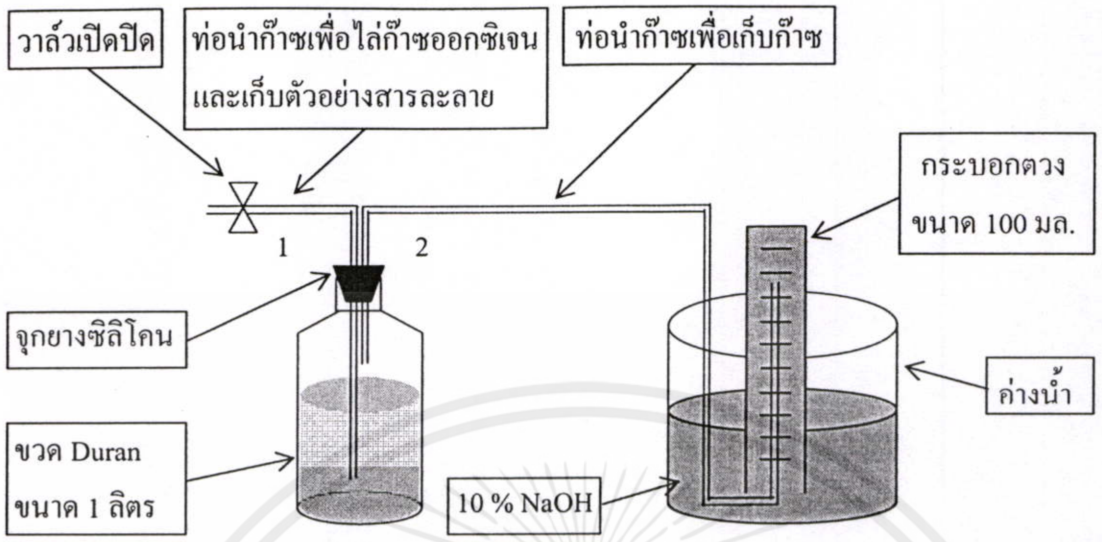
ส่วนที่ 2 ส่วนเก็บก๊าซไฮโดรเจน

ก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นถูกเก็บด้วยวิธีการแทนที่น้ำ โดยใช้กระบอกตวงซึ่งมีสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรบรรจุอยู่เต็ม คว่ำในอ่างน้ำที่บรรจุสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อดักจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก โดยท่อนำก๊าซนี้จะต่อกับสายยาง Tygon โดยปลายของสายยาง Tygon จะอยู่ข้างในกระบอกตวง วัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นโดยอ่านจากสเกลของกระบอกตวง (รูปที่ 3.2)

3.1.6.2 การทดสอบระบบถังหมัก

1) ทดสอบรอยรั่วของถังหมัก โดยการผ่านก๊าซไนโตรเจนเข้าสู่ระบบ สังเกตรอยรั่วทุกด้านโดยหยดน้ำสบู่ลงตรงที่มีรอยต่อ เพื่อตรวจสอบการรั่วของก๊าซ ถ้าพบว่ามีรอยรั่วทำการปิดรอยรั่วด้วยดินน้ำมัน

2) ทดสอบการเก็บก๊าซ โดยเติมก๊าซไนโตรเจนเข้าสู่ถังหมัก สังเกตการแทนที่น้ำของก๊าซไนโตรเจนในกระบอกตวง



สารตั้งต้น + หัวเชื้อ (ส่วนที่ 1)

การเก็บก๊าซ H_2 ใช้หลักการแทนที่น้ำโดยใช้สารละลาย 10 % NaOH เพื่อกำจัดก๊าซ CO_2 (ส่วนที่ 2)

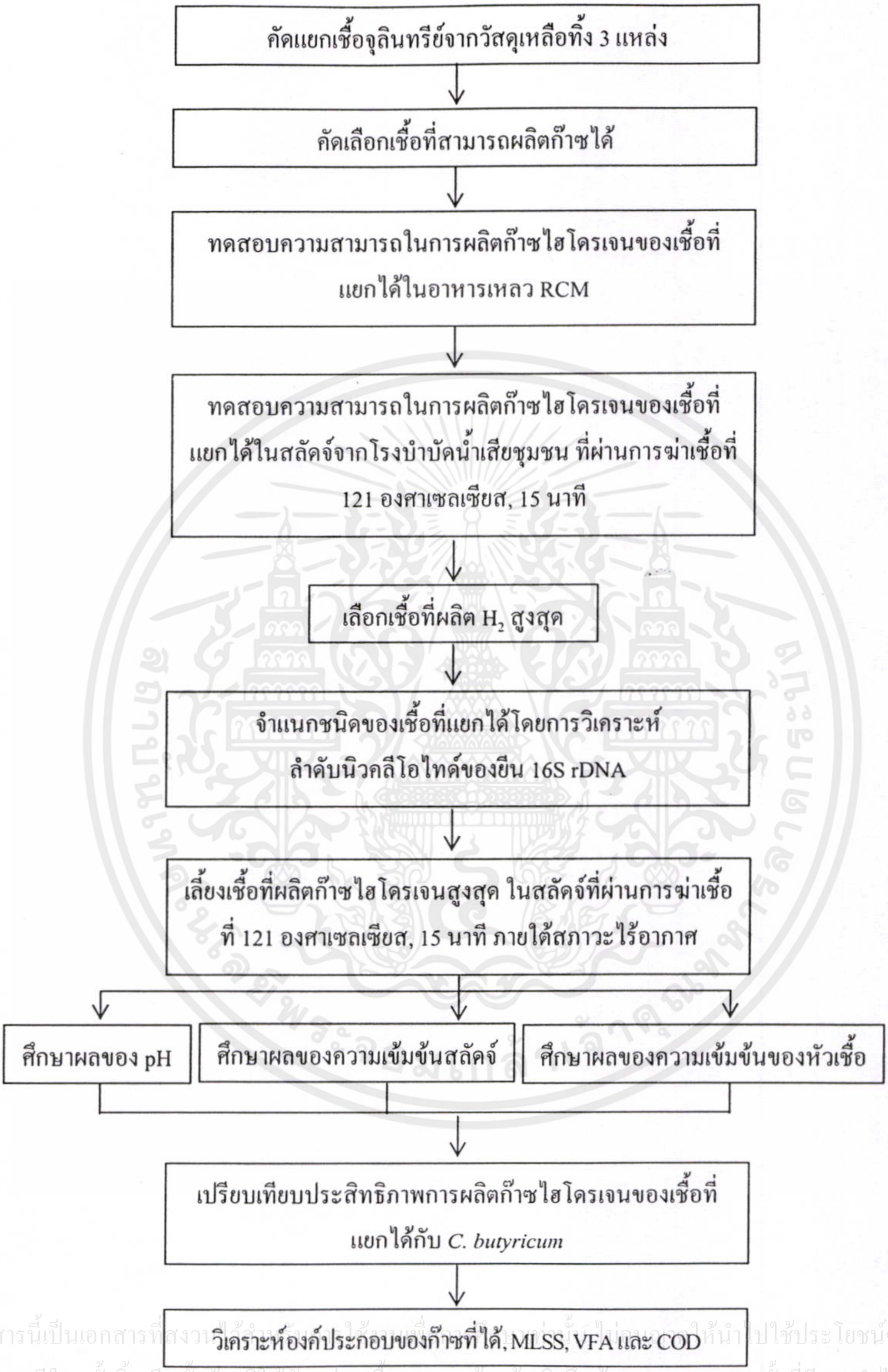
รูปที่ 3.2 การหมักก๊าซไฮโดรเจนและการเก็บก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้หลักการแทนที่น้ำ

3.2 ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของแบคทีเรียที่แยกได้จากวัสดุเหลือทิ้ง 3 แหล่ง ได้แก่ สลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน น้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบ และปุ๋ยคอกมูลวัว โดยทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการหมักแบบครั้งภายใต้สภาวะไร้อากาศ การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ 1) คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากวัสดุเหลือทิ้งทางชีวภาพและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ 2) จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ 3) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้

ขั้นตอนในการวิเคราะห์สรุปได้ดังรูปที่ 3.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.3 แผนภูมิขั้นตอนการทดลอง

3.2.1 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากวัสดุเหลือทิ้งทางชีวภาพและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

3.2.1.1 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากวัสดุเหลือทิ้งทางชีวภาพ

มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. เก็บตัวอย่างจากวัสดุเหลือทิ้ง 3 แหล่ง โดยเก็บตัวอย่างแหล่งละ 3 ซ้ำ จำนวน 2 ครั้ง ได้แก่ 1) สลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนเก็บครั้งที่ 1 วันที่ 18 สิงหาคม พ.ศ. 2549 และครั้งที่ 2 วันที่ 2 ธันวาคม พ.ศ. 2549 2) น้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบเก็บครั้งที่ 1 วันที่ 17 ตุลาคม พ.ศ. 2549 และครั้งที่ 2 วันที่ 27 ธันวาคม พ.ศ. 2549 และ 3) ปุ๋ยคอกมูลวัวครั้งที่ 1 วันที่ 14 พฤศจิกายน พ.ศ. 2549 และครั้งที่ 2 วันที่ 15 มกราคม พ.ศ. 2550

2. นำตัวอย่างจากข้อ 1 ไปอบในตู้อบ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดเชื้อกลุ่ม methanogenic bacteria (Kim *et al*., 2004) โดยทำการทดลองครั้งละ 2 ซ้ำ

3. นำตัวอย่างจากข้อ 2 มาละลายใน Reinforced Clostridial Media (RCM) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและทำการเจือจาง 10^{-1} - 10^{-4} เท่า

4. นำตัวอย่างที่ได้จากการเจือจางในข้อ 3 ไปเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Reinforced Clostridium Agar (RCA) (รายละเอียดดังภาคผนวก ก 1) โดยเทคนิค spread plate (รายละเอียดดังภาคผนวก ก 2) นำไปใส่ใน anaerobic jar ซึ่งในการศึกษานี้ประยุกต์ใช้ภาชนะที่มีฝาปิด และจุดเทียนไขเพื่อกำจัดออกซิเจน (รูปที่ 3.4)

5. ปิดฝาภาชนะให้สนิท แล้วพันพาราฟิล์มปิดรอบฝาอีกครั้ง เพื่อป้องกันไม่ให้อากาศเข้าไปข้างใน และปล่อยให้เทียนดับเอง

6. เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพไร้อากาศในตู้บ่ม 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48ชั่วโมง

รูปที่ 3.4 ภาชนะมีฝาปิดที่ใช้แทน Anaerobic jar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ที่มีลักษณะต่างกัน จากนั้นเลี้ยงแต่ละโคโลนีในอาหาร RCA ต่อไปโดยเทคนิค streak plate (รายละเอียดดังภาคผนวก ก 3) นำไปเลี้ยงใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

8. ตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้ด้วยการย้อมสีแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (รายละเอียดดังภาคผนวก ก 4)

9. ทำเช่นเดียวกับข้อ 7-8 จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บเป็นสต็อกเชื้อไว้ศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่อไปในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การทดลองขั้นตอนที่ 3.2.1.1 สรุปได้ดังรูปที่ 3.5

3.2.1.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่ง

มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. ใส่อาหารเหลว RCM ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร โดยใส่หลอดดักก๊าซ (durham tube) ลงไปในหลอดทดลอง แล้วปิดด้วยฝาครอบหลอดทดลองให้สนิท

2. นำหลอดทดลองที่ใส่อาหารในข้อ 1 ไปทำการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. นำออกจากหม้อนึ่งไอน้ำ ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

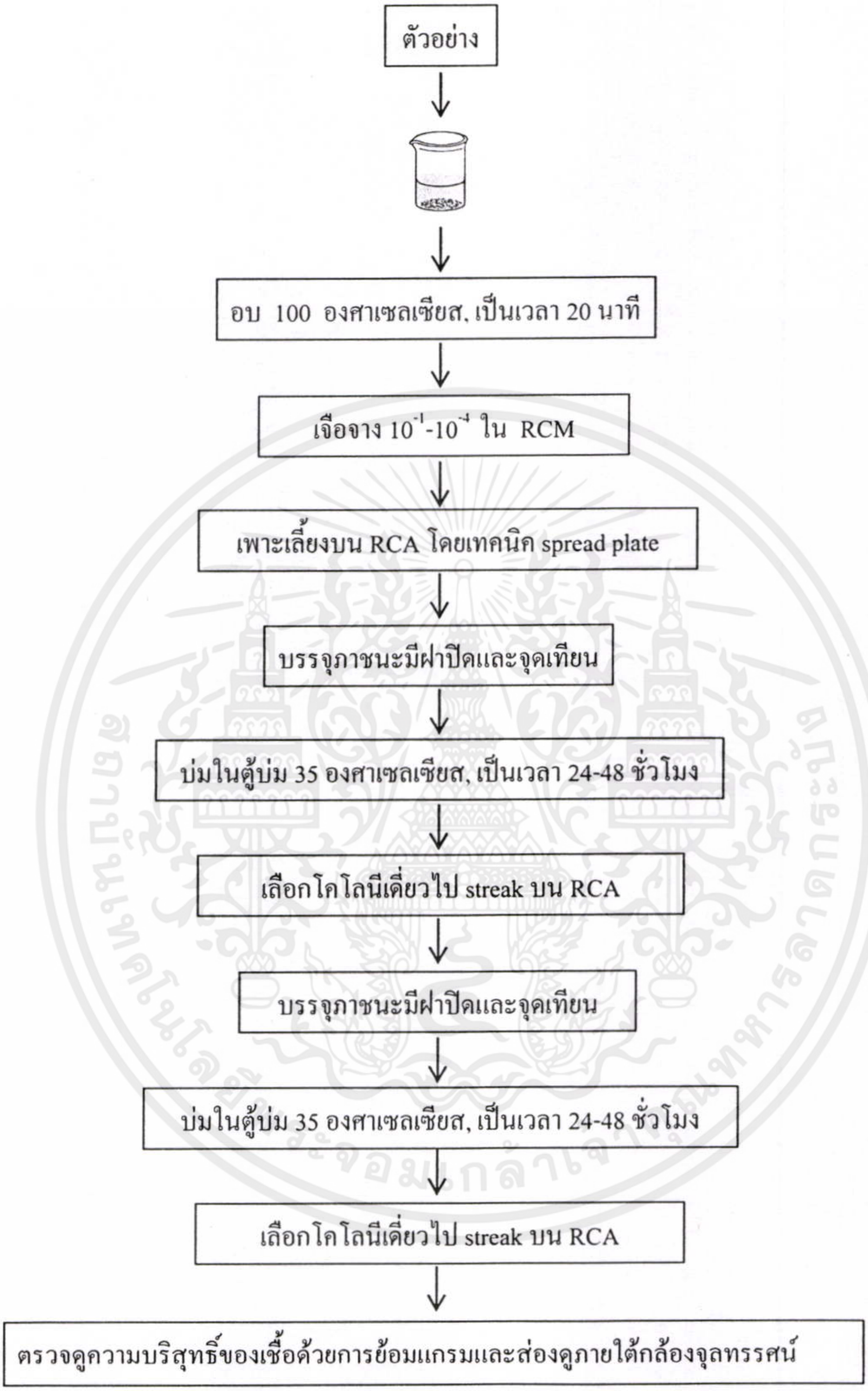
4. ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 ลงใน RCM หลอดละ 1 loop เพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

5. สังเกตปริมาณก๊าซที่ถูกผลิตขึ้นภายในหลอดดักก๊าซ นำเชื้อที่สามารถผลิตก๊าซได้ไปศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในขั้นตอนต่อไป

6. ชุดควบคุม (control) ทำเช่นเดียวกับข้อ 1-5 แต่ไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ในข้อ 4

7. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-6 อีก 2 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.5 แผนภูมิการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากวัสดุเหลือทิ้งและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การคัดเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด

3.2.2.1 การศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่ง โดยใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

1. ใส่อาหารเหลว RCM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร แล้วปิดด้วยฝาครอบหลอดทดลองให้สนิท

2. ใส่อาหารเหลว RCM ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร แล้วปิดด้วยสำลีให้สนิท

3. นำหลอดทดลองและขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารในข้อ 1 และ 2 ไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. นำออกจากหม้อนึ่งไอน้ำ ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5. ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซที่ได้จากข้อ 3.2.1.2 ลงในหลอดทดลองในข้อ 4 หลอดละ 2 loop จำนวน 2 หลอด เพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ใน ข้อ 5 ลงในขวดรูปชมพู่ ในข้อ 4 เพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7. นำหัวเชื้อที่ได้มาวัด OD_{600} และปรับความเข้มข้นของแต่ละเชื้อให้เท่ากัน โดยเจือจางเชื้อที่มีความเข้มข้นมากด้วย RCM ให้มีความเข้มข้นเท่ากับเชื้อที่มีความเข้มข้นน้อยสุด

8. ใส่อาหาร RCM ปริมาตร 630 มิลลิลิตร ในขวดดูแลน ขนาด 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

9. นำหัวเชื้อที่เตรียมในข้อ 7 ถ่ายลงในขวดหมักในข้อ 8 ให้มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (Kotay and Das, 2007; Wang *et al.*, 2003) เขย่าให้เข้ากัน ดูดอาหารออกมาขวดละ 10 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นโดยวิธีวัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปค-โตรโฟโตมิเตอร์และวิธีการนับจำนวนเซลล์โดยการ spread plate วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี Somogyi Nelson (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ข 1) และวัดพีเอชในอาหารด้วย pH meter (ตารางที่ 3.1)

10. ชุดควบคุม (control) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-3 แต่ไม่ใส่เชื้อ

11. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 7-10 อีก 2 ซ้ำ

12. เตรียมสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 800 มิลลิลิตร

13. คว่ำกระบอกตวงที่บรรจุสาร NaOH ไว้เต็ม ในอ่างน้ำที่บรรจุ NaOH ที่เตรียมในข้อ 12

14. ต่ออุปกรณ์การหมักดังรูปที่ 3.2 แต่ยังไม่ต่อส่วนที่ 2 แล้วทำการพ่นก๊าซไนโตรเจน เป็นเวลา 5 นาที เพื่อไล่ออกซิเจนออกจากขวดหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. ต่อสายยาง Tygon เข้ากับกระบอกตวงที่บรรจุสารละลาย NaOH (ส่วนที่ 2) ดังรูปที่ 3.2 โดยสารละลาย NaOH ทำหน้าที่ดักก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักส่วนตัวอย่างก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจะถูกเก็บโดยวิธีการแทนที่น้ำ

16. บันทึกปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นทุกชั่วโมง จนมีปริมาตรก๊าซคงที่ พร้อมบันทึกอุณหภูมิและความดันบรรยากาศ

17. เก็บตัวอย่างน้ำหมักไปวิเคราะห์หา growth curve ของจุลินทรีย์ โดยวิธีวัดความหนาแน่นของเซลล์และวิธีการนับจำนวนเซลล์ วัดค่าพีเอชและวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ทุกๆ 3 ชั่วโมง จนสิ้นสุดกระบวนการผลิตก๊าซ (ตารางที่ 3.1)

18. เก็บตัวอย่างก๊าซไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของก๊าซที่ผลิตขึ้นด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (GC-TCD) โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 3.2

19. เลือกเชื้อที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร RCA ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นสต็อกเชื้อในการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์และวิธีการวิเคราะห์

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์
พีเอช	pH meter
อุณหภูมิ	เทอร์โมมิเตอร์
ความดันบรรยากาศ	บารอมิเตอร์
ปริมาณน้ำตาล	Somogyi Nelson's method (Nelson, 1944 and Somogyi, 1952)
ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD)	วิธี Closed Reflux, Titrimetric method ตามวิธีมาตรฐานของ APHA, 1995
ของแข็งแขวนลอยในน้ำตะกอน (Mixed Liquor Suspended Solid, MLSS)	โดยวิธีมาตรฐานของ APHA, 1995
ก๊าซไฮโดรเจน	GC-TCD
ปริมาณของกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์	GC-MS

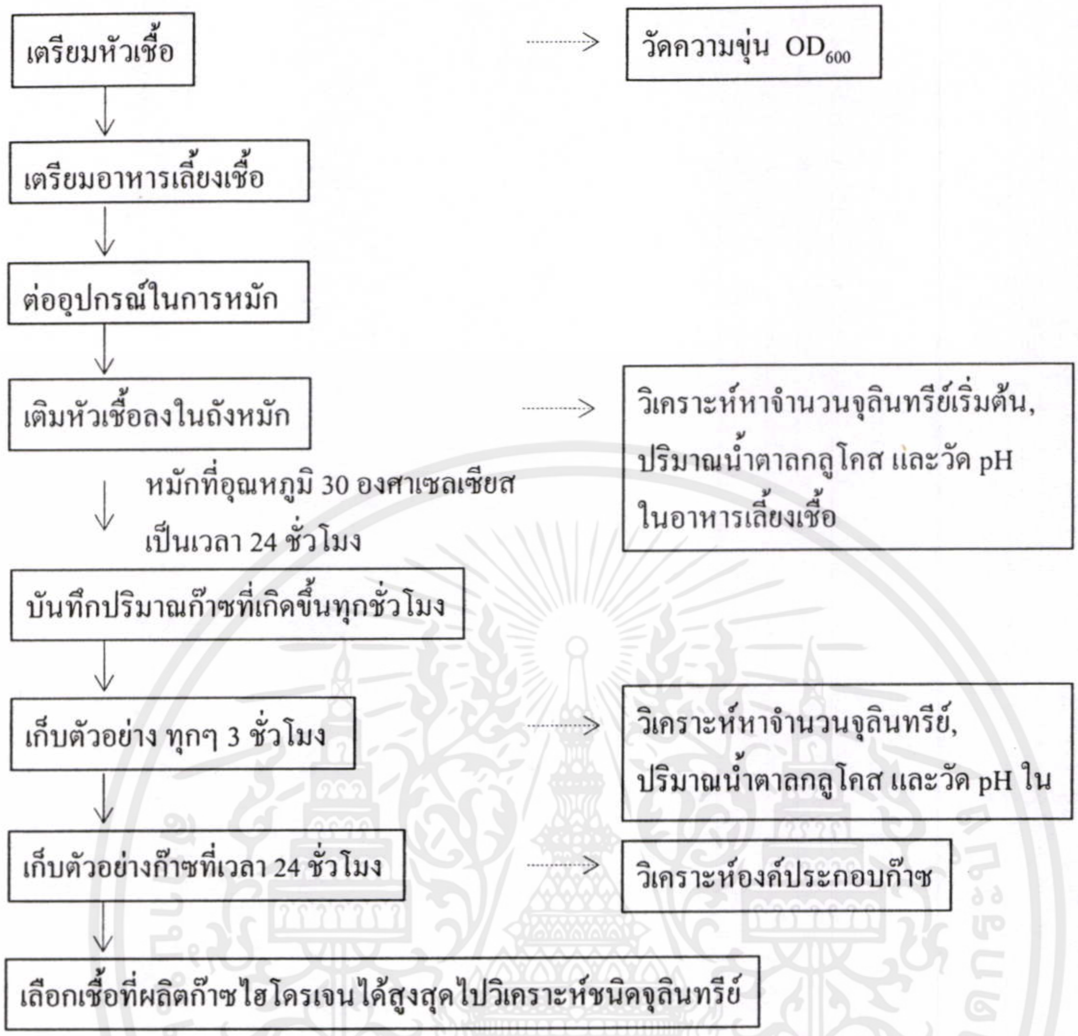
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง Gas Chromatograph - Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Gas Chromatograph	Varian model GC-CP 3800
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Column	Plot Fused Silica coating Molecular sieve 5A, 10 m x 0.53 mm i.d. x 50 µm (film thickness) column (fused-silica capillary column) (Varian, USA)
Temperature program	Injector temperature : 100 °C Oven temperature : 50 °C (initial temperature), holding at 50 °C for 5 mins, to 100 °C at 4 °C/min, holding at 100 for 2 mins Detector temperature : 150 °C
He carrier gas	Flow rate 5 ml/min (99.999 % purity)

ขั้นตอนการทดลองที่ 3.2.2 สรุปได้ดังรูปที่ 3.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.6 แผนภูมิการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อาหาร RCM เป็นแหล่งอาหาร

3.2.2.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่ง โดยใช้สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนเป็นแหล่งอาหาร

1. เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 1-7 ในหัวข้อ 3.2.2.1 และปรับความเข้มข้นของหัวเชื้อให้เท่ากับความเข้มข้นที่ใช้ในหัวข้อ 3.2.2.1

2. ใส่สลัดจ์ ปริมาตร 630 มิลลิลิตร ลงในขวดดูแลน ขนาด 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. นำหัวเชื้อที่เตรียมในข้อ 1 ถ่ายลงในขวดหมักในข้อ 2 ให้มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (Kotay and Das, 2007; Wang *et al.*, 2003) เขย่าให้เข้ากัน ดูดสลัดจ์มาขวดละ 10 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นในขวดหมักด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์โดยการ spread plate วิเคราะห์ซีโอดีด้วยวิธี Closed Reflux และวัดพีเอชเริ่มต้นในน้ำหมักด้วย pH meter (ตารางที่ 3.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ชุดควบคุม (control) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-3 แต่ไม่ใส่เชื้อ

5. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-4 อีก 2 ซ้ำ

6. เตรียมสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และต่ออุปกรณ์ที่ใช้ในการหมักเช่นเดียวกับข้อ 13-15 ในหัวข้อ 3.2.2.1

7. บันทึกปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นทุกชั่วโมง จนมีปริมาตรก๊าซคงที่ พร้อมทั้งบันทึกอุณหภูมิและความดันบรรยากาศ

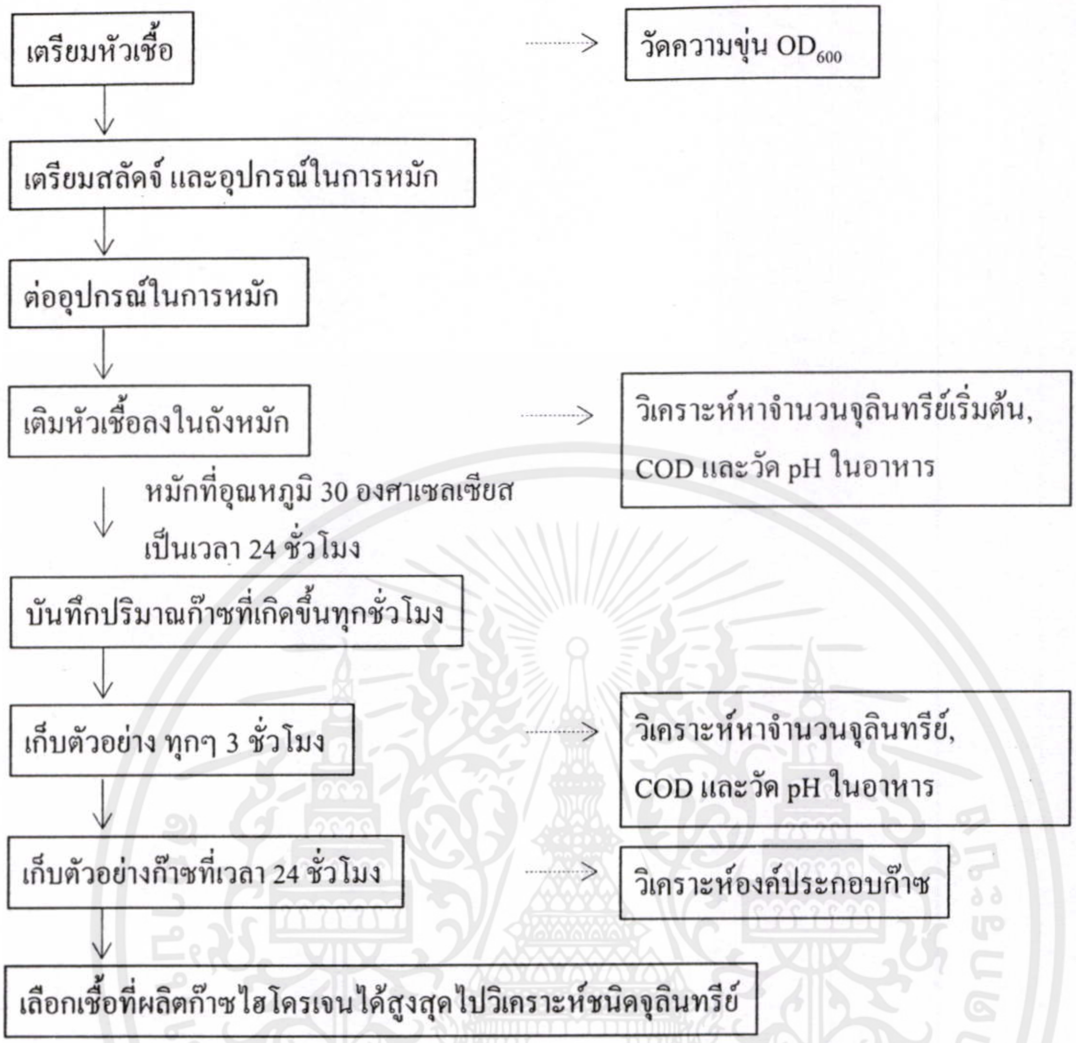
8. เก็บตัวอย่างน้ำหมักไปวิเคราะห์หา growth curve ของจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์โดยการ spread plate วัดค่าพีเอชและวิเคราะห์หาซีโอดีทุกๆ 3 ชั่วโมง จนสิ้นสุดกระบวนการผลิตก๊าซ

9. เก็บตัวอย่างก๊าซไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของก๊าซที่ผลิตขึ้นด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (GC-TCD) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตก๊าซ โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 3.2

10. เลือกเชื้อที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด มาจำแนกชนิดของเชื้อด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ใน RCA ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นสต็อกเชื้อในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

ขั้นตอนการทดลองที่ 3.2.2.2 สรุปได้ดังรูปที่ 3.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.7 แผนภูมิการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

3.2.3 การจำแนกเชื้อโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (Muyzer *et al*., 1993) ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

3.2.3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB (Luria Bertani) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เมื่อเชื้อเจริญ นำ loop มาเขี่ยเชื้อทั้งหมดลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ จากนั้นกระจายเชื้อในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย Tris-EDTA พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, ไลโซไซม์ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. เติมสารละลาย SDS 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. เติมสารละลายฟีนอลอิ่มตัว 420 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

5. ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ และนำไปสกัดด้วยสารละลายฟีนอลอิ่มตัวจนไม่เห็นตะกอนสีขาวระหว่างชั้นฟีนอลกับชั้นของน้ำ

6. ดูดส่วนใสมาเติมโซเดียมอะซีเตต ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และเติมเอทานอลความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 880 ไมโครลิตร และนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

8. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

9. เทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง

10. ละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (พีเอช 7.5) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

11. เติมสารละลาย RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

12. สกัดด้วยสารละลายฟีนอลอิ่มตัวปริมาตร 100 ไมโครลิตร

13. สกัดด้วยสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

14. สกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

15. ดูดส่วนใสด้านบนที่ได้ไปตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติมโซเดียมอะซีเตต ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเอทานอล ความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

16. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

17. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (พีเอช 7.5) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.2.3.1 มาวิเคราะห์ปริมาณบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) มีวิธีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 0.8 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA 100 มิลลิลิตร

2. นำไปให้ความร้อนในตู้ไมโครเวฟ เพื่อให้อะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3. ตั้งทิ้งไว้ให้อะกาโรสมีอุณหภูมิ ประมาณ 50 องศาเซลเซียส

4. เติมเจลสตาร์-อะกาโรส อัตราส่วน 1: 100 เขย่าเบาๆ แล้วเทลงในถาดที่มีแผ่นรองเจลและหวีเสียบ รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 นาที และดึงหวีออก

5. นำแผ่นรองเจลมาวางใน chamber ที่มีบัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA

6. นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ แล้วหยอดลงในช่องเจล (well) โดยใช้ฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII หรือ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

7. ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

8. นำแผ่นเจลที่ได้ไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.2.3.3 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

การทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ Forward DNA (5'-TCCTACGCGAGACAGCAGT-3') และไพรเมอร์ Reverse DNA (5'-TTGTGCGGGCCCCCGTCAAGT-3') (วิภาวี, 2547) และใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ 3 ขั้นตอน ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5
ดีออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (10 มิลลิโมลาร์)	1
ไพรเมอร์ Forward DNA (5 มิลลิโมลาร์)	2.5
ไพรเมอร์ Reverse DNA (5 มิลลิโมลาร์)	2.5
แมกนีเซียมคลอไรด์ (25 มิลลิโมลาร์)	3
เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5
จีโนมิกดีเอ็นเอ	1
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	34.5
ปริมาตรสุทธิ	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	Initial Denaturation	94	5 นาที
2	Denaturation (35 รอบ)	94	30 วินาที
	Annealing (35 รอบ)	50	30 วินาที
	Extension (35 รอบ)	72	1 นาที
3	Final Extension	72	10 นาที

3.2.3.4 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

หลังจากวิเคราะห์ขนาดและปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส แล้วทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่ต้องการด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) โดยโดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการใส่ลงในหลอดทดลอง เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด

2. เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน และนำ QIAquick spin column ใส่ลงใน collection tube

3. ปีเปตสารละลายดีเอ็นเอลงใน QIAquick spin column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

5. ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง และย้าย QIAquick spin column ลงในหลอดไมโคร-เซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่

6. เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และเก็บผลิตภัณฑ์ PCR ที่แยกได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^{R} 3700 DNA Analyzer แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน

3.2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

นำเชื้อที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด มาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมดังนี้

3.2.4.1 การศึกษาผลของพีเอชของสลัดจ์เริ่มต้น

1. เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 1-7 ในหัวข้อ 3.2.2.1 และปรับความเข้มข้นของหัวเชื้อให้เท่ากับความเข้มข้นที่ใช้ในหัวข้อ 3.2.2.1

2. เตรียมสลัดจ์ โดยปรับค่าพีเอชของสลัดจ์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้ได้พีเอช 7.0 ± 0.05 จากนั้นใส่สลัดจ์ ปริมาตร 630 มิลลิลิตร ลงในขวดหมักขนาด 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. นำหัวเชื้อที่เตรียมในข้อ 1 ถ่ายลงในขวดหมักในข้อ 2 ให้มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตรของสลัดจ์ (Kotay and Das, 2007; Wang *et al*., 2003) เขย่าให้เข้ากัน

4. เตรียมสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและต่ออุปกรณ์ที่ใช้ในการหมักเช่นเดียวกับในขั้นตอน 3.2.2.1

5. บันทึกปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นทุกชั่วโมง จนมีปริมาตรก๊าซคงที่ พร้อมบันทึกอุณหภูมิและความดันบรรยากาศ

6. เก็บตัวอย่างก๊าซไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของก๊าซที่ผลิตขึ้นด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (GC-TCD) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตก๊าซ สภาวะในการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3.2

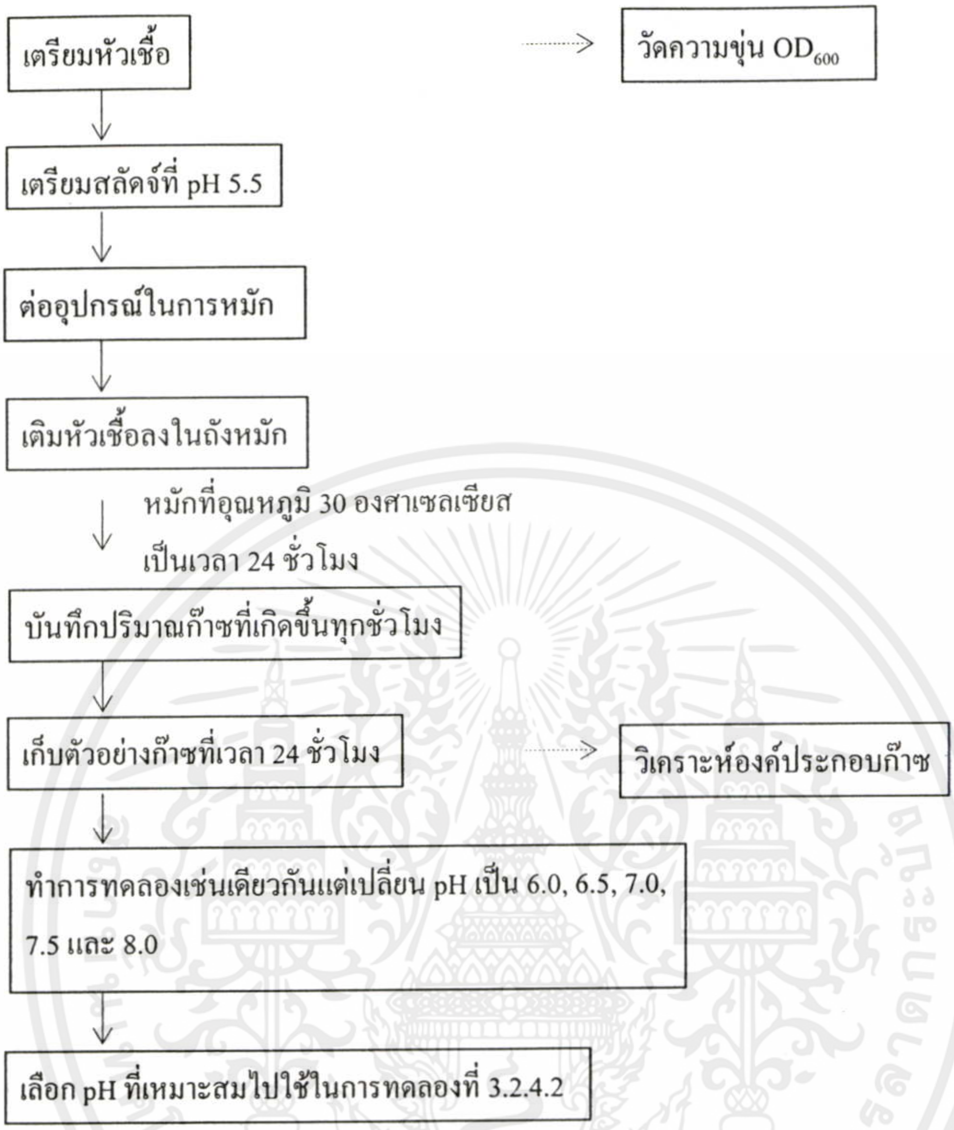
7. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-6 อีก 2 ซ้ำ

8. ทำชุดควบคุม (control) เช่นเดียวกับข้อ 1-6 แต่ไม่ใส่เชื้อ

9. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 - 8 โดยเปลี่ยนพีเอชเป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.5 และ 8.0

ขั้นตอนการทดลองที่ 3.2.4.1 สรุปได้ดังรูปที่ 3.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.8 แผนภูมิการศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

3.2.4.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้น

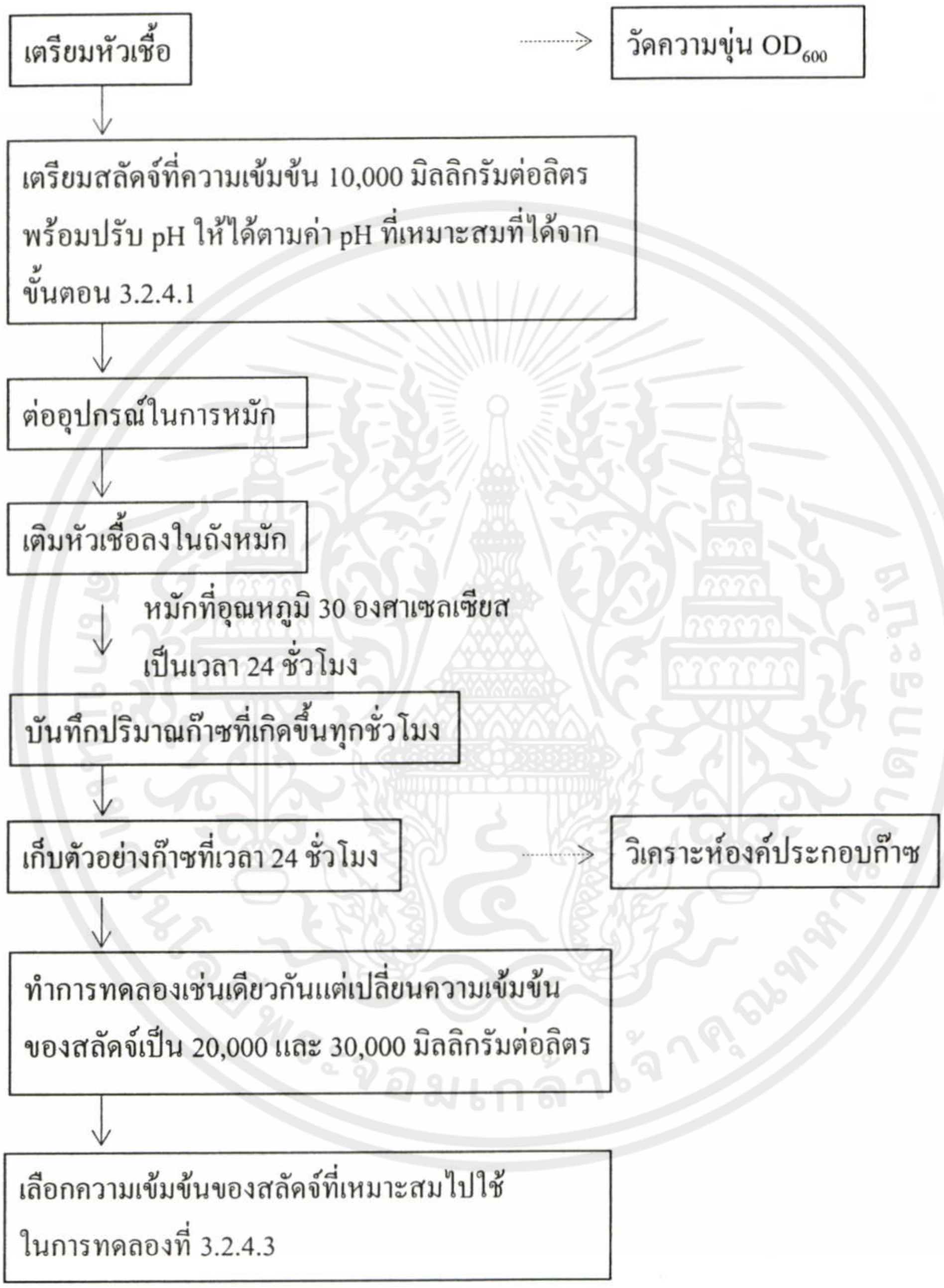
1. เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 1-7 ในหัวข้อ 3.2.2.1 และปรับความเข้มข้นของหัวเชื้อให้เท่ากับความเข้มข้นที่ใช้ในหัวข้อ 3.2.2.1

2. เตรียมสลัดจ์โดยหาค่า MLSS ของสลัดจ์เริ่มต้นก่อน จากนั้นเตรียมสลัดจ์ให้มีค่า MLSS เท่ากับ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และปรับค่าพีเอชของสลัดจ์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้ได้พีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง 3.2.4.1 จากนั้นใส่สลัดจ์ ปริมาตร 630 มิลลิลิตร ลงในขวดหมักขนาด 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3-8 ในขั้นตอน 3.2.4.1

4. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-3 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสลัดจ์เป็น 20,000 และ 30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ขั้นตอนการทดลองที่ 3.2.4.2 สรุปได้ดังรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 แผนภูมิการศึกษาผลของความเข้มข้นของสลัดจ์ต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

3.2.4.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

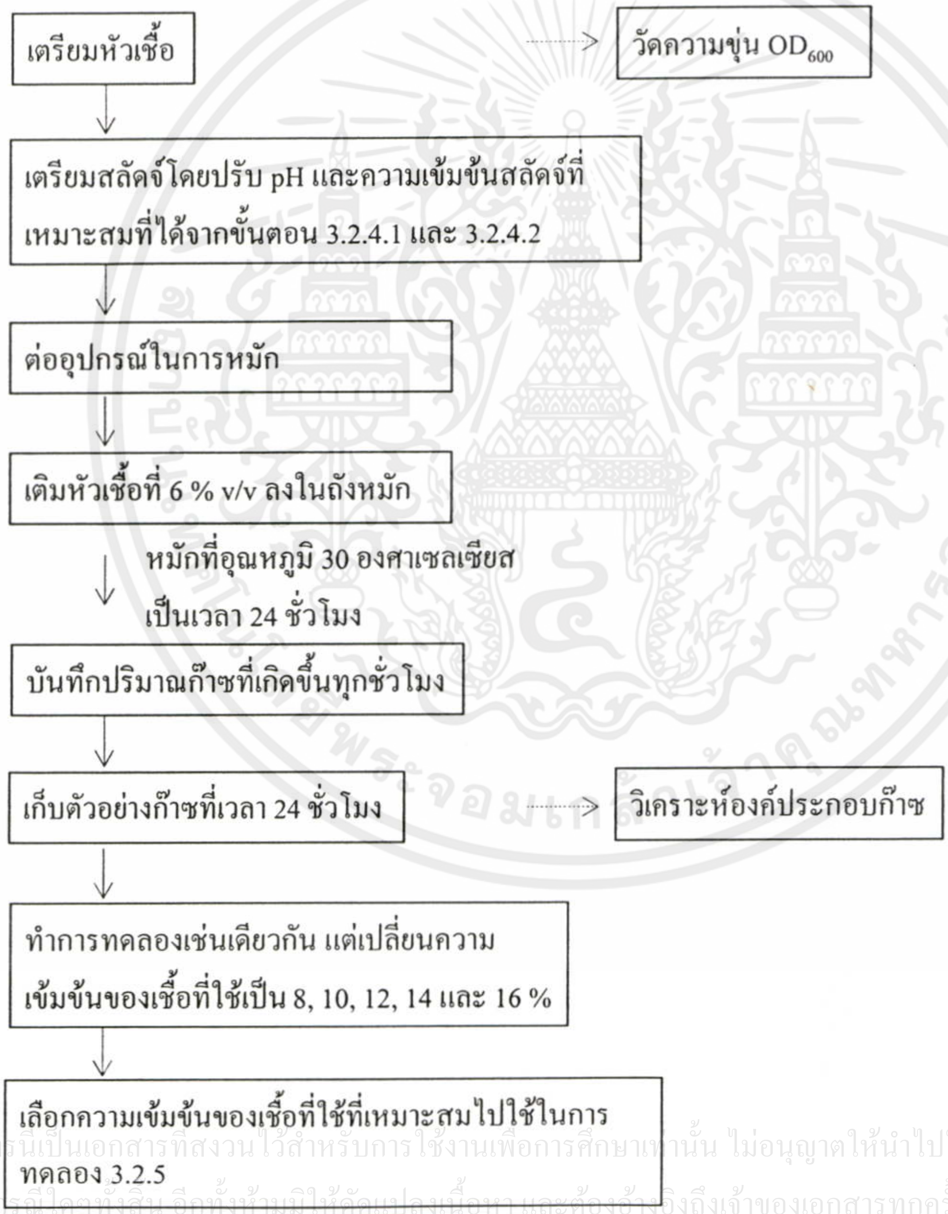
1. เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 1-7 ในหัวข้อ 3.2.2.1 และปรับความเข้มข้นของหัวเชื้อให้เท่ากับความเข้มข้นที่ใช้ในหัวข้อ 3.2.2.1

2. เตรียมสลัดจ์โดยปรับความเข้มข้นของสลัดจ์ให้เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.4.2 และและปรับค่าพีเอชด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ได้พีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.4.1 จากนั้นใส่สลัดจ์ ปริมาตร 630 มิลลิลิตร ลงในขวดหมักขนาด 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3-8 ในขั้นตอน 3.2.4.1

4. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-3 โดยเปลี่ยนปริมาตรเชื้อที่เติมลงในสลัดจ์เป็น 6, 8, 12, 14 และ 16 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของเชื้อต่อปริมาตรของอาหาร ตามลำดับ

ขั้นตอนการทดลองที่ 3.2.4.3 สรุปได้ดังรูปที่ 3.10



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.10 แผนภูมิการศึกษาผลของความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

3.2.5 การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนระหว่างเชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ได้จากการทดลองกับเชื้อ *C. butyricum*

3.2.5.1 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ได้จากการทดลองกับเชื้อ *C. butyricum* โดยใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

ในขั้นตอนนี้นำเชื้อที่ได้จากการทดลอง ทำการทดลองเช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.2.2.1 ส่วนเชื้อ *C. butyricum* มีวิธีการเตรียมหัวเชื้อดังนี้

1. ใส่อาหารเหลว RCM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 8 หลอด แล้วปิดฝาให้สนิท

2. ใส่อาหารเหลว RCM ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 8 หลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วปิดด้วยฝาให้สนิท

3. นำสต็อกเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว RCM ใส่ลงอาหารในข้อ 1 หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 8 หลอด และเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 3 ถ่ายลงอาหารในข้อ 2 ในแต่ละหลอด และเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. ถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 4 รวมกันในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปวัด OD_{600} และปรับความเข้มข้นให้เท่ากับความเข้มข้นของหัวเชื้อที่ใช้ในหัวข้อ 3.2.2.1

6. ทำการลองเช่นเดียวกับ ข้อ 8-19 ในหัวข้อ 3.2.2.1

3.2.5.2 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ได้จากการทดลองกับเชื้อ *C. butyricum* โดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

1. เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 1-7 ในหัวข้อ 3.2.2.1 และปรับความเข้มข้นของหัวเชื้อให้เท่ากับความเข้มข้นที่ใช้ในหัวข้อ 3.2.2.1

2. เตรียมตัวอย่างสลัดจ์โดยปรับความเข้มข้นของสลัดจ์ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.4.2 และและปรับค่าพีเอชด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ได้พีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.4.1 จากนั้นใส่สลัดจ์ ปริมาตร 630 มิลลิลิตร ลงในขวดหมักขนาด 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. นำหัวเชื้อที่เตรียมในข้อ 1 ถ่ายลงในขวดหมักในข้อ 2 โดยเติมตามปริมาตรเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.4.3 เขย่าให้เข้ากัน ดูดสลัดจ์มาขวดละ 50 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์โดยการ spread plate ส่วน ซีโอดี, กรดไขมันระเหยง่าย และวัดพีเอชในขวดหมักด้วยวิธีมาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 3.1

4. ต่ออุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก เก็บก๊าซที่เกิดขึ้นโดยวิธีแทนที่ในสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. บันทึกปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นทุกชั่วโมง จนมีปริมาตรก๊าซคงที่ พร้อมบันทึกอุณหภูมิและความดันบรรยากาศ

6. ดูดสลัดจ์มาขวดละ 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 3 ชั่วโมง ไปวัดค่าพีเอชและซีโอดี ด้วยวิธีมาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 3.1 ส่วนกรดไขมันระเหยง่ายใช้วิธีการสกัดด้วย SPME และวิเคราะห์ด้วย GC-MS สภาวะในการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3.5

7. เก็บตัวอย่างก๊าซไปหาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของก๊าซที่ผลิตขึ้นด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (GC-TCD) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตก๊าซ สภาวะในการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3.2

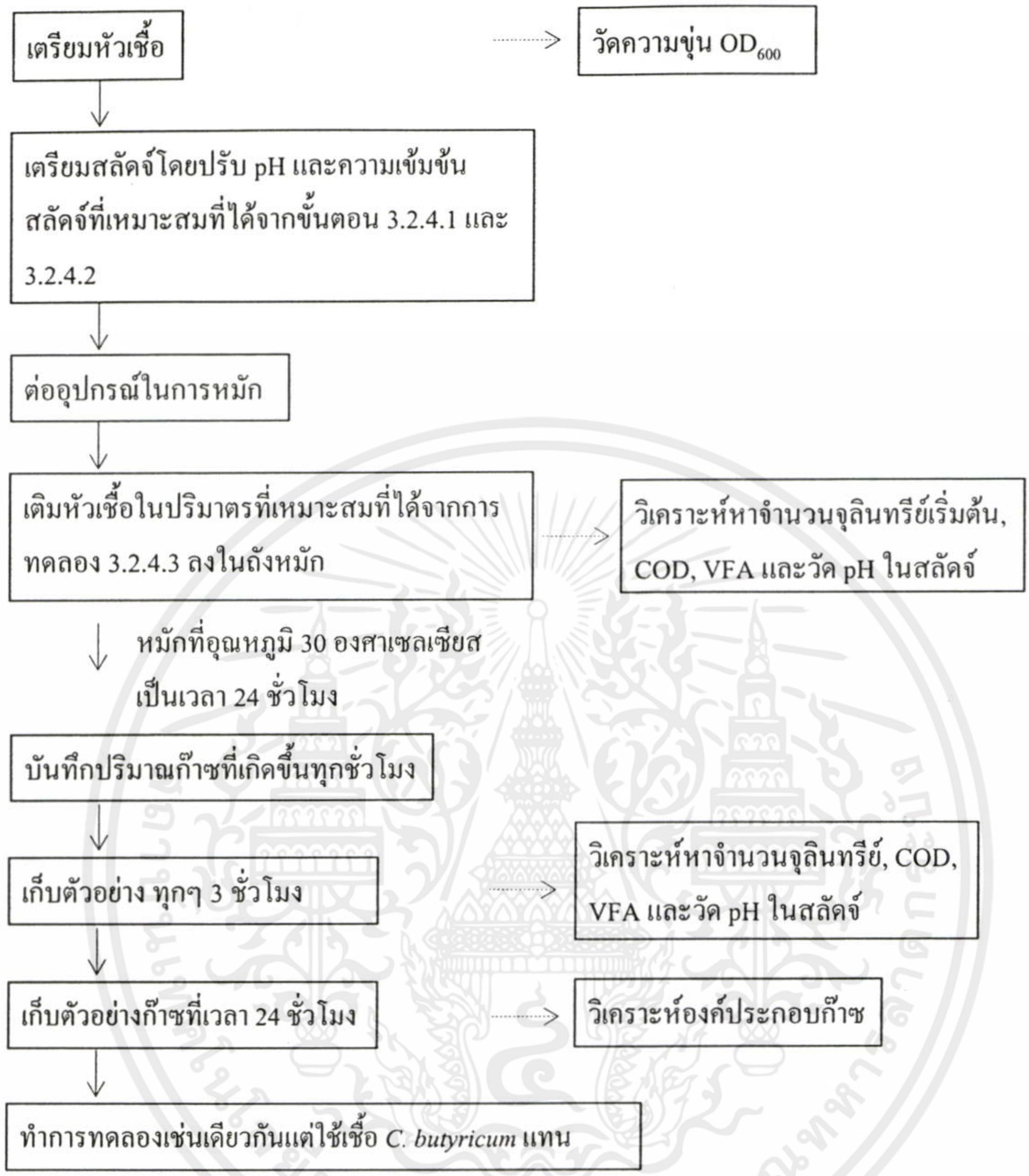
8. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-7 อีก 2 ซ้ำ

9. ชุดควบคุม (control) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-7 แต่ไม่ใส่เชื้อ

10. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-9 แต่ใช้เชื้อ *C. butyricum* แทน ซึ่งการเตรียมหัวเชื้อทำเช่นเดียวกับข้อ 1-5 ในหัวข้อ 3.2 5.1

ขั้นตอนการทดลองที่ 3.2.5.1 สรุปได้ดังรูปที่ 3.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.11 แผนภูมิการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. butyricum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.5 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดอินทรีย์โดยวิธีการสกัดด้วย SPME และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph – Mass spectrometer (GC-MS)

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
SPME conditions	
SPME	65 μm StableFlex™ PDME/DVB (Supelco, USA)
Sampling condition	25 mins stirring (Dias and Freeman, 1997)
GC conditions	
Gas Chromatograph	6890N (Agilent Technologies, USA)
Column	DB-FFAP 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.50 μm capillary column (J&W scientific, USA.)
Temperature Program	Injector temperature : 230 °C Oven temperature : 50 °C (initial temperature), holding at 50 °C for 8 mins, then increased from 50 °C to 160°C at 4 °C/min, holding at 160 °C for 1 min. Detector temperature : 280 °C
Injection mode	Split ratio 100 : 1
Helium Carrier gas	Flow rate 1 ml/min (99.999 % purity) (Praxair (Thailand) Co., Ltd.)
Mass Spectrometer conditions	
Detector	Mass Spectrometer 5973N (Agilent Technologies, USA)
MS mode	EI mode
Mass range / scan speed	30 – 500 amu / sec.
Transfer line temperature	160 °C
Filament / Multiplier delay	3 mins.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากวัสดุเหลือทิ้ง

ผลการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากวัสดุเหลือทิ้ง 3 แหล่ง ได้แก่ สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน น้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะชุมชน และปุ๋ยคอกมูลวัว โดยนำมาผ่านการบำบัดเบื้องต้นด้วยวิธีการอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดเชื้อกลุ่ม methanogenic bacteria (Kim *et al*., 2004) เมื่อนำมาแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Reinforced Clostridium Agar (RCA) ที่พีเอช 6.8 และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสายพันธุ์จุลินทรีย์ (isolate) ที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 มีจำนวนทั้งหมด 70 ไอโซเลท และได้จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 มีจำนวนทั้งหมด 65 ไอโซเลท แบ่งออกเป็นจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากสลัดจ์โรงบำบัดน้ำเสียชุมชน 32 ไอโซเลท จากน้ำชะขยะ 59 ไอโซเลท และจากปุ๋ยคอกมูลวัว 44 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลทจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากวัสดุเหลือทิ้ง 3 แหล่ง

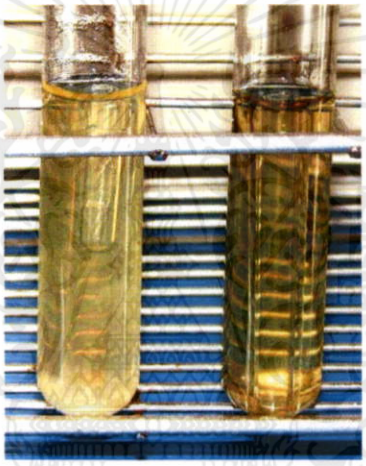
แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	ครั้งที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทจุลินทรีย์		
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	รวม
สลัดจ์โรงบำบัดน้ำเสียชุมชน	1	วันที่ 18 สิงหาคม 2549	12	20	32
	2	วันที่ 2 ธันวาคม 2549			
น้ำชะขยะ	1	วันที่ 17 ตุลาคม 2549	34	25	59
	2	วันที่ 27 ธันวาคม 2549			
ปุ๋ยคอกมูลวัว	1	วันที่ 14 พฤศจิกายน 2549	24	20	44
	2	วันที่ 15 มกราคม 2550			
รวม			70	65	135

4.2 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่ง และการศึกษาลักษณะของเชื้อเบื้องต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น

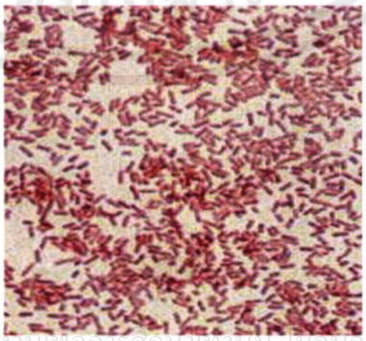
ผลการทดลองหาความสามารถในการผลิตก๊าซของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ทั้ง 135 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผลการทดลองที่ 4.1 โดยนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว Reinforced

Clostridial Media (RCM) ที่พีเอช 6.8 โดยภายในหลอดจะมีหลอดดักก๊าซ (durham tube) บ่มภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ 6 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากสลัดจ์โรงบำบัดน้ำเสียชุมชนสามารถผลิตก๊าซได้ สังเกตจากก๊าซที่เกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ (รูปที่ 4.1) โดยคัดแยกได้จากการเก็บตัวอย่างสลัดจ์ครั้งที่ 1 จำนวน 4 ไอโซเลท (S1-S4) และคัดแยกได้จากการเก็บตัวอย่างสลัดจ์ครั้งที่ 2 จำนวน 2 ไอโซเลท (S5-S6) และเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซได้นี้มาย้อมสีแกรม และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า จุลินทรีย์ทั้งหมดที่สามารถผลิตก๊าซได้มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของแกรมลบ (รูปที่ 4.2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jalal *et al*. (2006) และ Ranalli *et al*. (2000) ที่ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่ติดแกรมลบและมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น



ก **ข**

รูปที่ 4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซของเชื้อที่ได้จากการคัดแยกในอาหาร RCM ที่มีหลอดดักก๊าซ (ก) ตัวอย่าง (ข) ชุดควบคุม (ไม่ได้ใส่เชื้อ)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

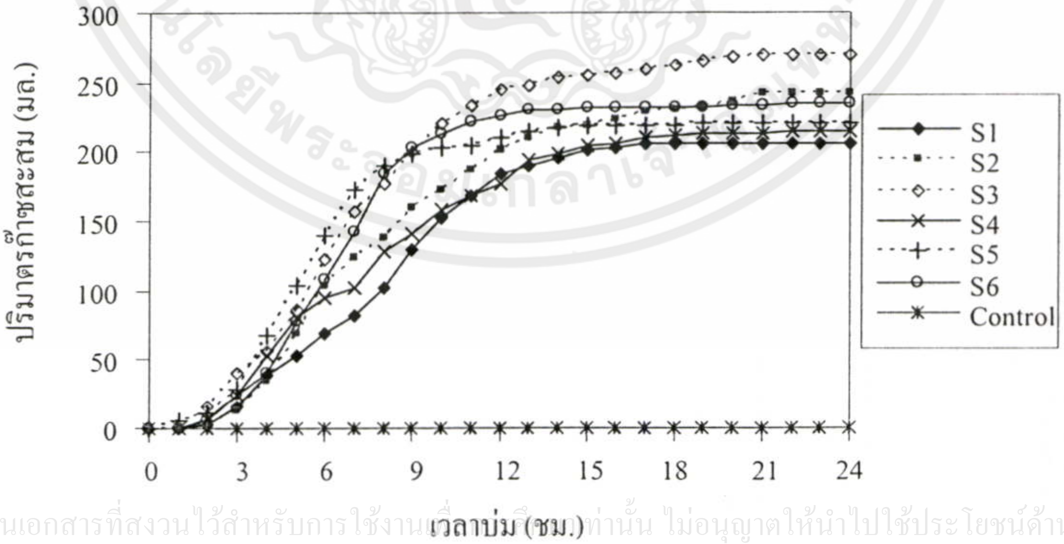
รูปที่ 4.2 ลักษณะเซลล์จุลินทรีย์และการติดสีแกรมลบของเชื้อไอโซเลท S3 ที่คัดแยกได้จากสลัดจ์

อย่างไรก็ตาม ในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำชะขยะ และปุ๋ยคอกมูลวัวครั้งนี้ไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะตัวอย่างน้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบที่ใช้ในการทดลองมีค่าพีเอช 8.0 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่มีการผลิตก๊าซมีเทนโดยเชื้อกลุ่ม methanogenic bacteria (Tchobanoglous and O' Leary, 1994) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะเจริญได้ดีที่พีเอช 5.5-6.7 (Shin *et al.*, 2007) นอกจากนี้ เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนยังเป็นเชื้อในกลุ่ม obligate anaerobic bacteria (Fang *et al.*, 2002) จึงอาจไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน anaerobic jar ที่ใช้การจุดเทียนไขในภาชนะปิด ซึ่งอาจไม่สามารถกำจัดออกซิเจนได้ทั้งหมด ส่วนปุ๋ยคอกมูลวัวที่ใช้ในการทดลองมีลักษณะแห้ง เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถอยู่ในปุ๋ยคอกมูลวัวจึงเป็นกลุ่มที่สร้างสปอร์ซึ่งทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี เช่น เชื้อกลุ่ม *Clostridium* sp. (Fan *et al.*, 2004) ที่เป็นเชื้อกลุ่ม obligate anaerobic bacteria และสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ อย่างไรก็ตาม สภาวะการทดลองที่ใช้อาจมีก๊าซออกซิเจนปนเปื้อน ทำให้เชื้อกลุ่ม obligate anaerobic bacteria ไม่สามารถเจริญเติบโตได้

4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่ง โดยใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

4.3.1 อัตราการผลิตก๊าซ

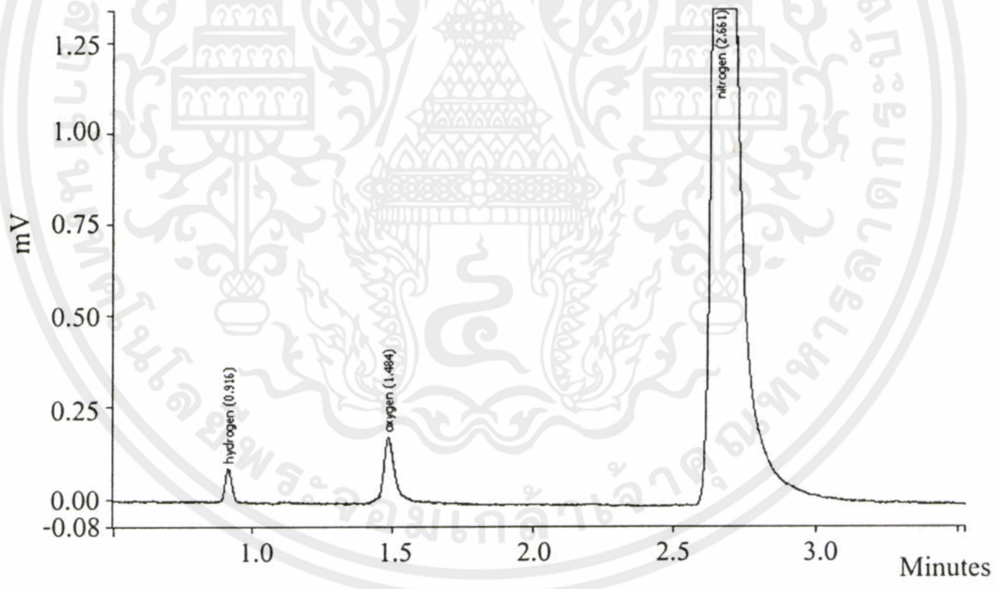
ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ที่คัดแยกได้จากผลการทดลองที่ 4.2 แสดงดังรูปที่ 4.3



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3 ปริมาตรก๊าซสะสมของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.2 พบปริมาตรก๊าซสะสมในเวลา 24 ชั่วโมง ที่ STP ของเชื้อไอโซเลท S3 มากที่สุด โดยสามารถผลิตได้ 269.92 มิลลิลิตร รองลงมา คือไอโซเลท S2, S6, S5, S4 และ S1 สามารถผลิตก๊าซได้ 241.96, 234.63, 220.39, 214.71 และ 205.63 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยไอโซเลท S1-S6 เริ่มมีการผลิตก๊าซหลังชั่วโมงที่ 2 จากนั้นจะผลิตก๊าซอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 2-8 หลังจากชั่วโมงที่ 8 อัตราการผลิตก๊าซจะลดลง และเริ่มคงที่ที่ชั่วโมงที่ 12 ส่วนชุดควบคุม ซึ่งไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย ไม่พบก๊าซ (ดูรายละเอียดในตารางที่ ค 1.1 ภาคผนวก ค) จากกระบวนการหมักแบบครั้ง พบก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซออกซิเจน และก๊าซไนโตรเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ไม่พบพีคของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากในการเก็บก๊าซครั้งนี้ใช้หลักการแทนที่น้ำโดยใช้สารละลาย 10 % NaOH ในการกำจัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก (Tanisho *et al.*, 1995) ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับสารละลาย NaOH ดังปฏิกิริยาที่ 4.1-4.2 ส่วนก๊าซไนโตรเจนเกิดจากการพ่นก๊าซไนโตรเจนในถังหมักเพื่อไล่ก๊าซออกซิเจน และก๊าซออกซิเจนอาจเกิดจากการไล่ออกซิเจนออกจากระบบไม่ดีพอ หรือเกิดการปนเปื้อนของอากาศในขณะเก็บตัวอย่างอากาศ



รูปที่ 4.4 โครมาโตรแกรมก๊าซไฮโดรเจนที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-TCD

$$CO_2\,(g) + NaOH \longrightarrow NaHCO_3 \quad (4.1)$$

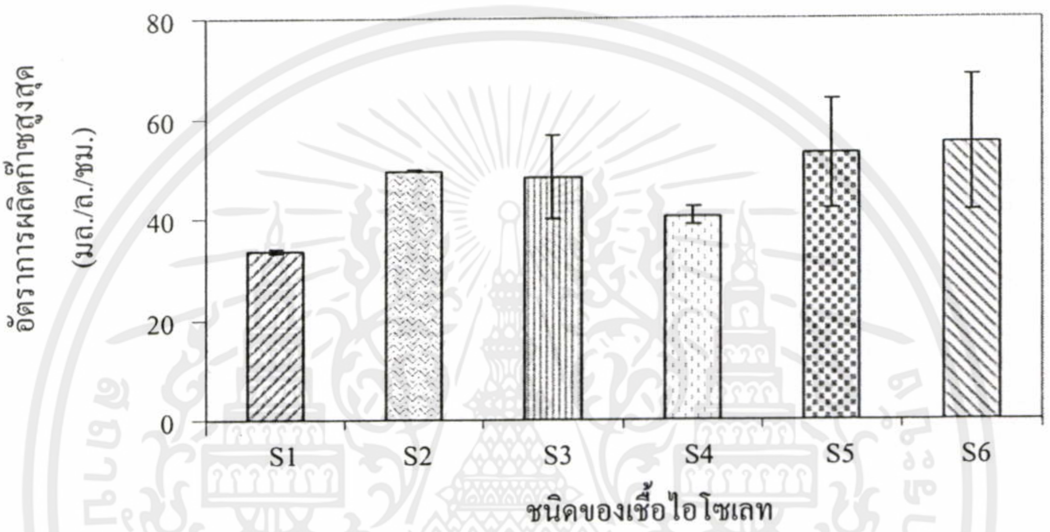
$$NaHCO_3 + NaOH \longrightarrow Na_2CO_3 + H_2O \quad (4.2)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้อมูลในรูปที่ 4.3 สามารถคำนวณอัตราการผลิตก๊าซสูงสุด โดยใช้สมการที่ 4.3

อัตราการผลิตก๊าซสูงสุด = $\dfrac{\text{ปริมาตรก๊าซสะสมช่วงเวลาที่มีการผลิตก๊าซสูงสุด (มล.)}}{\text{ปริมาตรอาหาร (ล.) x เวลา (ชม.)}}$ (4.3)

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อไอโซเลท S1 มีอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดในชั่วโมงที่ 7-10 ส่วนเชื้อไอโซเลท S2, S3, S4, S5 และ S6 มีอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดในชั่วโมงที่ 4-6, 4-7, 3-5, 3-6 และ 4-5 ตามลำดับ โดยอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S1-S6 แสดงดังรูปที่ 4.5



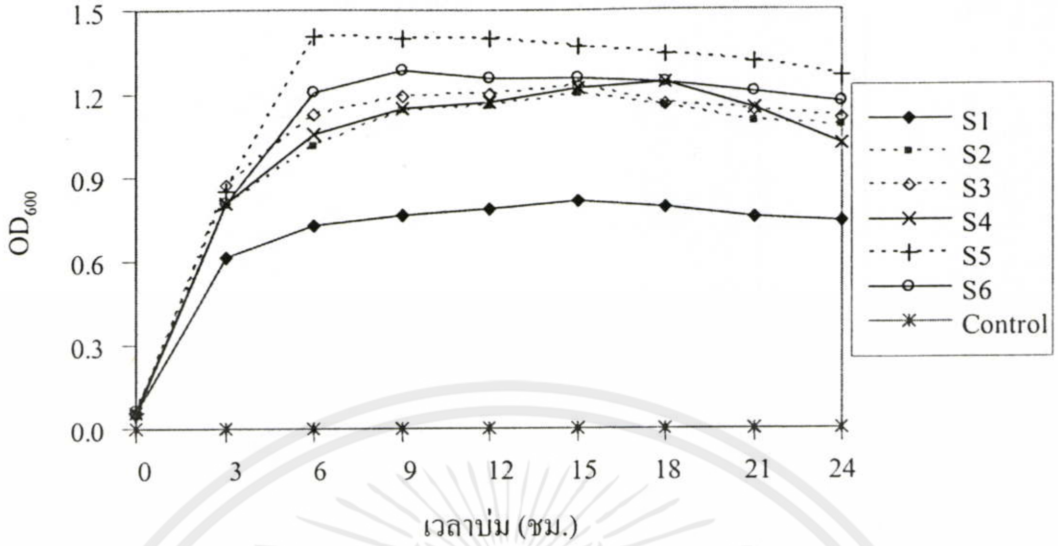
รูปที่ 4.5 อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.5 แสดงอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อนำค่าอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดมาคำนวณผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA พบว่า อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S2-S6 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ดูรายละเอียดในตารางที่ ง 1 ภาคผนวก ง) โดยเชื้อไอโซเลท S6 มีอัตราการผลิตก๊าซเท่ากับ 55.02±13.41 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมา คือ ไอโซเลท S5, S2, S3, S4, และ S1 มีค่าเท่ากับ 53.03±10.93, 49.70±0.37, 48.30±8.33, 40.48±1.80 และ 33.56±0.35 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

4.3.2 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ที่คัดแยกได้ ในช่วงการหมักที่เวลาต่างๆ โดยวิธีการวัด OD_{600} และวิธีการนับจำนวนเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ

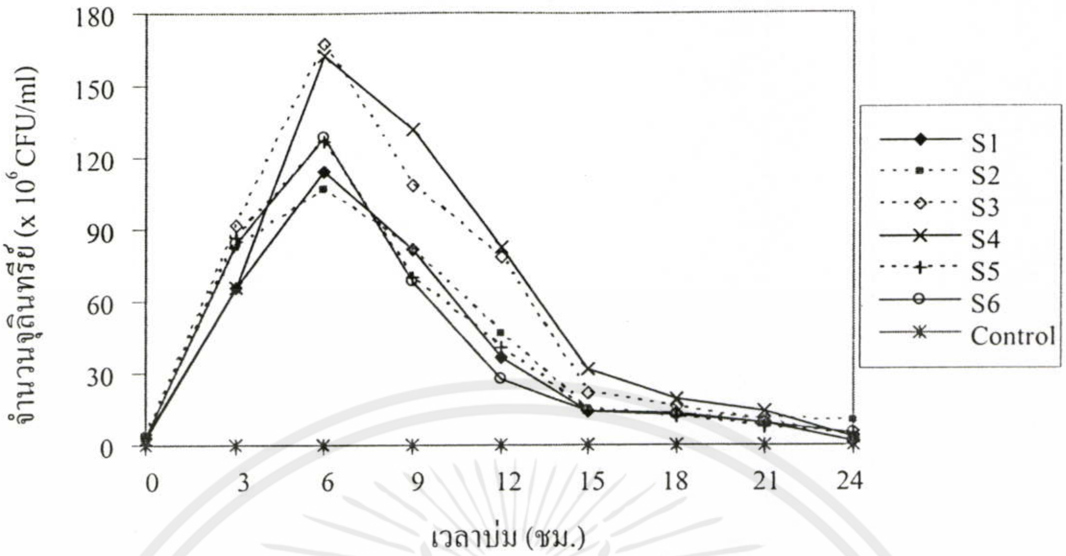
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งการนำมาใช้ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในช่วงการหมักที่เวลาต่างๆ โดยวิธีการวัด OD_{600} เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.6 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S1-S6 (รายละเอียดแสดงในตารางที่ ค 1.2 ภาคผนวก ค) โดยการเจริญเติบโตสามารถวัดโดยวิธีวัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Minnan *et al.*, 2005) ซึ่งวิธีนี้เป็นการวัดความหนาแน่นของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยไม่คำนึงถึงการมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ ในการทดลองนี้พบว่า เชื้อไอโซเลท S2-S6 มีการเจริญเติบโตแนวโน้มเดียวกัน โดยมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-6 ชั่วโมง ส่วนเชื้อไอโซเลท S1 มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-3 ชั่วโมง และหลังจากชั่วโมงที่ 6 ค่าความหนาแน่นของเซลล์จะเริ่มคงที่ อาจเป็นเพราะเชื้อจุลินทรีย์มีอัตราการตายมากกว่าอัตราการเจริญเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการผลิตก๊าซที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 6 ชั่วโมงแรก จากนั้นปริมาตรก๊าซเริ่มลดลงและเริ่มคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Shin *et al.* (2007) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้เชื้อ *Enterobacter asburiae* SNU-1 และใช้อาหาร peptone yeast extract glucose medium (PYG) พีเอชอาหารเริ่มต้น 7.2 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์เริ่มมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนขึ้นในระยะ log phase วิธีการวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีการวัดความหนาแน่นของเซลล์เป็นวิธีที่ง่าย แต่ไม่สามารถศึกษาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งมีผลต่ออัตราการผลิตก๊าซ ในการทดลองจึงใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ร่วมด้วย ได้ผลดังรูปที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



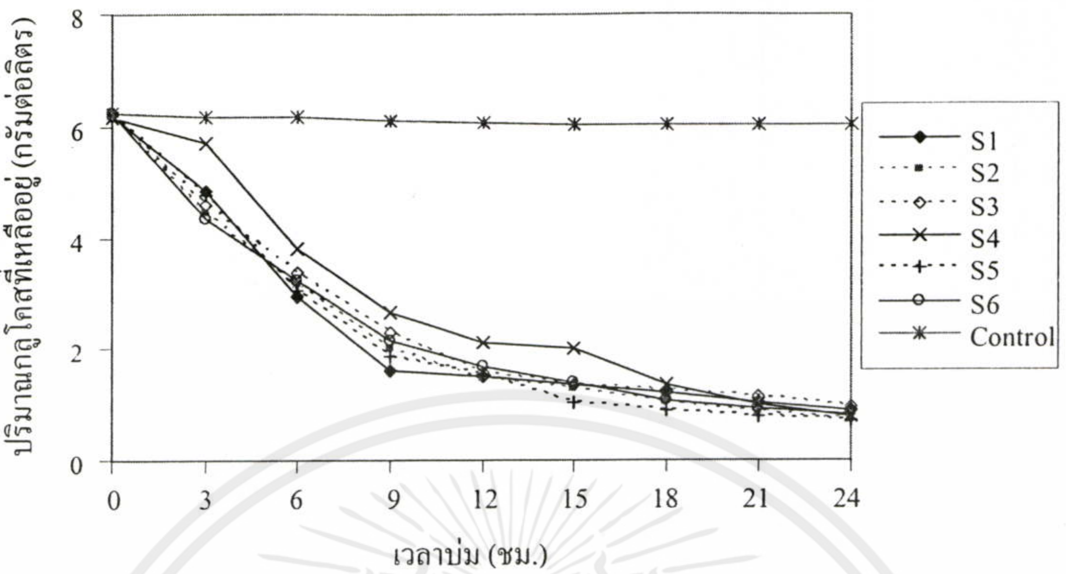
รูปที่ 4.7 การเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในช่วงเวลาหมักต่างๆ โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.7 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S1-S6 โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 1.3 ภาคผนวก ค) ซึ่งวิธีนี้จะแสดงเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ การทดลองนี้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วในช่วง 0-6 ชั่วโมง หรือเรียกว่าอยู่ในระยะ log phase ซึ่งมีแนวโน้มการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์คล้ายกับวิธีการวัดความหนาแน่นของเซลล์ (รูปที่ 4.6) แต่หลังจากชั่วโมงที่ 6 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์จะเริ่มลดลงและคงที่ที่ชั่วโมงที่ 15 อาจเนื่องมาจากอาหารเริ่มหมดลง เชื้อจุลินทรีย์บางส่วนเริ่มตายลง การแบ่งเซลล์มีจำนวนลดลง จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีจำนวนลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองอัตราการผลิตก๊าซ (รูปที่ 4.3)

4.3.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลการศึกษาการลดลงของกลูโคสที่เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ที่คัดแยกได้ ในช่วงการหมักที่เวลาต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



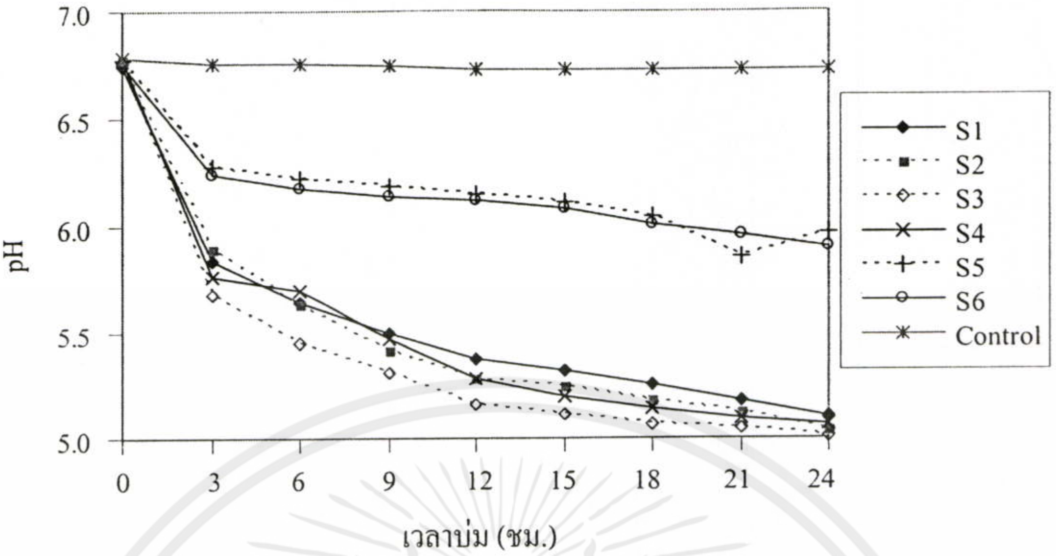
รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาหมักต่างๆ ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.8 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสในอาหาร RCM ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi Nelson ซึ่งได้ข้อมูลจาก ณัฐพร และคณะ (2551) พบว่าการลดลงของน้ำตาลกลูโคสสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยดูจากจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.7) ในการทดลองนี้พบปริมาณกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-9 ชั่วโมง (รูปที่ 4.8) (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 1.4-ค 1.6 และรูปที่ ค 1.1 ภาคผนวก ค) เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์มีการใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในช่วงเวลาดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Shin *et al.* (2007) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกลูโคสในช่วงเวลาต่างๆ ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อ *Enterobacter asburiae* SNU-1 พบว่า ในช่วงเวลาที่กลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วนั้น การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน

4.3.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการหมัก

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการหมักของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ที่คัดแยกได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่างการหมักเมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.9 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าในระหว่างที่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทจะมีค่าพีเอชลดลง และเชื้อไอโซเลท S1, S2, S3 และ S4 มีค่าพีเอชลดลงจากประมาณ 6.8 เป็น 5.0-5.1 ส่วน S5 และ S6 มีค่าพีเอชลดลงจากประมาณ 6.8 เป็น 5.9-6.0 (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1.7 ค ภาคผนวก ค) การลดลงของค่าพีเอชในกระบวนการหมักอาจเกิดจากการสะสมของกรดอินทรีย์ ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไร้อากาศ เช่น กรดอะซิติก กรดโปรปิโอนิก เป็นต้น ดังปฏิกิริยา 4.4 และ 4.5 Chen *et al.* (2005) ได้ศึกษากรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน พบว่า กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดโปรปิโอนิก กรดบิวทิริก นอกจากนี้ ยังเกิดก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้น

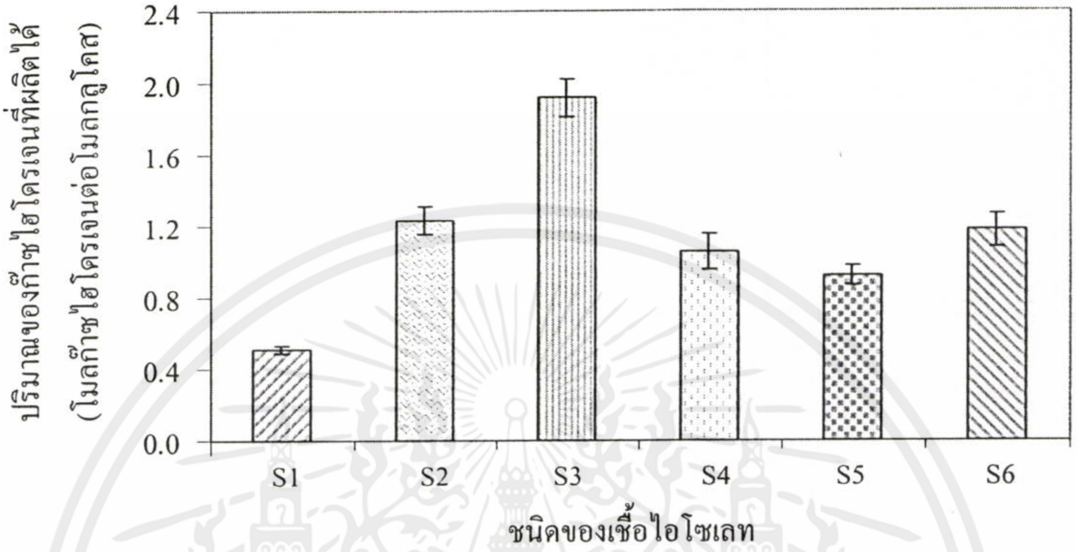
$$C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O \longrightarrow 2\,CH_3COOH + 4\,H_2\,(g) + 2\,CO_2\,(g) \quad (4.4)$$

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2\,H_2\,(g) + 2\,CO_2\,(g) \quad (4.5)$$

จากรูปที่ 4.9 สามารถแบ่งชนิดของจุลินทรีย์ตามเมตาบอลิซึมของกลูโคสออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรก คือ เชื้อไอโซเลท S5 และ S6 เป็นกลุ่มที่ผลิตกรดอินทรีย์ได้ในปริมาณต่ำ จึงทำให้ค่าพีเอชลดลงน้อย ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ เชื้อไอโซเลท S1, S2, S3 และ S4 เป็นกลุ่มที่ผลิตกรดอินทรีย์ได้ในปริมาณสูง จึงทำให้ค่าพีเอชลดลงมาก

4.3.5 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ต่อโมลกลูโคส

ผลการศึกษาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ต่อโมลกลูโคสของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ที่คัดแยกได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่างการหมัก เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.10 แสดงปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ (hydrogen yield) เชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท เมื่อนำปริมาณก๊าซไฮโดรเจนมาคำนวณผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA พบว่า เชื้อไอโซเลท S3 มีค่าปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ง 2 ภาคผนวก ง) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.92±0.10 โมลก๊าซไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส รองลงมา คือ เชื้อไอโซเลท S2, S6, S4, S5 และ S1 มีค่าเท่ากับ 1.23±0.07, 1.17±0.09, 1.06±0.10, 0.92±0.06 และ 0.51±0.02 โมลก๊าซไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 1.8-ค 1.9 และรูปที่ ค 1.2 ภาคผนวก ค) จากผลการทดลอง พบว่า เชื้อไอโซเลท S3 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Chittibabu *et al.* (2006) ที่ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้เชื้อ *Escherichia coli* BL-21 พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 0.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 2.3 โมลก๊าซไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทเมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

พารามิเตอร์		เชื้อไอโซเลท					
		S1	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**	**S6**
ปริมาตรก๊าซสะสม (มล.) ที่ STP		205.63	241.96	269.92	214.71	220.39	234.63
ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ (โมลก๊าซไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส)[a]		0.51±0.02	1.23±0.07	1.92±0.10	1.06±0.10	0.92±0.06	1.17±0.09
อัตราการผลิตก๊าซสูงสุด (มล./ล/ชม.)[b]		33.56±0.35	49.70±0.37	48.30±8.33	40.48±1.80	53.03±10.93	55.02±13.41
จำนวนเซลล์จุลินทรีย์[c]	Total plate count (x 10^6 CFU/ml)	114.00	107.00	167.67	162.33	127.00±3.61	128.67
	OD_{600}	0.732	1.016	1.127	1.060	1.410±0.044	1.205
พีเอช	เริ่มต้น	6.75	6.77	6.67	6.78	6.77±0.01	6.67
	สุดท้าย	5.11	5.04	5.01	5.07	5.96±0.02	5.90

[a] คือ ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ = โมลก๊าซไฮโดรเจน/โมลกลูโคสที่ถูกย่อยสลาย

[b] คือ อัตราการผลิตก๊าซ = ปริมาตรก๊าซสะสมสูงสุด (มิลลิลิตร)/เวลาที่ใช้ในการผลิตก๊าซสูงสุด (ชั่วโมง)/ปริมาตรอาหารทั้งหมด (ลิตร)

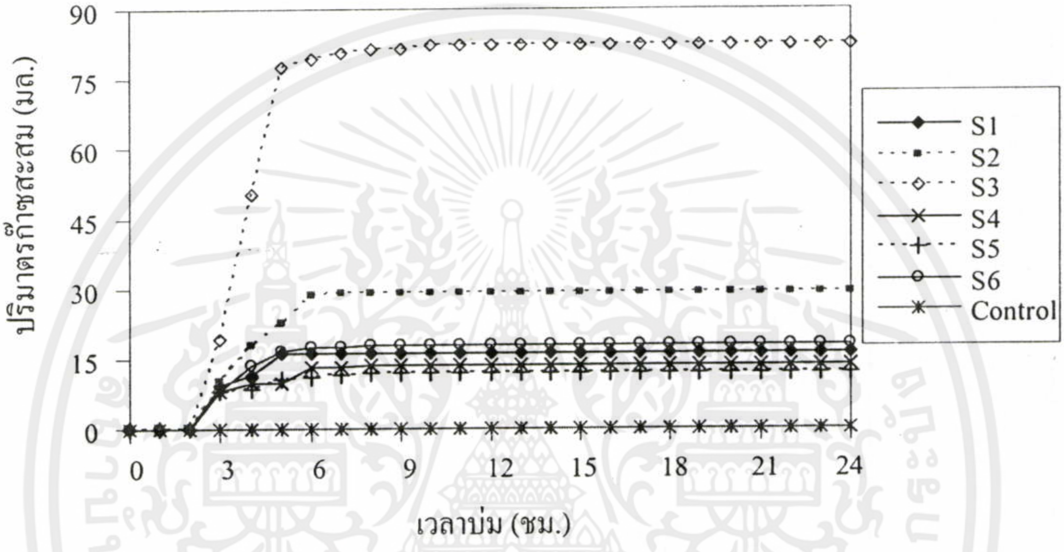
[c] คือ จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เวลาบ่ม ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งเป็นเวลาที่มีจำนวนจุลินทรีย์สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่ง โดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

4.4.1 อัตราการผลิตก๊าซ

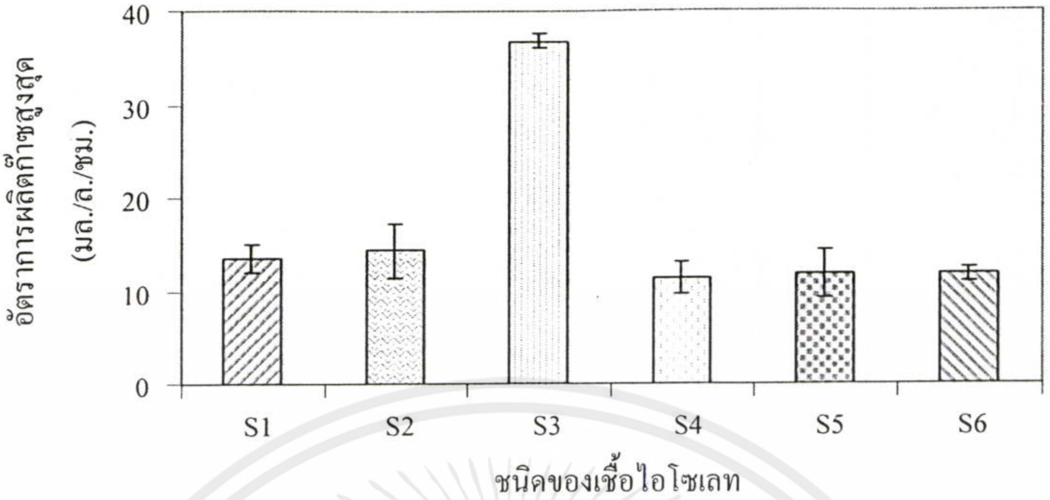
ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซของเชื้อไอโซเลท S1-S6 โดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร แสดงดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 ปริมาตรก๊าซสะสมของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.11 พบว่า ปริมาตรก๊าซสะสมในเวลา 24 ชั่วโมง ที่ STP ของเชื้อไอโซเลท S3 มากที่สุด สามารถผลิตได้ 82.18 มิลลิลิตร รองลงมา คือเชื้อไอโซเลท S2 สามารถผลิตได้ 28.96 มิลลิลิตร ส่วนเชื้อไอโซเลท S6, S1, S4 และ S5 มีค่าใกล้เคียงกัน คือสามารถผลิตได้ 17.71, 16.24, 13.71 และ 11.95 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเริ่มมีการผลิตก๊าซขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 2 และมีการผลิตก๊าซขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 2-6 หลังจากชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไปการผลิตก๊าซเริ่มจะหยุดลง โดยปริมาตรก๊าซสะสมของแต่ละไอโซเลทจะคงที่ ส่วนชุดควบคุมซึ่งไม่ใส่เชื้อ ไม่มีการผลิตก๊าซ (รายละเอียดดังในตารางที่ ค 2.1 แสดงภาคผนวก ค) จากข้อมูลในรูปที่ 4.11 สามารถคำนวณหาอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดโดยใช้ปฏิกิริยา 4.3 โดยเชื้อไอโซเลท S1, S2, S4, S5 และ S6 มีอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดในชั่วโมงที่ 2-3 ส่วนเชื้อไอโซเลท S3 มีอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดในชั่วโมงที่ 2-5 ดังแสดงในรูปที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



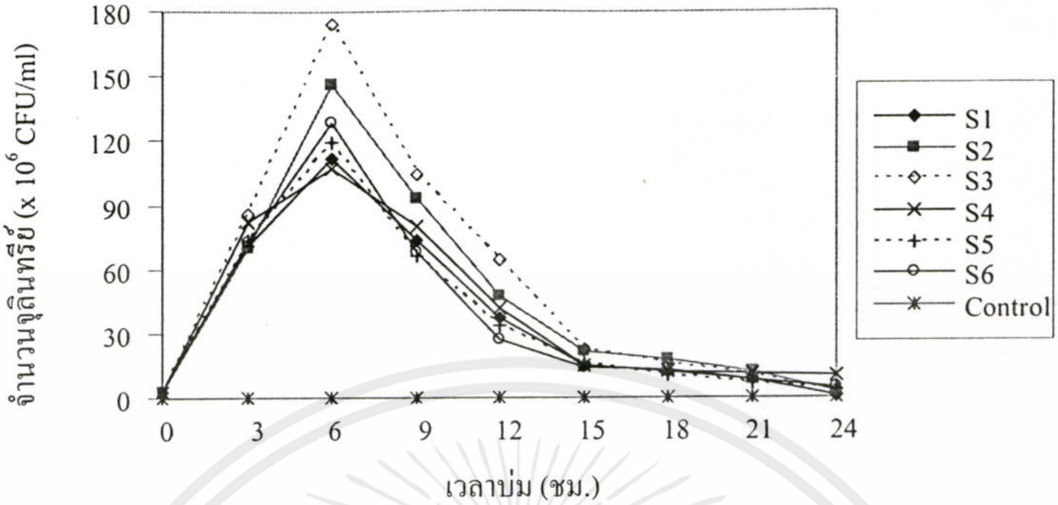
รูปที่ 4.12 อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.12 แสดงอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อนำค่าอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดมาคำนวณผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA พบว่า อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S3 มีค่าแตกต่างจากเชื้อไอโซเลทอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนเชื้อไอโซเลท S1, S2, S4, S5 และ S6 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ดูรายละเอียดในตารางที่ ง 3 ภาคผนวก ง) โดยเชื้อไอโซเลท S3 มีอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดเท่ากับ 36.88±0.68 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมา คือ เชื้อไอโซเลท S2, S1, S5, S6 และ S4 มีค่าเท่ากับ 14.34±2.93, 13.49±1.47, 11.79±2.64, 11.79±0.75 และ 11.36±1.79 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตก๊าซโดยใช้ RCM (รูปที่ 4.3) และสลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (รูปที่ 4.11) พบว่า เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร เชื้อไอโซเลท S3 มีความสามารถในการผลิตก๊าซลดลงประมาณ 3 เท่า อย่างไรก็ตาม เชื้อไอโซเลท S3 สามารถใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหารในการผลิตก๊าซได้ดีกว่าไอโซเลทอื่นๆ ดังนั้น จึงใช้เชื้อไอโซเลท S3 ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

4.4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในช่วงการหมักที่เวลาต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



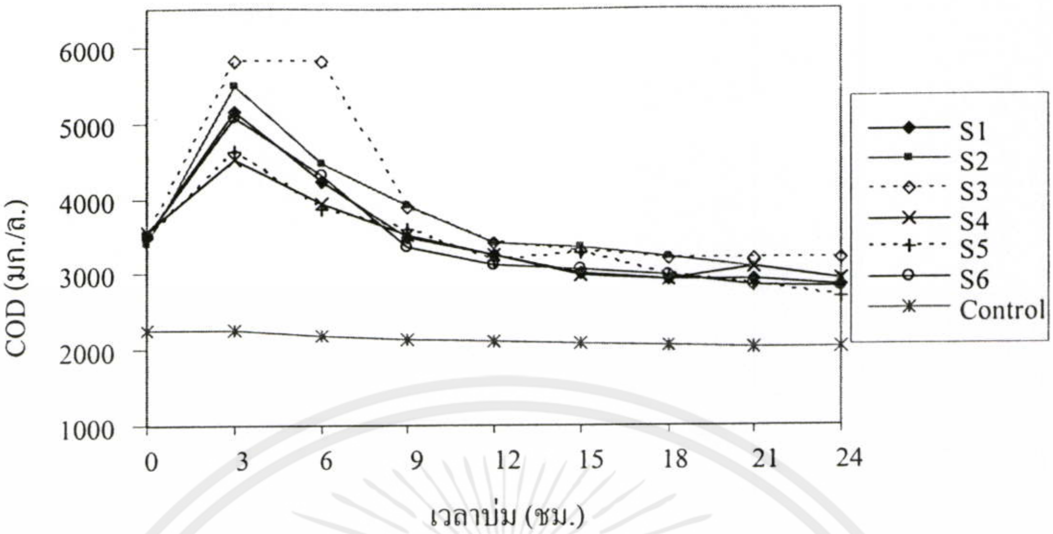
รูปที่ 4.13 การเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในช่วงเวลาหมักต่างๆ โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.13 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร โดยวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ โดย spread plate บนอาหาร RCM (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 2.2 ภาคผนวก ค) ผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ที่เจริญในสลัดจ์มีแนวโน้มคล้ายกับการเจริญเติบโตในอาหาร RCM แต่มีจำนวนน้อยกว่า อาจเป็นเพราะเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่อยู่ในสลัดจ์มาใช้ในการเจริญเติบได้ช้ากว่าการย่อยสลายสารอินทรีย์ในอาหาร RCM (รูปที่ 4.7) โดยเชื้อจุลินทรีย์มีการเพิ่มปริมาณเซลล์อย่างรวดเร็วในช่วง 0-6 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 6 จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์เริ่มลดลงและคงที่ที่ชั่วโมงที่ 15 เป็นต้นไป ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองอัตราการผลิตก๊าซ ซึ่งปริมาตรก๊าซจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 6 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 6

4.4.3 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลการเปลี่ยนแปลงซีโอดีของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในช่วงการหมักที่เวลาต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



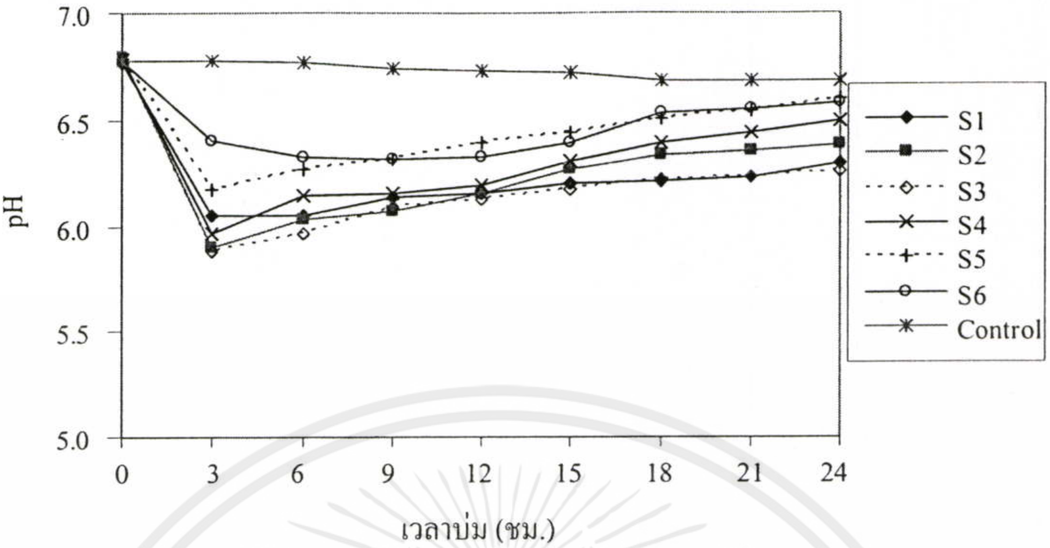
รูปที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในช่วงเวลาหมักต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.14 แสดงการเปลี่ยนแปลงของซีโอดีในระหว่างกระบวนการหมัก (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2.3 ค ภาคผนวก ค) ซึ่งได้ข้อมูลจาก ณัฐพร และคณะ (2551) พบว่าในระยะแรกค่าซีโอดีจะเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น ซึ่งเซลล์จุลินทรีย์เป็นสารอินทรีย์ ดังนั้น จึงทำให้ค่าซีโอดีเพิ่มขึ้นในช่วง 0-3 ชั่วโมง ในการทดลองนี้พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 3 เชื้อไอโซเลท S1, S2, S4, S5 และ S6 มีค่าซีโอดีลดลง ส่วนเชื้อไอโซเลท S3 มีค่าซีโอดีลดลง หลังจากชั่วโมงที่ 6 ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในสลัดจ์ในการเจริญเติบโต และจำนวนเซลล์จุลินทรีย์เริ่มลดลง (รูปที่ 4.13) ทำให้ค่าซีโอดีลดลง

4.4.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการหมัก

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการหมักของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ดังแสดงในรูปที่ 4.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่างการหมักเมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.15 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าในระหว่างที่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในช่วงเวลาที่ 0-3 ชั่วโมงของเชื้อไอโซเลท S1-S6 จะมีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมีค่าพีเอชต่ำที่สุด คือมีค่าประมาณ 5.8-6.4 เนื่องจากจุลินทรีย์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต กลายเป็นกรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดโปรปิโอนิก (ปฏิกิริยา 4.4-4.5) เป็นต้น (Shin *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2005; Kumar and Das, 2000) และหลังจากชั่วโมงที่ 3 ค่าพีเอชค่อยๆ เพิ่มขึ้น (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 2.4 ภาคผนวก ค) อาจจะเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ถูกย่อยสลายกลายเป็นสารอื่นๆ (Shin *et al.*, 2007) เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล ดังแสดงในปฏิกิริยา 4.6

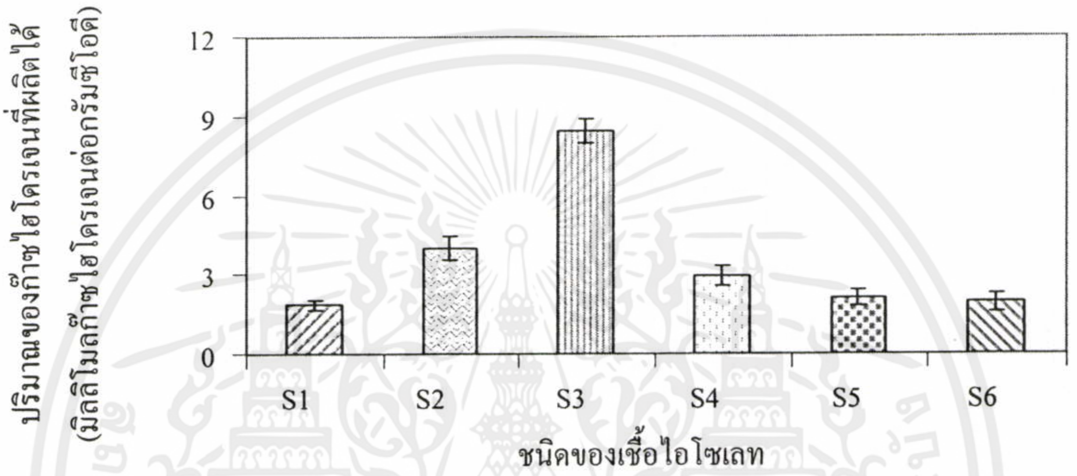
$$CH_3COOH + 2\,H_2\,(g) \longrightarrow CH_3CH_2OH + H_2O \qquad (4.6)$$

เนื่องจาก ช่วงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสลัดจ์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงพีเอช 5.8-6.5 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wang *et al.* (2003) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสลัดจ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 นาที พบว่า พีเอชมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงพีเอช 5.6-6.5 เมื่อเปรียบเทียบค่าพีเอชต่ำสุดในสลัดจ์และในอาหาร RCM พบว่าในอาหาร RCM มีค่าพีเอชต่ำสุดประมาณ 5.0 ซึ่งต่ำกว่าค่าพีเอชต่ำสุดในสลัดจ์ คือ ประมาณ 5.8 อาจเนื่องมาจากในอาหาร RCM มีสารอินทรีย์ที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถ

นำมาใช้ในการเจริญเติบโตเกิดเป็นกรดอินทรีย์และก๊าซไฮโดรเจนได้ง่ายและมีปริมาณมากกว่าในสลัดจ์

4.4.5 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ต่อกรัมซีโอดี

ผลการศึกษาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ต่อกรัมซีโอดีของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ดังแสดงในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่างการหมัก เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.16 แสดงปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 2.5 ภาคผนวก ค) พบว่า ก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยเชื้อไอโซเลท S3 มีปริมาณสูงกว่าเชื้อไอโซเลทอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อไอโซเลท S1, S4, S5 และ S6 มีปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ง 4 ภาคผนวก ง) ซึ่งเชื้อไอโซเลท S3 มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้เท่ากับ 8.43±0.45 มิลลิโมลก๊าซไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดี รองลงมา คือ เชื้อไอโซเลท S2, S4, S5, S6 และ S1 มีค่าเท่ากับ 3.97±0.46, 2.93±0.37, 2.14±0.31, 1.93±0.37 และ 1.88±0.19 มิลลิโมลก๊าซไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดี ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อไอโซเลท S3 มีการเจริญเติบโตและสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงกว่าเชื้อไอโซเลทอื่นๆ อาจเป็นเพราะเชื้อไอโซเลท S3 สามารถใช้สารอินทรีย์ที่อยู่ในสลัดจ์ในการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีกว่าเชื้ออื่น ๆ (รูปที่ 4.13)

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทเมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

พารามิเตอร์		**ไอโซเลท**					
		S1	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**	**S6**
ปริมาตรก๊าซสะสม (มล.) ที่ STP		16.24	28.96	82.18	13.71	11.95	17.71
ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ (มิลลิโมลก๊าซไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดี)[a]		1.88±0.19	3.97±0.46	8.43±0.45	2.93±0.37	2.14±0.31	1.93±0.37
อัตราการผลิตก๊าซสูงสุด (มล./ล/ชม.)[b]		13.49±1.47	14.34±2.93	36.88±0.68	11.36±1.79	11.79±2.64	11.79±0.75
จำนวนเซลล์จุลินทรีย์[c]	Total plate count (x 10^6 CFU/ml)	111.67	146.67	174.33	107.00	119.00	128.67
พีเอช	เริ่มต้น	6.78	6.80	6.79	6.79	6.80	6.79
	สุดท้าย	6.30	6.39	6.26	6.50	6.60	6.58

[a] คือ ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ = มิลลิโมลก๊าซไฮโดรเจน/กรัมซีโอดี

[b] คือ อัตราการผลิตก๊าซ = ปริมาตรก๊าซสะสมสูงสุด (มิลลิลิตร)/เวลาที่ใช้ในการผลิตก๊าซสูงสุด (ชั่วโมง)/ปริมาตรอาหารทั้งหมด (ลิตร)

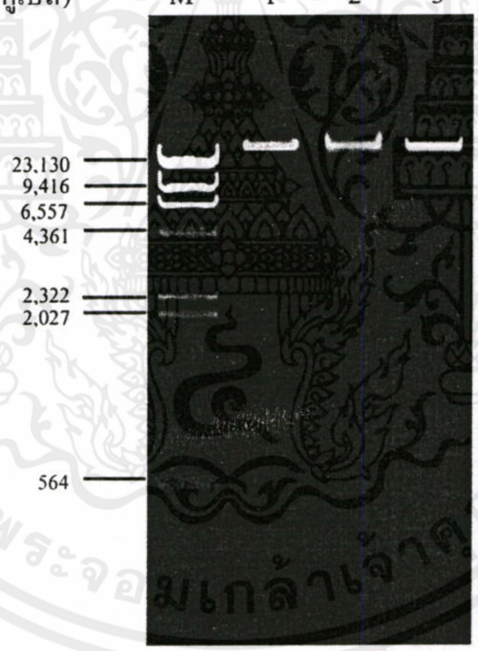
[c] คือ จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เวลาบ่ม ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งเป็นเวลาที่มีจำนวนจุลินทรีย์สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

4.5 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

4.5.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท S2, S3 และ S6

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด 3 ไอโซเลทที่ได้จากผลการทดลองที่ 4.3.5 ได้แก่ S2, S3 และ S6 บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอดังวิธีการในข้อ 3.2.3.1 วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ดังวิธีการในข้อ 3.2.3.2 ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 10 แถบขนาดและแถบดีเอ็นเอเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่า จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท S2, S3 และ S6 มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดังรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท S2, S3 และ S6 จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อไอโซเลท S2

2 จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อไอโซเลท S3

3 จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อไอโซเลท S6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอ 10 แถบที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป

4.5.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดของเชื้อไอโซเลท S2, S3 และ S6 ที่ได้จากข้อ 4.5.1 ไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ดังวิธีการในข้อ 3.2.3.3 พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้งสามไอโซเลทจำนวน 1 แถบ (รูปที่ 4.18)

รูปที่ 4.18 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของเชื้อไอโซเลท S2

2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของเชื้อไอโซเลท S3

3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของเชื้อไอโซเลท S6

เมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่า แถบที่ได้มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส (รูปที่ 4.18) ซึ่งตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้ จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.3 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อไอโซเลท S2, S3 และ S6

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลทมีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 600 คู่เบส (รูปที่ 4.19) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละไอโซเลทไปเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีนพบว่าไอโซเลท S2 และ S3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์แบคทีเรีย *E. coli* ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท S6 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์แบคทีเรียในสายพันธุ์ *Enterobacter* sp. ถึง 100 เปอร์เซ็นต์

4.6 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

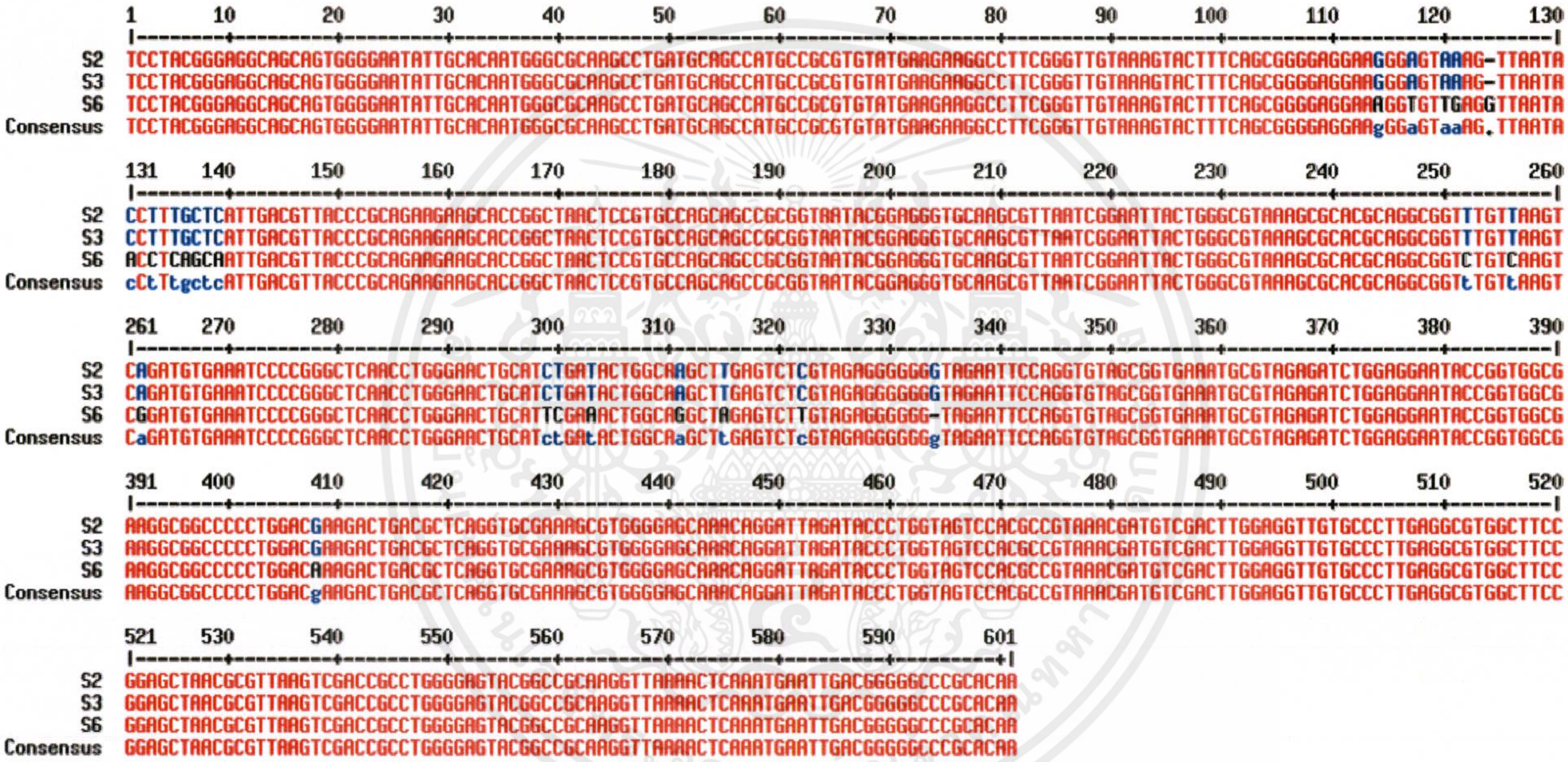
ผลการทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 ที่แยกได้จากสลัดจ์ โดยแปรผันสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ พีเอชของสลัดจ์เริ่มต้น, ความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้น และความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น ได้ผลการทดลองดังนี้

4.6.1 ผลของพีเอชของสลัดจ์เริ่มต้นต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

การศึกษาผลของพีเอชของสลัดจ์เริ่มต้นต่อความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 โดยศึกษาในรูปของปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.20

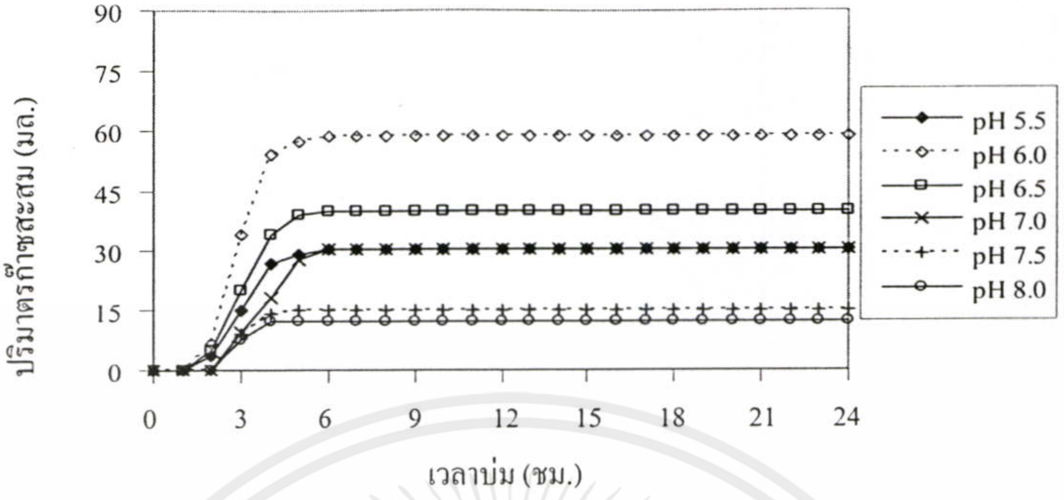
จากการศึกษาผลของพีเอชต่อความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสลัดจ์ที่พีเอชเริ่มต้น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 โดยสลัดจ์มีค่าความเข้มข้นของ Mixed Liquor Suspended Solid (MLSS) เท่ากับ 31,160 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้นสลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน) พบว่าพีเอชของสลัดจ์เริ่มต้น 6.0 เป็นค่าพีเอชที่เชื้อไอโซเลท S3 สามารถผลิตก๊าซได้สูงที่สุด ที่ STP เท่ากับ 58.92 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 5 รองลงมาคือพีเอชเริ่มต้น 6.5 ผลิตก๊าซได้ 39.90 มิลลิลิตร ส่วนพีเอชเริ่มต้น 5.5 สามารถผลิตก๊าซได้ใกล้เคียงกับพีเอชเริ่มต้น 7.0 โดยผลิตได้ 30.12 และ 30.09 มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนพีเอชเริ่มต้น 7.5 สามารถผลิตก๊าซได้ 14.76 มิลลิลิตร และที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 สามารถผลิตก๊าซได้ 12.38 มิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.20 (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 3.1 ภาคผนวก ค) จากการทดลอง พบว่า ที่พีเอช 6.0 เป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซของเชื้อไอโซเลท S3 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chittibabu *et al*. (2006) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้เชื้อ *E. coli* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ พีเอช 6.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาด 600 คู่เบสของเชื้อไอโซเลท S2, S3 และ S6

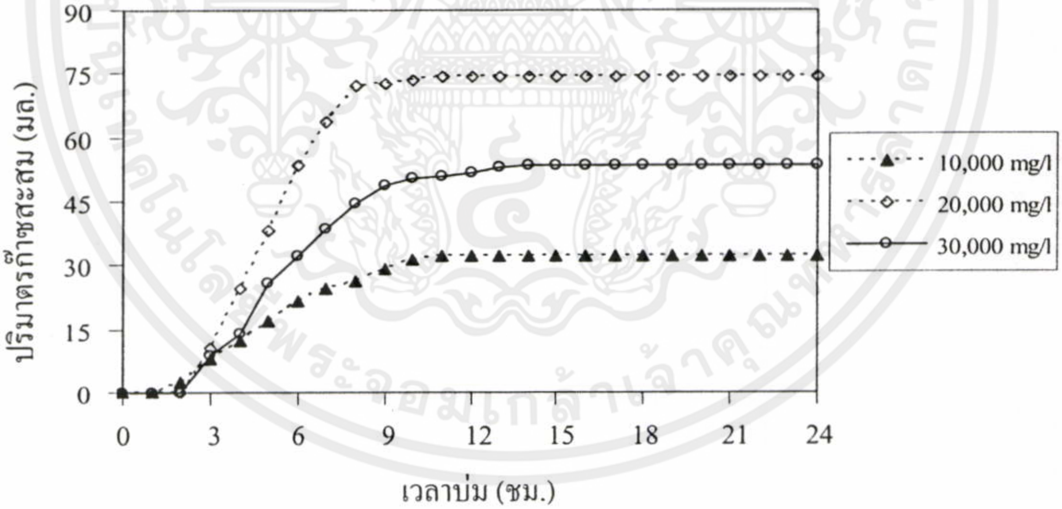
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า



รูปที่ 4.20 ผลของพีเอชเริ่มต้นของสลัดจ์ต่อการผลิตก๊าซ

4.6.2 ผลของความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้นต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ผลการศึกษาผลของความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้นต่อความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 โดยศึกษาในรูปของปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.21



รูปที่ 4.21 ผลของความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้นต่อการผลิตก๊าซ

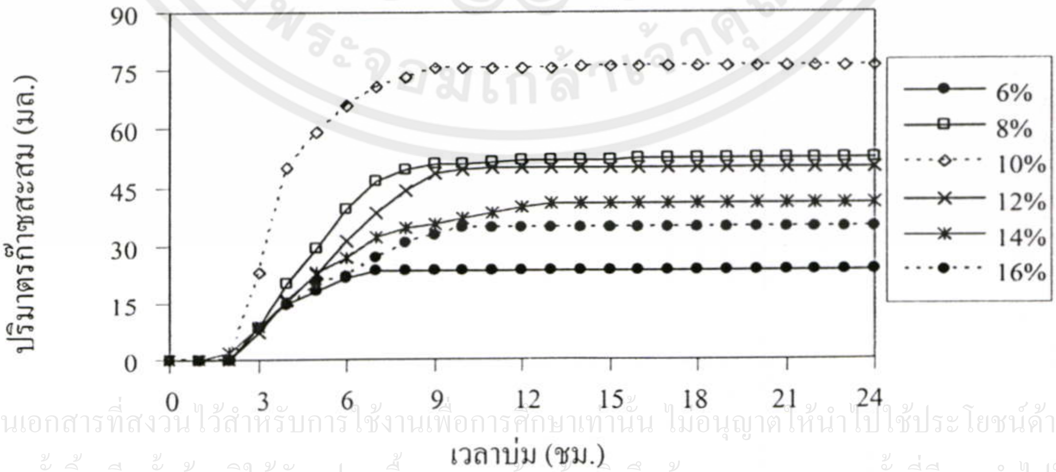
จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้นต่อความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยแปรผันค่า MLSS ของสลัดจ์เริ่มต้น ดังนี้ 10,000, 20,000 และ 30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่สภาวะพีเอชเริ่มต้น 6.0 ที่ได้จากผลการทดลองที่ 4.6.1 พบว่าความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นค่าที่เหมาะสม และ เชื้อไอโซเลท S3 สามารถผลิตก๊าซได้สูงที่สุด มี

ปริมาตรก๊าซสะสมในเวลา 24 ชั่วโมง ที่ STP เท่ากับ 74.46 มิลลิลิตร รองลงมาคือที่ความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้น 30,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถผลิตก๊าซได้สูงสุด เท่ากับ 53.50 และ 32.20 มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.21) (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 3.2 ภาคผนวก ค) เมื่อความเข้มข้นของสลัดจ์มากเกินไป สามารถผลิตก๊าซได้น้อย อาจเนื่องจากในสลัดจ์มีสารอินทรีย์มาก เชื้อจุลินทรีย์จะนำสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในสลัดจ์นั้นมาสร้างเซลล์มากกว่าการนำไปใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shin *et al.* (2007) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน พบว่า ถ้าความเข้มข้นของกลูโคสมากเกินไป เชื้อจุลินทรีย์จะนำกลูโคสไปใช้ในการสร้างเซลล์จุลินทรีย์มากกว่าการผลิตก๊าซ หรืออาจเกิดจากสลัดจ์มีความเข้นข้นมากเกินไป ทำให้สารพิษในสลัดจ์เพิ่มมากขึ้น จึงมีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ผลิตก๊าซได้น้อย ส่วนสลัดจ์ที่มีความเข้มข้นน้อย สามารถผลิตก๊าซได้น้อยนั้น อาจเนื่องจากในสลัดจ์มีสารอินทรีย์อยู่น้อย จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์นำสารอินทรีย์นั้นมาใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตก๊าซได้น้อย จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้นที่มีค่า MLSS เท่ากับ 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นค่าที่มีเหมาะสมต่อผลิตก๊าซได้สูงที่สุด

จากผลการศึกษาพีเอชของสลัดจ์เริ่มต้น (รูปที่ 4.20) และความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้น (รูปที่ 4.21) พบว่าช่วงเวลาที่มีการผลิตก๊าซสูงสุดต่างกัน อาจเป็นเพราะในการศึกษาครั้งนี้ได้กำหนดเฉพาะค่า MLSS แต่ไม่ได้วิเคราะห์ค่าซีโอดีเริ่มต้น ดังนั้น สารอาหารสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในสลัดจ์อาจมีไม่เท่ากัน จึงทำให้ใช้เวลาในการผลิตก๊าซสะสมสูงสุดต่างกัน

4.6.3 ผลของความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ผลการศึกษาผลของความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นต่อความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 โดยศึกษาในรูปของปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.22



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.22 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อไอโซเลท S3 ต่อการผลิตก๊าซ

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของเชื้อไอโซเลท S3 เริ่มต้นต่อความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เติมหัวเชื้อ 6, 8, 10, 12, 14, 16 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร (ที่ $OD_{600} = 0.8$) ที่พีเอชเริ่มต้น 6.0 และความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเติมหัวเชื้อเพิ่มขึ้น จะมีการผลิตก๊าซเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อเติมหัวเชื้อมากเกินไปจะทำให้การผลิตก๊าซลดลง (รูปที่ 4.22) (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 3.3 ภาคผนวก ค) อาจเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารในการผลิตเซลล์จุลินทรีย์มากกว่าการผลิตก๊าซ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kotay and Das (2007) ที่ศึกษาผลของปริมาตรของหัวเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเชื้อมากเกินไป เชื้อจุลินทรีย์จะนำสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจน จากผลการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อไอโซเลท S3 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตก๊าซได้สูงที่สุด ที่อัตราการผลิตเท่ากับ 35.90 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อไอโซเลท S3 ปริมาณต่าง ๆ

ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	ระยะเวลา (ชม.)	ปริมาตรก๊าซสะสม (มล.)	อัตราการผลิตก๊าซสูงสุด (มล./ล./ชม.)
6	2-6	21.56	7.70
8	2-6	39.31	14.40
10	2-4	50.25	35.90
12	2-9	48.47	9.89
14	2-7	32.48	8.78
16	2-9	32.78	6.69

4.7 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนระหว่างเชื้อไอโซเลท S3 กับ เชื้อ *C. butyricum*

ในการศึกษานี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเชื้อไอโซเลท S3 เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. butyricum* เนื่องจากเชื้อ *C. butyricum* สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงกว่าเชื้ออื่น ๆ

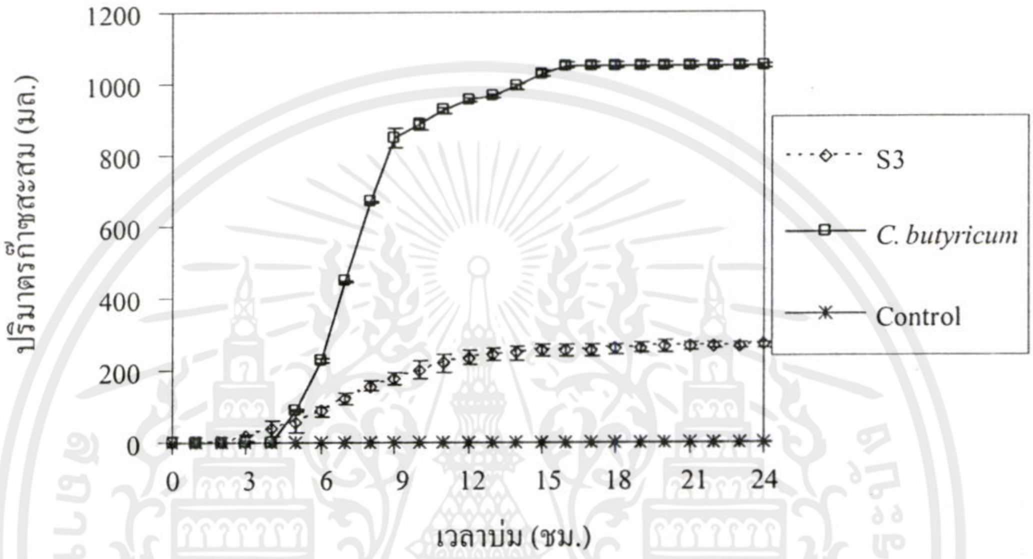
การทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทั้งในอาหาร RCM และในสลัดจ์ ได้ผลการทดลองดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

4.7.1.1 อัตราการผลิตก๊าซ

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 กับเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้อาหาร RCM เป็นแหล่งอาหาร ดังแสดงในรูปที่ 4.23

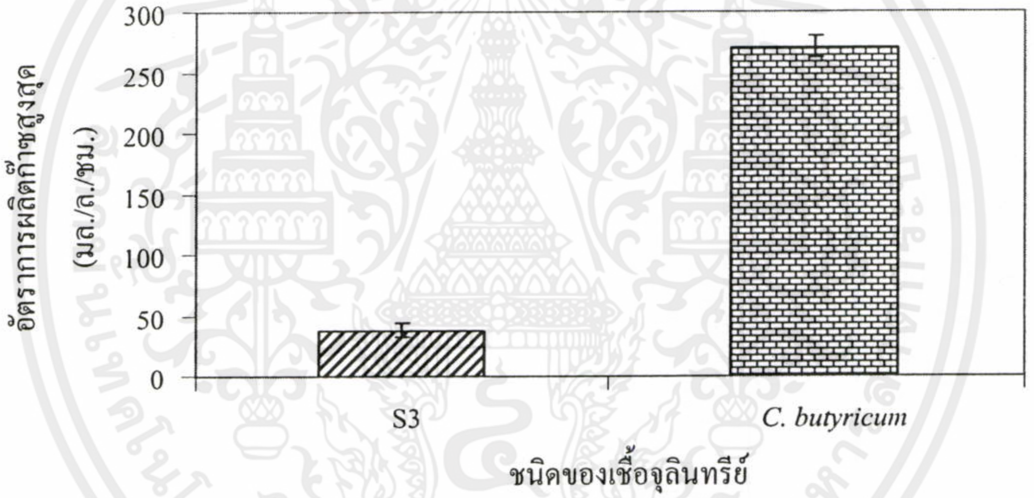


รูปที่ 4.23 ปริมาตรก๊าซสะสมของเชื้อไอโซเลท S3 เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. butyricum*

จากรูปที่ 4.23 แสดงปริมาตรก๊าซสะสมของเชื้อไอโซเลท S3 ที่คัดแยกได้ และเชื้อ *C. butyricum* พบว่า ปริมาตรก๊าซสะสมที่ STP ของเชื้อไอโซเลท S3 มีค่าเท่ากับ 269.92 มิลลิลิตร และเชื้อ *C. butyricum* มีค่าเท่ากับ 1,049.94 มิลลิลิตร ส่วนชุดควบคุมซึ่งไม่ใส่เชื้อ ไม่มีการผลิตก๊าซ จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ *C. butyricum* สามารถผลิตก๊าซได้มากกว่าเชื้อไอโซเลท S3 ประมาณ 3.7 เท่า (ดูรายละเอียดในตารางที่ ค 1.1 ภาคผนวก ค) โดยเชื้อไอโซเลท S3 เริ่มมีการผลิตก๊าซหลังจากชั่วโมงที่ 2 จากนั้นจะผลิตก๊าซอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 2-8 หลังจากชั่วโมงที่ 8 การผลิตก๊าซจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chittibabu *et al.* (2006) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้เชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่ม facultative bacteria และใช้อาหาร MYG ที่พีเอช 6.0-7.0 พบว่าที่เวลาดังกล่าวมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนขึ้นอย่างรวดเร็ว และหลังจากชั่วโมงที่ 8 จะผลิตก๊าซลดลง ส่วนเชื้อ *C. butyricum* มีการผลิตก๊าซหลังจากชั่วโมงที่ 5 จากนั้นจะผลิตก๊าซอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 5-12 และหลังจากชั่วโมงที่ 12 การผลิตก๊าซจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chen *et al.* (2005) ที่ทำการทดลอง โดยใช้เชื้อ *C. butyricum* CGS5 ใช้อาหารที่มี

ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 6.0 พบว่าเริ่มมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 5-12 และมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลงหลังชั่วโมงที่ 12

เชื้อ *C. butyricum* มีการผลิตก๊าซช้ากว่าเชื้อไอโซเลท S3 อาจเป็นเพราะเชื้อ *C. butyricum* เป็นเชื้อกลุ่ม Obligate anaerobic bacteria ซึ่งออกซิเจนอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้ ดังนั้น เชื้อนี้อาจต้องใช้เวลาในการปรับตัวนานเนื่องจากจุลินทรีย์นี้อาจจะเจริญจากส่วนล่างของอาหารซึ่งเป็นส่วนที่มีอากาศอยู่น้อย จึงทำให้เชื้อนี้ใช้เวลานานถึงจะเจริญไปถึงส่วนบนของอาหาร เมื่อมีจำนวนเซลล์มากขึ้น จึงจะเริ่มมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนออกมา จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้น สามารถนำมาคำนวณหาอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดด้วยสมการที่ 4.3 ซึ่งเชื้อไอโซเลท S3 และ *C. butyricum* มีอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดในชั่วโมงที่ 3-9 และ 5-9 ตามลำดับ โดยมีอัตราการผลิตก๊าซสูงสุด แสดงดังรูปที่ 4.24



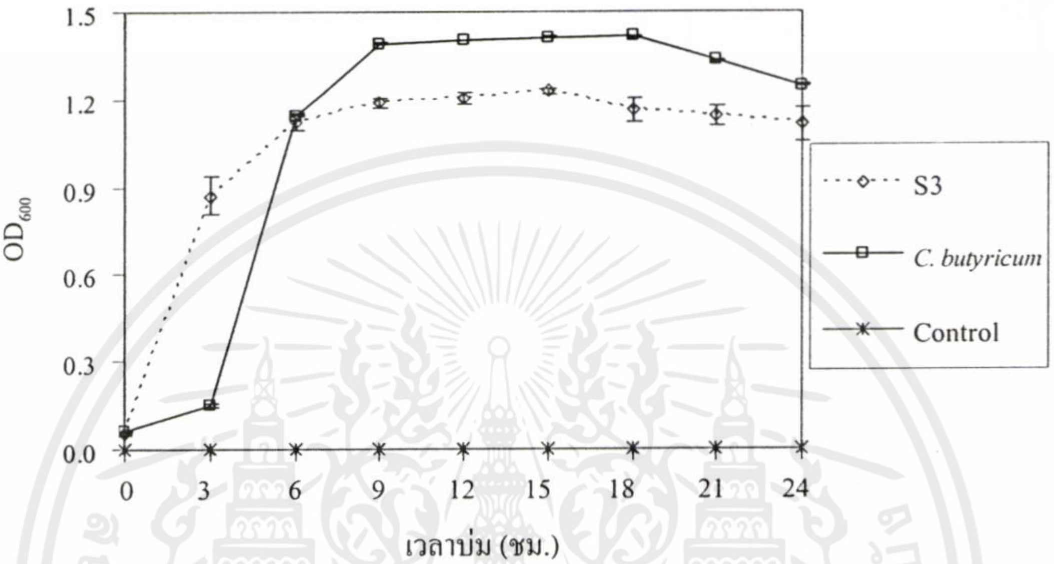
รูปที่ 4.24 อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.24 แสดงอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อนำค่าอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดมาคำนวณผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ดูรายละเอียดในตารางที่ ง 5 ภาคผนวก ง) โดยเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* มีอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดเท่ากับ 38.02±5.65 และ 270.77±8.75 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ... ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7.1.2 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

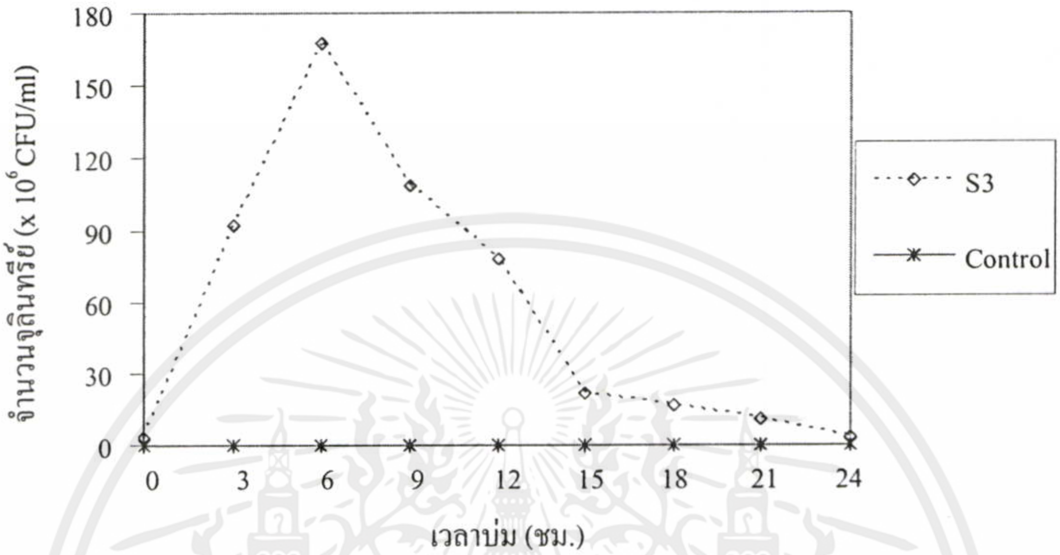
ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S3 ที่คัดแยกได้ ในช่วงการหมักที่เวลาต่างๆ โดยวิธีการวัด OD_{600} และวิธีการนับจำนวนเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 4.25 และ 4.26 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. butyricum* โดยวิธีการวัด OD_{600} ดังแสดงในรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.25 การเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในช่วงการหมักที่เวลาต่างๆ โดยวิธีการวัด OD_{600} เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.25 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* (รายละเอียดแสดงในตารางที่ ค 1.2 ภาคผนวก ค) ซึ่งการเจริญเติบโตวัดโดยวิธีวัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Minnan *et al*., 2005) พบว่าเชื้อไอโซเลท S3 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 0-3 ชั่วโมง ส่วน *C. butyricum* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 3-6 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น (รูปที่ 4.23) คือ เมื่อเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้น จะทำให้มีการผลิตก๊าซเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Shin *et al*. (2007) ซึ่งในการทดลองนี้เชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เริ่มมีการผลิตก๊าซอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 3-9 และชั่วโมงที่ 5-9 ตามลำดับ (รูปที่ 4.23) ซึ่งในระยะดังกล่าวเชื้อทั้งสองมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว หรือเรียกว่าอยู่ในระยะ log phase และหลังจากชั่วโมงที่ 6 ของเชื้อไอโซเลท S3 และหลังจากชั่วโมงที่ 9 ของเชื้อ *C. butyricum* มีค่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มคงที่ อาจเป็นเพราะเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารนั้นหยุดการแบ่งเซลล์และเริ่มตายลง แต่การวัดความหนาแน่นของเซลล์ไม่สามารถระบุได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์

มีชีวิตหรือไม่ ดังนั้น ค่าความขุ่นของอาหารจึงมีการเปลี่ยนแปลงน้อย อย่างไรก็ตาม วิธีการวัดการเจริญเติบด้วยวิธีนี้อาจไม่เพียงพอต่อการสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน อาจจะต้องใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ร่วมด้วย ดังรูปที่ 4.26



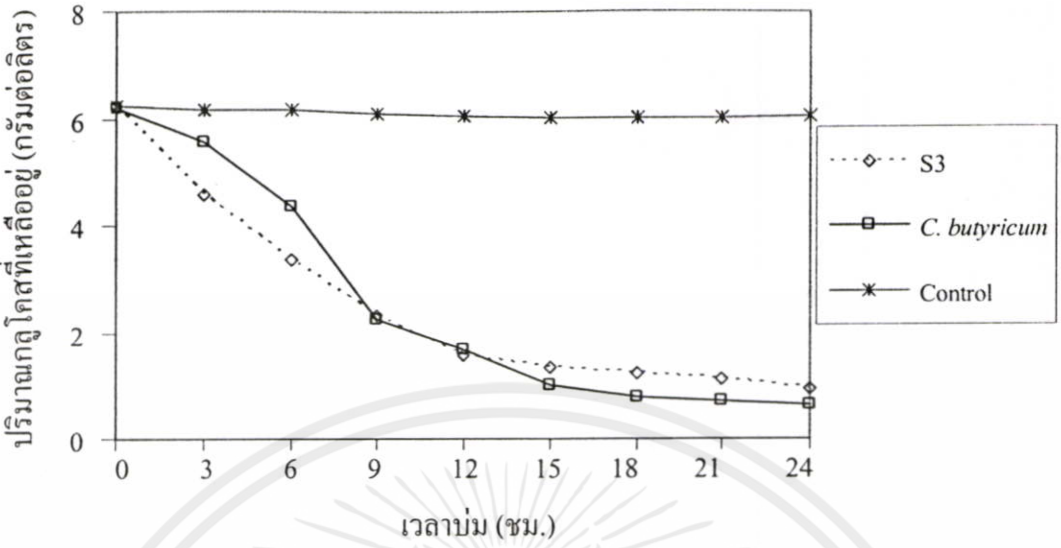
รูปที่ 4.26 การเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S3 ในช่วงเวลาหมักต่างๆ โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.26 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S3 โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 1.3 ภาคผนวก ค) ในการทดลองนี้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการเพิ่มปริมาณเซลล์อย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 0-6 เมื่อปริมาณเซลล์จุลินทรีย์มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น จึงเริ่มมีการผลิตก๊าซ (รูปที่ 4.23) ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Shin *et al.* (2007) ดังที่กล่าวในผลการทดลองที่ 4.3.1 ส่วนเชื้อ *C. butyricum* ไม่สามารถเจริญเติบโตในสภาวะการบ่มในการทดลองนี้ เนื่องจากอาจมีการปนเปื้อนของอากาศในช่องว่างของขวดดูแลนที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 2/3 ของขวด เชื้อ *C. butyricum* เป็น Obligate anaerobic bacteria จึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ การจุดเทียนไขในภาชนะปิดที่ใช้แทน anaerobic jar อาจไม่สามารถกำจัดออกซิเจนได้ทั้งหมด ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงไม่สามารถศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. butyricum* ด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ได้

4.7.1.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษาการลดลงของกลูโคสที่เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อไอโซเลท S3 ที่คัดแยกได้ และเชื้อ *C. butyricum* ในช่วงการหมักที่เวลาต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.27



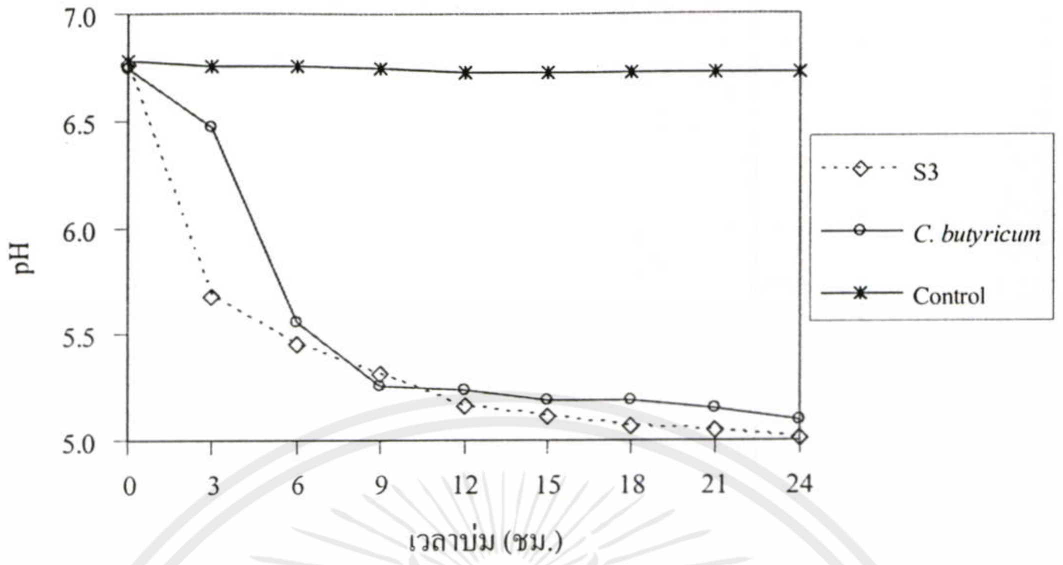
รูปที่ 4.27 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาหมักต่างๆ ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.27 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสในอาหาร RCM ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi Nelson ซึ่งได้ข้อมูลจาก ณัฐพร และคณะ (2551) พบว่า เชื้อไอโซเลท S3 มีปริมาณกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-9 ชั่วโมง เชื้อ *C. butyricum* มีปริมาณกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3-9 ชั่วโมง (รูปที่ 4.27) (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 1.4-ค 1.6 ภาคผนวก ค) ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยดูจากค่า OD_{600} (รูปที่ 4.25) ซึ่งอาจเป็นเพราะเชื้อจุลินทรีย์มีการใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในช่วงเวลาดังกล่าว ในขณะเดียวกันก็เริ่มมีการผลิตก๊าซขึ้น โดยการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Shin *et al.* (2007) ดังที่กล่าวมาแล้วในผลการทดลองที่ 4.3.3 ดังนั้น การลดลงของกลูโคส เนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์นำกลูโคสไปใช้ในการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์และผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั่นเอง

4.7.1.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการหมัก

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการหมักของเชื้อไอโซเลท S3 ที่คัดแยกได้และเชื้อ *C. butyricum* ดังแสดงในรูปที่ 4.28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.28 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในระหว่างการหมักเมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

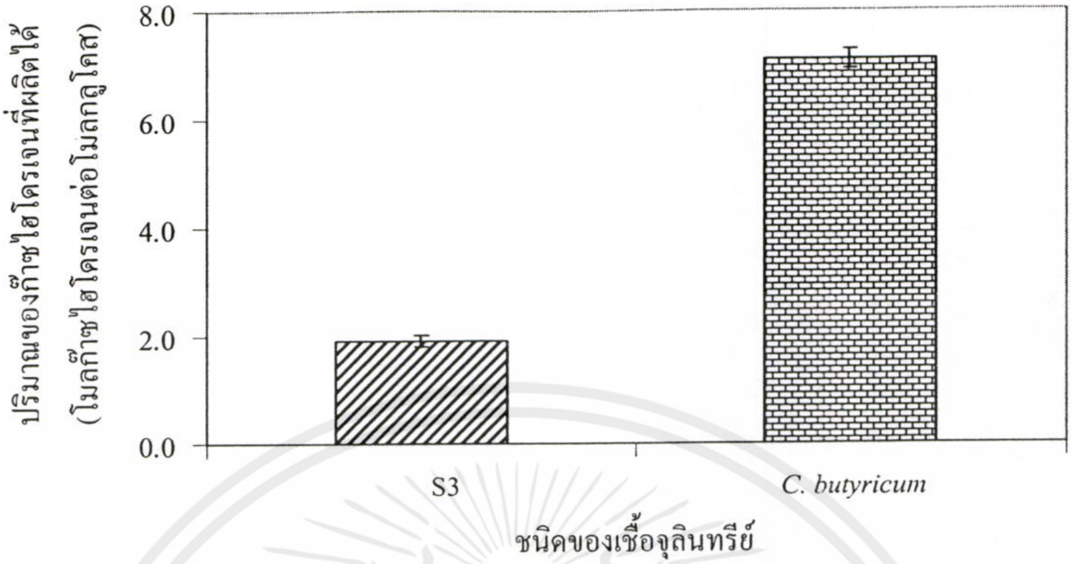
จากรูปที่ 4.28 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าในระหว่างที่มีการผลิตก๊าซอย่างรวดเร็วของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* จะมีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน โดยเชื้อไอโซเลท S3 มีค่าพีเอชลดลงจาก 6.8 ถึงประมาณพีเอช 5.7 ในชั่วโมงที่ 3 ส่วนเชื้อ *C. butyricum* มีค่าพีเอชลดลงจาก 6.8 ถึงประมาณพีเอช 5.6 ในชั่วโมงที่ 6 (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 1.7 ภาคผนวก ค) การลดลงของค่าพีเอชในกระบวนการหมักอาจเกิดจากการสะสมของกรดอินทรีย์ ดังที่กล่าวในผลการทดลองที่ 4.3.4

จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะอยู่ในช่วงพีเอช 5.5-6.7 (Shin *et al.*, 2007) ดังนั้น หลังจากเวลา 3 ชั่วโมงของเชื้อไอโซเลท S3 และหลังจากเวลา 6 ชั่วโมงของเชื้อ *C. butyricum* ค่าพีเอชลดลงต่ำกว่า 5.5 จึงทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ลดลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลงด้วย (รูปที่ 4.23)

4.7.1.5 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ต่อโมลกลูโคส

ผลการศึกษาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ต่อโมลกลูโคสของเชื้อไอโซเลท S3 ที่คัดแยกได้ และเชื้อ *C. butyricum* ดังแสดงในรูปที่ 4.29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.29 ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในระหว่างการหมัก เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.29 แสดงปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อนำปริมาณก๊าซไฮโดรเจนมาคำนวณผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA พบว่าปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อทั้งสองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ง 6 ภาคผนวก ง) ซึ่งปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* มีค่าเท่ากับ 1.92±0.10 และ 7.10±0.19 โมลของก๊าซไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ดังแสดงในตารางที่ 4.5 (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 1.8-ค 1.9 ภาคผนวก ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

พารามิเตอร์		**เชื้อจุลินทรีย์**	
		S3	***C. butyricum***
ปริมาตรก๊าซสะสม (มล.)		269.92	1,049.94
ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ (โมลก๊าซไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส)[a]		1.92±0.10	7.10±0.19
อัตราการผลิตก๊าซสูงสุด (มล./ล/ชม.)[b]		38.02±5.65	270.77±8.75
จำนวนเซลล์จุลินทรีย์[c]	Total plate count (x 10^6 CFU/ml)	167.67	-
	OD_{600}	1.127	1.146
พีเอช	เริ่มต้น	6.67	6.75
	สุดท้าย	5.01	5.09

[a] คือ ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ = โมลก๊าซไฮโดรเจน/โมลกลูโคส

[b] คือ อัตราการผลิตก๊าซสูงสุด = ปริมาตรก๊าซสะสมสูงสุด (มิลลิลิตร)/เวลาที่ใช้ในการผลิตก๊าซสูงสุด (ชั่วโมง)/ปริมาตรอาหารทั้งหมด (ลิตร)

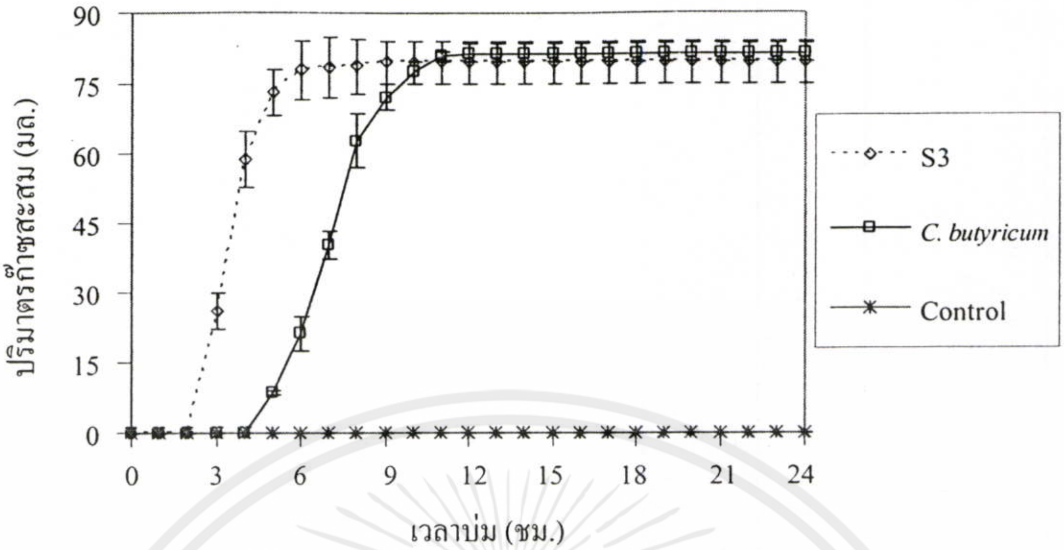
[c] คือ จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เวลาบ่ม ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งเป็นเวลาที่มีจำนวนจุลินทรีย์สูงสุด

4.7.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

4.7.2.1 อัตราการผลิตก๊าซ

จากการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซโดยเชื้อไอโซเลท S3 ที่แยกได้จากสลัดจ์และ *C. butyricum* โดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร ในสภาวะที่เหมาะสมคือ ที่พีเอชเริ่มต้น 6.0, ความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้น 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร ที่ได้จากผลการทดลองที่ 4.6.1, 4.6.2 และ 4.6.3 ตามลำดับ สามารถวัดปริมาตรของก๊าซสะสม ดังแสดงในรูปที่ 4.30

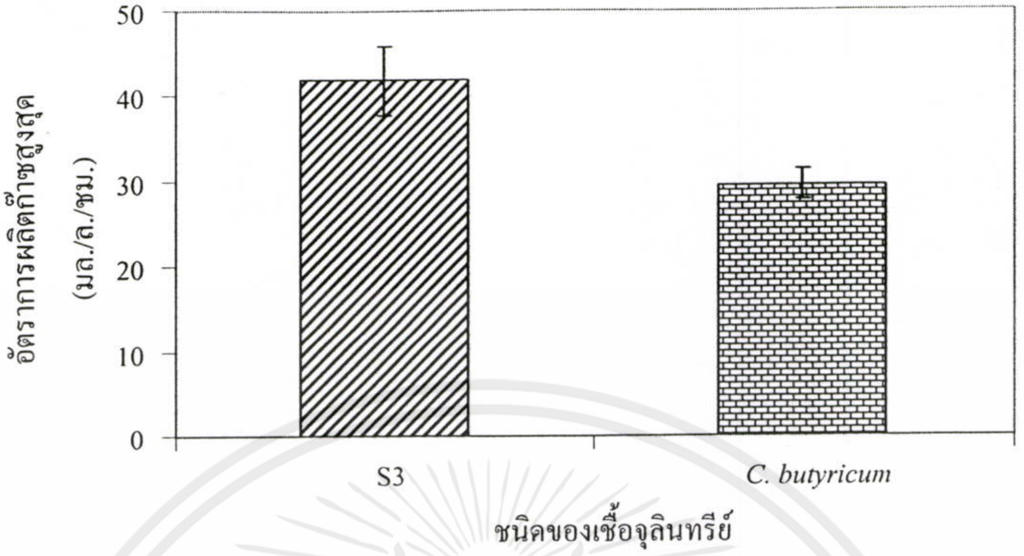
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.30 ปริมาตรก๊าซสะสมของเชื้อไอโซเลท S3 และ *C. butyricum* ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.30 พบว่า การผลิตก๊าซของเชื้อไอโซเลท S3 เริ่มผลิตก๊าซเร็วกว่าเชื้อ *C. butyricum* นั่นคือ เชื้อไอโซเลท S3 เริ่มผลิตก๊าซหลังจากชั่วโมงที่ 3 และสามารถผลิตก๊าซได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 มีค่าเท่ากับ 78.82 มิลลิลิตร ในขณะที่เชื้อ *C. butyricum* เริ่มผลิตก๊าซหลังจากชั่วโมงที่ 4 และสามารถผลิตก๊าซได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 11 มีค่าเท่ากับ 80.76 มิลลิลิตร (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 4.1 ภาคผนวก ค) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อไอโซเลท S3 เป็นเชื้อกลุ่ม facultative bacteria ที่แยกได้จากสลัดจ์ จึงสามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะในระบบได้ง่าย แต่เชื้อ *C. butyricum* เป็นกลุ่ม obligate anaerobic bacteria ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่หลงเหลืออยู่ในระบบ อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มนี้ จึงทำให้เชื้อ *C. butyricum* ใช้เวลาในการปรับตัวเข้ากับสภาวะนานกว่าเชื้อไอโซเลท S3 ส่วนปริมาตรก๊าซสะสมของทั้งสองเชื้อมีปริมาตรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ง 7 ภาคผนวก ง) จากข้อมูลในรูปที่ 4.30 นำมาคำนวณหาอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดด้วยสมการที่ 4.3 พบว่า เชื้อไอโซเลท S3 และ *C. butyricum* มีอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดในชั่วโมงที่ 2-4 และ 6-8 ตามลำดับ โดยมีอัตราการผลิตก๊าซสูงสุด แสดงดังรูปที่ 4.31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



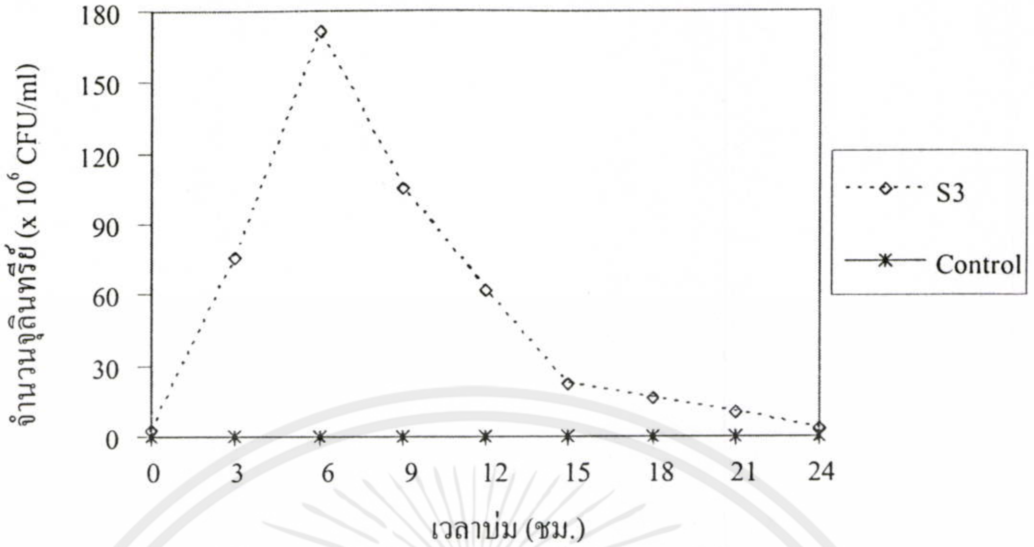
รูปที่ 4.31 อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S3 เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.31 และตางรางที่ 4.6 แสดงอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* พบว่า อัตราการผลิตก๊าซของทั้งสองเชื้อมีค่าใกล้เคียงกันโดยเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* มีอัตราการผลิตก๊าซสูงสุด เท่ากับ 41.69±4.21 และ 29.55±1.80 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งอัตราการผลิตก๊าซของเชื้อทั้งสองในสลัดจ์มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ง 8 ภาคผนวก ง)

4.7.2.2 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S3 เชื้อ *C. butyricum* ในช่วงการหมักที่เวลาต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



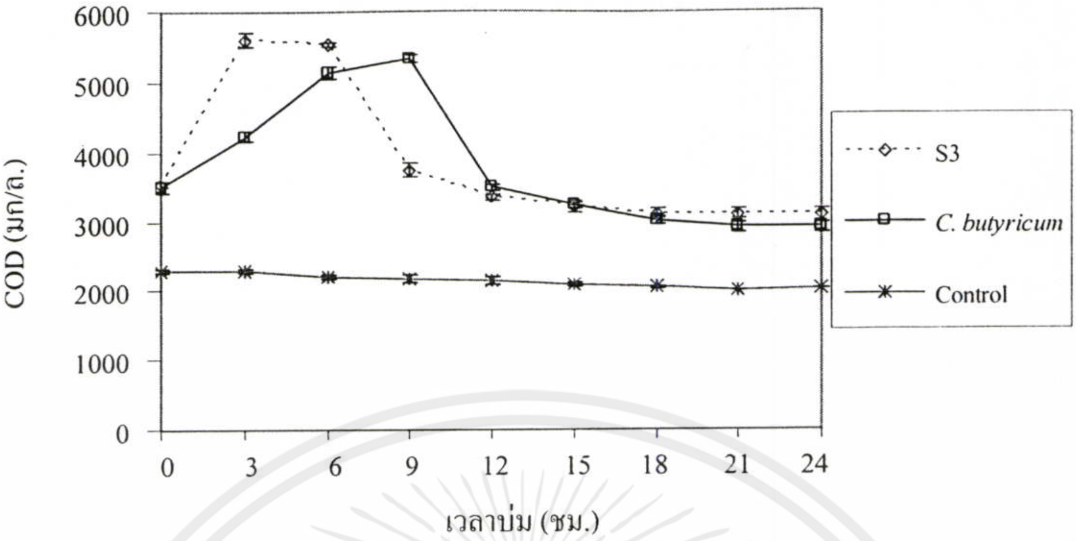
รูปที่ 4.32 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S3 ในช่วงเวลาหมักต่าง ๆ โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.32 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S3 โดยวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 4.2 ภาคผนวก ค) พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S3 ในระยะ log phase อยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 0-6 ซึ่งระยะนี้เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตก๊าซออกมาในอัตราที่สูง (รูปที่ 4.30) และหลังจากชั่วโมงที่ 6 จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์เริ่มลดลงเรื่อย ๆ อาจเกิดจากการสะสมของกรดอินทรีย์และการลดลงของสารอาหาร ส่วนเชื้อ *C. butyricum* มีการเจริญเติบโตในสลัดจ์ แต่ไม่สามารถศึกษาการเจริญเติบโตในสภาวะการบ่มในการทดลองนี้ เนื่องจากในขวดดูแลนมีอาหารเลี้ยงเชื้อมีอาหารเพียง 2/3 ของขวดจึงมีช่องว่างอากาศ ซึ่งเชื้อ *C. butyricum* เป็น obligate anaerobic bacteria จึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ อุปกรณ์ที่ใช้แทน anaerobic jar โดยการจุดเทียนไขในภาชนะปิด อาจไม่สามารถกำจัดออกซิเจนได้ทั้งหมด ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงไม่สามารถศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. butyricum* ด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ได้

4.7.2.3 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลการเปลี่ยนแปลงซีโอดีของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในช่วงการหมักที่เวลาต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



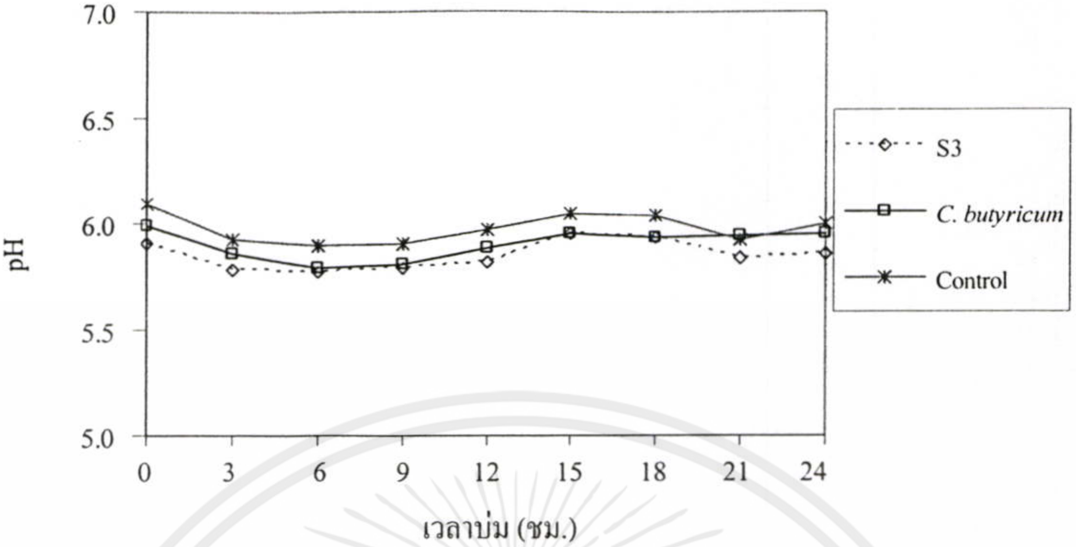
รูปที่ 4.33 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในช่วงเวลาหมักต่างๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.33 แสดงการเปลี่ยนแปลงซีโอดีในระหว่างการหมัก ซึ่งได้ข้อมูลจาก ณัฐพร และคณะ (2551) (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 4.3 ภาคผนวก ค) พบว่า ในชั่วโมงที่ 0-3 ของเชื้อไอโซเลท S3 และ ในชั่วโมงที่ 0-9 ของเชื้อ *C. butyricum* ค่าซีโอดีจะเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น ซึ่งเซลล์จุลินทรีย์เป็นสารอินทรีย์ ดังนั้น จึงทำให้ค่าซีโอดีเพิ่มขึ้น และค่าซีโอดีของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เริ่มลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 6 และชั่วโมงที่ 9 ตามลำดับ การลดลงของซีโอดี เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในสลัดจ์ในการเจริญเติบโต ทำให้ค่าซีโอดีลดลง และทดลองนี้พบว่าเชื้อไอโซเลท S3 มีค่าซีโอดีเพิ่มขึ้นเร็วกว่าเชื้อ *C. butyricum* ซึ่งสอดคล้องกับผลการผลิตก๊าซ (รูปที่ 4.30) เนื่องจากเชื้อไอโซเลท S3 เป็นเชื้อที่แยกได้จากสลัดจ์ จึงสามารถปรับตัวให้เข้ากับสลัดจ์ที่เป็นแหล่งอาหารได้ดีกว่า

4.7.2.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการหมัก

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพีเอชของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในระหว่างการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 4.34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



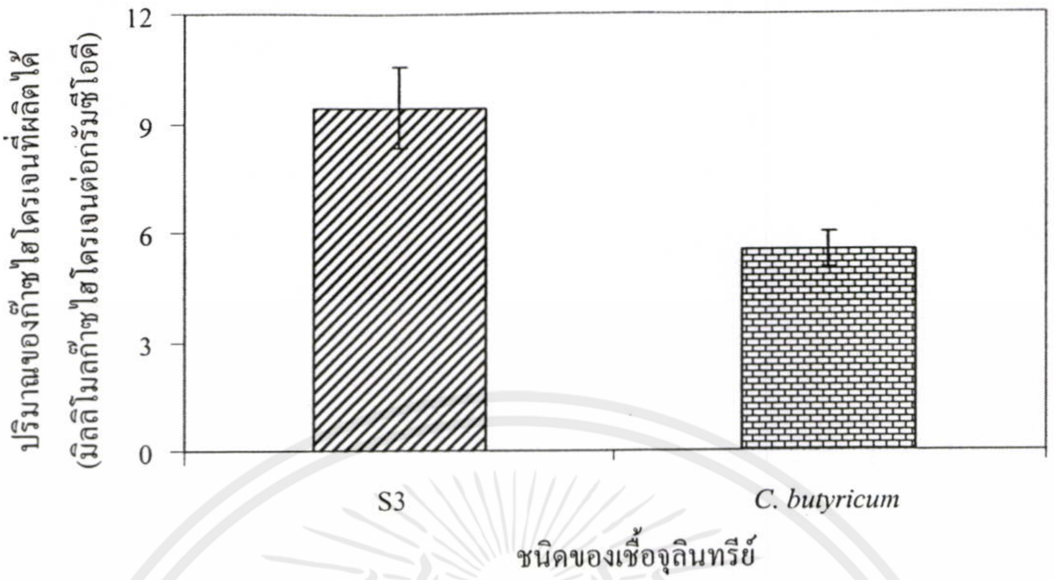
รูปที่ 4.34 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในช่วงเวลาการหมักที่เวลาต่างๆ ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในช่วงเวลาหมักต่างๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.34 แสดงเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างกระบวนการหมักที่มีการเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (KH_2PO_4 และ Na_2HPO_4) ควบคุมค่าพีเอชให้ได้ 6.0 ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* พบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในระหว่างกระบวนการหมักของทั้งสองเชื้ออยู่ในช่วง 5.7-6.0 ซึ่งค่าพีเอชของทั้งสองเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยและยังอยู่ในช่วงที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว แสดงว่าบัฟเฟอร์ที่เติมสามารถควบคุมพีเอชได้ดี (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 4.4 ภาคผนวก ค)

4.7.2.5 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ต่อกรัมซีโอดี

ผลการศึกษาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ต่อกรัมซีโอดีของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ดังแสดงในรูปที่ 4.35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.35 ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* ในระหว่างการหมัก เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

จากรูปที่ 4.35 แสดงปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* พบว่า ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* มีค่าเท่ากับ 9.45±0.81 และ 5.50±0.35 มิลลิโมลก๊าซไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดี ตามลำดับ (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 4.5 ภาคผนวก ค) ซึ่งปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อทั้งสองในสลัดจ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ง 9 ภาคผนวก ง) จากผลการทดลอง พบว่า เชื้อไอโซเลท S3 มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้สูงกว่าเชื้อ *C. butyricum* อาจเป็นเพราะอาหารและสภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท S3 มากกว่าเชื้อ *C. butyricum* การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสลัดจ์ระหว่างเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* แสดงในตารางที่ 4.6 และการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 กับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆ แสดงในตารางที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

พารามิเตอร์		**เชื้อจุลินทรีย์**	
		S3	***C. butyricum***
ปริมาตรก๊าซสะสม (มล.)		79.58	81.35
ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ (มิลลิโมลก๊าซไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดี)[a]		9.45±0.81	5.50±0.35
อัตราการผลิตก๊าซสูงสุด (มล./ล/ชม.)[b]		41.69±4.21	29.55±1.80
จำนวนเซลล์จุลินทรีย์[c]	Total plate count (x 10^6 CFU/ml)	171.67	-
พีเอช	เริ่มต้น	5.91	5.99
	สุดท้าย	5.86	5.96

[a] คือ ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ = มิลลิโมลก๊าซไฮโดรเจน/กรัมซีโอดี

[b] คือ อัตราการผลิตก๊าซสูงสุด = ปริมาตรก๊าซสะสมสูงสุด (มิลลิลิตร)/เวลาที่ใช้ในการผลิตก๊าซสูงสุด (ชั่วโมง)/ปริมาตรอาหารทั้งหมด (ลิตร)

[c] คือ จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เวลาบ่ม ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งเป็นเวลาที่มีจำนวนจุลินทรีย์สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 กับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ

เชื้อจุลินทรีย์	สารตั้งต้น	อุณหภูมิที่บ่ม (องศาเซลเซียส)	พีเอชเริ่มต้น	อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด (มล./ล./ชม.)	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ (โมลก๊าซไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส)	เอกสารอ้างอิง
E. coli strain MC13-4	กลูโคส	37±1	-	36	1.27	Ishikawa *et al.* (2006)
E. coli strain MC410	กลูโคส	30	7.3	4.58	-	Penfold *et al.* (2003)
E. coli strain HD701	กลูโคส	30	7.3	31.6	-	
E. coli BL-21	กลูโคส	37±1	6.0	-	3.12	Chittibabu *et al.* (2006)
E. coli (ไอโซเลท S3)	กลูโคส	30	6.8	38.02±5.65	1.92±0.10	การศึกษานี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

4.7.2.6 ปริมาณกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก

ในการศึกษาปริมาณกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักในสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนของเชื้อไอโซเลท S3 ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้จากการคัดแยกจากสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่คัดแยกได้ให้ดีขึ้นต่อไป ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ดังแสดงในตารางที่ 4.8 (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ ค 4.6-ค 4.10 และรูปที่ ค 4.1-ค 4.3 ภาคผนวก ค)

ตารางที่ 4.8 ปริมาณกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3

เวลาบ่ม (ชม.)	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	กรดอะซิติก	กรดโปรปิโอนิค	กรดบิวทิริค
0	48.4	84.9	0.8
3	1083.5	103.7	13.8
6	319.1	90.2	2.2
9	143.8	88.7	1.6
12	34.9	86.7	1.4
15	33.9	85.5	1.2
18	24.4	n.d.	1.0
21	19.5	n.d.	1.5
24	22.1	n.d.	1.6

หมายเหตุ : n.d. คือ ตรวจไม่พบ

จากตารางที่ 4.8 พบว่าเมื่อเวลาหมักเพิ่มขึ้นจาก 0-3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของกรดจะเพิ่มขึ้น และจะลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 3 โดยพบว่า ที่ชั่วโมงที่ 3 กรดอะซิติกมีความเข้มข้นสูงกว่ากรดโปรปิโอนิกและกรดบิวทิริก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองตอนที่ 4.4 ที่ไม่มีการเติมบัฟเฟอร์ลงไปในระบบ พบว่าในช่วง 0-3 ชั่วโมง ค่าพีเอชในระบบจะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการสะสมของกรดอินทรีย์ และหลังจากชั่วโมงที่ 3 ค่าพีเอชในสลัดจ์จะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ กรดอะซิติก, กรดโปรปิโอนิกและกรดบิวทิริกที่เกิดขึ้นนั้น ถูกเปลี่ยนไปเป็นก๊าซไฮโดรเจนดังแสดงในปฏิกิริยา 4.7-4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$CH_3CH_2CH_2COOH + 2\,H_2O \longrightarrow 2\,CH_3COOH + 2\,H_2\,(g) \qquad (4.7)$$

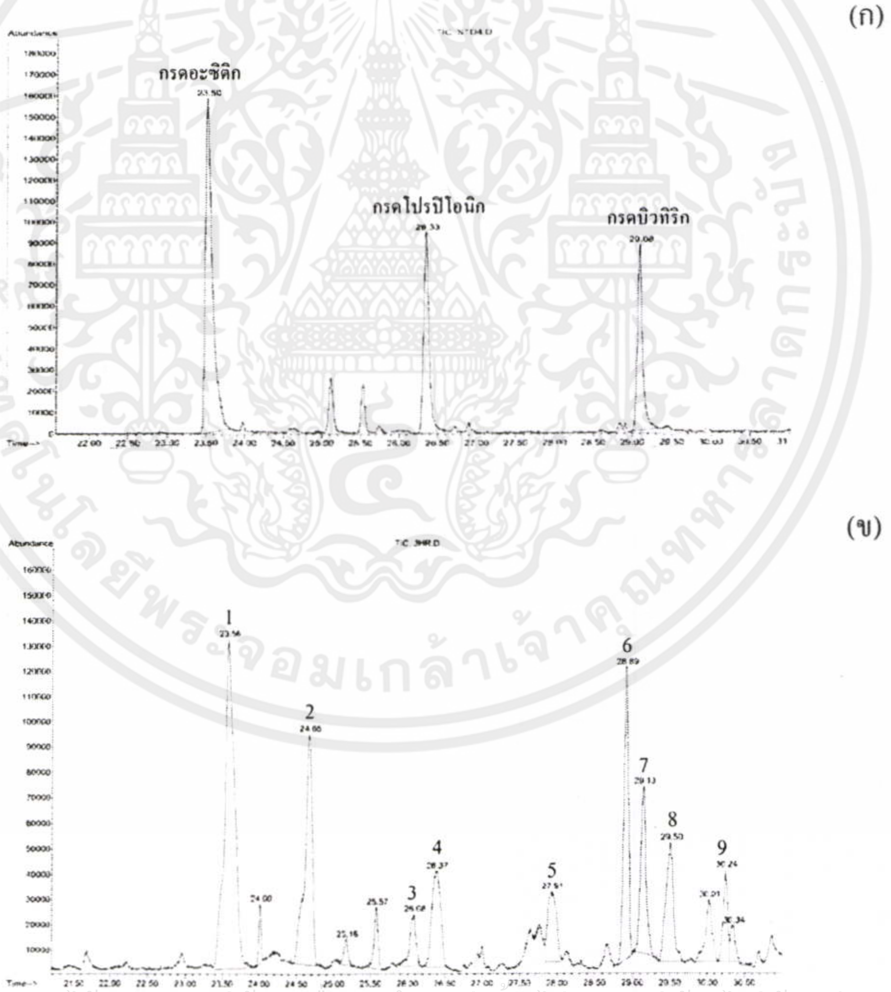
$$2\,CH_3CH_2COOH + 2\,H_2O \longrightarrow 3\,CH_3COOH + 2\,H_2\,(g) \qquad (4.8)$$

$$CH_3COOH + 2\,H_2O \longrightarrow 4\,H_2\,(g) + 2\,CO_2\,(g) \qquad (4.9)$$

สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักแสดงดังรูปที่ 4.36 และตารางที่ 4.9

จากข้อมูลในตารางที่ 4.8 พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 3 ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ทั้งหมดจะมีแนวโน้มลดลง เพราะจุลินทรีย์ใช้กรดอินทรีย์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chen *et al.* (2005) และ Kumar and Das, (2000) ที่ศึกษาสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน พบกรดอะซิติกเกิดในปริมาณที่สูงกว่ากรดโปรปิโอนิก และกรดบิวทิริก และช่วงที่พบกรดอินทรีย์ในปริมาณสูง จะทำให้ค่าพีเอชในระบบลดลงด้วย ในการทดลองนี้ พบว่า ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นมีการผลิตเอทานอล (รูปที่ 4.36) ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ ดังปฏิกิริยา 4.10

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,CH_3CH_2OH + 2\,CO_2\,(g) \qquad (4.10)$$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

รูปที่ 4.36 โครมาโตรแกรมกรดอินทรีย์ที่วิเคราะห์ด้วย SPME-GC-MS เมื่อ (ก) สารมาตรฐานกรดอะซิติกกรดโปรปินิค และกรดบิวทิก (ข) สารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่พบในน้ำหมัก

ตารางที่ 4.9 สารอินทรีย์ที่พบในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน

ลำดับพีค	ชื่อสารอินทรีย์ที่พบ
1	กรดอะซิติก (acetic acid)
2	1-เฮกซานอล (1-hexanol)
3	เบนซัลดีไฮด์ (benzaldehyde)
4	กรดโปรปิโอนิก (propionic acid)
5	ไพริดีน (pyridine)
6	เอทานอล (ethanol)
7	กรดบิวทิริก (Butyric acid)
8	ฟูราโนน (furanone)
9	2-ฟูแรนเมทานอล (2-furanmethanol)

อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในการทดลองนี้เกิดข้อผิดพลาด ทั้งนี้อาจเนื่องจากเทคนิค SPME ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างนี้ไม่เหมาะสมกับเตรียมตัวอย่างแอลกอฮอล์ เพราะแอลกอฮอล์เป็นสารที่ระเหยเร็วกว่ากรดอินทรีย์มาก ทำให้วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ ได้น้อยกว่าความเป็นจริง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. จุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จาก 3 แหล่ง ได้แก่ สลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน น้ำชะขยะจากหลุมฝังกลบขยะชุมชน และปุ๋ยคอกมูลวัว ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 135 ไอโซเลท และมีเพียง 6 ไอโซเลทที่สามารถผลิตก๊าซได้ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากสลัดจ์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนเพียงแหล่งเดียวเท่านั้น และพบว่ารูปร่างเชื้อเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ

2. จากผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร พบว่า เชื้อไอโซเลท S3 สามารถผลิตก๊าซได้มากกว่าเชื้อไอโซเลทอื่นๆ รองลงมา คือ เชื้อไอโซเลท S2, S6, S4, S5 และ S1 ซึ่งเชื้อไอโซเลท S3 มีปริมาตรก๊าซสะสมที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 269.92 มิลลิลิตร อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดเท่ากับ 48.30±8.33 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ 1.92±0.10 โมลก๊าซไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส

3. จากผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร พบว่า เชื้อไอโซเลท S3 สามารถผลิตก๊าซได้มากกว่าเชื้อไอโซเลทอื่นๆ รองลงมา คือ เชื้อไอโซเลท S2, S4, S5, S6 และ S1 ซึ่งเชื้อไอโซเลท S3 มีปริมาตรก๊าซสะสมที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 82.18 มิลลิลิตร อัตราการผลิตก๊าซสูงสุดเท่ากับ 36.88±0.68 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ 8.43±0.45 มิลลิโมลก๊าซไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดี

4. เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนในอาหาร RCM ได้สูง 3 ไอโซเลท คือ เชื้อไอโซเลท S3 รองลงมา คือ เชื้อไอโซเลท S2 และ S6 เมื่อนำไปจำแนกหาชนิดของเชื้อโดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่า เชื้อไอโซเลท S2 และ S3 เป็นเชื้อ *E. coli* ส่วนเชื้อไอโซเลท S6 เป็นเชื้อ *Enterobacter* sp.

5. เมื่อนำเชื้อไอโซเลท S3 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดมาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร พบว่า ที่ค่าพีเอช 6.0 ค่าความเข้มข้นของสลัดจ์โดยมีค่า MLSS เท่ากับ 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น (ที่ OD_{600} เท่ากับ 0.8) 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลองนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงแหล่งที่มาของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. จากผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนระหว่างเชื้อไอโซเลท S3 กับเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร พบว่าเชื้อ *C. butyricum* สามารถผลิตก๊าซ

ไฮโดรเจนได้สูงกว่าเชื้อไอโซเลท S3 ประมาณ 3.7 เท่า คือ ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* มีค่าเท่ากับ 1.92±0.10 และ 7.10±0.19 โมลก๊าซไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ตามลำดับ แต่เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร พบว่า เชื้อไอโซเลท S3 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงกว่าเชื้อ *C. butyricum* ประมาณ 1.7 เท่า คือ ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* มีค่าเท่ากับ 9.45±0.81 และ 5.50±0.35 มิลลิโมลก๊าซไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดี ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสลัดจ์โรงบำบัดน้ำเสียชุมชน โดยใช้ *E. coli* ที่แยกได้จากสลัดจ์โรงบำบัดน้ำเสียชุมชนเป็นการทดลองแบบครั้ง พบว่า มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนน้อย เนื่องจากเมื่อเวลาหมักเพิ่มขึ้น สารอาหารเริ่มลดลง จึงทำให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลงด้วย ดังนั้นจึงควรจะนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองนี้ไปศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระบบแบบต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนให้สูงขึ้น และอาจมีการใช้แหล่งอาหารอื่นร่วมกับสลัดจ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตให้สูงขึ้น และในระหว่างกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนควรวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างบีโอดีต่อซีโอดี เพื่อให้รู้ปริมาณสารอินทรีย์ในสลัดจ์ นอกจากนี้ ก๊าซที่ผลิตได้ในครั้งนี้ยังเป็นก๊าซผสม ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาวิธีการเก็บก๊าซไฮโดรเจน เพื่อที่จะนำก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการผลิตนี้ไปประยุกต์ใช้จริงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ณัฐพร จิระเรืองฤทธิ์, นิศานาถ อุดมมรกต และวิลานี วิชัยดิษฐ์. 2551. **ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดก๊าซไฮโดรเจนและการลดลงของน้ำตาลซูโครสในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสลัดจ์โรงบำบัดน้ำเสียชุมชนโดย *Escherichia coli* (*E.coli*).** วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประวิช รัตนเพียร. 2548. **คาดการณ์เทคโนโลยีเชื้อเพลิงอนาคตกลุ่มเอเปคมองไกลใช้ "ไฮโดรเจน".** [Online]. Available: http://www.manager.co.th/Science/ViewNews.aspx?NewsID=9480000152318

มั่นสิน ตัณฑุลเวศน์. 2542. **เทคโนโลยีบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ; โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิภาวี แบบประเสริฐ. 2547. **การศึกษาโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนของ *Vibrio* sp. ที่คัดแยกจากน้ำทะเล.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Aiyuk, S., Forrez, I., Lieven, D.K., Haandel, A.V. and Verstraete, W. 2006. **Anaerobic and Complementary Treatment of Domestic Sewage in Regions with Hot Climates-A Review.** Bioresource Technology, 97, 2225-2241.

American Public Health Association. 1995. **Standard Method for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed. Washington DC, USA: APHA.

Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wrenn, B.A. and Domiguez-Espinosa, R. 2004. **Production of Bioenergy and Biochemicals from Industrial and Agricultural Wastewater**. TRENDS in Biotechnology, 22(9), 477-485.

Brouzes, R. and Knowles, R. K. 1971. **Inhibition of Growth of *Clostridium pasteurianum* by Acetylene: Implication for Nitrogen Fixation Assay**. Can. J. Microbial., 17, 1483-1489.

Chang, J.S., Lee, K.S. and Lin, P.J. 2002. **Biohydrogen Production with Fixed-bed Bioreactors.** Int. J. Hydrogen Energy, 27, 1167-1174.

Chen, C.C., Lin, C.Y. and Lin, M.C. 2002. **Acid-base Enrichment Enhances Anaerobic Hydrogen Production Process**. Appl. Microbiol. Biotechnol., 58, 224-228.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chen, W.M., Tseng, Z.J., Lee, K.S. and Chang, J.S. 2005. **Fermentative Hydrogen Production with *Clostridium butyricum* CGS5 Isolated from Anaerobic Sewage Sludge**. Int. J. Hydrogen Energy, 30, 1063-1070.

Chen, X., Sun, Y., Xiu, Z., Li, X. and Zhang, D. 2006. **Stoichiometric Analysis of Biological Hydrogen Production by Fermentative Bacteria**. Int. J. Hydrogen Energy, 31, 539-549.

Chittibabu, G., Nath, K. and Das, D. 2006. **Feasibility Studies on the Fermentative Hydrogen Production by Recombinant *Escherichia coli* BL-21**. Process Biochemistry, 41, 682-688.

Dias, R. and Freeman, K. 1997. **Carbon Isotrope Analysis of Semivolatile Organic Compounds in Aqueous Media Using SPME and Isotope Ratio Monitoring GC/MS**. Anal. Chem., 69, 944-950.

Evvyernie, D., Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K. and Ohmiya, K. 2001. **Conversion of Chitinous Waste to Hydrogen Gas by *Clostridium paraputrificum* M-21**. J. Biosci. Bioeng., 91, 339-343.

EPA, 1978. **Hydrogen sulfide, Report to the Health Effects Research Laboratory**. Washington, D.C. : U.S. Environmental Protection Agency.

EPA. 1979. **Design Manual for Sludge Treatment and Disposal**. Washington, D.C. : U.S. Environmental Protection Agency.

EPA 1985. **Documents Provide the Basis for the Classification of Benzene as a Group A Carcinogen** Washington, D.C. : U.S. Environmental Protection Agency.

Fan, Y., Li, C., Lay, J.J., Hou, H. and Zhang, G. 2004. **Optimization of Initial Substrate and pH Levels for Germination of Sporing Hydrogen-Producing Anaerobes in Cow Dung Compost**. Bioresource Technology, 91, 189-193.

Fan, Y.T., Zhang, G.S., Guo, X.Y., Xing, Y. and Fan, M.H. 2006. **Biohydrogen-Production from Beer Lees Biomass by Cow Dung Compost**. Biomass and Bioenergy, 30(5), 493-496.

Fang , H.H.P. and Liu, H. 2002. **Effect of pH on Hydrogen Production from Glucose by a Mixed Culture**. Bioresource Technology, 82, 87-93.

Fang , H.H.P., Liu, H. and Zhang, T. 2002. **Characterisation of a Hydrogen-Producing Granular Sludge**. Biotechnol Bioeng., 78(1), 44-52.

Granovskii, M., Dincer, I. and Rosen, M.A. 2006. **Life Cycle Assessment of Hydrogen Fuel Cell and Gasoline Vehicles**. Int. J. Hydrogen Energy, 31, 337-352.

Hallenbeck, P.C. and Benemann, J.R. 2002. **Biological Hydrogen Production; Fundamentals and Limiting Processes**. Int. J. Hydrogen Energy, 27, 1185-1193.

Han, S.K. and Shin, H.S. 2004. **Biohydrogen Production by Anaerobic Fermentation of Food Waste**. Int. J. Hydrogen Energy, 29, 569-577.

Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L. and Hussy, I. 2002. **Sustainable Fermentative Hydrogen Production : Challenges for Process Optimization**. Int. J. Hydrogen Energy, 27, 1339-1347.

Hayes, T.P. and Theis, T.L. 1978. **The Distribution of Heavy Metal in Anaerobic Digestion**. J. Water Pollution Control Federation, 50(1), 307-313.

Ishikawa, M., Yamamura, S., Takamura, Y., Sode, K., Tamiya, E. and Tomiyama, M. 2006. **Development of a Compact High-Density Microbial Hydrogen Reactor for Portable Bio-Fuel Cell System**. Int. J. Hydrogen Energy, 31, 1484-1489.

Iyer, P., Bruns, M.A., Zhang, H., Ginkel, S.V. and Logan, B.E. 2004. **H_2-Producing Bacterial Communities from a Heat-treated Soil Inoculum**. Appl. Microbiol. Biotechnol., 66, 166-173.

Jalal, K.C.A., Alam, M.Z., Muyibi, S.A. and Jamal, P. 2006. **Isolation and Purification of Bacterial Strains from Treatment Plants for Effective and Efficient Bioconversion of Domestic Wastewater Sludge**. American Journal of Environmental Sciences, 2 (1), 1-5.

Kapdan, I.K. and Kargi, F. 2006. **Bio-hydrogen Production from Waste Materials**. Enzyme and Microbial Technology, 38, 569-582.

Kenealy, W. and Zeikus, J.G. 1981. **Influence of Corrinoid Antagonists on Methanogen Metabolism**. J. Bacteriol., 146, 133-140.

Khanal, S.K., Chen, W.H., Li, L. and Sung, S. 2004. **Biological Hydrogen Production : Effects of pH and Intermediate Products**. Int. J. Hydrogen Energy, 29, 1123-1131.

Kim, S.H., Han, S.K. and Shin, H.S. 2004. **Feasibility of Biohydrogen Production by Anaerobic Co-digestion of Food Waste and Sewage Sludge**. Int. J. Hydrogen Energy, 29, 1607-1616.

Kondratieva, E.N. and Gogotov, I.N. 1983. **Production of Molecular Hydrogen in Microorganisms**. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol, 28, 139-191.

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Koku, H., Eroglu, I., Gunduz, U., Yucel, M. and Lemi, T. 2002. **Aspects of the Metabolism of Hydrogen Production by *Rhodobacter sphaeroides*.** Int. J. Hydrogen Energy, 27, 1315-1329.

Kosaric, N. and Lyng, R.P. 1996. **Microbial Production of Hydrogen**. Pp. 101-134. *In* H. J. Rehmang G. Reed (eds). Biotechnology. 2^{nd} ed., VCH Publishers Inc., New York.

Kotay, S.M. and Das, D. 2007. **Microbial Hydrogen Production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 Isolated from Anaerobic Sewage Sludge**. Bioresource technology, 98, 1183-1190.

Kumar, N. and Das, D. 2000. **Enhancement of Hydrogen Production by *Enterobacter coacae* IIT-BT 08**. Process Biochemistry, 35, 589-593.

Kumar, N., Monga, P.S., Biswas, A.K. and Das, D. 2000. **Modeling and Simulation of Clean Fuel Production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08**. Int. J. Hydrogen Energy, 25, 945-952.

Lay, J.J. 2001. **Biohydrogen Generation by Mesophilic Anaerobic Fermentation of Microcrystalline Cellulose.** Biotechnol. Bioeng., 74, 280-287.

Lay, J.J., Lee, Y.J. and Noike, T. 1999. **Feasibility of Biological Hydrogen Production from Organic Fraction of Municipal Solid Waste.** Wat. Res., 33(11), 2579-2586.

Lay, J., Li, Y.Y. and Noike, T. 1997. **Influences of pH and Moisture Content on the Methane Production in High-Solids Sludge Digestion.** Wat. Res., 31(6), 1518-1524.

Lay, J.J. and Noike, T. 1999. **Hydrogen Production and Conversion of Cellulose by Anaerobic Digested Sludge**. J. Environ. Syst. Engng., (636/VII-13), 97-104.

Levin, D.B., Pitt, L. and Love, M. 2004. **Biohydrogen Production Prospects and Limitations to Practical Application**. Int. J. Hydrogen Energy, 29, 173-185.

Lin, C.Y. and Lay, C.H. 2004. **Carbon/Nitrogen Ratio Effect on Fermentative Hydrogen Production by Mixed Microflora**. Int. J. Hydrogen Energy, 29, 41-45.

Lin, C.Y. and Lay, C.H. 2005. **A Nutrient Formulation for Fermentative Hydrogen Production using Anaerobic Sewage Sludge Microflora**. Int. J. Hydrogen Energy, 30, 285-292.

Lin, S.Y., Harada, M. Suzuki, Y., and Hatano, H. 2005. **Process Analysis for Hydrogen Production by Reaction Integrated Novel Gasification (HyPr-RING)**. Energy Conversion and Management, 46(6), 869-880.

Logan, B.E., Oh, S.E. and Van Ginkel, S.W. 2002. **Biological Hydrogen Production Measured in Batch Anaerobic Respirometers**. Environ. Sci. Technol., 36(11), 2530-2535.

Lopez, F., Diaz, M.J., Eugenio, M.E., Ariza, J., Rodriguez, A. and Jimenez, L. 2003. **Optimization of Hydrogen Peroxide in Totally Chlorine Free Bleaching of Cellulose Pulp from Olive Tree Residues.** Bioresource Technology, 87, 255-261.

Manzel, J. 1989. **Sevar-Trocknungsverfahren mit Du¨nnbett [Sevar drying process in a thin bed]. In : Kla rschlammentsorgung.** Du sseldorf: VDI-Bildungswerk, 74-81.

Martines-Perez, N., Cherryman, S.J., Premier, G.C., Dinsdale, R.M., Hawkes, D.L., Hawkes, F.R., Kyazze, G. and Guwy, A.J. 2007. **The Potential for Hydrogen-Enriched Biogas Production from Crops : Scenarios in the UK** . Biomass and Bioenergy, 31, (2-3), 95-104.

McCarty, P.L. 1964. **Anaerobic Waste Treatment Fundamental part 1, 2, 3, 4.** Public Works. 95(9), 107-115.

Metcalf & Eddy, 1991. **Wastewater Engineering Treatment, Disposal and Reuse**. 3rd ed. New York, USA : McGraw Hill.

Metcalf & Eddy. 2004. **Wastewater Engineering treatment and Reuse**. 4th ed. New York, USA : McGraw-Hill.

Minnan, L., Jinli, H., Xiaobin, W., Huijuan, X., Jinzao, C., Chuannan, L., Fengzhang, Z. and Liangshu, X. 2005. **Isolation and Characterization of a High H_2-Producing Strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a Hot Spring.** Research in Microbiology, 156, 76-81.

Morimoto, M., Atsuko, M., Atif, A.A.Y., Ngan, M.A., l-Razi, A.F., Iyuke, S.E. and Bakir, A.M. 2004. **Biological Production of Hydrogen from Glucose by Natural Anaerobic Microflora.** Int. J. Hydrogen Energy, 29, 709-713.

Mu, Y., Zheng, X.J., Yu, H.Q. and Zhu, R.F. 2006. **Biological Hydrogen Production by Anaerobic Sludge at Various Temperatures.** Int. J. Hydrogen Energy, 31(6), 780-785.

Muyzer, G., deWaal, E.C. and Uitterlinden, A.G. 1993. **Profiling of Complex Microbial Population by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-amplified Genes Coding for 16S rDNA.** Appl. Environ. Microbial. 59, 695-700.

Nandi, R. and Sengupta, S. 1998. **Microbial Production of Hydrogen: An Overview**. Crit. Rev. Microbiol., 24, 61-84.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nelson, N. (1944), **A Photometric Adaptation of Somogyi Method for the Determination of Glucose**. Journal of Biological Chemistry, 153, 375-380.

Nesseri, S., Vaezi, F., Mahvi, A.H., Nabizadeh, R. and Haddadi, S. 2006. **Determination of the Ultrasonic Effectiveness in Advanced Wastewater Treatment**. J. Environ. Health Sci. Eng., 3(2), 109-116.

Ni, M., Leung, D.Y.C., Leung, M.K.H. and Sumathy, K. 2006. **An Overview of Hydrogen Production from Biomass**. Fuel Processing Technology, 87, 461-472.

Okamoto, M., Miyahara, T., Mizuno, O. and Noike, T. 2000. **Biological Hydrogen Potential of Materials Characteristic of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes**. Wate Sci. Technol, 41(3), 25-32.

Oremland, R.S. 1988. **Biogeochemistry of Methanogenic Bacteria. In : Zehnder AJB, editor. Biology of Anaerobic Microorganisms**. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore : Wiley; pp. 641-705.

Park, H.S., Kim, B.H., Kim, H.S., Kim, H.J., Kim, G.T., Kim,M., Chang, I.S., Park, Y.K. and Chang, H.I. 2001. **A Novel Electrochemically Active and Fe(III)-reducing Bacterium Phylogenetically Related to *Clostridium butyricum* Isolated from a Microbial Fuel Cell.** Anaerobe, 7, 297-306.

Penfold, DW., Forster, CF. **and** Macaskie, LE. **2003. Increased Hydrogen Production by *Escherichia coli* strain HD701 In Comparison with the Wild-Type Parent Strain MC4100**. Enzyme Microbial Technol, 33(2-3), 185-189.

Ranalli, G., Principi, P., and Sorlini, C. 2000. **Bacterial aerosol emission from wastewater treatment plants : Culture methods and bio-molecular tools**. Aerobiologia, 16, 39-46.

Shin, J-H., Yoon, J.H., Ahn, E.K., Kim, M-S., Sim, S.J. and Park, T.H. 2007. **Fermentative Hydrogen Production by the Newly Isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1**. Int. J. Hydrogen Energy, 32, 192-199.

Smith, G.D., Ewart, G.D. and Tucker, W. 1992. **Hydrogen Production by Cyanobacteria**. Int. J. Hydrogen Energy, 17, 695-698.

Soboh, B., Linder, D. and Hedderich, R. 2002. **Purification and Catalytic Properties of a CO-Oxidizing : H_2 - evolving Enzyme Complex from Carboxydothermus hydrogenoformans**. Europe Journal of Biochemistry, 269, 5712-5721.

Somogyi, M. (1952), **Notes on sugar determination**. Journal of Biological Chemistry, 195, 19-23.

Sparling, R., Risbey, D. and Poggi-varaldot, H. M. 1997. **Hydrogen Production from Inhibited Anaerobic Composters**. Int. J. Hydrogen Energy, 22(6), 563-566.

Taguchi, F., Yamada, K., Hasegawa, K., Taki-saito, T. and Hara, K. 1996. **Continuous Hydrogen Production by *Clostridium* sp. Strain No. 2 from Cellulose Hydrolysate in an Aqueous Two-Phase System.** J. Fermentation and Bioengineering, 82(1), 80-83.

Tanisho, S. and Ishiwata, Y. 1995. **Continous Hdrogen Poduction from Molasses by Fermentation using Urethane Foam as a Support of Flocks.** Int. J. Hydrogen Energy, 20 (7), 541-545.

Tchobanoglous, G., O Leary, P.R. 1994. **Landfilling <u>In</u> : Kreith, F. ed.**, Handbook of Solid Waste Management. McGraw-Hill, Inc., USA. Cth. 12,pp. 12.1-12.90

Ueno, Y., Otsuka, S. and Morimoto, M. 1996. **Hydrogen Production from Industrial Wastewater by Anaerobic Microflora in Chemostat Culture**. J. Fermentation and Bioengineering, 82 (2), 194-197.

Valdez-Vazquez, I., Leal, E.R., Garcia, F.E., Cecchi, F. and Varaldo, H.M.P. 2005. **Semi-Continuous Solid Substrate Anaerobic Reactors for H_2 Production from Organic waste : Mesophilic versus Thermophilicre gime**. Int. J. Hydrogen Energy, 30, 1383-1391.

Van Ginkel, S.W. and Logan, B. 2005. **Increased Biological Hydrogen Production with Reduced Organic Loading**, Water Res., 39, 3819-3826.

Van Ginkel, S., Sung, S. and Lay, J.J. 2001. **Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration.** Environ. Sci. Technol., 35, 4726-4730.

Wang, C.C., Chang, C.W., Chu, C.P., Lee, D.J., Chang, B.-V. and Liao, C.S. 2003. **Producing Hydrogen from Wastewater Sludge by *Clostridium bifermentans*.** J. Biotechnology, 102, 83-92.

Wang, C.H., Lin, P.J. and Chang, J.S. 2006. **Fermentative Conversion of Sucrose and Pineapple Waste into Hydrogen Gas in Phosphate-buffered Culture Seeded with Municipal Sewage Sludge.** Process Biochemistry. 41, 1353-1358.

Wunschiers R. and Lindblad, P. 2002. **Hydrogen in Education - A Biological Approach.** Int. J. Hydrogen Energy, 27 (11-12), 1131-1140.

Yokoi, H., Maki, R., Hirose, J. and Hayashi, S. 2002. **Microbial Production of Hydrogen from Starch-Manufacturing Wastes.** Biomass and Bioenergy, 22, 389-395.

Yokoi, H., Saitsu, A., Uchida, H., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 2001. **Microbial Hydrogen Production from Sweet Potato Starch Residue**. J. Bioscience and Bioengineering, 91 (1), 58-63.

Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1998. **Hydrogen Production from Starch by Mixed Culture of *Clostridium buytricum* and *Enterobacter aerogenes***. Biotechnol Lett , 20(2), 143–147.

Zajic, J.E., Kosaric, N. and Brosseau, J.D. 1978. **Microbial Production of Hydrogen**. Adv. Biochem. Eng, 9, 57-109.

Zhang, Y., Liu, G. and Shen, J. 2005. **Hydrogen Production in Batch Culture of Mixed Bacteria with Sucrose under Different Iron Concentrations**. Int. J. Hydrogen Energy, 30, 855-860.

Zhu, H. and Béland, M. 2006. **Evaluation of Alternative Methods of Preparing Hydrogen Producing Seeds from Digested Wastewater Sludge**. Int. J. Hydrogen Energy, 31(14), 1980-1988.

http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

http://www.techno.msu.ac.th/bt/pdfdocxls/b.doc

http://www.chlorine-eng.co.jp/.../puretron/img/p10.gif

http://www.hydrogenassociation.org/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการตรวจวิเคราะห์เชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก 1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ ก 1 สูตรอาหาร Reinforced Clostridial Media (RCM) และ Reinforced Clostridium agar (RCA)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	
	RCM	RCA
Casein peptone	10.0	10.0
Yeast extract	3.0	3.0
Meat extract	10.0	10.0
Dextrose	5.0	5.0
Sodium chloride	5.0	5.0
Sodium acetate	3.0	3.0
Soluble starch	1.0	1.0
Cysteine	0.5	0.5
Agar	0.5	12.0

ก 1.1 วิธีการเตรียมอาหารแข็ง Reinforced Clostridium Agar (RCA) จากอาหารเหลว RCM

1. ละลายอาหารสำเร็จ Reinforced Clostridium Medium (RCM) 33 กรัม (33 กรัมต่อน้ำ 1000 มิลลิลิตร) ในน้ำกลั่น ประมาณ 500 มิลลิลิตร
2. นำไปเข้า Microwave เพื่อ RCM ละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นประมาณ 950 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับพีเอช ด้วย 3 N NaOH หรือ 3 N HCl จนได้พีเอช ประมาณ 6.8±0.2 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร
3. แบ่งใส่ขวดขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 333 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด แล้วเติม Agar ขวดละ 5 กรัม (15 กรัมต่อน้ำ 1,000 มิลลิลิตร)
4. อาหารไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
5. นำออกจากหม้อนึ่งอบไอน้ำ ปล่อยให้อุ่นจนสามารถจับได้ แล้วเทใส่ในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้จนเย็นเพื่อให้วุ้นแข็งตัวดี คว่ำจานอาหารเพาะเชื้อ ใส่ถุง ระบุชื่ออาหาร วันที่เตรียมอาหาร นำไปแช่ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก 2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยเทคนิค Spread plate

วิธีการ

1. เจือจางตัวอย่างโดยปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร จะได้ความเจือจาง 1:10 เขย่าให้เข้ากันดี
2. ใช้ปิเปตดูดเชื้อที่ความเจือจาง 1:10 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร จะได้ความเจือจาง $1:10^2$ เขย่าให้เข้ากันดี ทำเช่นเดียวกันในความเจือจาง $1:10^3$, $1:10^4$ และ $1:10^5$
3. ดูดเชื้อที่ความเจือจาง $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$ และ $1:10^5$ ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง RCA ความเจือจางละ 3 จาน
4. ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วลนไฟ เพื่อฆ่าเชื้อ และปล่อยให้เย็น
5. เอาแท่งแก้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร โดยทำการฆ่าเชื้อแท่งแก้วใหม่ทุกครั้งเมื่อเปลี่ยนจานเพาะเชื้อ
6. บ่มเชื้อทิ้งไว้ 24-48 ชั่วโมง

ก 3 การแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยเทคนิค Streak plate

วิธีการ

1. เผาเข็มเขี่ยเชื้อ (loop) ให้แดง ปล่อยให้เย็น
2. ตักเชื้อผสมมาแตะที่ผิวหน้าวุ้น (อาหารแข็ง RCA) ใกล้ๆ ขอบใดขอบหนึ่งของจานเพาะเชื้อ ลากเข็มเขี่ยเชื้อเบา ๆ บนผิววุ้นไปมา 3-4 เส้น เสร็จแล้วปิดฝาจาน
3. เผาเข็มเขี่ยเชื้อ (loop) ให้แดง ปล่อยให้เย็น
4. หมุนจานเล็กน้อยให้เหมาะและถนัดในการ streak เปิดฝาจาน streak ครั้งที่ 2 โดยลากเข็มเขี่ยเชื้อผ่านเชื้อที่แตะไว้ครั้งแรก ลากไปมาบนผิววุ้น 5-6 เส้น ให้เส้นถี่หรือใกล้กันที่สุด
5. ทำเช่นเดียวกันในครั้งที่ 3 และที่ 4
6. บ่มเชื้อทิ้งไว้ 24-48 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งโคโลนีของเชื้อมีขนาดใหญ่พอเหมาะกับการเขี่ยเชื้อ เลือกเขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวๆ ที่มีลักษณะแตกต่างกัน ลงในอาหารแข็ง RCA ต่อไป โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 1-6 จนได้โคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะเหมือนกันทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก 4 การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

ก 1.4.1 สารเคมี

1. Gram's crytral violet

Solution A

Crytral violet	2	กรัม
Ethyl alcohol (95 เปอร์เซ็นต์)	20	มิลลิลิตร

Solution B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

นำสารละลาย A ผสมกับ B แล้วกรองส่วนที่เป็นตะกอนออก แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

2. Gram's iodine

Iodine	1	กรัม
Potassium iodide (KI)	2	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

เติมไอโอดีนหลังจาก KI ละลายหมด แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

3. Gram's alcohol (ใช้สำหรับล้างสี)

Ethyl alcohol (95 เปอร์เซ็นต์)	98	มิลลิลิตร

4. Gram's safranin

Safranin O (2.5เปอร์เซ็นต์ใน Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

ก 1.4.2 วิธีการ

1. สเมียร์เชื้อลงบนสไลด์ วางทิ้งไว้ให้แห้ง แล้ว fix เชื้อด้วยความร้อน
2. หยดสี crytral violet ลงบนเชื้อที่สเมียร์บนสไลด์ วางทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกโดยให้น้ำไหลผ่านเบา ๆ
3. หยดสี iodine ลงบนเชื้อ วางทิ้งไว้ 1 นาที (iodine เป็น mordant ช่วยให้สีติดดีขึ้น) แล้วล้างออกโดยให้น้ำไหลผ่านเบา ๆ
4. ล้างสีด้วย alcohol ลงบนเชื้อ วางทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างออกโดยให้น้ำไหลผ่านเบา ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. หยดสี safranin ลงบนเชื้อ วางทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกโดยให้น้ำไหลผ่านเบา ๆ ในกรณีที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกติดสีม่วงของ crytral violet ส่วนแบคทีเรียแกรมลบติดสีแดงของ safranin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข 1 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi Nelson's method (Nelson, 1940)

ข 1.1 อุปกรณ์และสารละลายเคมี

1. สารละลาย Copper reagent
2. สารละลาย Nelson's reagent
3. สาระลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร
4. สารละลายตัวอย่างน้ำตาล
5. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
6. อ่างน้ำเย็น
7. ลูกแก้ว
8. เครื่องแก้วต่าง ๆ

ข 1.2 การเตรียมสารละลาย

ข 1.2.1 การเตรียมสารละลาย copper reagent

1. ละลาย $Na_2HPO_4.12H_2O$ จำนวน 70.5495 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร
2. เติม Sodium potassium tartrate (tetrahydrate) ปริมาณ 40 กรัม
3. เติม 1N NaOH จำนวน 100 มิลลิลิตร
4. เติม Na_2SO_4 (anhydrous) จำนวน 120 กรัม
5. เติม 10 เปอร์เซ็นต์ copper sulfate จำนวน 100 มิลลิลิตร (เตรียมได้จาก $CuSO_4.5H_2O$ จำนวน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร)
6. ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บใส่ไว้ในขวดสีชา
7. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4

ข 1.2.2 การเตรียมสารละลาย Nelson's reagent

1. โดยละลาย ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) จำนวน 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร
2. เติม conc. H_2SO_4 ปริมาตร 21 มิลลิลิตร
3. ละลาย disodium hydrogen arsenate ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) จำนวน 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และค่อย ๆ ผสมสารละลายเข้าด้วยกัน
4. ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บใส่ไว้ในขวดสีชา
5. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่อนุญาตให้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข 1.2.3 วิธีการทดลอง

1. ปิเปตสารละลายกลูโคสและสารละลายตัวอย่างน้ำตาล และน้ำกลั่นดังตารางที่ ข 1
2. ปิเปต Copper reagent ลงไป 2 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด
3. นำหลอดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ควรวางลูกแก้วไว้บนฝาหลอดเพื่อลดการระเหยของน้ำ
4. นำหลอดไปวางในอ่างน้ำเย็นทันที
5. ปิเปต Nelson's reagent ลงไป 2 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด และผสมให้เข้ากัน
6. เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน
7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ไม่มีน้ำตาลเป็น blank พร้อมบันทึกผล

ตารางที่ ข 1 ปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

ปริมาตรของสารละลาย	หลอดที่							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1. สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น (100 ไมโครกรัมต่อลิตร) (มล.)	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-	-
2. สารละลายตัวอย่างน้ำตาล (มล.)	-	-	-	-	-	-	0.5	1.0
3. น้ำกลั่น (มล.)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	-	0.5	-
4. Copper reagent (มล.)	2	2	2	2	2	2	2	2
5. Nelson's reagent (มล.)	2	2	2	2	2	2	2	2
6. น้ำกลั่น (มล.)	5	5	5	5	5	5	5	5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค 1 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่ง โดยใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

ตารางที่ ค 1.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

S1										
เวลา (ชม.)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			(ครั้งที่ 3)			$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
2	5.0	4.98	4.42	0	0	0	0	0	(0)	2.21
3	25.0	24.98	22.17	10.2	10.18	9.00	5.0	4.98	(4.42)	15.58
4	48.0	47.98	42.58	40.0	39.98	35.40	18.0	17.98	(15.97)	38.99
5	68.0	67.98	60.32	54.0	53.98	47.79	34.0	33.98	(30.18)	54.06
6	80.0	79.98	70.97	75.0	74.98	66.38	48.0	47.98	(42.62)	68.68
7	100.0	99.98	88.72	86.0	85.98	76.12	65.0	64.98	(57.72)	82.42
8	120.0	119.98	106.47	112.0	111.98	99.14	78.0	77.98	(69.27)	102.81
9	152.0	151.98	134.86	140.0	139.98	123.93	95.0	94.98	(84.37)	129.40
10	180.0	179.98	159.71	165.0	164.98	146.07	105.0	104.98	(93.25)	152.89
11	200.0	199.98	177.46	182.0	181.98	161.12	112.0	111.98	(99.47)	169.29
12	220.0	219.98	195.21	198.0	197.98	175.28	120.0	119.98	(106.58)	185.25
13	225.0	224.98	199.64	206.0	205.98	182.37	120.0	119.98	(106.58)	191.01
14	230.0	229.98	204.08	214.0	213.98	189.45	125.0	124.98	(111.02)	196.77
15	236.0	235.98	209.41	220.0	219.98	194.76	125.0	124.98	(111.02)	202.08
16	236.0	235.98	209.41	224.0	223.98	198.30	125.0	124.98	(111.02)	203.85
17	240.0	239.98	212.95	224.0	223.98	198.30	125.0	124.98	(111.02)	205.63
18	240.0	239.98	212.95	224.0	223.98	198.30	128.0	127.98	(113.68)	205.63
19	240.0	239.98	212.95	224.0	223.98	198.30	128.0	127.98	(113.68)	205.63
20	240.0	239.98	212.95	224.0	223.98	198.30	128.0	127.98	(113.68)	205.63
21	240.0	239.98	212.95	224.0	223.98	198.30	130.0	129.98	(115.46)	205.63
22	240.0	239.98	212.95	224.0	223.98	198.30	130.0	129.98	(115.46)	205.63
23	240.0	239.98	212.95	224.0	223.98	198.30	130.0	129.98	(115.46)	205.63
24	240.0	239.98	212.95	224.0	223.98	198.30	130.0	129.98	(115.46)	205.63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ถึงทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9849 atm ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm
(ครั้งที่ 3) เป็นค่าที่แตกต่างจากกลุ่ม (outliner) จึงไม่นำมาใช้ในการคำนวณ

ตารางที่ ค 1.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

S2										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			(ครั้งที่ 3)			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
2	8.0	7.98	7.08	0	0	0	0	0	(0)	3.54
3	21.0	20.98	18.62	8.0	7.98	7.07	5.0	4.98	(4.42)	12.84
4	56.0	55.98	49.68	21.0	20.98	18.57	17.0	16.98	(15.08)	34.13
5	100.0	99.98	88.72	56.0	55.98	49.56	28.0	27.98	(24.85)	69.14
6	134.0	133.98	118.89	100.0	99.98	88.52	43.0	42.98	(38.18)	103.71
7	146.0	145.98	129.54	134.0	133.98	118.62	65.0	64.98	(57.72)	124.08
8	166.0	165.98	147.29	146.0	145.98	129.25	96.0	95.98	(85.26)	138.27
9	194.0	193.98	172.13	166.0	165.98	146.95	112.0	111.98	(99.47)	159.54
10	197.0	196.98	174.80	194.0	193.98	171.74	125.0	124.98	(111.02)	173.27
11	225.0	224.98	199.64	197.0	196.98	174.40	130.0	129.98	(115.46)	187.02
12	232.0	231.98	205.86	225.0	224.98	199.19	132.0	131.98	(117.24)	202.52
13	244.0	243.98	216.50	232.0	231.98	205.39	135.0	134.98	(119.90)	210.95
14	248.0	247.98	220.05	244.0	243.98	216.01	137.0	136.98	(121.68)	218.03
15	248.0	247.98	220.05	248.0	247.98	219.55	140.0	139.98	(124.34)	219.80
16	256.0	255.98	227.15	248.0	247.98	219.55	140.0	139.98	(124.34)	223.35
17	260.0	259.98	230.70	256.0	255.98	226.64	140.0	139.98	(124.34)	228.67
18	260.0	259.98	230.70	260.0	259.98	230.18	140.0	139.98	(124.34)	230.44
19	262.0	261.98	232.48	262.0	261.98	231.95	140.0	139.98	(124.34)	232.21
20	262.0	261.98	232.48	272.0	271.98	240.80	140.0	139.98	(124.34)	236.64
21	270.0	269.98	239.58	276.0	275.98	244.34	140.0	139.98	(124.34)	241.96
22	270.0	269.98	239.58	276.0	275.98	244.34	140.0	139.98	(124.34)	241.96
23	270.0	269.98	239.58	276.0	275.98	244.34	140.0	139.98	(124.34)	241.96
24	270.0	269.98	239.58	276.0	275.98	244.34	140.0	139.98	(124.34)	241.96

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm

(ครั้งที่ 3) เป็นค่าที่แตกต่างจากกลุ่ม (outliner) จึงไม่นำมาใช้ในการคำนวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

S3										
เวลา (ชม.)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	20.0	19.98	17.73	25.0	24.98	22.12	8.0	7.98	7.09	15.64
3	55.0	54.98	48.79	65.0	64.98	57.53	18.0	17.98	15.97	40.76
4	84.0	83.98	74.52	78.0	77.98	69.04	27.0	26.98	23.97	55.84
5	112.0	111.98	99.37	100.0	99.98	88.52	82.0	81.98	72.82	86.90
6	156.0	155.98	138.41	140.0	139.98	123.93	121.0	120.98	107.46	123.27
7	193.0	192.98	171.25	176.0	175.98	155.81	163.0	162.98	144.77	157.28
8	220.0	219.98	195.21	196.0	195.98	173.51	186.0	185.98	165.20	177.97
9	258.0	257.98	228.93	216.0	215.98	191.22	204.0	203.98	181.19	200.45
10	274.0	273.98	243.13	248.0	247.98	219.55	222.0	221.98	197.18	219.95
11	282.0	281.98	250.22	270.0	269.98	239.03	240.0	239.98	213.17	234.14
12	296.0	295.98	262.65	276.0	275.98	244.34	255.0	254.98	226.50	244.50
13	298.0	297.98	264.42	286.0	285.98	253.20	256.0	255.98	227.38	248.33
14	299.0	298.98	265.31	295.0	294.98	261.16	264.0	263.98	234.49	253.65
15	300.0	299.98	266.20	300.0	299.98	265.59	264.0	263.98	234.49	255.43
16	300.0	299.98	266.20	301.0	300.98	266.48	266.0	265.98	236.27	256.31
17	300.0	299.98	266.20	305.0	304.98	270.02	274.0	273.98	243.37	259.86
18	304.0	303.98	269.75	310.0	309.98	274.45	276.0	275.98	245.15	263.11
19	304.0	303.98	269.75	315.0	314.98	278.87	280.0	279.98	248.70	265.77
20	304.0	303.98	269.75	315.0	314.98	278.87	289.0	288.98	256.70	268.44
21	304.0	303.98	269.75	315.0	314.98	278.87	292.0	291.98	259.36	269.33
22	304.0	303.98	269.75	315.0	314.98	278.87	292.0	291.98	259.36	269.33
23	304.0	303.98	269.75	315.0	314.98	278.87	294.0	293.98	261.14	269.92
24	304.0	303.98	269.75	315.0	314.98	278.87	294.0	293.98	261.14	269.92

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 ^{o}C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 ^{o}C, 0.9859 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 ^{o}C, 0.9859 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

S4										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			(ครั้งที่ 3)			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
2	0	0	0	16.0	15.98	14.15	0	0	(0)	7.07
3	16.0	15.98	14.15	40.0	39.98	35.40	10.0	9.98	(8.87)	24.77
4	40.0	39.98	35.41	82.0	81.98	72.58	25.0	24.98	(22.19)	53.99
5	82.0	81.98	72.60	102.0	101.98	90.29	46.0	45.98	(40.84)	81.44
6	102.0	101.98	90.31	112.0	111.98	99.14	67.0	66.98	(59.50)	94.73
7	112.0	111.98	99.17	119.0	118.98	105.34	85.0	84.98	(75.49)	102.25
8	135.0	134.98	119.54	154.0	153.98	136.33	98.0	97.98	(87.03)	127.93
9	154.0	153.98	136.36	166.0	165.98	146.95	109.0	108.98	(96.81)	141.66
10	174.0	173.98	154.07	184.0	183.98	162.89	120.0	119.98	(106.58)	158.48
11	184.0	183.98	162.93	196.0	195.98	173.51	136.0	135.98	(120.79)	168.22
12	196.0	195.98	173.56	205.0	204.98	181.48	148.0	147.98	(131.45)	177.52
13	220.0	219.98	194.81	220.0	219.98	194.76	155.0	154.98	(137.67)	194.79
14	225.0	224.98	199.24	225.0	224.98	199.19	162.0	161.98	(143.88)	199.21
15	231.0	230.98	204.55	231.0	230.98	204.50	164.0	163.98	(145.66)	204.53
16	231.0	230.98	204.55	235.0	234.98	208.04	165.0	164.98	(146.55)	206.30
17	235.0	234.98	208.09	240.0	239.98	212.47	165.0	164.98	(146.55)	210.28
18	240.0	239.98	212.52	240.0	239.98	212.47	166.0	165.98	(147.44)	212.50
19	242.0	241.98	214.29	240.0	239.98	212.47	166.0	165.98	(147.44)	213.38
20	242.0	241.98	214.29	240.0	239.98	212.47	166.0	165.98	(147.44)	213.38
21	243.0	242.98	215.18	240.0	239.98	212.47	167.0	166.98	(148.33)	213.82
22	245.0	244.98	216.95	240.0	239.98	212.47	167.0	166.98	(148.33)	214.71
23	245.0	244.98	216.95	240.0	239.98	212.47	167.0	166.98	(148.33)	214.71
24	245.0	244.98	216.95	240.0	239.98	212.47	167.0	166.98	(148.33)	214.71

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 ^{o}C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 ^{o}C, 0.9859 atm

(ครั้งที่ 3) เป็นค่าที่แตกต่างจากกลุ่ม (outliner) จึงไม่นำมาใช้ในการคำนวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

S5										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	12.0	11.98	10.61	6.0	5.98	5.29	0	0	0	5.30
3	15.0	14.98	13.27	15.0	14.98	13.26	10.0	9.98	8.87	11.80
4	42.0	41.98	37.18	42.0	41.98	37.17	15.0	14.98	13.31	29.22
5	84.0	83.98	74.37	120.0	119.98	106.23	24.0	23.98	21.30	67.30
6	146.0	145.98	129.28	144.0	143.98	127.47	64.0	63.98	56.83	104.53
7	187.0	186.98	165.59	178.0	177.98	157.58	111.0	110.98	98.58	140.58
8	200.0	199.98	177.10	206.0	205.98	182.37	180.0	179.98	159.87	173.11
9	214.0	213.98	189.50	221.0	220.98	195.65	210.0	209.98	186.52	190.56
10	224.0	223.98	198.35	225.0	224.98	199.19	226.0	225.98	200.73	199.43
11	225.0	224.98	199.24	228.0	227.98	201.85	235.0	234.98	208.73	203.27
12	227.0	226.98	201.01	230.0	229.98	203.62	238.0	237.98	211.39	205.34
13	235.0	234.98	208.09	240.0	239.98	212.47	240.0	239.98	213.17	211.24
14	238.0	237.98	210.75	250.0	249.98	221.32	240.0	239.98	213.17	215.08
15	244.0	243.98	216.06	254.0	253.98	224.86	240.0	239.98	213.17	218.03
16	249.0	248.98	220.49	254.0	253.98	224.86	240.0	239.98	213.17	219.51
17	249.0	248.98	220.49	254.0	253.98	224.86	240.0	239.98	213.17	219.51
18	250.0	249.98	221.38	254.0	253.98	224.86	240.0	239.98	213.17	219.80
19	250.0	249.98	221.38	254.0	253.98	224.86	240.0	239.98	213.17	219.80
20	250.0	249.98	221.38	256.0	255.98	226.64	240.0	239.98	213.17	220.39
21	250.0	249.98	221.38	256.0	255.98	226.64	240.0	239.98	213.17	220.39
22	250.0	249.98	221.38	256.0	255.98	226.64	240.0	239.98	213.17	220.39
23	250.0	249.98	221.38	256.0	255.98	226.64	240.0	239.98	213.17	220.39
24	250.0	249.98	221.38	256.0	255.98	226.64	240.0	239.98	213.17	220.39

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 ^{o}C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 ^{o}C, 0.9859 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 ^{o}C, 0.9859 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

S6										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			(ครั้งที่ 3)			
เวลา (ชม.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
2	7.2	7.18	6.36	6.0	5.98	5.29	0	0	(0)	5.83
3	38.0	37.98	33.63	18.0	17.98	15.92	10.0	9.98	(8.87)	24.78
4	66.0	65.98	58.43	24.0	23.98	21.23	25.0	24.98	(22.19)	39.83
5	102.0	101.98	90.31	75.0	74.98	66.38	48.0	47.98	(42.62)	78.35
6	125.0	124.98	110.68	120.0	119.98	106.23	72.0	71.98	(63.94)	108.45
7	142.0	141.98	125.74	180.0	179.98	159.35	95.0	94.98	(84.37)	142.54
8	167.0	166.98	147.87	250.0	249.98	221.32	112.0	111.98	(99.47)	184.60
9	188.0	187.98	166.47	271.0	270.98	239.92	126.0	125.98	(111.91)	203.19
10	210.0	209.98	185.95	271.0	270.98	239.92	140.0	139.98	(124.34)	212.94
11	230.0	229.98	203.67	271.0	270.98	239.92	155.0	154.98	(137.67)	221.79
12	240.0	239.98	212.52	271.0	270.98	239.92	167.0	166.98	(148.33)	226.22
13	249.0	248.98	220.49	271.0	270.98	239.92	178.0	177.98	(158.10)	230.20
14	249.0	248.98	220.49	271.0	270.98	239.92	184.0	183.98	(163.43)	230.20
15	254.0	253.98	224.92	271.0	270.98	239.92	186.0	185.98	(165.20)	232.42
16	254.0	253.98	224.92	271.0	270.98	239.92	188.0	187.98	(166.98)	232.42
17	254.0	253.98	224.92	271.0	270.98	239.92	188.0	187.98	(166.98)	232.42
18	254.0	253.98	224.92	271.0	270.98	239.92	190.0	189.98	(168.76)	232.42
19	254.0	253.98	224.92	271.0	270.98	239.92	190.0	189.98	(168.76)	232.42
20	257.0	256.98	227.58	271.0	270.98	239.92	190.0	189.98	(168.76)	233.75
21	257.0	256.98	227.58	271.0	270.98	239.92	192.0	191.98	(170.53)	233.75
22	259.0	258.98	229.35	271.0	270.98	239.92	192.0	191.98	(170.53)	234.63
23	259.0	258.98	229.35	271.0	270.98	239.92	192.0	191.98	(170.53)	234.63
24	259.0	258.98	229.35	271.0	270.98	239.92	192.0	191.98	(170.53)	234.63

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm

(ครั้งที่ 3) เป็นค่าที่แตกต่างจากกลุ่ม (outliner) จึงไม่นำมาใช้ในการคำนวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

	C. butyricun									
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			(ครั้งที่ 3)*			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
5	100.0	99.98	88.81	105.0	104.98	93.25	50.0	49.98	(44.40)	91.03
6	250.0	249.98	222.05	258.0	257.98	229.16	147.0	146.98	(130.56)	225.61
7	500.0	499.98	444.13	508.0	507.98	451.23	290.0	289.98	(257.59)	447.68
8	750.0	749.98	666.20	758.0	757.98	673.30	320.0	319.98	(284.23)	669.75
9	934.0	933.98	829.64	978.0	977.98	868.73	510.0	509.98	(453.01)	849.18
10	986.0	985.98	875.83	1010.0	1009.98	897.15	605.0	604.98	(537.40)	886.49
11	1035.0	1034.98	919.36	1050.0	1049.98	932.68	640.0	639.98	(568.49)	926.02
12	1070.0	1069.98	950.45	1080.0	1079.98	959.33	670.0	669.98	(595.13)	954.89
13	1084.0	1083.98	962.88	1092.0	1091.98	969.99	680.0	679.98	(604.02)	966.44
14	1110.0	1109.98	985.98	1124.0	1123.98	998.42	690.0	689.98	(612.90)	992.20
15	1154.0	1153.98	1025.06	1165.0	1164.98	1034.84	700.0	699.98	(621.78)	1029.95
16	1178.0	1177.98	1046.38	1190.0	1189.98	1057.04	700.0	699.98	(621.78)	1051.71
17	1178.0	1177.98	1046.38	1190.0	1189.98	1057.04	700.0	699.98	(621.78)	1051.71
18	1178.0	1177.98	1046.38	1190.0	1189.98	1057.04	700.0	699.98	(621.78)	1051.71
19	1178.0	1177.98	1046.38	1190.0	1189.98	1057.04	700.0	699.98	(621.78)	1051.71
20	1178.0	1177.98	1046.38	1190.0	1189.98	1057.04	700.0	699.98	(621.78)	1051.71
21	1178.0	1177.98	1046.38	1190.0	1189.98	1057.04	700.0	699.98	(621.78)	1051.71
22	1178.0	1177.98	1046.38	1190.0	1189.98	1057.04	700.0	699.98	(621.78)	1051.71
23	1178.0	1177.98	1046.38	1190.0	1189.98	1057.04	700.0	699.98	(621.78)	1051.71
24	1178.0	1177.98	1046.38	1186.0	1185.98	1053.49	700.0	699.98	(621.78)	1049.94

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9859 atm

(ครั้งที่ 3) เป็นค่าที่แตกต่างจากกลุ่ม (outliner) จึงไม่นำมาใช้ในการคำนวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.2 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์โดยวัดค่าความหนาแน่นของเซลล์ในน้ำหมักที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S1	0	0.052	0.056	O	0.054
	3	0.745	0.484	O	0.615
	6	0.845	0.619	O	0.732
	9	0.860	0.672	O	0.766
	12	0.878	0.700	O	0.789
	15	0.883	0.752	O	0.818
	18	0.856	0.726	O	0.791
	21	0.832	0.688	O	0.760
	24	0.813	0.679	O	0.746
S2	0	0.054	0.058	O	0.056
	3	0.816	0.789	O	0.803
	6	1.090	0.942	O	1.016
	9	1.160	1.120	O	1.140
	12	1.160	1.160	O	1.160
	15	1.200	1.200	O	1.200
	18	1.160	1.150	O	1.155
	21	1.090	1.110	O	1.100
	24	1.080	1.090	O	1.085
S3	0	0.049	0.056	0.050	0.052
	3	0.836	0.946	0.834	0.872
	6	1.120	1.160	1.100	1.127
	9	1.200	1.200	1.170	1.190
	12	1.210	1.220	1.180	1.203
	15	1.240	1.220	1.230	1.230
	18	1.160	1.130	1.210	1.167
	21	1.140	1.110	1.180	1.143
	24	1.120	1.050	1.170	1.113

หมายเหตุ : ค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่ามากกว่า 1 ได้จากการเจือจาง 100 เท่า

O คือ ค่า Outliner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.2 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์โดยวัดค่าความหนาแน่นของเซลล์ในน้ำหมักที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S4	0	0.054	0.058	O	0.056
	3	0.768	0.851	O	0.810
	6	1.080	1.040	O	1.060
	9	1.160	1.140	O	1.150
	12	1.180	1.170	O	1.175
	15	1.240	1.200	O	1.220
	18	1.210	1.270	O	1.240
	21	1.130	1.170	O	1.150
	24	1.050	0.986	O	1.018
S5	0	0.060	0.057	0.059	0.059
	3	0.904	0.853	0.802	0.853
	6	1.430	1.440	1.360	1.410
	9	1.430	1.430	1.340	1.400
	12	1.410	1.450	1.330	1.397
	15	1.390	1.410	1.310	1.370
	18	1.380	1.350	1.300	1.343
	21	1.360	1.380	1.210	1.317
	24	1.350	1.250	1.190	1.263
S6	0	0.068	0.062	O	0.065
	3	0.836	0.780	O	0.808
	6	1.080	1.330	O	1.205
	9	1.220	1.350	O	1.285
	12	1.200	1.320	O	1.260
	15	1.190	1.320	O	1.255
	18	1.180	1.310	O	1.245
	21	1.170	1.240	O	1.205
	24	1.140	1.200	O	1.170

หมายเหตุ : ค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่ามากกว่า 1 ได้จากการเจือจาง 100 เท่า

O คือ ค่า Outliner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.2 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์โดยวัดค่าความหนาแน่นของเซลล์ในน้ำหมักที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
C. butyricum	0	0.060	0.063	O	0.062
	3	0.146	0.154	O	0.150
	6	1.144	1.147	O	1.146
	9	1.396	1.390	O	1.393
	12	1.402	1.405	O	1.404
	15	1.410	1.415	O	1.413
	18	1.414	1.415	O	1.415
	21	1.336	1.332	O	1.334
	24	1.245	1.250	O	1.248
Control	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

หมายเหตุ : ค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่ามากกว่า 1 ได้จากการเจือจาง 100 เท่า

n.d. คือ ไม่พบ

O คือ ค่า Outliner

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.3 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำหมักวัดโดยเทคนิค spread plate เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ (x 10^6 CFU/ml)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S1	0	2.90	3.07	O	2.99
	3	62.00	69.00	O	65.67
	6	110.00	118.00	O	114.00
	9	82.00	82.00	O	82.00
	12	33.00	41.00	O	37.00
	15	13.80	14.70	O	14.27
	18	12.90	13.10	O	13.00
	21	9.80	7.80	O	8.80
	24	1.31	1.27	O	1.27
S2	0	2.98	3.00	O	2.99
	3	89.00	76.00	O	82.33
	6	105.00	109.00	O	107.00
	9	78.00	85.00	O	81.67
	12	44.00	49.00	O	46.33
	15	14.20	15.10	O	14.67
	18	12.20	12.90	O	12.53
	21	11.00	10.90	O	10.93
	24	9.80	9.90	O	9.87
S3	0	2.94	2.96	2.90	2.93
	3	89.00	92.00	94.00	91.67
	6	176.00	151.00	176.00	167.67
	9	110.00	104.00	112.00	108.67
	12	78.00	81.00	76.00	78.33
	15	21.50	22.00	22.40	21.97
	18	16.20	15.40	17.10	16.23
	21	10.00	10.20	11.00	10.40
	24	2.80	3.20	3.50	3.17

หมายเหตุ : O คือ ค่า Outliner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.3 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำหมักวัดโดยเทคนิค spread plate เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ (x 10^6 CFU/ml)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S4	0	2.89	2.87	O	2.88
	3	62.00	69.00	O	65.67
	6	151.00	174.00	O	162.33
	9	134.00	130.00	O	132.00
	12	88.00	77.00	O	82.33
	15	35.00	28.00	O	31.67
	18	19.80	19.30	O	19.53
	21	15.00	13.90	O	14.47
	24	3.03	2.89	O	2.96
S5	0	3.00	2.96	3.01	2.99
	3	83.00	88.00	90.00	87.00
	6	123.00	130.00	128.00	127.00
	9	69.00	71.00	70.00	70.00
	12	38.00	40.00	45.00	41.00
	15	13.80	14.50	14.90	14.40
	18	12.00	11.10	11.50	11.53
	21	7.60	6.80	7.30	7.23
	24	3.50	4.20	3.80	3.83
S6	0	2.93	3.15	O	3.04
	3	78.00	91.00	O	84.33
	6	133.00	124.00	O	128.67
	9	72.00	65.00	O	68.33
	12	26.80	27.90	O	27.33
	15	13.80	15.00	O	14.40
	18	12.40	13.10	O	12.73
	21	9.00	8.70	O	8.83
	24	4.60	5.30	O	4.93

หมายเหตุ : O คือ ค่า Outliner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.3 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำหมักวัดโดยเทคนิค spread plate เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ (x 10^6 CFU/ml)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
C. butyricum	0	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	9	-	-	-	-
	12	-	-	-	-
	15	-	-	-	-
	18	-	-	-	-
	21	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
Control	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

หมายเหตุ : - คือ ไม่สามารถทดลองได้ อาจเนื่องมาจากมีการปนเปื้อนของก๊าซออกซิเจน ทำให้เชื้อ *C. butyricum* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้

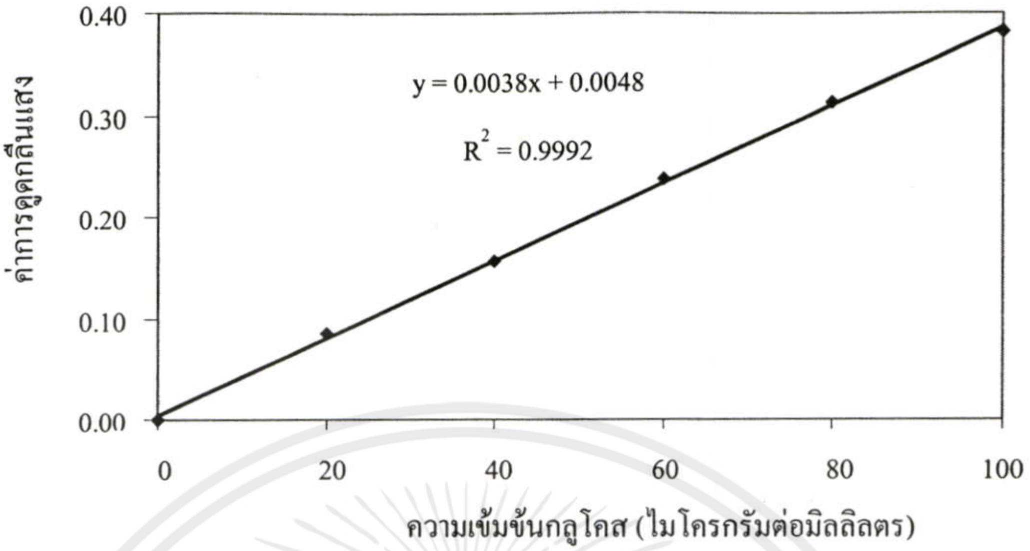
n.d. คือ ตรวจไม่พบ

O คือ ค่า Outliner

ตารางที่ ค 1.4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
0	0	0	0	0
20	0.085	0.084	0.089	0.086
40	0.165	0.157	0.146	0.156
60	0.245	0.244	0.241	0.243
80	0.314	0.315	0.307	0.312
100	0.379	0.376	0.394	0.383

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค 1.1 กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสในตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S1	0	0.239	0.241	O	0.240
	3	0.190	0.187	O	0.189
	6	0.116	0.118	O	0.117
	9	0.070	0.062	O	0.066
	12	0.062	0.062	O	0.062
	15	0.058	0.056	O	0.057
	18	0.053	0.049	O	0.051
	21	0.043	0.045	O	0.044
	24	0.041	0.038	O	0.040
S2	0	0.238	0.243	O	0.241
	3	0.171	0.178	O	0.175
	6	0.124	0.126	O	0.125
	9	0.086	0.075	O	0.081
	12	0.062	0.059	O	0.061
	15	0.056	0.053	O	0.055
	18	0.043	0.045	O	0.044
	21	0.038	0.037	O	0.038
	24	0.032	0.032	O	0.032
S3	0	0.240	0.243	0.241	0.241
	3	0.177	0.179	0.181	0.179
	6	0.130	0.135	0.134	0.133
	9	0.094	0.096	0.087	0.092
	12	0.062	0.067	0.065	0.065
	15	0.058	0.054	0.056	0.056
	18	0.053	0.052	0.051	0.052
	21	0.048	0.047	0.049	0.048
	24	0.042	0.040	0.041	0.041

หมายเหตุ : ทั้งหมดเจือจาง 100 เท่า, O คือ ค่า Outliner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสในตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S4	0	0.239	0.239	O	0.239
	3	0.215	0.227	O	0.221
	6	0.155	0.143	O	0.149
	9	0.106	0.106	O	0.106
	12	0.086	0.084	O	0.085
	15	0.080	0.082	O	0.081
	18	0.056	0.058	O	0.057
	21	0.044	0.042	O	0.043
	24	0.034	0.035	O	0.035
S5	0	0.242	0.241	0.242	0.242
	3	0.181	0.190	0.187	0.186
	6	0.123	0.119	0.121	0.121
	9	0.075	0.076	0.075	0.075
	12	0.062	0.063	0.064	0.063
	15	0.046	0.042	0.043	0.044
	18	0.041	0.039	0.038	0.039
	21	0.036	0.033	0.035	0.035
	24	0.031	0.035	0.032	0.033
S6	0	0.242	0.241	O	0.242
	3	0.170	0.169	O	0.170
	6	0.128	0.126	O	0.127
	9	0.088	0.085	O	0.087
	12	0.069	0.069	O	0.069
	15	0.058	0.058	O	0.058
	18	0.045	0.046	O	0.046
	21	0.040	0.041	O	0.041
	24	0.036	0.035	O	0.036

หมายเหตุ : ทั้งหมดเจือจาง 100 เท่า, O คือ ค่า Outliner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงที่มาของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสในตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
C. butyricum	0	0.242	0.238	O	0.240
	3	0.219	0.215	O	0.217
	6	0.169	0.174	O	0.172
	9	0.095	0.085	O	0.090
	12	0.069	0.069	O	0.069
	15	0.045	0.042	O	0.044
	18	0.036	0.033	O	0.035
	21	0.030	0.034	O	0.032
	24	0.027	0.032	O	0.030
Control	0	0.244	0.243	0.241	0.243
	3	0.239	0.239	0.240	0.239
	6	0.238	0.239	0.240	0.239
	9	0.236	0.238	0.237	0.237
	12	0.236	0.234	0.235	0.235
	15	0.235	0.234	0.233	0.234
	18	0.233	0.235	0.233	0.234
	21	0.234	0.233	0.235	0.234
	24	0.236	0.234	0.233	0.234

หมายเหตุ : ทั้งหมดเจือจาง 100 เท่า

O คือ ค่า Outliner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.6 ความเข้มข้นกลูโคสที่ได้จากการคำนวณในสมการจากกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S1	0	6.16	6.22	O	6.19
	3	4.87	4.82	O	4.83
	6	2.93	3.06	O	2.99
	9	1.72	1.87	O	1.70
	12	1.48	1.51	O	1.50
	15	1.40	1.37	O	1.37
	18	1.27	1.16	O	1.21
	21	1.01	1.03	O	1.03
	24	0.95	0.90	O	0.91
S2	0	6.19	6.27	O	6.20
	3	4.37	4.56	O	4.46
	6	3.14	3.19	O	3.16
	9	2.14	1.85	O	1.99
	12	1.48	1.43	O	1.47
	15	1.35	1.27	O	1.30
	18	1.01	1.06	O	1.00
	21	0.87	0.90	O	0.87
	24	0.69	0.72	O	0.71
S3	0	6.19	6.27	6.22	6.22
	3	4.53	4.58	4.64	4.58
	6	3.29	3.43	3.40	3.37
	9	2.35	2.40	2.16	2.30
	12	1.51	1.64	1.58	6.19
	15	1.40	1.29	1.35	4.83
	18	1.27	1.24	1.22	2.99
	21	1.14	1.11	1.16	1.70
	24	0.98	0.93	0.95	1.50

หมายเหตุ : O คือ ค่า Outliner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.6 ความเข้มข้นกลูโคสที่ได้จากการคำนวณในสมการจากกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S4	0	6.16	6.16	O	6.17
	3	5.53	5.85	O	5.73
	6	3.54	3.65	O	3.72
	9	2.65	2.65	O	2.97
	12	2.39	2.08	O	2.20
	15	1.97	2.02	O	1.95
	18	1.34	1.39	O	1.34
	21	1.03	0.98	O	0.98
	24	0.74	0.79	O	0.77
S5	0	6.24	6.22	6.24	6.23
	3	4.64	4.87	4.79	4.77
	6	3.11	3.01	3.06	3.06
	9	1.85	1.87	1.85	1.86
	12	1.51	1.53	1.56	1.53
	15	1.08	0.98	1.01	1.02
	18	0.95	0.90	0.87	0.91
	21	0.82	0.74	0.79	0.79
	24	0.69	0.79	0.72	0.73
S6	0	6.14	6.22	O	6.20
	3	4.35	4.32	O	4.28
	6	3.24	3.19	O	3.19
	9	2.19	2.11	O	2.22
	12	1.72	1.69	O	1.70
	15	1.32	1.40	O	1.37
	18	1.06	1.01	O	1.05
	21	0.90	0.95	O	0.93
	24	0.82	0.79	O	0.74

หมายเหตุ : O คือ ค่า Outliner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.6 ความเข้มข้นกลูโคสที่ได้จากการคำนวณในสมการจากกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
C. butyricum	0	6.16	6.14	O	6.18
	3	5.58	5.53	O	5.58
	6	4.32	4.45	O	4.37
	9	2.19	2.11	O	2.22
	12	1.72	1.69	O	1.70
	15	1.03	0.98	O	1.02
	18	0.82	0.74	O	0.76
	21	0.66	0.74	O	0.72
	24	0.58	0.72	O	0.65
Control	0	6.29	6.27	6.22	6.26
	3	6.16	6.16	6.19	6.17
	6	6.14	6.16	6.19	6.16
	9	6.08	6.14	6.11	6.11
	12	6.08	6.03	6.06	6.06
	15	6.06	6.03	6.01	6.03
	18	6.01	6.06	6.01	6.02
	21	6.03	6.01	6.06	6.03
	24	6.08	6.04	6.00	6.04

หมายเหตุ : O คือ ค่า Outliner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

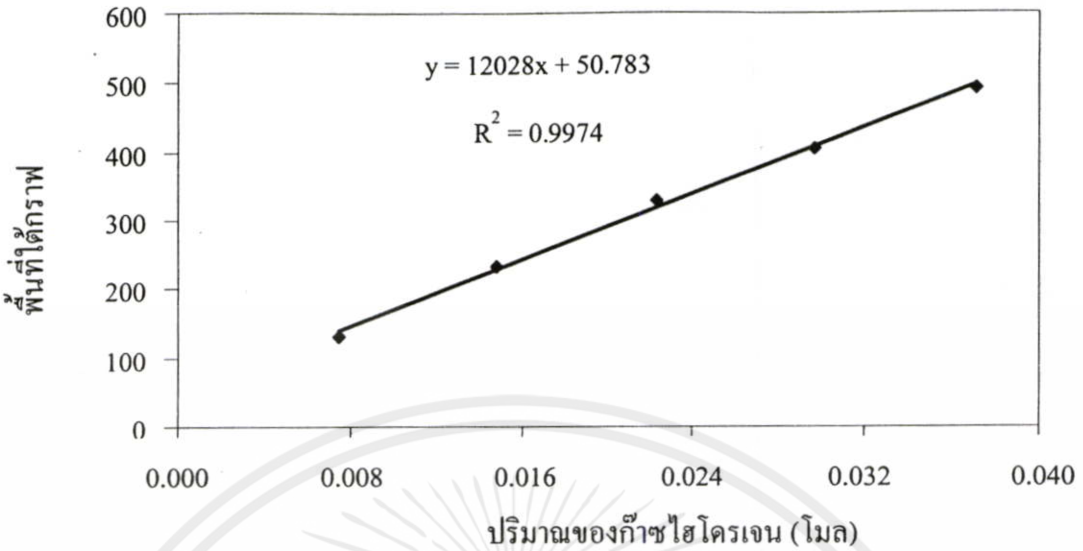
ตารางที่ ค 1.7 การเปลี่ยนแปลงพีเอชที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

เวลา (ชม.)	พีเอช							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	*C. butyricum*	Control
0	6.75	6.77	6.76	6.78	6.77	6.76	6.75	6.78
3	5.84	5.89	5.68	5.76	6.27	6.24	6.47	6.76
6	5.64	5.63	5.45	5.70	6.22	6.18	5.55	6.76
9	5.50	5.41	5.31	5.47	6.18	6.13	5.26	6.75
12	5.38	5.29	5.16	5.29	6.15	6.12	5.24	6.73
15	5.32	5.25	5.12	5.20	6.11	6.08	5.19	6.73
18	5.26	5.18	5.07	5.14	6.05	6.01	5.19	6.73
21	5.18	5.12	5.04	5.10	5.85	5.96	5.15	6.73
24	5.11	5.04	5.01	5.07	5.96	5.90	5.09	6.73

ตารางที่ ค 1.8 พื้นที่ใต้กราฟของก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐานความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ปริมาตรต่างๆ

ปริมาตรก๊าซที่ฉีด (มล.)	จำนวนกรัม	จำนวนโมล	พื้นที่ใต้กราฟ		
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	$\overline{X}$
0.5	0.015	0.0074	139	126	132.5
1.0	0.030	0.0148	229	238	233.5
1.5	0.045	0.0223	323	335	329.0
2.0	0.060	0.0297	418	406	412.0
2.5	0.075	0.0371	497	489	493.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค 1.2 กราฟของก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 1.9 จำนวนโมลของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นต่อจำนวนโมลของกลูโคสที่ถูกใช้ไป

รหัสเชื้อ	จำนวนกลูโคสที่ถูกย่อย (โมล)			จำนวนโมลก๊าซไฮโดรเจน (โมล)			ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจน (โมลก๊าซไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคสที่ถูกย่อยสลาย)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$±S.D.
S1	0.018	0.018	-	0.009	0.010	-	0.49	0.53	-	0.51±0.02
S2	0.018	0.019	-	0.024	0.022	-	1.29	1.18	-	1.23±0.07
S3	0.018	0.018	0.018	0.035	0.033	0.036	1.92	1.82	2.02	1.92±0.10
S4	0.015	0.016	-	0.014	0.018	-	0.99	1.13	-	1.06±0.10
S5	0.018	0.018	0.018	0.018	0.016	0.017	0.97	0.86	0.94	0.92±0.06
S6	0.017	0.018	-	0.019	0.022	-	1.10	1.24	-	1.17±0.09
C. butyricum	0.020	0.020	-	0.145	0.140	-	7.24	6.97	-	7.10±0.44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ค 2 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อที่แยกได้จาก 3 แหล่ง โดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

ตารางที่ ค 2.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

S1										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	12.0	11.98	10.63	10.0	9.98	8.84	10.0	9.98	8.87	9.44
4	13.0	12.98	11.52	12.0	11.98	10.61	14.0	13.98	12.42	11.51
5	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
6	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
7	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
8	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
9	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
10	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
11	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
12	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
13	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
14	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
15	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
16	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
17	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
18	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
19	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
20	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
21	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
22	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
23	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24
24	20.0	19.98	17.73	17.0	16.98	15.03	18.0	17.98	15.97	16.24

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9829 atm, ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9842 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9859 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 2.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

S2										
เวลา (ชม.)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	14.0	13.98	12.41	10.0	9.98	8.84	10.0	9.98	8.87	10.04
4	21.0	20.98	18.62	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	18.02
5	29.0	28.98	25.72	18.0	17.98	15.92	30.0	29.98	26.63	22.76
6	35.0	34.98	31.04	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.67
7	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
8	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
9	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
10	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
11	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
12	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
13	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
14	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
15	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
16	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
17	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
18	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
19	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
20	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
21	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
22	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
23	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96
24	36.0	35.98	31.93	28.0	27.98	24.77	34.0	33.98	30.18	28.96

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 $^{\circ}$C, 0.9842 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C, 0.9859 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 2.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

S3

เวลา (ชม.)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	33.5	33.48	29.71	15. 0	14.98	13.26	16.0	15.98	14.19	19.06
4	73.5	73.48	65.21	56.0	55.98	49.56	41.0	40.98	36.40	50.39
5	89.0	88.98	78.96	86.0	85.98	76.12	87.0	86.98	77.26	77.45
6	93.0	92.98	82.51	86.0	85.98	76.12	90.0	89.98	79.93	79.52
7	96.0	95.98	85.17	86.0	85.98	76.12	90.0	89.98	79.93	80.41
8	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	92.0	91.98	81.70	81.59
9	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	92.0	91.98	81.70	81.59
10	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
11	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
12	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
13	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
14	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
15	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
16	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
17	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
18	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
19	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
20	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
21	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
22	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
23	98.0	97.98	86.95	86.0	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18
24	98.0	97.98	86.95	86.00	85.98	76.12	94.0	93.98	83.48	82.18

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9842 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9888 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 2.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

S4										
เวลา (ชม.)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			(ครั้งที่ 3)			$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
3	8.0	7.98	7.07	10.0	9.98	8.84	0	0	(0)	7.95
4	8.0	7.98	7.07	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	9.72
5	8.0	7.98	7.07	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	9.72
6	16.0	15.98	14.15	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.26
7	16.0	15.98	14.15	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.26
8	16.8	16.78	14.86	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.62
9	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
10	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
11	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
12	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
13	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
14	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
15	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
16	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
17	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
18	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
19	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
20	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
21	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
22	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
23	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71
24	17.0	16.98	15.04	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	13.71

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9842 atm

(ครั้งที่ 3) เป็นค่าที่แตกต่างจากกลุ่ม (outliner) จึงไม่นำมาใช้ในการคำนวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 2.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

S5										
เวลา	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			
(ชม.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	7.0	6.98	6.18	11.0	10.98	9.72	10.0	9.98	8.87	8.26
4	7.0	6.98	6.18	11.5	11.48	10.16	11.0	10.98	9.75	8.70
5	13.5	13.48	11.94	12.0	11.98	10.61	11.0	10.98	9.75	10.77
6	14.0	13.98	12.38	13.0	12.98	11.49	11.0	10.98	9.75	11.21
7	15.0	14.98	13.27	13.0	12.98	11.49	11.0	10.98	9.75	11.50
8	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
9	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
10	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
11	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
12	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
13	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
14	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
15	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
16	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
17	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
18	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
19	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
20	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
21	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
22	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
23	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95
24	16.0	15.98	14.15	13.5	13.48	11.93	11.0	10.98	9.75	11.95

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 ^{o}C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 ^{o}C, 0.9842 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 ^{o}C, 0.9888 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 2.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

S6										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	9.0	8.98	7.95	9.0	8.98	7.95	10.0	9.98	8.87	8.26
4	9.0	8.98	7.95	18.0	17.98	15.92	19.0	18.98	16.86	13.58
5	18.0	17.98	15.92	18.0	17.98	15.92	20.0	19.98	17.75	16.53
6	19.0	18.98	16.81	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.42
7	19.0	18.98	16.81	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.42
8	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
9	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
10	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
11	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
12	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
13	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
14	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
15	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
16	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
17	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
18	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
19	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
20	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
21	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
22	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
23	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71
24	20.0	19.98	17.69	18.0	17.98	15.92	22.0	21.98	19.52	17.71

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9842 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9888 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ดังวัน ใช้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 2.2 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำหมักเมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ (x 10^6 CFU/ml)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S1	0	2.86	2.70	2.78	2.78
	3	74.00	68.00	70.00	70.67
	6	109.00	111.00	115.00	111.67
	9	69.00	75.00	77.00	73.67
	12	33.00	38.00	40.00	37.00
	15	14.60	15.20	14.70	14.83
	18	12.90	12.20	12.60	12.57
	21	9.80	8.60	8.00	8.80
	24	1.18	1.20	1.24	1.21
S2	0	2.68	2.73	2.78	2.73
	3	66.00	70.00	75.00	70.33
	6	152.00	148.00	140.00	146.67
	9	98.00	88.00	94.00	93.33
	12	47.00	50.00	45.00	47.33
	15	21.00	22.80	21.60	21.80
	18	18.00	17.30	16.70	17.33
	21	13.00	12.50	11.90	12.47
	24	2.78	2.90	2.87	2.85
S3	0	2.68	2.70	2.75	2.71
	3	79.00	85.00	94.00	86.00
	6	170.00	177.00	176.00	174.33
	9	98.00	104.00	110.00	104.00
	12	66.00	58.00	70.00	64.67
	15	21.50	22.00	22.40	21.97
	18	16.20	15.40	17.10	16.23
	21	10.00	10.20	11.00	10.40
	24	2.80	3.20	3.50	3.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 2.2 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำหมักเมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ (x 10^6 CFU/ml)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S4	0	2.98	2.97	O	2.97
	3	89.00	76.00	O	82.33
	6	105.00	109.00	O	107.00
	9	78.00	83.00	O	80.33
	12	44.00	39.00	O	41.67
	15	14.20	15.10	O	14.67
	18	12.20	12.90	O	12.53
	21	11.00	10.90	O	10.93
	24	9.80	9.90	O	9.87
S5	0	2.80	2.76	2.91	2.82
	3	75.00	67.00	80.00	74.00
	6	122.00	117.00	118.00	119.00
	9	60.00	68.00	70.00	66.00
	12	28.00	39.00	35.00	34.00
	15	15.30	15.70	16.30	15.77
	18	10.40	10.00	10.30	10.23
	21	6.70	6.80	7.40	6.97
	24	4.00	3.50	4.40	3.97
S6	0	2.76	2.87	2.89	2.84
	3	75.00	74.00	68.00	72.33
	6	133.00	127.00	126.00	128.67
	9	72.00	64.00	69.00	68.33
	12	268.00	279.00	273.00	273.33
	15	13.80	14.50	14.90	14.40
	18	12.40	12.90	12.90	12.73
	21	9.00	8.30	9.20	8.83
	24	4.60	5.00	5.20	4.93

หมายเหตุ : O คือ ค่า Outliner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 2.2 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำหมักเมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ (x 10^6 CFU/ml)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
Control	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

หมายเหตุ n.d. คือ ตรวจไม่พบ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 2.3 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีในน้ำหมักเมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S1	0	3440.00	3559.18	3499.59	3499.59
	3	5204.82	5089.16	5146.99	5146.99
	6	4279.52	4185.71	4232.62	4232.62
	9	3467.00	3520.00	3493.50	3493.50
	12	3269.92	3200.00	3234.96	3234.96
	15	2971.43	3050.00	3010.71	3010.71
	18	2971.43	2873.47	2922.45	2922.45
	21	2971.43	2873.47	2922.45	2922.45
	24	2835.44	2873.47	2854.46	2854.46
S2	0	3240.00	3559.18	3399.59	3399.59
	3	5746.94	5224.49	5485.71	5485.71
	6	4571.43	4342.86	4457.14	4457.14
	9	3918.37	3885.71	3902.04	3902.04
	12	3395.92	3395.92	3395.92	3395.92
	15	3395.92	3306.00	3350.96	3350.96
	18	3265.31	3200.00	3232.65	3232.65
	21	3200.00	2971.43	3085.71	3085.71
	24	2971.43	2873.47	2922.45	2922.45
S3	0	3395.92	3585.54	3490.73	3490.73
	3	5877.55	5746.94	5812.24	5812.24
	6	5877.55	5746.94	5812.24	5812.24
	9	3918.37	3853.06	3885.71	3885.71
	12	3395.92	3395.92	3395.92	3395.92
	15	3306.00	3315.00	3310.50	3310.50
	18	3200.00	3200.00	3200.00	3200.00
	21	3200.00	3200.00	3200.00	3200.00
	24	3195.78	3200.00	3197.89	3197.89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงชื่อของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 2.3 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีในน้ำหมักเมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S4	0	3559.18	3572.36	O	3565.77
	3	4481.93	4526.68	O	4504.30
	6	3881.63	3932.65	O	3907.14
	9	3460.00	3502.15	O	3481.08
	12	3295.92	3247.96	O	3271.94
	15	3006.00	2988.71	O	2997.36
	18	2873.47	2922.45	O	2897.96
	21	2971.43	3085.71	O	3028.57
	24	2873.47	2922.45	O	2897.96
S5	0	3585.54	3383.13	3484.34	3484.34
	3	4481.93	4742.17	4612.05	4612.05
	6	3804.15	3918.37	3861.26	3861.26
	9	3660.00	3544.30	3602.15	3602.15
	12	3195.78	3159.49	3177.64	3177.64
	15	3306.00	3265.31	3285.65	3285.65
	18	3018.37	2971.43	2994.90	2994.90
	21	2835.44	2873.47	2854.46	2854.46
	24	2700.00	2680.00	2690.00	2690.00
S6	0	3460.00	3559.18	3509.59	3509.59
	3	5046.94	5085.71	5066.33	5066.33
	6	4371.43	4257.14	4314.29	4314.29
	9	3395.92	3295.92	3345.92	3345.92
	12	3150.00	3095.92	3122.96	3122.96
	15	3050.00	3095.92	3072.96	3072.96
	18	2971.43	2971.43	2971.43	2971.43
	21	2873.47	2817.72	2845.60	2845.60
	24	2873.47	2771.43	2822.45	2822.45

หมายเหตุ : O คือ ค่า Outliner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 2.3 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีในน้ำหมักเมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
Control	0	2220.41	2304.930	2262.67	2262.67
	3	2220.41	2304.900	2262.65	2262.65
	6	2155.10	2220.410	2187.76	2187.76
	9	2057.14	2220.410	2138.78	2138.78
	12	2048.39	2190.000	2119.20	2119.20
	15	2034.23	2124.430	2079.33	2079.33
	18	2027.25	2068.640	2047.95	2047.95
	21	2023.49	2023.490	2023.49	2023.49
	24	2024.49	2024.490	2024.49	2024.49

ตารางที่ ค 2.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

เวลา (ชม.)	พีเอช						
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Control
0	6.78	6.80	6.80	6.79	6.80	6.79	6.79
3	6.06	5.96	5.88	5.97	6.18	6.41	6.79
6	6.05	6.12	5.96	6.15	6.27	6.33	6.78
9	6.03	6.16	6.09	6.16	6.32	6.32	6.75
12	6.20	6.23	6.13	6.19	6.39	6.33	6.73
15	6.27	6.31	6.18	6.31	6.44	6.39	6.72
18	6.36	6.45	6.23	6.39	6.50	6.54	6.68
21	6.39	6.46	6.24	6.44	6.55	6.56	6.69
24	6.45	6.49	6.26	6.50	6.60	6.58	6.68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 2.5 จำนวนโมลของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นต่อกรัมซีโอดี

รหัสเชื้อ	จำนวนโมลก๊าซไฮโดรเจน (มิลลิโมล)			ซีโอดีที่ถูกย่อยสลาย (กรัม)[a]			ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ (มิลลิโมลก๊าซไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดีที่ถูกย่อยสลาย)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X}$±S.D.
S1	2.35	2.18	2.68	1.35	1.22	1.28	1.74	1.79	2.09	1.88±0.19
S2	6.34	5.34	6.67	1.84	1.27	1.56	3.44	4.19	4.28	3.97±0.46
S3	10.49	9.58	9.25	1.24	1.08	1.16	8.46	8.86	7.79	8.43±0.45
S4	2.10	2.43	-	0.79	0.76	-	2.66	3.19	-	2.93±0.37
S5	1.51	2.18	2.35	0.79	1.09	0.94	1.92	2.00	2.50	2.14±0.31
S6	1.85	2.76	2.10	1.13	1.18	1.15	1.63	2.35	1.82	1.93±0.37
Control	0	0	0	0.07	0.08	0.07	0	0	0	0

[a] คำนวณจากผลต่างของค่าเอสซีโอดีที่ชั่วโมงที่ 0 และ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ค 3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

ค 3.1 ผลการศึกษาพีเอชของสลัดจ์เริ่มต้น

ตารางที่ ค 3.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

พีเอช 5.5										
เวลา (ชม.)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			(ครั้งที่ 3)			$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
2	8.0	7.98	7.08	0	0	0	10.0	9.98	(8.86)	3.54
3	18.0	17.98	15.96	16.0	15.98	14.15	18.0	17.98	(15.96)	15.05
4	28.0	27.98	24.83	32.0	31.98	28.31	18.0	17.98	(15.96)	26.57
5	30.0	29.98	26.60	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	28.79
6	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
7	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
8	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
9	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
10	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
11	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
12	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
13	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
14	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
15	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
16	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
17	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
18	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
19	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
20	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
21	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
22	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
23	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12
24	33.0	32.98	29.27	35.0	34.98	30.97	18.0	17.98	(15.96)	30.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ห้ามดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9849 atm, ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm

(ครั้งที่ 3) เป็นค่าที่แตกต่างจากกลุ่ม (outliner) จึงไม่นำมาใช้ในการคำนวณ

ตารางที่ ค 3.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

พีเอช 6.0										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			(ครั้งที่ 3)			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
2	15.0	14.98	13.29	0	0	0	10.0	9.98	(8.86)	6.65
3	37.0	36.98	32.82	40.0	39.98	35.40	18.0	17.98	(15.96)	34.11
4	60.0	59.98	53.23	62.0	61.98	54.87	30.0	29.98	(26.60)	54.05
5	62.0	61.98	55.00	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	57.59
6	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
7	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
8	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
9	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
10	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
11	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
12	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
13	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
14	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
15	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
16	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
17	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
18	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
19	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
20	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
21	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
22	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
23	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92
24	65.0	64.98	57.66	68.0	67.98	60.19	43.0	42.98	(38.14)	58.92

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 $^{\circ}$C, 0.9859 atm

(ครั้งที่ 3) เป็นค่าที่แตกต่างจากกลุ่ม (outliner) จึงไม่นำมาใช้ในการคำนวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสาร ... ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ... มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 3.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

พีเอช 6.5										
เวลา (ชม.)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	10.0	9.98	8.84	7.0	6.98	6.20	5.01
3	26.0	25.98	23.05	24.0	23.98	21.23	18.0	17.98	15.97	20.09
4	41.0	40.98	36.37	36.0	35.98	31.86	38.0	37.98	33.74	33.99
5	45.0	44.98	39.91	43.0	42.98	38.05	44.0	43.98	39.07	39.01
6	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
7	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
8	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
9	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
10	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
11	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
12	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
13	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
14	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
15	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
16	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
17	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
18	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
19	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
20	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
21	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
22	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
23	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90
24	45.0	44.98	39.91	46.0	45.98	40.71	44.0	43.98	39.07	39.90

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9859 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสาร ... ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ... ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 3.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

พีเอช 7.0										
เวลา (ชม.)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			(ครั้งที่ 3)			$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
3	13.0	12.98	11.49	8.0	7.98	7.07	10.0	9.98	(8.84)	9.28
4	20.0	19.98	17.69	21.0	20.98	18.57	16.0	15.98	(14.15)	18.13
5	28.0	27.98	24.78	34.0	33.98	30.08	16.0	15.98	(14.15)	27.43
6	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
7	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
8	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
9	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
10	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
11	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
12	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
13	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
14	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
15	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
16	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
17	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
18	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
19	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
20	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
21	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
22	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
23	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09
24	32.0	31.98	28.32	36.0	35.98	31.86	16.0	15.98	(14.15)	30.09

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm

(ครั้งที่ 3) เป็นค่าที่แตกต่างจากกลุ่ม (outliner) จึงไม่นำมาใช้ในการคำนวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสาร ... ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ... ที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 3.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

พีเอช 7.5										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			
เวลา (ชม.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	9.0	8.98	7.95	11.0	10.98	9.72	10.0	9.98	8.87	8.85
4	18.0	17.98	15.92	15.0	14.98	13.26	14.0	13.98	12.42	13.87
5	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
6	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
7	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
8	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
9	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
10	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
11	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
12	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
13	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
14	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
15	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
16	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
17	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
18	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
19	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
20	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
21	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
22	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
23	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76
24	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	16.0	15.98	14.19	14.76

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9859 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสาร ... เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ... และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 3.1 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

พีเอช 8.0										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			(ครั้งที่ 3)			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	(0)	0
3	7.0	6.98	6.18	10.0	9.98	8.84	0	0	(0)	7.51
4	13.0	13.48	11.94	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.16
5	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
6	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
7	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
8	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
9	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
10	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
11	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
12	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
13	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
14	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
15	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
16	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
17	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
18	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
19	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
20	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
21	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
22	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
23	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38
24	14.0	13.98	12.38	14.0	13.98	12.38	0	0	(0)	12.38

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm

(ครั้งที่ 3) เป็นค่าที่แตกต่างจากกลุ่ม (outliner) จึงไม่นำมาใช้ในการคำนวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสาร ... ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ... มีการนำไปใช้

ค 3.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้น

ตารางที่ ค 3.2 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้นต่าง ๆ

MLSS 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร										
เวลา (ชม.)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			$\bar{X}_{STP}$ (มล.)
	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	8.0	7.98	7.08	0	0	0	0	0	0	2.36
3	10.0	9.98	8.86	7.0	6.98	6.19	10.0	9.98	8.84	7.96
4	10.0	9.98	8.86	15.0	14.98	13.29	16.0	15.98	14.15	12.10
5	16.0	15.98	14.18	20.0	19.98	17.73	22.0	21.98	19.46	17.12
6	22.0	21.98	19.50	25.0	24.98	22.17	26.0	25.98	23.00	21.56
7	24.0	23.98	21.28	31.0	30.98	27.49	28.0	27.98	24.77	24.51
8	27.0	26.98	23.94	34.0	33.98	30.15	28.0	27.98	24.77	26.29
9	33.0	32.98	29.27	36.0	35.98	31.93	30.0	29.98	26.54	29.25
10	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	36.0	35.98	31.86	31.61
11	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20
12	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20
13	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20
14	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20
15	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20
16	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20
17	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20
18	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20
19	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20
20	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20
21	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20
22	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20
23	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20
24	35.0	34.98	31.04	36.0	35.98	31.93	38.0	37.98	33.63	32.20

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 ^{o}C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 30 ^{o}C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 31 ^{o}C, 0.9859 atm

เอกสารนี้...เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ...ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 3.2 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้นต่าง ๆ (ต่อ)

MLSS 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	11.0	10.98	9.74	15.0	14.98	13.29	10.0	9.98	8.84	10.62
4	24.0	23.98	21.28	33.0	32.98	29.27	27.0	26.98	23.89	24.81
5	42.0	41.98	37.25	46.0	45.98	40.80	41.0	40.98	36.28	38.11
6	57.0	56.98	50.56	59.0	58.98	52.34	65.0	64.98	57.53	53.48
7	77.0	76.98	68.31	72.0	71.98	63.87	76.0	75.98	67.27	66.48
8	80.0	79.98	70.97	82.0	81.98	72.75	87.0	86.98	77.01	73.58
9	80.0	79.98	70.97	84.0	83.98	74.52	87.0	86.98	77.01	74.17
10	80.0	79.98	70.97	84.0	83.98	74.52	87.0	86.98	77.01	74.17
11	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46
12	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46
13	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46
14	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46
15	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46
16	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46
17	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46
18	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46
19	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46
20	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46
21	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46
22	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46
23	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46
24	80.0	79.98	70.97	85.0	84.98	75.41	87.0	86.98	77.01	74.46

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 31 $^{\circ}$C, 0.9859 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสาร ... เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ... ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 3.2 ปริมาตรก๊าซสะสมที่ความเข้มข้นของสลัดจ์เริ่มต้นต่าง ๆ (ต่อ)

MLSS 30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	10.0	9.98	8.86	10.0	9.98	8.84	10.5	10.48	9.31	9.00
4	15.0	14.98	13.29	18.0	17.98	15.92	14.0	13.98	12.42	13.88
5	31.0	30.98	27.49	30.0	29.98	26.54	26.0	25.98	23.08	25.70
6	38.0	37.98	33.70	36.0	35.98	31.86	35.0	34.98	31.07	32.21
7	46.0	45.98	40.80	42.0	41.98	37.17	43.0	42.98	38.18	38.72
8	48.0	47.98	42.58	54.0	53.98	47.79	49.0	48.98	43.51	44.63
9	55.0	54.98	48.79	57.0	56.98	50.45	53.0	52.98	47.06	48.77
10	58.0	57.98	51.45	59.0	58.98	52.22	54.0	53.98	47.95	50.54
11	58.0	57.98	51.45	59.0	58.98	52.22	55.0	54.98	48.84	50.84
12	59.0	58.98	52.34	60.0	59.98	53.10	56.0	55.98	49.73	51.72
13	59.0	58.98	52.34	60.0	59.98	53.10	60.0	59.98	53.28	52.91
14	59.0	58.98	52.34	60.0	59.98	53.10	62.0	61.98	55.06	53.50
15	59.0	58.98	52.34	60.0	59.98	53.10	62.0	61.98	55.06	53.50
16	59.0	58.98	52.34	60.0	59.98	53.10	62.0	61.98	55.06	53.50
17	59.0	58.98	52.34	60.0	59.98	53.10	62.0	61.98	55.06	53.50
18	59.0	58.98	52.34	60.0	59.98	53.10	62.0	61.98	55.06	53.50
19	59.0	58.98	52.34	60.0	59.98	53.10	62.0	61.98	55.06	53.50
20	59.0	58.98	52.34	60.0	59.98	53.10	62.0	61.98	55.06	53.50
21	59.0	58.98	52.34	60.0	59.98	53.10	62.0	61.98	55.06	53.50
22	59.0	58.98	52.34	60.0	59.98	53.10	62.0	61.98	55.06	53.50
23	59.0	58.98	52.34	60.0	59.98	53.10	62.0	61.98	55.06	53.50
24	59.0	58.98	52.34	60.0	59.98	53.10	62.0	61.98	55.06	53.50

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9859 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสาร ... ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ... ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค 3.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น

ตารางที่ ค 3.3 ปริมาตรก๊าซสะสมของการเติมหัวเชื้อที่ปริมาตรต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

6 เปอร์เซ็นต์										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			
เวลา (ชม.)	V อ่าน (มล.)	V จริง (มล.)	V_{STP} (มล.)	V อ่าน (มล.)	V จริง (มล.)	V_{STP} (มล.)	V อ่าน (มล.)	V จริง (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\bar{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	12.0	11.98	10.63	10.0	9.98	8.84	7.0	6.98	6.20	8.56
4	18.0	17.98	15.96	17.0	16.98	15.03	15.0	14.98	13.31	14.77
5	21.0	20.98	18.62	23.0	22.98	20.35	18.0	17.98	15.97	18.31
6	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	21.0	20.98	18.64	21.56
7	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
8	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
9	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
10	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
11	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
12	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
13	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
14	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
15	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
16	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
17	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
18	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
19	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
20	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
21	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
22	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
23	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64
24	25.0	24.98	22.17	27.0	26.98	23.89	28.0	27.98	24.85	23.64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ทำการดัดแปลงแก้ไข และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9859 atm

ตารางที่ ค 3.3 ปริมาตรก๊าซสะสมของการเติมหัวเชื้อที่ปริมาตรต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

8 เปอร์เซ็นต์										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	9.0	8.98	7.97	10.0	9.98	8.84	10.0	9.98	8.87	8.56
4	20.0	19.98	17.73	23.0	22.98	20.35	25.0	24.98	22.19	20.09
5	35.0	34.98	31.04	34.0	33.98	30.08	30.0	29.98	26.63	29.25
6	43.0	42.98	38.14	44.0	43.98	38.94	46.0	45.98	40.84	39.31
7	52.0	51.98	46.13	53.0	52.98	46.91	53.0	52.98	47.06	46.70
8	53.0	52.98	47.01	57.0	56.98	50.45	58.0	57.98	51.50	49.65
9	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	60.0	59.98	53.28	50.84
10	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	60.0	59.98	53.28	50.84
11	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	62.0	61.98	55.06	51.43
12	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	64.0	63.98	56.83	52.02
13	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	64.0	63.98	56.83	52.02
14	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	64.0	63.98	56.83	52.02
15	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	64.0	63.98	56.83	52.02
16	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	65.0	64.98	57.72	52.32
17	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	65.0	64.98	57.72	52.32
18	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	65.0	64.98	57.72	52.32
19	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	65.0	64.98	57.72	52.32
20	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	65.0	64.98	57.72	52.32
21	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	65.0	64.98	57.72	52.32
22	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	65.0	64.98	57.72	52.32
23	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	65.0	64.98	57.72	52.32
24	54.0	53.98	47.90	58.0	57.98	51.33	65.0	64.98	57.72	52.32

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9859 atm

เอกสารนี้ ... ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ... ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 3.3 ปริมาตรก๊าซสะสมของการเติมหัวเชื้อที่ปริมาตรต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

10 เปอร์เซ็นต์										
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	25.0	24.98	22.17	23.0	22.98	20.35	30.0	29.98	26.63	23.05
4	48.0	47.98	42.58	52.0	51.98	46.02	70.0	69.98	62.16	50.25
5	64.0	63.98	56.77	65.0	64.98	57.53	71.0	70.98	63.05	59.12
6	76.0	75.98	67.42	74.0	73.98	65.50	73.0	72.98	64.83	65.92
7	85.0	84.98	75.41	79.0	78.98	69.93	75.0	74.98	66.60	70.65
8	85.0	84.98	75.41	85.0	84.98	75.24	77.0	76.98	68.38	73.01
9	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	80.0	79.98	71.05	75.37
10	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	80.0	79.98	71.05	75.37
11	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	80.0	79.98	71.05	75.37
12	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	81.0	80.98	71.93	75.67
13	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	81.0	80.98	71.93	75.67
14	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	82.0	81.98	72.82	75.97
15	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	82.0	81.98	72.82	75.97
16	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	82.0	81.98	72.82	75.97
17	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	82.0	81.98	72.82	75.97
18	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	82.0	81.98	72.82	75.97
19	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	82.0	81.98	72.82	75.97
20	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	82.0	81.98	72.82	75.97
21	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	82.0	81.98	72.82	75.97
22	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	82.0	81.98	72.82	75.97
23	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	82.0	81.98	72.82	75.97
24	85.0	84.98	75.41	90.0	89.98	79.67	82.0	81.98	72.82	75.97

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 ^{o}C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 ^{o}C, 0.9859 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 ^{o}C, 0.9859 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ... และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 3.3 ปริมาตรก๊าซสะสมของการเติมหัวเชื้อที่ปริมาตรต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

	12 เปอร์เซ็นต์									
เวลา (ชม.)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
	V อ่าน (มล.)	V จริง (มล.)	V_{STP} (มล.)	V อ่าน (มล.)	V จริง (มล.)	V_{STP} (มล.)	V อ่าน (มล.)	V จริง (มล.)	V_{STP} (มล.)	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	10.0	9.98	8.86	10.0	9.98	8.84	5.0	4.98	4.42	7.37
4	18.0	17.98	15.96	22.0	21.98	19.46	14.0	13.98	12.42	15.94
5	24.0	23.98	21.28	28.0	27.98	24.77	25.0	24.98	22.19	22.75
6	32.0	31.98	28.38	36.0	35.98	31.86	38.0	37.98	33.74	31.32
7	43.0	42.98	38.14	39.0	38.98	34.51	48.0	47.98	42.62	38.42
8	49.0	48.98	43.46	47.0	46.98	41.59	54.0	53.98	47.95	44.34
9	54.0	53.98	47.90	56.0	55.98	49.56	54.0	53.98	47.95	48.47
10	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	56.0	55.98	49.73	49.36
11	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95
12	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95
13	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95
14	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95
15	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95
16	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95
17	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95
18	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95
19	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95
20	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95
21	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95
22	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95
23	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95
24	55.0	54.98	48.79	56.0	55.98	49.56	58.0	57.98	51.50	49.95

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9859 atm

เอกสารนี้ ... ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ... ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 3.3 ปริมาตรก๊าซสะสมของการเติมหัวเชื้อที่ปริมาตรต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

	14 เปอร์เซ็นต์									
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	6.0	5.98	5.29	0	0	0	1.76
3	10.0	9.98	8.84	10.0	9.98	8.84	10.0	9.98	8.87	8.85
4	18.0	17.98	15.92	16.0	15.98	14.15	18.0	17.98	15.97	15.35
5	24.0	23.98	21.24	28.0	27.98	24.77	26.0	25.98	23.08	23.03
6	30.0	29.98	26.55	34.0	33.98	30.08	28.0	27.98	24.85	27.16
7	38.0	37.98	33.63	42.0	41.98	37.17	30.0	29.98	26.63	32.48
8	40.0	39.98	35.41	44.0	43.98	38.94	34.0	33.98	30.18	34.84
9	42.0	41.98	37.18	44.0	43.98	38.94	35.0	34.98	31.07	35.73
10	45.0	44.98	39.83	45.0	44.98	39.82	35.0	34.98	31.07	36.91
11	46.0	45.98	40.72	45.0	44.98	39.82	39.0	38.98	34.63	38.39
12	47.0	46.98	41.60	45.0	44.98	39.82	43.0	42.98	38.18	39.87
13	47.0	46.98	41.60	45.0	44.98	39.82	46.0	45.98	40.84	40.76
14	47.0	46.98	41.60	45.0	44.98	39.82	46.0	45.98	40.84	40.76
15	47.0	46.98	41.60	45.0	44.98	39.82	46.0	45.98	40.84	40.76
16	47.0	46.98	41.60	45.0	44.98	39.82	46.0	45.98	40.84	40.76
17	47.0	46.98	41.60	45.0	44.98	39.82	46.0	45.98	40.84	40.76
18	47.0	46.98	41.60	45.0	44.98	39.82	46.0	45.98	40.84	40.76
19	47.0	46.98	41.60	45.0	44.98	39.82	46.0	45.98	40.84	40.76
20	47.0	46.98	41.60	45.0	44.98	39.82	46.0	45.98	40.84	40.76
21	47.0	46.98	41.60	45.0	44.98	39.82	46.0	45.98	40.84	40.76
22	47.0	46.98	41.60	45.0	44.98	39.82	46.0	45.98	40.84	40.76
23	47.0	46.98	41.60	45.0	44.98	39.82	46.0	45.98	40.84	40.76
24	47.0	46.98	41.60	45.0	44.98	39.82	46.0	45.98	40.84	40.76

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9859 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสาร[illegible]ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น [illegible]ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 3.3 ปริมาตรก๊าซสะสมของการเติมหัวเชื้อที่ปริมาตรต่าง ๆ เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

	16 เปอร์เซ็นต์									
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			
เวลา (ชม.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{อ่าน}$ (มล.)	$V_{จริง}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	9.0	8.98	7.95	10.0	9.98	8.84	8.0	7.98	7.09	7.96
4	18.0	17.98	15.92	17.0	16.98	15.03	14.0	13.98	12.42	14.46
5	23.0	22.98	20.35	24.0	23.98	21.23	21.0	20.98	18.64	20.07
6	28.0	27.98	24.78	26.0	25.98	23.00	21.0	20.98	18.64	22.14
7	33.0	32.98	29.21	30.0	29.98	26.54	28.0	27.98	24.85	26.87
8	34.0	33.98	30.09	34.0	33.98	30.08	36.0	35.98	31.96	30.71
9	36.0	35.98	31.86	38.0	37.98	33.63	37.0	36.98	32.85	32.78
10	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
11	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
12	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
13	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
14	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
15	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
16	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
17	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
18	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
19	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
20	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
21	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
22	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
23	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55
24	38.0	37.98	33.63	39.0	38.98	34.51	40.0	39.98	35.51	34.55

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9829 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 °C, 0.9859 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 30 °C, 0.9859 atm

เอกสารนี้...ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ...ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค 4 ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้โดยใช้สภาวะเหมาะสมที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับเชื้อ *C. butyricum*

ตารางที่ ค 4.1 ปริมาตรก๊าซสะสมของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

S3										
เวลา (ชม.)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	33.5	33.48	29.61	30.0	29.98	26.52	25.0	24.98	22.09	26.07
4	72.0	71.98	63.66	68.0	67.98	60.13	59.0	58.98	52.17	58.65
5	86.0	85.98	76.05	86.0	85.98	76.05	76.0	75.98	67.20	73.10
6	94.0	93.98	83.12	90.0	89.98	79.58	80.0	79.98	70.74	77.82
7	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	81.0	80.98	71.62	78.40
8	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	82.0	81.98	72.51	78.70
9	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
10	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
11	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
12	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
13	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
14	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
15	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
16	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
17	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
18	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
19	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
20	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
21	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
22	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
23	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58
24	95.0	94.98	84.01	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	79.58

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 31 $^{\circ}$C, 0.9849 atm , ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 $^{\circ}$C, 0.9849 atm
ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 31 $^{\circ}$C, 0.9849 atm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 4.1 ปริมาตรก๊าซสะสมของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

	C. butyricum									
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			
เวลา (ชม.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$V_{\text{อ่าน}}$ (มล.)	$V_{\text{จริง}}$ (มล.)	V_{STP} (มล.)	$\overline{X}_{STP}$ (มล.)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	10.0	9.98	8.83	9.0	8.98	7.94	10.0	9.98	8.83	8.53
6	28.0	27.98	24.75	24.0	23.98	21.21	20.0	19.98	17.67	21.21
7	49.0	48.98	43.32	45.0	44.98	39.78	42.0	41.98	37.13	40.08
8	78.0	77.98	68.97	69.0	68.98	61.01	65.0	64.98	57.47	62.48
9	85.0	84.98	75.16	80.0	79.98	70.74	79.0	78.98	69.86	71.92
10	90.0	89.98	79.58	85.0	84.98	75.16	87.0	86.98	76.93	77.23
11	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	92.0	91.98	81.35	80.76
12	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	94.0	93.98	83.12	81.35
13	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	94.0	93.98	83.12	81.35
14	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	94.0	93.98	83.12	81.35
15	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	94.0	93.98	83.12	81.35
16	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	94.0	93.98	83.12	81.35
17	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	94.0	93.98	83.12	81.35
18	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	94.0	93.98	83.12	81.35
19	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	94.0	93.98	83.12	81.35
20	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	94.0	93.98	83.12	81.35
21	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	94.0	93.98	83.12	81.35
22	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	94.0	93.98	83.12	81.35
23	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	94.0	93.98	83.12	81.35
24	92.0	91.98	81.35	90.0	89.98	79.58	94.0	93.98	83.12	81.35

หมายเหตุ : ครั้งที่ 1 อุณหภูมิ 31 $^{\circ}$C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 2 อุณหภูมิ 31 $^{\circ}$C, 0.9849 atm

ครั้งที่ 3 อุณหภูมิ 31 $^{\circ}$C, 0.9849 atm

เอกสารนี้ [illegible] การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น [illegible] และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 4.2 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำหมักเมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหารของเชื้อไอโซเลท S3

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์จุลินทรีย์[a] (x 10^6 CFU/ml)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S3	0	2.46	2.60	2.55	2.54
	3	68.00	76.00	83.00	75.67
	6	164.00	172.00	179.00	171.67
	9	105.00	111.00	99.00	105.00
	12	57.00	62.00	67.00	62.00
	15	21.00	21.80	22.60	21.80
	18	15.20	15.90	16.70	15.93
	21	9.90	10.30	11.00	10.40
	24	3.00	3.50	3.90	3.47
Control	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

หมายเหตุ : n.d. คือ ตรวจไม่พบ

[a] จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ของเชื้อ *C. butyricum* ไม่สามารถเจริญเติบโตโดยวิธี spread plate ในการทดลองนี้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 4.3 การเปลี่ยนแปลงซีโอดีในน้ำหมักของเชื้อไอโซเลท S3 และ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

รหัสเชื้อ	เวลา (ชม.)	ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X}$
S3	0	3518.86	3568.87	3543.87	3543.87
	3	5543.07	5676.03	5609.55	5609.55
	6	5520.02	5561.73	5540.88	5540.88
	9	3681.44	3810.16	3745.80	3745.80
	12	3315.44	3375.80	3345.62	3345.62
	15	3161.73	3276.68	3219.21	3219.21
	18	3061.22	3165.31	3113.27	3113.27
	21	3061.22	3165.31	3113.27	3113.27
	24	3026.70	3156.68	3091.69	3091.69
C. butyricum	0	3440.00	3559.18	3499.59	3499.59
	3	4279.52	4185.71	4232.62	4232.62
	6	5204.82	5089.16	5146.99	5146.99
	9	5372.85	5288.83	5330.84	5330.84
	12	3467.00	3520.00	3493.50	3493.50
	15	3269.92	3200.00	3234.96	3234.96
	18	2971.43	3050.00	3010.72	3010.72
	21	2971.43	2873.47	2922.45	2922.45
	24	2971.43	2873.47	2922.45	2922.45
Control	0	2262.67	2304.93	2283.80	2283.80
	3	2262.65	2304.90	2283.78	2283.78
	6	2187.76	2220.41	2204.09	2204.09
	9	2138.78	2220.41	2179.60	2179.60
	12	2119.20	2190.00	2154.60	2154.60
	15	2079.33	2124.43	2101.88	2101.88
	18	2047.95	2068.64	2058.30	2058.30
	21	2023.49	2023.49	2023.49	2023.49
	24	2024.49	2024.49	2024.49	2024.49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา ต้องอ้างอิงถึงเนื้อหาของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 4.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

เวลา (ชม.)	**พีเอช**		
	S3	***C. butyricum***	**Control**
0	5.91	5.99	6.07
3	5.78	5.86	5.95
6	5.77	5.80	5.93
9	5.80	5.81	5.94
12	5.82	5.88	5.98
15	5.96	5.96	6.04
18	5.93	5.93	6.04
21	5.84	5.94	5.98
24	5.86	5.96	6.03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

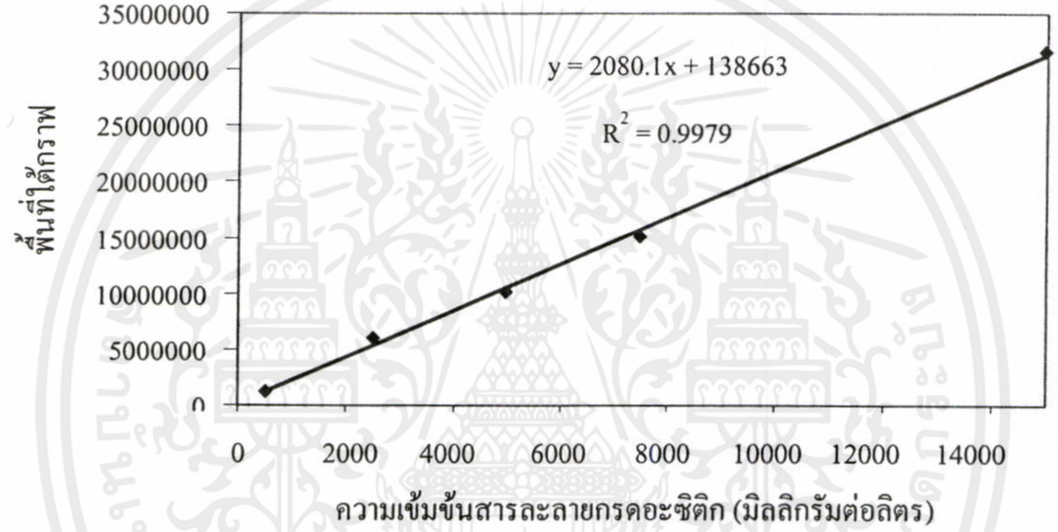
ตารางที่ ค 4.5 จำนวนโมลของก๊าซไฮโดรเจนและค่าซีโอดีที่ถูกย่อยสลายของเชื้อไอโซเลท S3 และ

รหัสเชื้อ	จำนวนโมลก๊าซไฮโดรเจน (มิลลิโมล)			ซีโอดีที่ถูกย่อยสลาย (กรัม)[a]			ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ (มิลลิโมลก๊าซไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดีที่ถูกย่อยสลาย)			
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**ครั้งที่ 1**	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**ครั้งที่ 1**	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**$\bar{X}$±S.D.**
S3	10.49	9.58	10.11	1.02	1.11	1.07	10.25	8.62	9.47	9.45±0.81
C. butyricum	9.91	10.24	10.03	1.92	1.75	1.83	5.16	5.85	5.47	5.50±0.35
Control	0	0	0	0.24	0.28	0.28	0	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ตารางที่ ค 4.6 ความเข้มข้นของสารละลายกรดอะซิติก

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
499	1177091
2493	6010939
4985	10120654
7478	15059483
14955	31576927

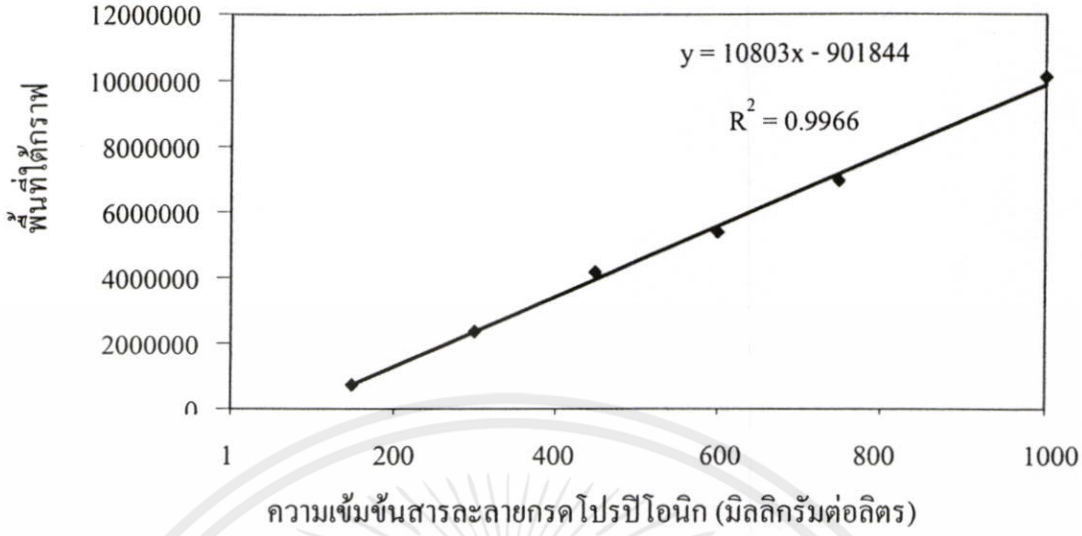


รูปที่ ค 4.1 กราฟสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติก

ตารางที่ ค 4.7 ความเข้มข้นของสารละลายกรดโปรปิโอนิก

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
150	746583
300	2342905
450	4161856
599	5367682
749	6944115
999	10099546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

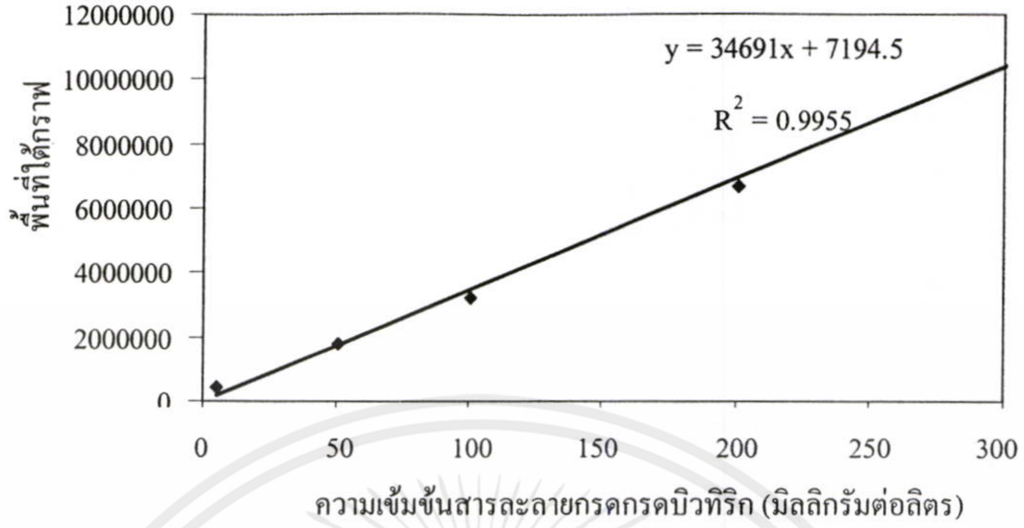


รูปที่ ค 4.2 กราฟสารละลายมาตรฐานกรดโปรปิโอนิก

ตารางที่ ค 4.8 ความเข้มข้นของสารละลายกรดบิวทิริก

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
5	443420
50	1790061
101	3203024
201	6694104
302	10747055

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค 4.3 กราฟสารละลายมาตรฐานกรดกรดบิวทิริก

ตารางที่ ค 4.9 พื้นที่ใต้กราฟ ที่ได้จากการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ในน้ำหมักด้วย GC-MS

เวลาบ่ม (ชม.)	พื้นที่ใต้กราฟ		
	กรดอะซิติก	กรดโปรปิโอนิก	กรดบิวทิริก
0	239254	15855	34663
3	2392545	218651	486212
6	802522	72564	85079
9	437764	56078	62172
12	211226	35144	56342
15	209255	21865	48621
18	189354	n.d.	41319
21	179131	n.d.	60069
24	184595	n.d.	61965

หมายเหตุ : n.d. คือ ตรวจไม่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค 4.10 ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ในน้ำหมัก

เวลาบ่ม (ชม.)	ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	กรดอะซิติก	กรดโปรปิโอนิก	กรดบิวทิริก
0	48	85	1
3	1084	104	14
6	319	90	2
9	144	89	2
12	35	87	1
15	34	86	1
18	24	0	1
21	19	0	2
24	22	0	2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง 1 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

กลุ่ม		**ผลการทดสอบทางสถิติ**			
		F	**Sig.**	***P***	**ผล***
S1	S2	2.002×10^3	0.000	0.05	D
	S3	5.627	0.098	0.05	N.D.
	S4	28.582	0.033	0.05	D
	S5	5.715	0.097	0.05	N.D.
	S6	5.123	0.152	0.05	N.D.
	C. butyricum	1.288×10^6	0.000	0.05	D
S2	S1	2.002×10^3	0.000	0.05	D
	S3	0.050	0.837	0.05	N.D.
	S4	50.585	0.019	0.05	D
	S5	0.167	0.710	0.05	N.D.
	S6	0.315	0.831	0.05	N.D.
	C. butyricum	1.059×10^6	0.000	0.05	D
S3	S1	5.627	0.098	0.05	N.D.
	S2	0.050	0.837	0.05	N.D.
	S4	1.550	0.302	0.05	N.D.
	S5	0.355	0.583	0.05	N.D.
	S6	0.510	0.527	0.05	N.D.
	C. butyricum	1.874×10^3	0.000	0.05	D
S4	S1	28.582	0.033	0.05	D
	S2	50.585	0.019	0.05	D
	S3	1.550	0.302	0.05	N.D.
	S5	2.344	0.223	0.05	N.D.
	S6	2.312	0.268	0.05	N.D.
	C. butyricum	1.749×10^4	0.000	0.05	D

* N.D. คือ ยอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) D คือ ปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง 1 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

กลุ่ม		**ผลการทดสอบทางสถิติ**			
		F	**Sig.**	***P***	**ผล***
S5	S1	5.715	0.097	0.05	N.D.
	S2	0.167	0.710	0.05	N.D.
	S3	0.355	0.583	0.05	N.D.
	S4	2.344	0.223	0.05	N.D.
	S6	0.034	0.865	0.05	N.D.
	C. butyricum	1.053×10^{3}	0.000	0.05	D
S6	S1	5.123	0.152	0.05	N.D.
	S2	0.315	0.831	0.05	N.D.
	S3	0.510	0.527	0.05	N.D.
	S4	2.312	0.268	0.05	N.D.
	S5	0.034	0.865	0.05	N.D.
	C. butyricum	756.044	0.001	0.05	D
C. butyricum	S1	1.288×10^{6}	0.000	0.05	D
	S2	1.059×10^{6}	0.000	0.05	D
	S3	1.874×10^{3}	0.000	0.05	D
	S4	1.749×10^{4}	0.000	0.05	D
	S5	1.053×10^{3}	0.000	0.05	D
	S6	756.044	0.001	0.05	D

* N.D. คือ ยอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) D คือ ปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง 2 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่างการหมัก เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

กลุ่ม		ผลการทดสอบทางสถิติ			
		F	Sig.	*P*	ผล*
S1	S2	277.596	0.000	0.05	D
	S3	305.017	0.000	0.05	D
	S4	24.774	0.008	0.05	D
	S5	67.439	0.001	0.05	D
	S6	81.452	0.001	0.05	D
	C. butyricum	2.021×10^4	0.000	0.05	D
S2	S1	277.596	0.000	0.05	D
	S3	85.764	0.001	0.05	D
	S4	30.358	0.005	0.05	D
	S5	71.856	0.001	0.05	D
	S6	4.358	0.105	0.05	N.D.
	C. butyricum	1.917×10^4	0.000	0.05	D
S3	S1	305.017	0.000	0.05	D
	S2	85.764	0.001	0.05	D
	S4	133.871	0.000	0.05	D
	S5	183.382	0.000	0.05	D
	S6	95.529	0.001	0.05	D
	C. butyricum	4.893×10^3	0.000	0.05	D
S4	S1	24.774	0.008	0.05	D
	S2	30.358	0.005	0.05	D
	S3	133.871	0.000	0.05	D
	S5	0.111	0.756	0.05	N.D.
	S6	7.584	0.051	0.05	N.D.
	C. butyricum	9.350×10^3	0.000	0.05	D

* N.D. คือ ยอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) D คือ ปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ตารางที่ ง 2 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่างการหมัก เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

กลุ่ม		**ผลการทดสอบทางสถิติ**			
		F	**Sig.**	***P***	**ผล***
S5	S1	67.439	0.001	0.05	D
	S2	71.856	0.001	0.05	D
	S3	183.382	0.000	0.05	D
	S4	0.111	0.756	0.05	N.D.
	S6	10.303	0.033	0.05	D
	C. butyricum	1.959×10^4	0.000	0.05	D
S6	S1	81.452	0.001	0.05	D
	S2	4.358	0.105	0.05	N.D.
	S3	95.529	0.001	0.05	D
	S4	7.584	0.051	0.05	N.D.
	S5	10.303	0.033	0.05	D
	C. butyricum	1.055×10^4	0.000	0.05	D
C. butyricum	S1	2.021×10^4	0.000	0.05	D
	S2	1.917×10^4	0.000	0.05	D
	S3	4.893×10^3	0.000	0.05	D
	S4	9.350×10^3	0.000	0.05	D
	S5	1.959×10^4	0.000	0.05	D
	S6	1.055×10^4	0.000	0.05	D

* N.D. คือ ยอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) D คือ ปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง 3 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

กลุ่ม		ผลการทดสอบทางสถิติ			
		F	Sig.	*P*	ผล*
S1	S2	11.410	0.078	0.05	N.D.
	S3	591.271	0.000	0.05	D
	S4	3.731	0.193	0.05	N.D.
	S5	13.368	0.035	0.05	D
	S6	0.000	0.991	0.05	N.D.
S2	S1	11.410	0.078	0.05	N.D.
	S3	238.079	0.001	0.05	D
	S4	20.207	0.046	0.05	D
	S5	43.235	0.007	0.05	D
	S6	13.297	0.068	0.05	N.D.
S3	S1	591.271	0.000	0.05	D
	S2	238.079	0.001	0.05	D
	S4	711.529	0.000	0.05	D
	S5	1.157×10^3	0.000	0.05	D
	S6	682.744	0.000	0.05	D
S4	S1	3.731	0.193	0.05	N.D.
	S2	20.207	0.046	0.05	D
	S3	711.529	0.000	0.05	D
	S5	2.957	0.184	0.05	N.D.
	S6	9.753	0.089	0.05	N.D.

* N.D. คือ ยอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) D คือ ปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง 3 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S1-S6 เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

กลุ่ม		ผลการทดสอบทางสถิติ			
		F	Sig.	*P*	ผล*
S5	S1	13.368	0.035	0.05	D
	S2	43.235	0.007	0.05	D
	S3	1.157×10^{3}	0.000	0.05	D
	S4	2.957	0.184	0.05	N.D.
	S6	24.116	0.016	0.05	D
S6	S1	0.000	0.991	0.05	N.D.
	S2	13.297	0.068	0.05	N.D.
	S3	682.744	0.000	0.05	D
	S4	9.753	0.089	0.05	N.D.
	S5	24.116	0.016	0.05	D

* N.D. คือ ขอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) D คือ ปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง 4 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่างการหมัก เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

กลุ่ม		ผลการทดสอบทางสถิติ			
		F	**Sig.**	***P***	**ผล***
S1	S2	53.047	0.002	0.05	D
	S3	542.394	0.000	0.05	D
	S4	19.059	0.012	0.05	D
	S5	1.575	0.278	0.05	N.D.
	S6	0.054	0.827	0.05	N.D.
S2	S2	53.047	0.002	0.05	D
	S3	143.484	0.000	0.05	D
	S4	12.572	0.024	0.05	D
	S5	32.431	0.005	0.05	D
	S6	35.694	0.004	0.05	D
S3	S1	542.394	0.000	0.05	D
	S2	143.484	0.000	0.05	D
	S4	307.989	0.000	0.05	D
	S5	396.106	0.000	0.05	D
	S6	373.640	0.000	0.05	D
S4	S1	19.059	0.012	0.05	D
	S2	12.572	0.024	0.05	D
	S3	307.989	0.000	0.05	D
	S5	6.842	0.059	0.05	N.D.
	S6	9.779	0.035	0.05	D

*** N.D. คือ ยอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) D คือ ปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง 4 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S1-S6 ในระหว่างการหมัก เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร (ต่อ)

กลุ่ม		ผลการทดสอบทางสถิติ			
		F	**Sig.**	***P***	**ผล***
S5	S1	1.575	0.278	0.05	N.D.
	S2	32.431	0.005	0.05	D
	S3	396.106	0.000	0.05	D
	S4	6.842	0.059	0.05	N.D.
	S6	0.555	0.498	0.05	N.D.
S6	S1	0.054	0.827	0.05	N.D.
	S2	35.694	0.004	0.05	D
	S3	373.640	0.000	0.05	D
	S4	9.779	0.035	0.05	D
	S5	0.555	0.498	0.05	N.D.

* N.D. คือ ยอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) D คือ ปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0)

ตารางที่ ง 5 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

กลุ่ม		ผลการทดสอบทางสถิติ			
		F	**Sig.**	***P***	**ผล***
S3	*C. butyricum*	1.621×10^3	0.001	0.05	D

* N.D. คือ ยอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) D คือ ปฏิเสธสมมติฐานหลัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง 6 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้ RCM เป็นแหล่งอาหาร

กลุ่ม		ผลการทดสอบทางสถิติ			
		F	Sig.	*P*	ผล*
S3	*C. butyricum*	4.747×10^3	0.000	0.05	D

* N.D. คือ ยอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) D คือ ปฏิเสธสมมติฐานหลัก

ตารางที่ ง 7 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของปริมาตรก๊าซสะสมของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum*เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

กลุ่ม		ผลการทดสอบทางสถิติ			
		F	Sig.	*P*	ผล*
S3	*C. butyricum*	0.492	0.522	0.05	N.D.

* N.D. คือ ยอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) D คือ ปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0)

ตารางที่ ง 8 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์เป็นแหล่งอาหาร

กลุ่ม		ผลการทดสอบทางสถิติ			
		F	Sig.	*P*	ผล*
S3	*C. butyricum*	21.837	0.009	0.05	D

* N.D. คือ ยอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) D คือ ปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0)

ตารางที่ ง 9 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของเชื้อไอโซเลท S3 และเชื้อ *C. butyricum* เมื่อใช้สลัดจ์ เป็นแหล่งอาหาร

กลุ่ม		ผลการทดสอบทางสถิติ			
		F	Sig.	*P*	ผล*
S3	*C. butyricum*	19.837	0.47	0.05	D

* N.D. คือ ยอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) D คือ ปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววารุณี บัวลา
วัน เดือน ปีเกิด	17 มกราคม พ.ศ. 2525
ที่อยู่	218 หมู่ 1 ต.โนนสวรรค์ อ.นาจะหลวย จ.อุบลราชธานี 34280
ประวัติการศึกษา	2548 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา
	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี
	2551 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้