บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1.วัสดุ

1.1 น้ำเสีย ตัวอย่างน้ำเสียจากถัง UASB จำนวน 3 โรงงาน คือ โรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น จำกัด โรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์ และโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด

1.2 จุลินทรีย์

ในการทดลองใช้เชื้อ *Ralstonia eutropha* สั่งซื้อจากศูนย์จุลินทรีย์แห่งประเทศไทย (MIRCEN) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารสำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์

Ralstonia eutropha TISTR 1259 จะถูกเก็บรักษาในอาหารวุ้นเอียง (Nutrient agar slant) โดยใช้สูตรอาหารของ Yan และคณะ (2003) ซึ่งประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) yeast extract 10, peptone 10, beef extract 5, $(NH_4)_2SO_4$ 5 และพีเอชเท่ากับ 7 โดยมีการถ่ายเชื้อใหม่ (subculture) ทุกเดือน

1.4 สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ : $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4, $C_3H_6O_2$, $C_4H_8O_2$
- สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ : HCl, NaOH, H_2SO_4, $CHCl_3$, NaOCl, C_2H_6O, CH_3COCH_3

2. อุปกรณ์

- ถังหมัก
- ตู้ถ่ายเชื้อ
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- โถดูดความชื้น
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1 การหาชนิดและปริมาณกรดในน้ำเสีย

3.1.1 นำตัวอย่างน้ำเสียจากถัง UASB มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

3.1.2 นำส่วนใสมาเติม phosphoric acid (H_3PO_4) และ 4- methyl-n-valeric acid แล้วฉีดเข้า gas chromatography ซึ่งใช้ capillary column (J&W Science, model DB-FFAP) โดยกำหนดสภาวะของ gas chromatography มีดังนี้คือความดันอากาศภายในเครื่อง 50 psi, ความดันของก๊าซฮีเลียม 60 psi และ ความดันของไฮโดรเจน 40 psi ตั้งค่าของ Oven temperature เท่ากับ 50 ^{0}C, Inlet temperature เท่ากับ 230 ^{0}C, Detector temperature เท่ากับ 250 °C, Ramp เท่ากับ 20 ^{0}C /min, อัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน เท่ากับ 40 mL/min, อัตราการไหลของอากาศเท่ากับ 400 mL/min, อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียมเท่ากับ 179 mL/min และใช้สารละลายกรดระเหยผสมเพื่อเป็นสารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบการสร้างกรด สารละลายกรดผสมประกอบด้วย กรดฟอร์มิก, กรดอะซิติก, กรดโพรพิโอนิก, กรดไอโซบิวทิริก, กรดไอโซวาเลริก, กรดไอโซคาโพรอิก และกรดเฮปทาโนอิก (Thanakoses *et al.*, 2003)

3.2 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Kjeldahl method)

นำตัวอย่างน้ำเสียจากถัง UASB ที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดย่อย ใส่ catalyst KH_2PO_4ลงในหลอดๆ ละ 1 เม็ด เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร แล้ววางลงในเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส ย่อยเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนสารละลายในหลอดใสและไม่มีควัน นำหลอดออกจากจานเครื่องย่อยวางในที่วางหลอด และทิ้งไว้ให้สารละลายอุ่นเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 75 มิลลิลิตร จัดอุปกรณ์กลั่น เปิดสวิตซ์ไฟและเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น เติม 4% กรดบอริก ลงในขวดรูปชมพู่ ประมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นวางลงในเครื่องกลั่นซึ่งพร้อมที่จะกลั่นโดยให้ส่วนปลายของเครื่องกลั่น เติม 40% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ประมาณ 20 มิลลิลิตร ทำการกลั่นจนสารละลายในขวดรูปชมพู่เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว ได้สารละลายที่กลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำสารละลายในขวดรูปชมพูที่ได้มาไทเทรตกับกรด 0.1 N ไฮโดรคลอริก จนได้จุดยุติเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ ทำ blank ด้วยวิธีเดียวกันแต่ไม่ใส่สารละลายตัวอย่าง นำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณไนโตรเจน (A.O.A.C., 1999)

3.3 การหาปริมาณฟอสเฟต (Ascorbic Acid Method)

นำตัวอย่างน้ำเสียจากถัง UASB ที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมฟีนอล์ฟทาลีน 1 หยด ถ้าเกิดสีแดงให้หยด 5 N กรดซัลฟูริก ลงไปจนกระทั่งสีแดงหายไปจึงเติมน้ำยารวม (combined reagent) 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 – 30 นาที เพื่อให้

เกิดสีก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน (APHA, AWWA and WPCF, 1998)

3.4 การหาปริมาณ COD และคาร์บอนอินทรีย์ทั้งหมด (TOC)

นำตัวอย่างน้ำเสียมาปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสที่ได้มากรองด้วยแผ่นกรอง 0.2 ไมโครเมตร บรรจุในขวดเก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์หาค่า COD (APHA, AWWA and WEF, 1998) โดยนำค่า COD ที่ได้มาคำนวณหาค่าปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ทั้งหมด (TOC) โดยคำนวณตามสมการด้านล่างนี้

$$\text{TOC (mg/l)} = \frac{(\text{ค่าของ COD - ค่าของ Blank}) \times \text{dilution}}{3.22} \qquad (2)$$

3.5 การวัดการเจริญของเชื้อ

- การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ด้วยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสออกแล้วนำตะกอนเซลล์อบให้แห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนัก ทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA)

นำเซลล์แห้งที่ได้จากการวิเคราะห์ในข้อ 3.5 มาวิเคราะห์หาปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 มิลลิลิตร เขย่าและทิ้งเอาไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วย อะซีโตน 5 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วเท่าเดิม ล้างตะกอนอีกครั้งด้วยเอทธานอลบริสุทธิ์ 99.80% 5 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม เก็บส่วนของตะกอนไว้จากนั้นนำไปอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักหาปริมาณ PHA

3.7 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในแต่ละขั้นตอนของการศึกษาจะมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) โดยกำหนดให้จำนวนซ้ำ (replication) ในการศึกษาแต่ละครั้งเท่ากับ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science) Version 14.0

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อสำหรับเป็นเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 ที่เก็บรักษาในอาหาร (Nutrient agar slant) มาถ่ายลงในอาหารเหลว (Nutrient broth, NB จากบริษัท HARDY DIAGNOSTICS จำกัด) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการถ่ายเชื้อ 30 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว (NB) ผสมกับน้ำเสียอัตราส่วน 1:1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 270 มิลลิลิตร (คิดเป็นปริมาณหัวเชื้อ 10 %) ด้วยวิธีการแบบปลอดเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ โดยรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นของการทดลองตลอดงานวิจัยนี้โดยควบคุมเชื้อเริ่มต้นที่ค่าการดูดกลืนแสง (OD) เท่ากับ 0.8 ทุกครั้ง ปริมาณที่ใช้สำหรับการทดลองแต่ละครั้งคือ ร้อยละ 10 โดยปริมาตร

2. ศึกษาคุณลักษณะของน้ำเสียและการผลิตกรดโดยการหมักแบบไร้อากาศ

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ดังนี้

- ตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อรวมที่ผ่านการดักเศษยางก่อนเข้าระบบบำบัดแบบ UASB ของโรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น
- ตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อรวมที่ผ่านการดักเศษเปลือกกุ้งก่อนเข้าระบบบำบัดแบบ UASB ของโรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์
- ตัวอย่างน้ำเสียที่ออกจากบ่อที่ผ่านการหมัก (ACID TANK) ก่อนเข้าระบบบำบัดแบบ UASB ของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง

นำน้ำเสียจากทั้ง 3 โรงงานมาทำการศึกษาการเตรียมน้ำเสียโดยทำการผลิตกรดด้วยวิธีการหมักแบบไร้อากาศ ทำการทดลองโดยปรับพีเอชเริ่มต้นให้ได้ 5.5 เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทนและส่งเสริมจุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรดซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการเจริญของ *R.eutropha* แล้วทำการหมักแบบไร้อากาศในถังปิดขนาด 4 ลิตร ที่อุณหภูมิห้องโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 50 % จากถัง UASB ของโรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์ ทำการหมักเป็นระยะเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนำน้ำเสียที่ผ่านการหมักและไม่ผ่านการหมักมาทำการวิเคราะห์คุณลักษณะต่าง ๆ ได้แก่

ก. COD และปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ทั้งหมด(Total organic carbon, TOC) ตามวิธีการใน Standard Method for the Examination of Water and Wastewater (APHA,AWWA and WPCF, 1998)

ข. พีเอช วัดค่าโดยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

ค. ปริมาณกรดระเหยง่าย(volatile acid,VA) โดย Direct Titration Method (APHA,AWWA and WPCF, 1998)

ง. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดใช้ Kjeldahl method (APHA, AWWA and WPCF, 1998)

จ. ปริมาณฟอสเฟตใช้ Ascorbic Acid Method (APHA, AWWA and WPCF, 1998) คัดเลือกวิธีการเตรียมน้ำเสียของทั้งสามโรงงานที่มีค่า VA สูงสุด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. ศึกษาชนิดของน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA

นำน้ำเสียจากทั้งสามโรงงานได้แก่โรงงานฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น โรงงานห้องเย็นโชติวัฒน์ และโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 แล้วใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 ml ปริมาณ 300 ml นำไปฆ่าเชื้อที่ 121^{0}C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อ *Ralstonia eutropha* ที่อุณหภูมิ 30^{0}C เพาะเลี้ยงในตู้เขย่าที่ความเร็วเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHA ที่เซลล์ผลิตได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เลือกชนิดของน้ำเสียที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุด

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA

4.1 การศึกษาสภาวะที่เห มาะสมต่อการผลิต PHA ในขวดรูปชมพู่

4.1.1 ศึกษาผลของการเติมกรด

นำตัวอย่างน้ำเสียที่คัดเลือกจากข้อ 3 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3 โดยศึกษาการเติม propionic acid และ butyric acid ในปริมาณ 0, 5 ,10 และ 15 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับการเติม propionic acid 5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ butyric acid 5 กรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงในตู้เขย่าที่ความเร็วเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHA ที่เซลล์ผลิตได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เลือกชนิดและความเข้มข้นของกรดที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.1.2 ศึกษาผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio)

เลือกความเข้มข้นและชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุด จากข้อ 4.1.1 มาใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้สภาวะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 เพื่อศึกษาอัตราส่วน C:N ที่เหมาะสมโดยทำการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่อัตราส่วน C:N ratio เท่ากับ 32, 44 และ 55 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต

(C:N ratio เท่ากับ 66) ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4.1.1

4.1.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งฟอสฟอรัส

เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากข้อ 4.1.2 มาใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้สภาวะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA โดยเลือกใช้โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่าง และวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4.1.1

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ในถังหมัก (fermenter)

4.2.1 ศึกษาอัตราการให้อากาศ

เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากข้อ 4.1.3 มาใช้ในการศึกษาหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA โดยทำการทดลองในถังหมักขนาด 3 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 มีอัตราการให้อากาศ 0, 0.5, 1 และ 2 vvm ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHA ที่เซลล์ผลิตได้ เลือกชุดการทดลองที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.2.2 ศึกษาอัตราการกวน

เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากข้อ 4.2.1 มาใช้ในการศึกษาหาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA โดยมีอัตราการกวนที่ความเร็ว 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHA ที่เซลล์ผลิตได้ เลือกชุดการทดลองที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.2.3 ศึกษาการควบคุมพีเอช

เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากข้อ 4.2.2 มาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบการควบคุมพีเอช และไม่มีการควบคุมพีเอช โดยจะทำการควบคุม pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 ทั้งสองชุดการทดลอง ซึ่งในส่วนของชุดการทดลองที่มีการควบคุม pH จะทำการควบคุม pH ตลอดการทดลองโดยใช้ตัวควบคุมอัตโนมัติด้วยชุด controller โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ เพื่อควบคุมพีเอช ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ และปริมาณ PHA ที่เซลล์ผลิตได้

5. ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมัก

เลือกสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4 มาทำการเลี้ยงเชื้อ *Ralstonia eutropha* เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมงวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์, ปริมาณ PHA ที่เซลล์ผลิตได้, ค่า COD, กรดระเหยง่ายทั้งหมด และคำนวณค่าพารามิเตอร์ของจลนพลศาสตร์ ดังนี้ อัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (μ), สัมประสิทธิ์ผลผลิตเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ($Y_{X/S}$), สัมประสิทธิ์ผลผลิตเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงกรดระเหยง่ายในน้ำเสีย ($Y_{X/VA}$), สัมประสิทธิ์ผลผลิต PHA ต่อปริมาณเซลล์ ($Y_{P/X}$), อัตราการใช้สารอินทรีย์ในน้ำเสียจำเพาะ (q_S), อัตราการใช้กรดระเหยง่ายในน้ำเสียจำเพาะ (q_{VA}) และอัตราการสร้าง PHA จำเพาะ (q_P) โดยที่

อัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (μ) = $\dfrac{\ln X_t - \ln X_0}{t}$

สัมประสิทธิ์ผลผลิตเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ($Y_{X/S}$) = $\dfrac{X_t - X_0}{COD_0 - COD_t}$

สัมประสิทธิ์ผลผลิตเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงกรดระเหยง่ายในน้ำเสีย ($Y_{X/VA}$) = $\dfrac{X_t - X_0}{VA_0 - VA_t}$

สัมประสิทธิ์ผลผลิต PHA ต่อปริมาณเซลล์ ($Y_{P/X}$) = $\dfrac{P - P_0}{X_t - X_0}$

อัตราการสร้าง PHA จำเพาะ (q_P) = $Y_{\frac{P}{X}} \cdot \mu$

อัตราการใช้สารอินทรีย์ในน้ำเสียจำเพาะ (q_S) = $\dfrac{-\mu}{Y_{X/S}} - \dfrac{q_P}{Y_{P/X}}.Y_{X/S}$

อัตราการใช้กรดระเหยง่ายในน้ำเสียจำเพาะ (q_{VA}) = $\dfrac{-\mu}{Y_{X/VA}} - \dfrac{q_P}{Y_{P/X}}.Y_{X/VA}$

เมื่อ X_t = ปริมาณเซลล์ที่ชั่วโมงที่ 72

X_0 = ปริมาณเซลล์ที่ชั่วโมงที่ 0

COD_t = ค่า COD ที่ชั่วโมงที่ 72

COD_0 = ค่า COD ที่ชั่วโมงที่ 0

VA_t = ปริมาณกรดระเหยง่ายที่ ชั่วโมงที่ 72

VA_0 = ปริมาณกรดระเหยง่ายที่ ชั่วโมงที่ 0

P = ปริมาณผลผลิต PHA ที่ชั่วโมงที่ 72

P_0 = ปริมาณผลผลิต PHA ที่ชั่วโมงที่ 0

6. การสกัดแยก PHAให้บริสุทธิ์ขั้นต้นและการขึ้นรูปฟิล์ม PHA

นำตะกอนหลังจากการอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส ในข้อ 3.6 มาสกัด PHA ให้บริสุทธิ์ขั้นต้นโดยนำตะกอนที่ได้หลังจากการอบแห้งแล้วไปเติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 30 วินาทีทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ นำส่วนที่เป็นตะกอนไปสกัด PHA อีกครั้ง รวมส่วนใสที่ได้กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยมีหลอดที่มีขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตรรองรับ นำมาเติมคลอโรฟอร์มจนปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาตกตะกอนด้วยเฮกเซน แล้วกรองจะได้ตะกอน PHA จากนั้นนำไปอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส (คมกฤช คลอารมย์, 2542) เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาคุณสมบัติของ PHA และขึ้นรูปฟิล์มต่อไป

นำสาร PHA 0.25 g ที่ผลิตได้และผ่านการทำบริสุทธิ์ขั้นต้นมาละลายด้วยคลอโรฟอล์ม 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาเทลงในจานเพาะเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 เซนติเมตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยคลอโรฟอร์ม (ทำในตู้ดูดควัน) จะได้ฟิล์มพลาสติกหนาประมาณ 0.1-0.3 มิลลิเมตร เพื่อใช้ในการทดลองการย่อยสลายและศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของฟิล์ม PHA ที่ได้ (Zhao *et al.,* 2002)

7. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของฟิล์ม PHA ที่ได้

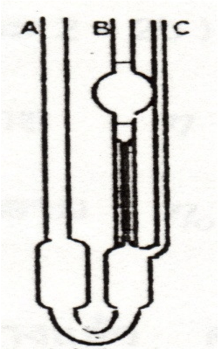
นำฟิล์ม PHA ที่ผลิตได้จากข้อ 6 มาวิเคราะห์คุณสมบัติได้แก่

7.1 อุณหภูมิหลอมเหลว (Melting point temperature, T_m), อุณหภูมิการเกิดผลึก (Crystalline temperature, T_c) และ อุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้ว (Glass Transition Temperature, T_g) ด้วยวิธี Differential scanning calorimetry (DSC) การหาจุดหลอมเหลวสามารถทำได้โดยนำเอาพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัด 10 มิลลิกรัม ใส่ลงในภาชนะอลูมิเนียม (aluminium plachet) แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer DSC7 differential scanning calorimetry โดยทำการวิเคราะห์ จะเริ่มที่ -100 องศาเซลเซียส ถึง 250 องศาเซลเซียส และให้อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิเท่ากับ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนที่ 20 มิลลิลิตรต่อนาที (Slater *et al*., 1992)

7.2 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล โดยเตรียมสารละลายพอลิเมอร์โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายด้วยความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น โดยให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.1 – 1.0 g/dl และตัวทำละลายบริสุทธิ์ 1 ชุด

วัดค่าเวลาการไหล (flow-time, t) ของสารละลายแต่ละความเข้มข้นจากความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง โดยทำดังนี้ ปิเปตสารละลายด้วยปริมาตรที่แน่นอนในช่วง 10-15 มิลลิลิตร ใส่ใน วิสโคมิเตอร์ (viscometer) ชนิด Ubbelohde ที่สะอาดผ่านทางด้าน A และติดตั้งวิสโคมิเตอร์ในอ่างควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในแนวดิ่ง พักไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เกิดการปรับสมดุลของอุณหภูมิ

จากนั้นให้ลมดันผ่านทางด้าน A อย่างช้าๆ โดยใช้นิ้วปิดทางด้าน C ในขณะเดียวกัน เมื่อสารละลายถูกดันขึ้นไปตามท่อด้าน B เมื่อระดับของสารละลายอยู่เหนือขีดบนของด้าน B พอประมาณ หยุดให้ลมดันพร้อมเปิดทางด้าน C เริ่มจับเวลาในช่วงของการเคลื่อนที่จากขีดบนมาถึงขีดล่างของด้าน B ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง บันทึกค่าเฉลี่ยของเวลาการไหลในแต่ละค่าของความเข้มข้น ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 วิสโคมิเตอร์ชนิด Ubbelohde

Figure 6. Ubbelohde viscometer

สำหรับตัวทำละลายบริสุทธิ์ ทำในทำนองเดียวกันกับสารละลาย และควรทำเป็นครั้งแรกก่อนที่จะเริ่มทำการทดลองกับสารละลาย

จากค่าเวลาการไหลเฉลี่ย คำนวณค่า η_{red} และ η_{inh} พร้อมทั้งสร้างกราฟระหว่าง η_{red} และ η_{inh} กับความเข้มข้น หาจุดตัดแกน η_{red} และ η_{inh} ค่า K' และ K'' และ M_v โดยใช้โปรแกรม Via M_v version 1.0 ของภาควิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์ โดยใช้สมการของ Sakurada ในการคำนวณหาค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยดังแสดงในสมการที่ 2

$[\eta] = K\overline{M}_V^{\,a}$ ซึ่งสามารถแปลงสมการได้เป็น $M_V = \sqrt[a]{[n/K]}$ (2)

เมื่อ K คือ ค่าคงที่ ที่มีความสัมพันธ์ของแรงกระทำระหว่างตัวถูกละลายกับตัวทำละลายในสารละลายที่อุณหภูมิหนึ่ง และ a เป็นค่าคงที่ ที่มีความสัมพันธ์ถึงความสามารถในการละลายของตัวถูกละลายในตัวทำละลาย และการจัดรูปร่างของโมเลกุลตัวถูกละลายในสารละลายที่อุณหภูมิหนึ่งๆ ส่วนค่า M เป็นค่ามวลโมเลกุลของตัวถูกละลาย สำหรับสารพอลิเมอร์ และใช้ค่าความหนืด $[\eta]$ คำนวณค่ามวลโมเลกุล

7.3 ความหนา

ตัดตัวอย่างขนาด 5 ซม.× 5 ซม. ทำการสุ่มวัดค่าความหนาโดยใช้เครื่องไมโครมิเตอร์ จำนวน 5 จุดคือจุดตรงกลาง 1 จุด และจุดโดยรอบอีก 4 จุด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Gennadios, *et al*., 1993)

7.4 Tensile strength [MPa]

โดยทำการวัดค่าการต้านทานแรงดึง และค่าการยืดตัวเมื่อขาด ตามวิธีการของ ASTM (1996) โดยใช้เครื่องทดสอบความแข็งแรงของวัสดุ (universal testing machine) ยี่ห้อ LLYOD รุ่น 30 KN กำหนดระยะห่างของการจับเริ่มต้น (initial grip separation) เท่ากับ 40 มม. และความเร็วของการทดสอบ (test speed) เท่ากับ 50 มม./นาที โดยใช้ load cell 100 N

7.5 วิเคราะห์หาหน่วยย่อยของพอลิเมอร์ด้วยเครื่อง gas chromatography-mass spectrophotometer (GC-MS)

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบย่อยของ PHA สามารถวิเคราะห์ได้โดยการเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของพอลิเมอร์ ด้วยการนำพอลิเมอร์ 4-10 มิลลิกรัมละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟิวริก-เมทานอล (15:85) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต้มในอ่างน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 140 นาที เพื่อทำการเปลี่ยนกรดไขมันให้กลายเป็นเมทิลเอสเทอร์ แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยการใช้ gas chromatography-mass spectrophotometer (GC-MS) ตามวิธีการของ Ganzeveld (Ganzeveld *et al*.,1999) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการทดสอบแยกเป็น 2 ส่วนคือ สภาวะของ Gas Chromatograph จะควบคุมโดยใช้ Inlet temperature 250 C, splitless mode 0.07 minute, Oven initial temperature: 90 C 5 minutes, Ramp to 160 C 3 minutes at 4 C/minute, Ramp to 230 C 10 minutes at 10 C/minute และใช้คอลัมน์ชนิด INNOWAX, 30 m., film thickness 0.25 um, ID. 0.25 mm และสภาวะของ Mass Spectrometer ควบคุมโดยใช้ Ionization mode: Electron Ionization, Acquisition mode: Scan 55-500 amu, Solvent delay time: 4.0 minutes, Transfer line temperature: 230 ^{0} C

8. ศึกษาการย่อยสลายของฟิล์ม PHA โดยการฝังดิน

เตรียมดินโดยนำดินจากสถานที่กำจัดขยะมูลฝอย เทศบาลนครหาดใหญ่ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา มากำจัดซากของต้นไม้ และพวกสัตว์ต่างๆที่อยู่ในดิน แล้วนำดินที่ได้ไปใส่ในแก้วพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร ความสูง 10 เซนติเมตร (นพรัตน์ มะเห, 1997)

วางแผ่นฟิล์มขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ที่ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นแล้วฝังในดินฝังที่ระดับความลึก 3.5 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างมาวัดน้ำหนักในสัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 หลังจากนำ

ตัวอย่างขึ้นจากดินแล้ว นำแผ่นฟิล์มมาล้างด้วยน้ำ ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนชั่งน้ำหนักทำการปรับสภาวะของแผ่นฟิล์มโดยการวางแผ่นฟิล์มไว้ในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้มาหาร้อยละน้ำหนักที่หายไป (% weight loss)

$$\text{ร้อยละน้ำหนักที่หายไป} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น - น้ำหนักหลังการย่อยสลาย (degraded weight)}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น (initial sample weight)}} \times 100$$