การปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันของอุตสาหกรรมทูน่ากระป๋องด้วยวิธีการทางชีวภาพเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตแก๊สชีวภาพ

Pretreatment of Scum from Oil Trap of Tuna Canning Industry Using Biological Method for Application in Biogas Production

ชุติมา ไทยประดิษฐ์

Shutima Thaipradit

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Prince of Songkla University

2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันของอุตสาหกรรมทูน่ากระป๋องด้วยวิธีการทางชีวภาพเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตแก๊สชีวภาพ

Pretreatment of Scum from Oil Trap of Tuna Canning Industry Using Biological Method for Application in Biogas Production

ชุติมา ไทยประดิษฐ์

Shutima Thaipradit

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for
the Degree of Master of Science in Biotechnology
Prince of Songkla University
2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันของอุตสาหกรรมทูน่ากระป๋องด้วยวิธีการทางชีวภาพเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตแก๊สชีวภาพ

ผู้เขียน นางสาวชุติมา ไทยประดิษฐ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิริยะ ดวงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.เบญจมาส เชียรศิลป์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมพงศ์ โอทอง)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิริยะ ดวงสุวรรณ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิริยะ ดวงสุวรรณ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ .....
(นางสาวชุติมา ไทยประดิษฐ์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ .....
(นางสาวชุติมา ไทยประดิษฐ์)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันของอุตสาหกรรมทูน่ากระป๋องด้วยวิธีการทางชีวภาพเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตแก๊สชีวภาพ

ผู้เขียน นางสาวชุติมา ไทยประดิษฐ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2564

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันของระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตทูน่ากระป๋องเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตแก๊สชีวภาพ จากการย่อยสลายตะกอนลอยเบื้องต้นด้วย *Bacillus subtilis* AH73 ที่มีเอนไซม์ไลเปส พบว่า มีการผลิตแก๊สมีเทนสูงกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากเชื้อมีกิจกรรมเอนไซม์ต่ำ ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำ จึงทำการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ พบ 16 ไอโซเลต แสดงขนาดของวงใสของการย่อยโปรตีนและไขมันที่กว้างภายใต้สภาวะมีอากาศและ 2 ไอโซเลตแสดงขนาดของวงใสที่กว้างภายใต้สภาวะไร้อากาศ โดยจากการทดลองย่อยตะกอนลอยในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ พบว่า และ ไอโซเลต SNL1 ให้กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 177.45 ยูนิตต่อลิตร และ 1,695 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลต INL11 ให้ค่าซีโอดีละลายน้ำสูงสุดเท่ากับ 17.02 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือก พบว่า SNL1 และ INL11 มีความเหมือนกับ *Bacillus cereus* และ *Aeromonas caviae* ตามลำดับ

จากการทดลองการปรับสภาพตะกอนลอยไขมันด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้และศึกษาศักยภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพจากตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพในระดับขวดทดลองโดยใช้ระบบการหมักแบบกะ พบว่า เมื่อปรับสภาพด้วย SNL1 ภายใต้สภาวะมีอากาศเป็นระยะเวลา 7 วัน สามารถลดปริมาณของแข็งทั้งหมดจาก 112.9 กรัมต่อลิตร เป็น 79.0 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตมีเทนสูงสุดเท่ากับ 34.3 $mLCH_4/gVS$ นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราส่วนตะกอนลอยไขมันต่อน้ำเสียเท่ากับ 80:20 สามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้สูงกว่าการใช้อัตราส่วน 90:10 และ 70:30 และจากการศึกษาเปรียบเทียบการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1, การปรับสภาพโดย biostimulation คือ โดยมีการให้อากาศแต่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์

และชุดการทดลองที่ไม่มีการปรับสภาพ (unpretreatment) ในถังหมักขนาด 6.5 ลิตร โดยใช้ระบบการหมักแบบกะ พบว่า การทดลองที่ไม่ผ่านการปรับสภาพตะกอนลอยให้การผลิตมีเทนต่ำกว่าชุดการทดลองที่มีการปรับสภาพตะกอน โดยการผลินมีเทนสะสมสูงสุดมีค่าเท่ากับ 14,759 มิลลิลิตร ในวันที่ 60 เมื่อมีการเสริมทางชีวภาพของเชื้อ SNL1 เป็นระยะเวลา 7 วัน นอกจากนี้เมื่อทดลองโดยเดินระบบแบบกึ่งต่อเนื่อง พบว่า การปรับสภาพด้วยการเสริมทางชีวภาพของเชื้อ SNL1 สามารถผลิตมีเทนได้สูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการปรับสภาพตะกอนลอยถึง 1.96 เท่า และให้ผลผลิตมีเทนเท่ากับ 259.8 $mLCH_4/gVS$ และสูงกว่าชุดการทดลองที่มีการปรับสภาพด้วยการให้อากาศแต่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ 1.21 เท่า

จากการปรับสภาพตะกอนลอยโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 และศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนจากตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพในถังหมักขนาด 200 ลิตรโดยใช้ระบบการหมักแบบกะ พบว่า เมื่อมีการเติมเชื้อ SNL1 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตแก๊สมีเทนจาก 0.76 LCH_4 (ชุดการทดลองที่ไม่มีการปรับสภาพตะกอน) เป็น 3.71 LCH_4 และมีผลผลิตมีเทนสูงสุดเท่ากับ 25.8 $mLCH_4/gVS$ ประสิทธิภาพในการกำจัดของของแข็งทั้งหมด เท่ากับร้อยละ 38 และเมื่อทำการขยายขนาดการผลิตมีเทนจากตะกอนไขมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเชื้อ SNL1 ในถังหมักขนาด 1000 ลิตร พบว่า มีการผลิตแก๊สชีวภาพสะสมและแก๊สมีเทนสะสมสูงสุดเท่ากับ 6124.33 L และ 1192.91 LCH_4 ตามลำดับ ซึ่งมีผลผลิตมีเทนเท่ากับ 1893 $mLCH_4/gVS$ ในวันที่ 81 ของการหมัก ประสิทธิภาพในการกำจัดของแข็งทั้งหมดและซีโอดีทั้งหมดสูงสุดโดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 83 และ 87 ตามลำดับ และมีปริมาณมีเทนอยู่ในช่วงร้อยละ 50 ถึง 73 ตลอดระยะเวลาของการหมัก

หลังจากการผลิตแก๊สชีวภาพ พบว่า ตะกอนที่เหลือหลังจากกระบวนการหมักมีปริมาณสารอินทรีย์ ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัสเป็นไปตามมาตรฐานปุ๋ย ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำตะกอนหลังการหมักแก๊สชีวภาพไปใช้ประโยชน์เป็นปุ๋ยต่อไปได้

Thesis title Pretreatment of Scum from Oil Trap of Tuna Canning Industry using Biological Method for Application in Biogas Production
Author Miss Shutima Thaipradit
Major Program Biotechnology
Academic Year 2021

ABTRACT

This research studied the pretreatment of scum from oil trap tank of wastewater treatment system located at a tuna canning industry to be used as substrate in biogas production. The primary lipid hydrolysis with *Bacillus subtilis* AH73 only slightly improved methane production from scum likely due to its low enzyme activity. Therefore, lipase and protease in the isolation and selection of lipase and protease producing bacteria were isolated from wastewater treatment system and screened under aerobic and anaerobic conditions. The results revealed that 16 isolates presented the large clear zone of hydrolysis under aerobic condition and 2 isolates presented large clear zone under anaerobic condition. In the digestion of scum sludge under aerobic and anaerobic conditions, it was found that SNL1 had the highest lipase and protease activities of 177.45 U/L and 1,695 U/L, respectively. While INL11 gave highest soluble COD of 17.02 g/L. Later, SNL1 and INL11 were identified as *Bacillus cereus* and *Aeromonas caviae*, respectively.

The pretreatment of scum sludge by the biological method using isolated bacteria and the biochemical methane potential produced from the pretreated scum were studied at the flask level using in batch fermentation mode. It was found that the pretreatment with SNL1 under aerobic condition for 7 days resulted in the reduction of total solids from 112.9 g/l to 79.0 g/l, and the maximum methane yield was obtained at 34.3 mLCH_4/gVS. In addition, the scum to wastewater ratio at 80:20 produced higher biogas production than at the ratio of 90:10 and 70:30. Moreover, the pretreatment of scum sludge by bioaugmentation using SNL1 and biostimulation with aeration (without microbial inoculation) was compared with

unpretreatment of scum sludge in a 6.5 l fermentation tank using a batch fermentation mode. It was found that the experiment without pretreatment of scum sludge produce Methane lower than bioaugmentation by SNL1, which gave the maximum cumulative methane production of 14,759 ml at day 60. Due to SNL1 bacterial degradation and aeration, nutrients are readily available than untreated scum. Furthermore, the experiment was performed with the semi-continuous mode. The result showed that the bioaugmentation by SNL1 produced higher cumulative methane than the unpretreatment (1.96 times) and the biostimulation (1.21 times) with the methane yield of 259.8 $mLCH_4/gVS$, since nutrients are transferred into and out of the system, microorganisms get new nutrients to use as a source for growth due to the addition of bacteria producing enzymes that can help decompose the preliminary sediment, causing the nutrients to be converted into usable structures easier than untreated scum.

Pretreatment of scum sludge using the bioaugmentation by SNL1 and the biochemical methane potential from pretreated scum was investigated in a 200 L reactor using a batch fermentation mode. The results found that the pretreatment of scum sludge using bioaugmentation by SNL1 improved the methane production from 0.76 LCH_4 (the experiment without sludge pretreatment) to 3.71 LCH_4 with a maximum methane yield of 25.8 $mLCH_4/gVS$ and total solids removal efficiency of 38%. Finally, the methane production from SNL1 pretreated scum was scaled up to 1000 L reactor. It showed that the highest cumulative biogas and cumulative methane production were 6124.33 L and 1192.91 LCH_4, respectively with the methane yield of 1893 mLCH4/gVS on day 81 of fermentation, the total solids removal efficiency of 83%, and the total COD removal efficiency of 87%. The methane content ranged from 50 to 73% throughout the period of fermentation.

The residues after biogas production contained organic matter, nitrogen, and phosphorus following the standard of fertilizer. Therefore, it was possible to use the residues after biogas production for fertilizer.

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Characteristics of wastewater from different source of tuna canning industry	3
2	Properties of biogas	5
3	Physical and chemical characteristics of methane	6
4	Methane reaction of each organic substance	7
5	Advantages and disadvantages of enzyme hydrolysis	13
6	Standard criteria of the properties of compost	24
7	Characteristics of scum and wastewater from the oil trap of wastewater treatment system of tuna canning industry	51
8	Code name of lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment and cultured on media under aerobic condition for 48 h	57
9	Primary screening of lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment and cultured on media under aerobic condition for 48 h	58
10	Enzymatic index of lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment and cultured on media under aerobic condition for 48 h	59
11	Lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment and cultured on media under aerobic condition for 48 h	61
12	Code name of lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment under anaerobic condition and cultured on media under aerobic and anaerobic conditions for 48 h	64

LIST OF TABLES (Cont.)

Table		Page
13	Primary screening of lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment under anaerobic condition and cultured on media under aerobic and anaerobic conditions for 48 h	65
14	Enzymatic index of lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment under anaerobic condition and cultured on media under aerobic and anaerobic conditions for 48 h	66
15	Lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment under anaerobic condition and cultured on media under aerobic and anaerobic conditions for 48 h	71
16	16S rDNA gene identification of lipase and protease producing bacteria	85
17	Pretreatment performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) using biostimulation without microbial inoculation and bioaugmentation by SNL1 and INL11 under sterile and non-sterile conditions with shaking at 150 rpm for 7 days	90
18	Biogas performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) using biostimulation without microbial inoculation and bioaugmentation by SNL1 and INL11 under sterile and non-sterile conditions with shaking at 150 rpm for 7 days	97
19	Performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 90:10, 80:20 and 70:30) by bioaugmentation (with the inoculation of SNL1) and biostimulation without microbial inoculation (control) under sterile and non-sterile conditions with shaking at 150 rpm for 7 days	101

LIST OF TABLES (Cont.)

Table		Page
20	Biogas performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 90:10, 80:20 and 70:30) using biostimulation without microbial inoculation and bioaugmentation by SNL1 under sterile and non-sterile conditions with shaking at 150 rpm for 7 days	110
21	Performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) by bioaugmentation (with the inoculation of SNL1) and biostimulation without microbial inoculation (control) under non-sterile conditions with aeration at 0.4 vvm for 7 days in 6L reactor	113
22	Biogas performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) using biostimulation without microbial inoculation and bioaugmentation by SNL1 under non-sterile conditions with aeration at 0.4 vvm for 7 days	118
23	Biogas performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) using without microbial inoculation and bioaugmentation by SNL1 under non-sterile conditions with aeration for 4 days	125
24	Biogas performance of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) using bioaugmentation by SNL1 under non-sterile conditions with aeration for 3 days at batch mode in 1000 L fermentor	135
25	Biogas performance of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) using bioaugmentation by SNL1 under non-sterile conditions at the different air of fermentor in batch mode	135
26	Comparison of nutrients in residual sludge after biogas production	139

LIST OF FIGURES

Figures		Page
1	Wastewater treatment system of Tuna Canning Industry.	4
2	Anaerobic digestion.	9
3	Bioaugmentation and biostimulation.	14
4	Structure of triglyceride.	15
5	Protein hydrolysis by protease.	18
6	Methane producing bacteria (A) and B. subtilis AH73 (B) from upflow anaerobic sludge blanket (UASB).	27
7	Schematic diagram of 6.5 L fermentation tank in anaerobic digestion.	29
8	Schematic diagram of 200 L fermentation tank in anaerobic digestion.	30
9	Schematic diagram of 1000 L fermentation tank in anaerobic digestion.	31
10	Anaerobic digestion system of pretreated scum in 6.5 L fermentor.	45
11	Anaerobic digestion of pretreated scum in 200 L fermentor.	47
12	Anaerobic digestion of pretreated scum in 1000 L fermentor.	49
13	pH profile (A) and lipase production (B) during the digestion of scum from oil trap using *Bacillus subtilis* AH73.	52
14	Daily biogas production (A), cumulative biogas production (B), and cumulative methane production (C) of scum from oil trap with pretreatment by *B. subtilis* AH73 for 72 h and without pretreatment (control).	54
15	Sample sources from tuna canning industry for isolation of lipase and protease producing (EM for smell reduction (A), sludge from microorganisms collecting sludge pond (B), wastewater from oil trap (C), and scum from oil trap (D)).	57

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figures		Page
16	Lipase production on tween 80 agar (A), Protease production on skimmed milk agar (B), and confirm lipase production on rhodamine B agar (C) of bacteria isolated from wastewater treatment system of tuna canning industry.	57
17	SVI values before and after the digestion of scum from oil trap using lipase and protease producing bacteria with shaking at 150 rpm for 72 h under sterile conditions (A), and non-sterile conditions (B) (scum is the initial value before digestion; control is the value after digestion without microorganism addition).	73
18	pH (A), total solids (B), and total suspended solids (c) before and after the digestion of scum from oil trap using lipase and protease producing bacteria under sterile and non-sterile conditions with shaking at 150 rpm for 72 h (scum is the initial value before digestion; control is the value after digestion without microorganism addition).	76
19	Soluble COD (A), lipase activity (B), and protease activity (c) before and after the digestion of scum from oil trap using lipase and protease producing bacteria under sterile and non-sterile conditions with shaking at 150 rpm for 72 h (scum is the initial value before digestion; control is the value after digestion without microorganism addition).	77
20	SVI values before and after the digestion of scum from oil trap using lipase and protease producing bacteria without shaking for 72 h under sterile conditions (A), and non-sterile conditions (B) (scum is the initial value before digestion; control is the value after digestion without microorganism addition).	79

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figures		Page
21	pH (A), total solids (B), and total Suspended Solids (c) before and after the digestion of scum from oil trap using lipase and protease producing bacteria under sterile and non-sterile conditions without shaking for 72 h (scum is the initial value before digestion; control is the value after digestion without microorganism addition).	82
22	Soluble COD (A), lipase activity (B), and protease activity (c) before and after the digestion of scum from oil trap using lipase and protease producing bacteria under sterile and non-sterile conditions without shaking for 72 h (scum is the initial value before digestion; control is the value after digestion without microorganism addition).	84
23	pH, soluble COD, lipase activity, and protease activity before and after the pretreatment of scum from oil trap without (control) and with using lipase and protease producing bacteria SNL1 and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking at 150 rpm for 3, 5 and 7 days.	89
24	Cumulative biogas production of scum slurry pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.	93
25	Overview of cumulative biogas production of scum slurry pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.	94
26	Cumulative methane production of scum slurry pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.	95

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figures		Page
27	Overview of cumulative methane production of scum slurry pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.	96
28	pH, soluble COD, lipase activity, and protease activity before and after the pretreatment of scum from oil trap at the different ratio without (control) and with using lipase and protease producing bacteria SNL1 and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking at 150 rpm for 3, 5 and 7 days.	100
29	Cumulative biogas production of scum slurry at the different ratio pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.	106
30	Overview of cumulative biogas production of scum slurry at the different ratio pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.	107
31	Cumulative methane production of scum slurry at the different ratio pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.	108
32	Overview of cumulative methane production of scum slurry at the different ratio pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.	109

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figures		Page
33	pH, soluble COD, lipase activity, and protease activity before and after the pretreatment of scum from oil trap without (control) and with using lipase and protease producing bacteria SNL1 under non-sterile condition with aeration at 0.4 vvm for 7 days.	112
34	Cumulative biogas production (A) and cumulative methane production (B) of scum slurry pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1 under non-sterile condition with aeration at 0.4 vvm for 7 days and unpretreated scum.	117
35	Composition and relative abundance of microbial flora during biogas production (at day 0 and 60) of scum slurry pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1 under non-sterile condition with aeration at 0.4 vvm for 7 days and unpretreated scum.	119
36	pH, soluble COD, lipase activity, protease activity, total solids and total suspended solids before and after the pretreatment of scum from oil trap with using lipase and protease producing bacteria SNL1 under non-sterile condition with aeration for 4 days.	121
37	Cumulative biogas production (A) and cumulative methane production (B) of scum slurry pretreated by the bioaugmentation by SNL1 under non-sterile condition with aeration for 4 days.	124
38	Total volatile fatty acid and alkalinity before and after the pretreatment of scum from oil trap with using lipase and protease producing bacteria SNL1 under non-sterile condition with aeration for 4 days.	126
39	pH, Soluble COD, lipase activity, and protease activity total solids and total suspended solids before and after the digestion of scum from oil trap by using lipase and protease producing bacteria and aeration for 3 days.	128

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figures		Page
40	Cumulative biogas production and cumulative methane production of digestion of scum pretreated by the bioaugmentation of SNL1 and adding aeration for 3 days.	134
41	Total volatile fatty acid and alkalinity before and after the anaerobic digestion of pretreated scum from oil trap by using lipase and protease producing bacteria and aeration for 3 days.	136
42	Standard curve of palmitic acid.	151
43	Standard curve of tyrosine.	152

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง อาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิริยะ ดวงสุวรรณ อาจารย์ ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำเป็นที่ปรึกษา ให้กำลังใจ ชี้แนะแนวทางในการทำวิจัย การออกแบบถังหมัก การค้นคว้าและสนับสนุนทุนในการทำวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.เบญจมาส เชียรศิลป์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.สมพงศ์ โอทอง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสียสละเวลาอันมีค่ายิ่งในการให้ข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะ และ การตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วาสนา สุโยธา กรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ที่คอยให้ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม ทุกท่านที่ อบรมสั่งสอนให้ความรู้ คอยให้คำเนะนำในการศึกษาครั้งนี้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จารุชา ยี่แสง ผู้เป็นแรงผลักดันและเป็นอีกหนึ่งกำลังใจให้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณพ่อแม่ และครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจ สนับสนุนกำลังทรัพย์ และให้ข้อคิดดีๆ แก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด และขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกคนที่คอยให้กำลังใจและ การช่วยเหลือ เกื้อกูลต่างๆ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	(5)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(19)
สารบัญ	(20)
LIST OF TABLES	(10)
LIST OF FIGURES	(13)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	26
ขอบเขตงานวิจัย	26
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	
วัสดุและอุปกรณ์	27
วิธีการวิเคราะห์	32
วิธีการดำเนินการวิจัย	37
3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	50
4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	138
เอกสารอ้างอิง	140
ภาคผนวก	149
ประวัติผู้เขียน	150

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเลโดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารทะเลกระป๋อง เป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญของประเทศไทย ในปี 2564 มีกำลังการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง 54,376 ตัน ลดลงร้อยละ 1.3 จากปี 2563 (จันทิมา เพียรผล, 2564) อย่างไรก็ตามในกระบวนการผลิตจะเกิดของเสียซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ของเสียที่เป็นของแข็งปริมาณร้อยละ 25 ถึง 30 และของเหลวปริมาณร้อยละ 30 ถึง 35 ของวัตถุดิบ (กำชัย รุ่งเพชรรัตน์, 2545) ปัจจุบันโรงงานมีกำลังการผลิตทูน่ากระป๋อง 400 ตันต่อวัน เกิดน้ำเสียจากรายการผลิต 5,000 ลบ.เมตร/วัน ของเสียจากกระบวนการผลิตบางส่วนสามารถแยกและนำไปขายได้ ส่วนน้ำเสียจะถูกนำไปบำบัดในบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงาน ก่อนน้ำเสียจะเข้าสู่กระบวนการบำบัดจะต้องผ่านบ่อดักจับไขมันเพื่อทำให้ไขมันลอยอยู่บนผิวน้ำจึงเกิดการสะสมของชั้นไขมันหนาขึ้น เรียกส่วนนี้ว่าตะกอนลอยไขมัน (มาริสา ทองน้อยและวิสสุตา แก้วทอง, 2561) โดยทั่วไปตะกอนลอยไขมันประกอบด้วยสารอินทรีย์ประเภทไขมันและโปรตีน ซึ่งไขมันมีโครงสร้างเป็นกรดไขมันสายยาวจึงเป็นการยากที่จะถูกกำจัดและยังเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดมลพิษทางกลิ่น นอกจากนี้ความเข้มข้นของไขมันและโปรตีนที่สูงในน้ำทิ้งยังมีผลทำให้กระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศเกิดปัญหา เนื่องจากจะก่อตัวเป็นก้อนหรือเป็นเม็ดตะกอน ทำให้ขัดขวางการตกตะกอนและลดประสิทธิภาพของการบำบัด (Jensen และคณะ, 2016) ปัญหาดังกล่าวอาจแก้ไขได้โดยการบำบัดด้วยวิธีการทางชีวภาพซึ่งเป็นการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายไขมันและโปรตีนในตะกอน ดังนั้นการปรับสภาพด้วยวิธีการทางชีวภาพจึงถูกนำมาใช้เพื่อปรับปรุงการย่อยสลายของตะกอนลอยซึ่งนำไปสู่การผลิตแก๊สชีวภาพและมีเทนที่เพิ่มขึ้น Goswami และคณะ (2018) รายงานวิธีการทางชีวภาพสองวิธี ได้แก่ การเสริมทางชีวภาพ (bioaugmentation) คือ การใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ หรือการกระตุ้นทางชีวภาพ (biostimulation) โดยการเติมสารอาหารหรือออกซิเจนเข้าสู่ระบบเพื่อกระตุ้นการทำงานของจุลินทรีย์เดิมในระบบ

งานวิจัยนี้จึงสนใจในการนำตะกอนลอยไขมันที่ไม่ได้มีประโยชน์มาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มโดยวิธีการปรับสภาพทางชีวภาพ โดยจะทำย่อยสลายตะกอนลอยไขมันเบื้องต้นด้วย *Bacillus subtilis* AH73 และทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสจากตัวอย่างตะกอนลอยไขมันของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตทูน่ากระป๋องเพื่อทำการปรับสภาพตะกอนลอยไขมันด้วยวิธีการทางชีวภาพก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายแบบ

ไร้อากาศเพื่อผลิตแก๊สชีวภาพซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนของโรงงานได้ โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ในสภาวะมีอากาศและคัดแยกแบคทีเรียในสภาวะไร้อากาศเนื่องจากต้องการลดต้นทุนของการเติมอากาศก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ นอกจากนี้ของเสียที่เหลือจากการผลิตแก๊สชีวภาพยังสามารถนำไปศึกษาถึงความเป็นไปได้เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตปุ๋ย จึงเป็นแนวทางหนึ่งตามแนวทางของ zero waste และยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียให้กับโรงงาน แนวคิดดังกล่าวสามารถเป็นไปได้ในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามการนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในโรงงาน ถังหมักและการเดินระบบที่เหมาะสมถือเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้เกิดการนำไปใช้ประโยชน์ในวงกว้าง ควรมีการศึกษาขยายขนาดเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้จริงเพื่อผลิตแก๊สชีวภาพและศึกษากากตะกอนเพื่อผลิตปุ๋ยอัดเม็ดในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะของเสียจากอุตสาหกรรมผลิตทูน่ากระป๋อง

อุตสาหกรรมทูน่ากระป๋องเป็นอุตสาหกรรมส่งออกที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ในกระบวนการแปรรูปปลาทูน่ากระป๋องก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือ 2 ส่วน คือ วัสดุเศษเหลือที่เป็นของแข็ง ปริมาณร้อยละ 25 ถึง 30 ของวัตถุดิบ และอีกส่วนหนึ่งเป็นของเหลว ปริมาณร้อยละ 30 ถึง 35 ของวัตถุดิบ ซึ่งวัสดุเศษเหลือที่เป็นของเหลวเหล่านี้ส่วนใหญ่ทางโรงงานยังไม่ได้มีการนำมาใช้ประโยชน์มากนัก นอกจากปล่อยลงสู่ระบบบำบัดน้ำเสีย วัสดุเศษเหลือเหล่านี้ประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ที่สำคัญ เช่น โปรตีนและไขมัน เป็นต้น ระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต (Figure 1) ปัจจุบันมีกำลังการผลิตทูน่ากระป๋อง 400 ตันต่อวัน เกิดน้ำเสียจากรายการผลิต 5,000 ลูกบาศก์เมตรต่อวัน เนื่องจากปลาทูน่ามีองค์ประกอบของโปรตีนและไขมันเป็นส่วนใหญ่ น้ำเสียจากรายการผลิตจึงมีการปนเปื้อนของโปรตีนและไขมันมากเช่นกัน โดยก่อนที่น้ำเสียจะเข้าสู่ระบบบำบัดจะถูกกักไว้ในบ่อดักไขมัน เพื่อให้ไขมันลอยขึ้นสู่ผิวหน้าของระบบ เกิดการสะสมของชั้นไขมันหนาขึ้นและยากต่อการกำจัด มักเรียกไขมันจากส่วนนี้ว่า ตะกอนลอยไขมันซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีดำ หรือ สีน้ำตาลแก่และมีกลิ่นเหม็นคาว จากรายงานของมาริสา ทองน้อย และวิสสุตา แก้วทอง (2561) ทำการศึกษาลักษณะของตะกอนลอยไขมันจากบ่อดักไขมันโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง พบว่ามีค่าพีเอชเท่ากับ 6.93 มีปริมาณของแข็งระเหยได้ร้อยละ 98.31 ปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 89.58 ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดมีค่าร้อยละ 3.20 ปริมาณไขมันทั้งหมด ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร เท่ากับ 1.83 และมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ร้อยละโดยมวลเท่ากับ 0.30 (Table 1.) นอกจากนี้ยังมี Dissolved air floatation system (DAF) ซึ่งเป็นระบบที่ใช้แยกไขมันออกจากน้ำ โดยใช้สารเคมีในกลุ่มของพอลิเมอร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับอากาศเพื่อเร่งให้ไขมัน

จับตัวกันเป็นก้อนและลอยอยู่เหนือน้ำ จากรายงานของชุติมน ตั้งพงศ์เสถียรและนันทิชา ภักดีไทย (2560) ศึกษาลักษณะของตะกอนลอยไขมันจากระบบ Dissolved air floatation หรือบ่อ DAF ผลการวิเคราะห์พบว่า ตะกอนลอยไขมันที่ใช้ในการทดลองมีสภาพเป็นกลางคือ มีค่าพีเอชเฉลี่ยเท่ากับ 6.93 มีปริมาณอินทรีย์คาร์บอนและปริมาณไนโตรเจนเฉลี่ย ร้อยละโดยมวลเท่ากับ 3.35 และ ร้อยละโดยมวล เท่ากับ 0.34 ตามลำดับ ปริมาณไขมันทั้งหมดมีค่าร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร เท่ากับ 1.19 และมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ได้เฉลี่ยร้อยละโดยมวล เท่ากับ 9.85 (Table 1) ตะกอนลอยไขมันเป็นหนึ่งในสารอินทรีย์ที่สำคัญซึ่งพบมากในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมเกษตร จึงถูกพิจารณาว่าเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสำหรับการผลิตแก๊สชีวภาพเนื่องจากมีการปนเปื้อนสารอินทรีย์สูงซึ่งอุดมไปด้วยโปรตีนและไขมัน (Jensen และคณะ, 2016)

Table 1 Characteristics of wastewater from different source of tuna canning industry

Parameters	Lipid from Oil Trap	Lipid from DAF
pH	6.93±0.02	6.93±0.02
Total Carbon	3.20±0.18 % wt.	3.35±0.18 % wt.
Total organic carbon	44.82±0.01 g/kg	-
Total Nitrogen	0.30±0.01 % wt.	0.34±0.01 % wt.
Total fat	1.83±0.01 % w/v	1.19 % w/v
Total Solids (TS)	89.58±0.23 %	19.07±0.38 %
Volatile Solids (VS)	98.31±0.05 %	82.54±0.73 %

ที่มา: มาริสา ทองน้อย และ วิสสุตา แก้วทอง (2561), ชุติมน ตั้งพงศ์เสถียร และ นันทิชา ภักดีไทย (2560)

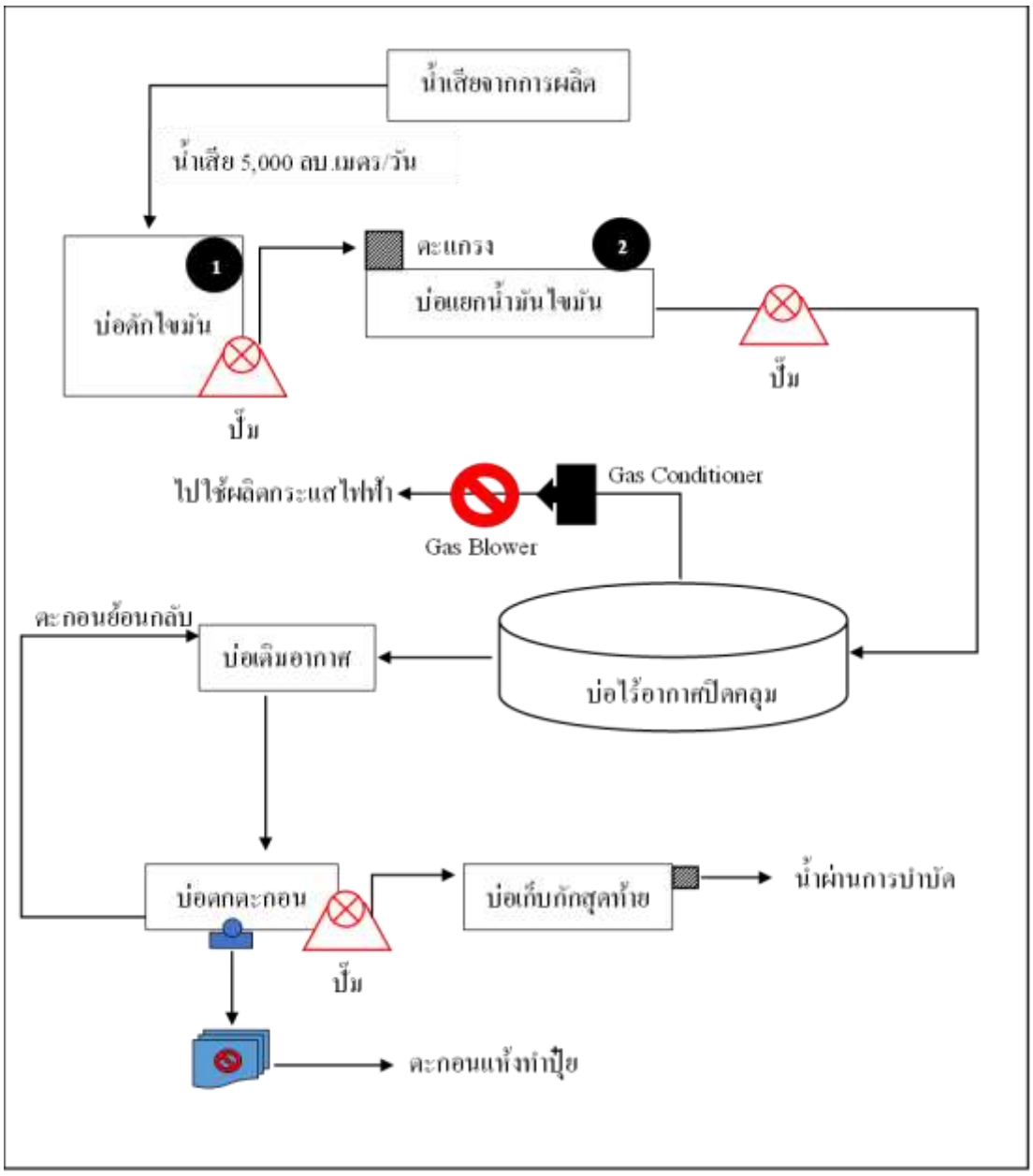


Figure 1 Wastewater treatment system of Tuna Canning Industry.

ที่มา: ชุติมน ตั้งพงศ์เสถียร และ นันทิชา ภักดีไทย (2560)

2. แก๊สชีวภาพ

2.1 ระบบของแก๊สชีวภาพ

แก๊สชีวภาพ เป็นแก๊สที่ได้จากการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic digestion) ซึ่งสารอินทรีย์ส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจน เมื่อผ่านการย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน จนมีขนาดโครงสร้างโมเลกุลเล็กลงและเกิดการสร้างเป็นแก๊สมีเทนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์รวมไปถึงแก๊สอื่น ๆ ซึ่งองค์ประกอบของแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ ได้แก่ แก๊สมีเทน (CH_4) ประมาณร้อยละ 65 แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ประมาณร้อยละ 30 แก๊สไฮโดรเจนซัลไฟล์ (H_2S) ประมาณร้อยละ 3 แก๊สไฮโดรเจน (H_2) และแก๊สไนโตรเจน (N_2) ประมาณร้อยละ 2 (Balsam และคณะ, 2006) แก๊สชีวภาพที่มีแก๊สมีเทนมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อผสมกับอากาศมากกว่า 5 ถึง 7 เท่า สามารถจุดไฟติดได้ที่อุณหภูมิ 600 ถึง 700 องศาเซลเซียส และให้พลังงานความร้อน ดังนั้นแก๊สชีวภาพจึงสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนได้ (ศูนย์ประสานงานโครงการส่งเสริมเทคโนโลยีแก๊สชีวภาพ, 2551)

2.2 คุณสมบัติของแก๊สชีวภาพ

แก๊สชีวภาพที่ถูกนำไปใช้ประโยชน์ ค่าพลังงานที่ได้จะขึ้นอยู่กับสัดส่วน (เปอร์เซ็นต์) ของแก๊สมีเทนที่มีอยู่ในเนื้อแก๊สชีวภาพซึ่งมีคุณสมบัติทั่วไปของแก๊สชีวภาพและลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของแก๊สชีวภาพแสดงดัง Table 2 และ Table 3

Table 2 Properties of biogas

Properties of biogas	Values
Heating value	21.5 MJ/m^3
Proper high velocity	25 cm/s
Combustion temperature	650 °C
Heat capacity	1.6 $kJ/m^3 \cdot °C$
Density	1.15 kg/m^3

ที่มา: ศูนย์ประสานงานโครงการส่งเสริมเทคโนโลยีแก๊สชีวภาพ (2551)

Table 3 Physical and chemical characteristics of methane

Property of methane	Values
Molecular formula	CH_4
Purity	99.87 %
Molecular weight	16 g/mol
Explosible range	4.4-17 vol. %
Melting point	-161 ºC
Specific heat capacity	35.69 J/mol. K
Boiling point	-182.5 ºC
Heat of vaporization	-74.87 kJ/mol
Maximum explosion pressure	8.1 (barg)
Heat of combustion	55 MJ/kg
Diffusivity	1.60 m^2/sec
Adiabatic flame temperature	2226 K
Burning velocity	39 cm/s

ที่มา: Addai และคณะ (2016)

2.3 กระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ

กระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic digestion) เกิดจากกระบวนการหมักสารอินทรีย์ หรือสารประกอบชีวโมเลกุล ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยจะถูกย่อยด้วยแบคทีเรียหลายกลุ่มเพื่อเปลี่ยนรูปไปเป็นแก๊สมีเทนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ Leung และคณะ (2016 อ้างโดย Sarker และคณะ, 2019) กล่าวว่าในทางทฤษฎี สารประกอบชีวโมเลกุลในกลุ่มของไขมันจะมีศักยภาพในการเปลี่ยนไปเป็นมีเทนสูงสุด รองลงมาคือ โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ตามลำดับ (Table 4) โดยแบคทีเรียจะทำการย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาสารอินทรีย์บางส่วนที่ถูกย่อยสลายจะถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย การผลิตแก๊สชีวภาพได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการทดลอง (ราตรี ซุ่ยหิรัญ, 2554)

Table 4 Methane reaction of each organic substance

Component	Methanogenic reaction	Biogas (L/g)	CH_4 (%)
Lipids	$C_{50}H_{90}O_6 + 24.5H_2O \longrightarrow 34.75CH_4 + 15.25CO_2$	1.425	69.5
Carbohydrates	$C_6H_{10}O_5 + H_2O \longrightarrow 3CH_4 + 3CO_2$	0.830	50.0
Protein	$C_{16}H_{24}O_5N_4 + 14.5H_2O \longrightarrow 8.25CH_4 + 3.75CO_2 + 4NH_4^+ + 4HCO_3^-$	0.921	68.8

ที่มา: Leung และคณะ (2016)

ผลผลิตที่สำคัญของกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพในสภาวะไร้อากาศ คือ แก๊สมีเทน ซึ่งในกระบวนการผลิตแก๊สมีเทนอาศัยแบคทีเรียที่สำคัญ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ไม่สร้างมีเทน (non - methanogenic bacteria) และกลุ่มที่สร้างมีเทน (methanogenic bacteria) แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน (Figure 2) ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การย่อยสลาย (Hydrolysis)

สารอินทรีย์ยังอยู่ในรูปโมเลกุลใหญ่แบคทีเรียไม่สามารถจะย่อยสลายได้ทันทีจำเป็นที่จะต้องมีการทำให้เกิดการแตกตัวเป็นโมเลกุลเล็กก่อน โดยมีแบคทีเรียกลุ่มแรกปล่อยเอนไซม์มาช่วยเร่งการแตกตัวของโมเลกุล แบคทีเรียกลุ่มนี้จะได้รับสารอาหารบางชนิดจากสารอินทรีย์ผ่านการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง สำหรับการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลใหญ่ ได้แก่ ไขมัน โพลีแซคคาไรด์ โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ให้อยู่ในรูปสารอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เช่น กรดไขมัน โมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ กรดอะมิโนพิวรีน และไพริมิดีน โดยอาศัยกลุ่มแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสียในการเปลี่ยนแปลงรูปของสารประกอบอินทรีย์ (ราตรี ซุ่ยหิรัญ, 2554)

ขั้นตอนที่ 2 การสร้างกรด (Acidogenisis)

แบคทีเรียอีกกลุ่มจะทำการย่อยสลายโมเลกุลที่แตกตัวแล้วจากขั้นตอนแรกให้เป็นกรดอินทรีย์ (Organic Acid) แบคทีเรียทีกลุ่มนี้ เรียกว่า Acid Forming Bacteria เป็นแบคทีเรียที่อยู่ได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน โดยแบคทีเรียสร้างกรดจะดูดซึมสารอินทรีย์ขนาดเล็กเข้าไปในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหาร เปลี่ยนเป็นกรดไขมันมันระเหยง่าย (volatile fatty acid, VFA) เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น และผลิตไฮโดรเจนกับคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาด้วยกระบวนการชีวเคมี แบคทีเรียสร้างกรด เช่น *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Clostridium* spp. และ *Escherichia coli* ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศร้อยละ 99 ซึ่ง

แบคทีเรียกลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่สร้างแก๊สมีเทน โดยผลิตภัณฑ์หลักที่สำคัญของกระบวนการนี้ คือ กรดไขมันระเหยง่ายที่จัดเป็นผลิตภัณฑ์รองและเป็นสารตัวกลางที่ถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นแก๊สมีเทน มีรายงานว่ากรดอะซิติกเป็นกรดไขมันที่พบมากสุดในกระบวนการหมักคิดเป็นร้อยละ 72 ที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นแก๊สมีเทนมากที่สุด

ขั้นตอนที่ 3 การสร้างกรดอะซิติกจากกรดไขมันระเหยง่าย (Acetogenesis)

ในขั้นตอนนี้แบคทีเรียในกลุ่มของ อะซิโตจินิก มีบทบาทที่สำคัญในระหว่างขั้นตอนการสร้างกรดและขั้นตอนการสร้างมีเทน ซึ่งการผลิตมีเทนนั้นจำเป็นต้องการสารอาหารที่เฉพาะเจาะจง ได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก ไฮโดรเจน เมทานอล และเมทิลามีน เพื่อให้แบคทีเรียผลิตมีเทนนำอาหารไปใช้เนื่องจากกรดไขมันระเหยง่ายมีคาร์บอนมากกว่า 2 อะตอม เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็นสารอาหารในการผลิตมีเทนได้โดยตรง

$$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \xrightarrow{\text{acetogenic bacteria}} CH_3COOH + CH_2 + CH_3$$

$$CH_3CH_2\ CH_2COOH + 2H_2O \longrightarrow 2CH_3COOH + 2H$$

ขั้นตอนที่ 4 การสร้างมีเทน (Methanogenesis)

ในขั้นตอนนี้แบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งเรียกว่า Methanogens หรือ Methane Forming Bacteria จะทำการเปลี่ยนกรดอะซิติกและไฮโดรเจนเป็นแก๊สมีเทนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แบคทีเรียพวกนี้ต้องอยู่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (Obligate Anaerobic Bacteria) ปริมาณแก๊สมีเทนที่เกิดขึ้นในขั้นตอนนี้จะขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดอะซิติกจากปฏิกิริยาก่อนหน้านี้ เมื่อจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มสร้างมีเทนพบว่า มีความคล้ายกับแบคทีเรียที่พบในกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องและพบในถังตกตะกอนสารอินทรีย์จากแม่น้ำ ได้แก่ *Methanobacterium formicicium, Methanobrevibactor arboriphilus*, *Methanomicrobium mobile* และ *Methanosarcina barkeri* ซึ่งพบอยู่ในช่วง 10^6–10^8 เซลล์ต่อลูกบาศก์เมตร

$$CH_3COOH + 2H_2O \xrightarrow{\text{methanogenic bacteria}} CH_4 + H_2CO_3$$

$$4H_2 + H_2CO_3 \longrightarrow CH_4 + 3H_2O$$

แบคทีเรียสร้างมีเทนเจริญเติบโตได้ช้าสภาพแวดล้อมมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตค่อนข้างมาก ทำให้ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของแบคทีเรียชนิดนี้แคบ โดยสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงพีเอชประมาณ 6.8 ถึง 7.2 และแบคทีเรียในกลุ่มที่มีอัตราการ

เจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) หรือการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ใหม่จะต้องการสารอาหารที่โครงสร้างไม่ซับซ้อน ดังนั้นการเติบโตของแบคทีเรียสร้างมีเทน จึงขึ้นอยู่กับการทำงานของแบคทีเรียสร้างกรดโดยแบคทีเรียทุกกลุ่มต้องทำงานอย่างสัมพันธ์กัน ดังนั้นเมื่อพิจารณากลุ่มของแบคทีเรียที่อยู่รวมกันในระบบการหมักแบบไร้อากาศ พบว่ากลุ่มของแบคทีเรียสร้างมีเทนจะเป็นกลุ่มแบคทีเรียหลักที่ควบคุมความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดในระบบ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีอัตราการเติบโตช้าที่สุด และมีข้อจำกัดด้านสภาพแวดล้อมของระบบมากกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่น

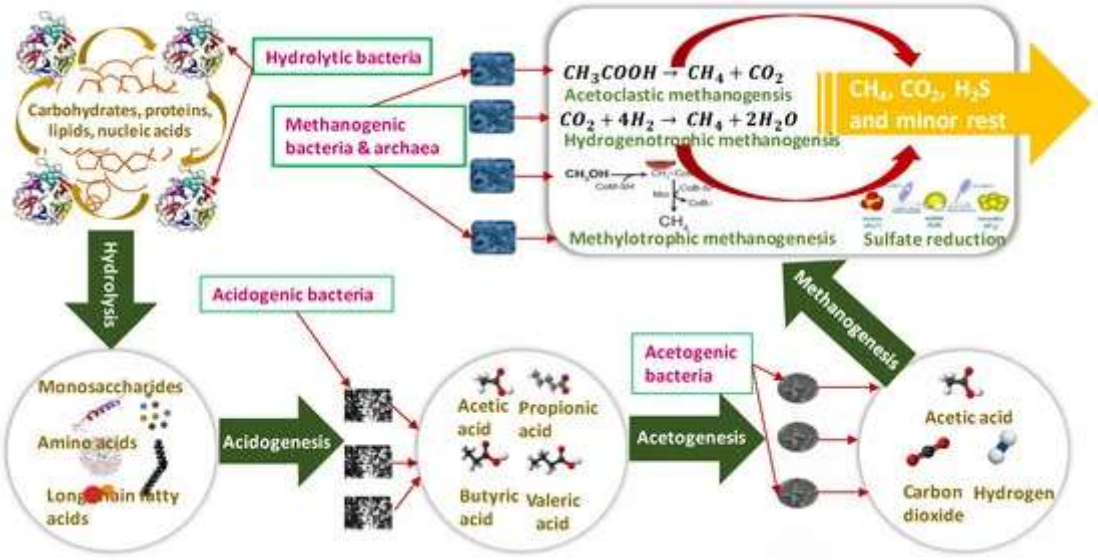


Figure 2 Anaerobic digestion.
ที่มา: Sarker และคณะ (2019)

3. Biochemical methane potential (BMP)

เป็นการประเมินหาศักยภาพในการผลิตมีเทนจากวัสดุเศษเหลือ ด้วยกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ ซึ่งในการทดลองมีปัจจัยสำคัญหลายประการ เช่น อัตราส่วนหัวเชื้อต่อซับสเตรท ขนาดของอนุภาคซับสเตรท อัตราการกวนผสมเพื่อให้จุลินทรีย์สัมผัสและใช้สารอาหารได้ดียิ่งขึ้น การป้องกันการสะสมของกรดไขมันที่มากเกินไป ปริมาณสารอาหารที่เติมลงไป ซึ่งล้วนแต่ส่งผลต่อผลผลิตมีเทนที่ได้ และอัตราการผลิตมีเทน ค่าบีเอ็มพีส่วนใหญ่รายงานผลในรูปผลผลิตมีเทนที่ได้ (จารุพัฒน์ กาญจนรงค์, 2554)

จากรายงานของชุติมน ตั้งพงศ์เสถียรและนันทิชา ภักดีไทย (2560) ทำการศึกษาศักยภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากตะกอนลอยไขมันที่มีการเติมอาหารสังเคราะห์ โดยใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นเท่ากับ 0.60 กรัมของของแข็งระเหยง่ายต่อลิตรต่อซับสเตรท คือ ตะกอน

ลอยไขมันเท่ากับ 0.60, 0.30, 0.20 กรัมของของแข็งระเหยง่ายต่อลิตร คิดเป็นอัตราส่วน Inoculums to substrate volatile solids ratio; ISRs เท่ากับ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ พบว่าปริมาณการผลิตแก๊สมีเทนสะสมที่อัตราส่วน ISRs = 2 มีศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนสูงสุด (Methane production potential) โดยมีค่าเท่ากับ 340 ลิตรมีเทนต่อกรัมของของแข็งระเหยง่าย

จากรายงานของมาริสา ทองน้อย และวิสสุตา แก้วทอง (2561) ได้ทำการทดลองศึกษาผลของจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสต่อการผลิตแกสชีวภาพจากการย่อยสลายกากตะกอนลอยไขมัน (oil trap) โดยการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและผลิตแก๊สชีวภาพได้สูงสุด โดยใช้แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ Biogrease®, *B. Subtilis* TISTR 1248 และ *B. Subtilis* AH73 โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็นสองชุดได้แก่ ทำการปรับสภาพกากตะกอนลอยไขมันด้วยจุลินทรีย์ผลิตไลเปสก่อนนำไปผลิตแก๊สชีวภาพ และการเติมจุลินทรีย์ผลิตไลเปสและจุลินทรีย์ผลิตมีเทนร่วมกันในการผลิตแก๊สชีวภาพ ซึ่งทำการทดลองการผลิตแก๊สชีวภาพโดยการใช้กากตะกอนลอยไขมันและน้ำเสียที่ออกจากโรงงานร่วมกับการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย ทำการทดลองในขวดซีรั่มขนาด 120 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรหมักจริง 70 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ผลิตมีเทนที่มีความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น MLVSS เท่ากับ 40 กรัมของของแข็งระเหยง่ายต่อลิตร คิดเป็นร้อยละโดยปริมาตรต่อปริมาตร เท่ากับ 20 ดังนั้นเติมปริมาตรเท่ากับ 14 มิลลิลิตร เติม cell culture (นำหัวเชื้อจุลินทรีย์ผลิตไลเปสเลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมกากตะกอนลอยไขมันทูน่า ร้อยละ 2 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง) ปริมาตร 14 มิลลิลิตร และเติมกากตะกอนลอยไขมันน้ำหนักเปียกเท่ากับ 0.58 กรัม (มีอัตราส่วน Inoculum substrate ratio :ISR = 2 โดยมีความเข้มข้นของหัวเชื้อจุลินทรีย์ผลิตมีเทนเริ่มต้นเท่ากับ 0.80 กรัมของของแข็งระเหยง่าย ต่อตะกอนลอยไขมันเท่ากับ 0.40 กรัมVS ตามลำดับ) ผลของการศึกษาศักยภาพการผลิตมีเทนจากกากตะกอนลอยไขมันทูน่า (Biochemical Methane Potential, BMP) ร่วมกับแบคทีเรีย พบว่าศักยภาพการผลิตมีเทนสูงสุด (Methane production potential: Hm) จากชุดการการทดลองที่ทำการปรับสภาพกากตะกอนลอยไขมันด้วยจุลินทรีย์ผลิตไลเปสก่อนนำไปผลิตแก๊สชีวภาพ เชื้อถูกชักนำให้ผลิตเอนไซม์ไลเปสก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ (cell culture) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* TISTR 1248 มีค่า *Hm* เท่ากับ 886.68 ลิตรมีเทนต่อกรัมของของแข็งระเหยง่าย และมีค่าใกล้เคียงกับ *B. subtilis* AH73 (830.86 ลิตรมีเทนต่อกรัมของของแข็งระเหยง่าย) แต่ *B. subtilis* AH73 มีแนวโน้มการสะสมแก๊สมีเทนสูงกว่า สำหรับการทดลองชุดที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผลิตไลเปสโดยตรง ไม่มีการชักนำให้ผลิตเอนไซม์ไลเปสก่อน พบว่า *B. subtilis* AH73 มีค่า *Hm* เท่ากับ 1705.32 ลิตรมีเทนต่อกรัมของของแข็งระเหยง่าย ซึ่งมีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อ Biogrease® และ *B. subtilis* TISTR 1248

4. การปรับสภาพ (Pretreatment)

ในกระบวนการปรับสภาพวัสดุเศษเหลือจะกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนคุณสมบัติทางด้านกายภาพ คือ ทำให้วัสดุมีการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของสารอินทรีย์จากโมเลกุลใหญ่เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลงหรือถูกทำลาย ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้การเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถทำงานได้ง่ายขึ้น การปรับสภาพเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดในการปรับปรุงผลผลิตแก๊สมีเทนซึ่งวัตถุประสงค์หลักของการปรับสภาพ คือ

- เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของพื้นผิวของวัสดุเศษเหลือ หรือเพิ่มความเป็นรูพรุน
- เพื่อลด หรือ กำจัดสารประกอบที่เป็นพิษที่อาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการ
- เพื่อปรับปรุงจลนศาสตร์ของการย่อยสลายโปรตีนและไขมัน
- เพื่อเพิ่มความสามารถในการเข้าถึงสารประกอบที่เข้าถึงได้ยาก
- เพื่อเปลี่ยนแปลงสภาพของวัสดุเศษเหลือก่อนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ

อย่างไรก็ตามควรเลือกวิธีการปรับสภาพตามลักษณะของวัสดุเศษเหลือซึ่งแบ่งวิธีการปรับสภาพได้ดังนี้

4.1 วิธีทางกายภาพ (Physical pretreatment) สามารถแบ่งได้ 3 วิธีดังนี้

4.1.1 การใช้แรงทางกล (Mechanical communition)

คือ วิธีการทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลงสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การทุบ การบด การโม่ การเขย่าวัตถุดิบ เป็นต้น ซึ่งจะมีผลทำให้เพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น ความสามารถในการลดขนาดจะขึ้นอยู่กับขนาดสุดท้ายของวัสดุและคุณสมบัติของวัสดุนั้นๆ

4.1.2 การไพโรไลซิส (Pyrolysis)

คือ วิธีการอบโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงทำให้วัตถุดิบเปลี่ยนสภาพเป็นแก๊สหรือของแข็ง การใช้อุณหภูมิต่ำจะส่งผลให้กระบวนการดำเนินได้ช้าลงและเกิดการระเหยจะต่ำ จากการวิจัยพบว่า การใช้อุณหภูมิสูงหรือต่ำจนเกินไปไม่ก่อให้เกิดผลดี

4.1.3 การใช้ความร้อน (Thermal heat treatment)

คือ การปรับสภาพของวัตถุดิบเพื่อทำลายโครงสร้างของไขมันและโปรตีน ทำให้เกิดการแตกตัวของไขมัน โดยส่วนใหญ่มักจะใช้อุณหภูมิสูงกว่า 150-180 องศาเซลเซียส แต่มีข้อจำกัดเรื่องขนาดของวัสดุที่ต้องมีขนาดที่เล็กก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยวัตถุดิบทางความร้อน

ซึ่งการปรับสภาพด้วยวิธีการทางกายภาพมีข้อดี คือ ใช้ระยะเวลาย่อยสลายสั้นลง และข้อเสีย คือ ต้องใช้พลังงานมาก (Karthikeyan และคณะ, 2018)

4.2 วิธีการทางเคมี (Chemical pretreatment)

ส่วนใหญ่อาศัยสารเคมีในการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของวัสดุเศษเหลือ เป็นกระบวนการที่รวดเร็วซึ่งต้องการการเพิ่มประสิทธิภาพที่เฉพาะเจาะจงโดยขึ้นอยู่กับลักษณะของวัสดุเศษเหลือ เพื่อหลีกเลี่ยงการสะสมของสารยับยั้งเช่นสารประกอบฟูรานิกหรือฟีนอลิก หรือกรดไขมันสายยาว ซึ่งส่งผลต่อการผลิตแก๊สมีเทน การปรับสภาพด้วยกรดเป็นที่ทราบกันดีว่ามีประสิทธิภาพในการละลายคาร์โบไฮเดรตในขณะที่การปรับสภาพด้วยอัลคาไลมีประสิทธิภาพในการละลายโปรตีนและลิกนิน รวมทั้งการย่อยสลายไขมัน อย่างไรก็ตามสารเคมีที่ใช้ในการปรับสภาพซึ่งเป็นกรดที่มีฤทธิ์กัดกร่อน (เช่น H_2SO_4, HCl เป็นต้น) และการปรับสภาพด้วยด่างต้องใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานกว่าการปรับสภาพด้วยกรด ซึ่งการปรับสภาพด้วยสารเคมีมีข้อดี คือ สามารถย่อยสลายวัสดุเศษเหลือได้รวดเร็วกว่าวิธีอื่นๆ และข้อเสีย คือ เมื่อใช้กรดในการปรับสภาพเช่น กรดซัลฟิวริกซึ่งมีฤทธิ์ในการกัดกร่อนอาจทำให้ถังปฏิกรณ์เกิดความเสียหายได้ (Karthikeyan และคณะ, 2018)

4.3 วิธีการทางชีวภาพ (Biological pretreatment)

เป็นการปรับสภาพของวัสดุเศษเหลือโดยการใช้เอนไซม์ หรือ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ ซึ่งการใช้วิธีการทางชีวภาพในการปรับสภาพนั้นสามารถย่อยสลายไขมันและโปรตีนได้ดีกว่าการปรับสภาพด้วยวิธีอื่นๆ เนื่องจากว่าเอนไซม์มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558) ดังนั้นจึงมีการเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการใช้เอนไซม์ไว้ใน (Table 5)

Table 5 Advantages and disadvantages of enzyme hydrolysis

Advantages	Disadvantages
1. Mild conditions	1. Pretreatment of raw materials is required
2. Highly specific reaction leading to obtain high purity of product	2. Product inhibition problem
3. Product not easily convert to other compounds	3. Enzyme may be lost due to the absorption on undigested materials
4. The imultaneous hydrolysation and fermentation can be possible	4. High risk to contamination
5. None corrosion problem	

ที่มา: ณัฏฐิยา วัฒนกิจจานุกูล (2552)

การเสริมทางชีวภาพและการกระตุ้นทางชีวภาพ (Bioaugmentation and Biostimulation) (Figure 3) ถือเป็นการบำบัดทางชีวภาพอย่างหนึ่งโดยการเสริมทางชีวภาพ จะเป็นการเพิ่มจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีอยู่เดิมเข้าไปในระบบเพื่อช่วยในการบำบัดและฟื้นฟูสารมลพิษต่างๆ (สาวิกา กัลปพฤกษ์, 2557) ซึ่งการเพิ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ดัดแปลงพันธุกรรมแล้วสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารมลพิษได้มากกว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่น ในขณะที่การกระตุ้นทางชีวภาพ จะเป็นการกระตุ้นจุลินทรีย์ประจำถิ่นให้เติบโตด้วยการเติมปัจจัยบางอย่าง เช่น สารอาหาร ได้แก่ ฟอสฟอรัสและไนโตรเจน หรือกระตุ้นให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในระบบสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้สูงสุดโดยการปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น การเติมสารอาหาร อากาศหรือสารออกซิไดซ์อื่นๆ (da Silva และคณะ, 2020)

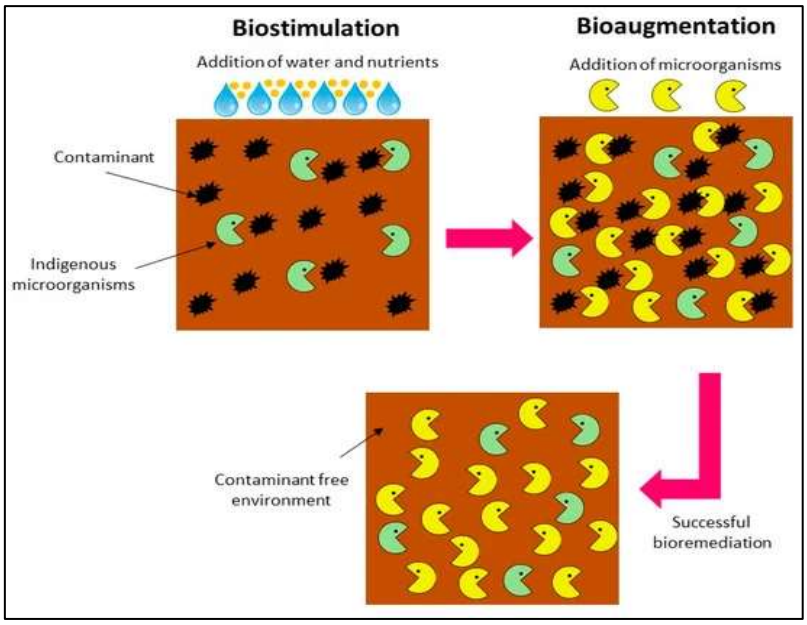


Figure 3 Bioaugmentation and biostimulation.
ที่มา: da Silva และคณะ (2020)

5. การปรับสภาพด้วยวิธีการทางชีวภาพของวัสดุเศษเหลือประเภทไขมัน

ไขมันหรือลิปิดประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นของแข็งที่เรียกว่า ไขมัน (Fat) และส่วนที่เป็นของเหลวเรียกว่า น้ำมัน (Oil) มักเรียกรวมกันทั้งส่วนของแข็งและของเหลวว่าไขมัน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารประกอบชีวโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์สาร เช่น อีเทอร์ ไขมันมักอยู่ในรูปของกรดไขมันซึ่งพบมากในพืชและสัตว์มักไม่พบในรูปแบบอิสระแต่จะอยู่รวมกับลิปิดด้วยพันธะโควาเลนต์และสามารถย่อยสลายได้เมื่อใช้เอนไซม์ หรือย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537) ส่วนประกอบของไตรกลีเซอไรด์ (Figure 4) เป็นเอสเทอร์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกรดไขมันสามโมเลกุลที่เชื่อมต่อกับโมเลกุลของกลีเซอรอลทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า triacylglycerol กรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์มักไม่เหมือนกัน (Rai และ Ingle, 2019) ซึ่งเอนไซม์ที่นำมาใช้ในการย่อยสลายไขมัน ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส (EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ที่มักจะเป็นโมเลกุลที่มีสายโซ่คาร์บอนของกรดไขมันยาวให้ได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล

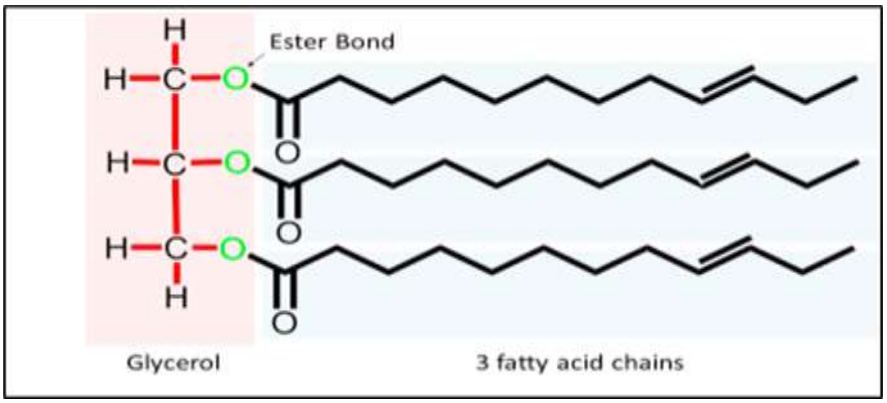


Figure 4 Structure of triglyceride.
ที่มา: Lee และคณะ, (2019)

5.1 การปรับสภาพไขมันด้วยเอนไซม์ไลเปส

จากรายงานของ Ning และคณะ (2016) ได้ศึกษาผลของการปรับสภาพไขมันในน้ำเสียจากโรงงานฆ่าสุกรโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร เท่ากับ 0.04, 0.2 และ 0.4 เพื่อผลิตแก๊สชีวภาพโดยทำการย่อยสลายไขมันแบบไร้อากาศและใช้ระบบการหมักแบบกะเป็นระยะเวลา 50 วัน พบว่า จากการปรับสภาพไขมันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ความเข้มข้น ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร เท่ากับ 0.2 สามารถเพิ่มผลผลิตแก๊สชีวภาพได้ ซึ่งให้ผลิตผลิตของแก๊สมีเทนเท่ากับ 851.6 มิลลิลิตรต่อกรัมของของแข็งระเหยง่าย โดยให้ผลผลิตสูงกว่าชุดการทดลองของน้ำเสียที่ไม่ผ่านการปรับสภาพถึง ร้อยละ 18.4 ผลลัพธ์นี้แสดงให้เห็นว่าผลผลิตแก๊สชีวภาพที่สูงขึ้น อาจเป็นผลมาจากการปรับสภาพของไขมันในน้ำเสียก่อนการผลิตแก๊สชีวภาพ

Adulkar และ Rathod (2013) ศึกษาการปรับสภาพน้ำเสียจากโรงงานผลิตนมที่มีการปนเปื้อนของไขมันในปริมาณสูง โดยใช้ไลเปสทางการค้าที่มีความแตกต่างกัน เพื่อการย่อยสลายของเสียก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพารามิเตอร์ที่สำคัญ ได้แก่ ผลของ enzyme loading, อุณหภูมิ, ความเข้มข้นของไขมันและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่แตกต่างกัน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมัน จากการศึกษาพบว่า lipase Z สามารถย่อยสลายไขมันสูงสุดเท่ากับร้อยละ 75 โดยมีการโหลดเอนไซม์ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร เท่ากับ 0.2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นของไขมันเท่ากับ 2,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นจึงมีการสรุปได้ว่าการปรับสภาพไขมันก่อนการย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศของเอนไซม์ lipase Z สามารถช่วยลดเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ต้องใช้ในการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน และสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้ดีขึ้นและเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดค่าซีโอดีได้ดียิ่งขึ้น

Meng และคณะ (2017) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศของไขมันหยาบในเศษอาหารโดยการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ จากการศึกษาผู้วิจัยประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส 3 ชนิด ได้แก่ Lipase-I สกัดได้จาก *Aspergillus*, Lipase-II สกัดได้จาก *Candida* และ Lipase-III สกัดได้จากตับอ่อนหมู เอนไซม์ทั้งสามชนิดเป็นเอนไซม์ทางการค้าที่ถูกนำมาใช้ในการปรับสภาพไขมันหยาบในเศษอาหาร โดยมีตัวอย่างซับสเตรท 3 ชนิด ได้แก่ floatable grease (FG), Animal fat (AF) และ vegetable oil (VO) ผลการวิจัยพบว่า Lipase-I และ Lipase-II มีการปลดปล่อยกรดไขมันสายยาวในตัวอย่างซับสเตรท 3 ชนิด ได้อย่างชัดเจนเมื่อทำการปรับสภาพเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 1,000 ถึง 1500 ไมโครลิตรและใช้อุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการปรับสภาพพบว่า อัตราการผลิตไบโอมีเทนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 80.8 ถึง 157.7, ร้อยละ 26.9 ถึง 53.8 และร้อยละ 37.0 ถึง 40.7 จากตัวอย่าง AF, VO และ FG ตามลำดับ และใช้เวลาในการย่อยสลายสั้นลง 10 ถึง 40 วัน การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการปรับสภาพไขมันด้วยเอนไซม์ไลเปสโดยใช้สภาวะที่เหมาะสม อาจเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มอัตราการผลิตแก๊สมีเทนได้

Cherif และคณะ (2014) ได้ศึกษาผลการปรับสภาพไขมัน Soap Stock จากอุตสาหกรรมการกลั่นน้ำมันด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Staphylococcus haemolyticus* ที่ถูกนำมาใช้ในการย่อยสลายไขมันก่อนการผลิตแก๊สชีวภาพ เนื่องจาก Soap Stock เป็นของเสียที่อุดมไปด้วยไขมัน โดยมีการใช้เอนไซม์ไลเปสหยาบ (S10, S20 และ S30) และเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (E10, E20 และ E30) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ ร้อยละ 10, 20 และ 30 เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการปรับสภาพ ผลการทดลองพบว่า ในชุดการทดลองที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ไลเปสหยาบและเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ให้ผลผลิตแก๊สชีวภาพสูง 800 ถึง 900 มิลลิลิตร ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการปรับสภาพให้ผลผลิตแก๊สชีวภาพเท่ากับ 400 มิลลิลิตร ดังนั้นการใช้เอนไซม์ไลเปสเพื่อปรับสภาพของสารอินทรีย์ก่อนการผลิตแก๊สชีวภาพดูเหมือนจะเป็นทางเลือกที่มีแนวโน้มมากในการเพิ่มปริมาณแก๊สชีวภาพ

5.2 การปรับสภาพไขมันด้วยจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปส

Affes และคณะ (2017) ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Staphylococcus xylosus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสต่อการย่อยสลายแบบไร้อากาศของการหมักร่วมกันระหว่างน้ำเสียจากโรงงานฆ่าสัตว์และไขมันสัตว์โดยใช้ระบบการหมักแบบกะเพื่อผลิตแก๊สชีวภาพ ผลการทดลองพบว่า จากการปรับสภาพไขมันสัตว์ด้วยเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้นั้น สามารถลดปริมาณไขมันได้ถึง 1.12 กรัมต่อลิตร เมื่อนำไขมันสัตว์ที่ผ่านการปรับสภาพมาหมักร่วมกับน้ำเสียจากโรงงานฆ่าสัตว์ผ่าน

กระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ โดยศึกษาอัตราส่วนระหว่างไขมันสัตว์ต่อน้ำเสียจากโรงงานฆ่าสัตว์ เท่ากับ 100 ต่อ 0, ร้อยละ 10 ต่อร้อยละ 90, ร้อยละ 25 ต่อร้อยละ 75, ร้อยละ 50 ต่อร้อยละ 50, ร้อยละ 75 ต่อร้อยละ 25 และ 0 ต่อ 100 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (หัวเชื้อมีเทน+น้ำกลั่น) พบว่า ในชุดการทดลองที่มีอัตราส่วนระหว่างไขมันสัตว์ต่อน้ำเสียจากโรงงานฆ่าสัตว์เท่ากับร้อยละ 25 ต่อร้อยละ 75 ให้ผลผลิตของแก๊สชีวภาพสูงขึ้น 0.6 ลิตรต่อกรัมของซีโอดี เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการปรับสภาพไขมันสัตว์

Prasad และ Manjunath (2011) ศึกษาการบำบัดด้วยน้ำเสียที่ปล่อยออกมาจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โรงงานผลิตนม โรงฆ่าสัตว์ อุตสาหกรรมสบู่ และน้ำเสียในครัวเรือน ด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis, B. licheniformis, B. amyloliquefaciens, Serratia marsescens, Pseudomonas aeruginosa*, และ *Staphylococcus aureus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสีย โดยจะทำการทดลองเป็นระยะเวลา 12 วัน และสังเกตปริมาณบีโอดีและปริมาณ lipid content ที่ลดลง ผลการทดลองพบว่า หลังจากการบำบัดทางชีวภาพเป็นระยะเวลา 12 วัน การบำบัดด้วย *P. aeruginosa* สามารถลดปริมาณบีโอดีได้ดีที่สุดในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม, น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสบู่, น้ำทิ้งจากครัวเรือนและน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตนม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 112 มิลลิกรัมต่อลิตร, 145 มิลลิกรัมต่อลิตร, 9 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 82 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ *S. aureus* สามารถลดปริมาณบีโอดีในน้ำเสียจากโรงฆ่าสัตว์ได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 11 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไขมันในน้ำเสียหลังการบำบัดทางชีวภาพเป็นระยะเวลา 12 วัน พบว่า *P. aeruginosa* สามารถลดปริมาณไขมันในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม, น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสบู่และน้ำทิ้งจากครัวเรือนได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 325 มิลลิกรัมต่อลิตร, 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 17 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ *S. marsescens* มีการลดปริมาณไขมันในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตนมได้ดี ซึ่งมีค่าเท่ากับ 280 มิลลิกรัมต่อลิตร และ *S. aureus* สามารถลดปริมาณไขมันในน้ำเสียโรงฆ่าสัตว์ได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 320 มิลลิกรัมต่อลิตร

6. การปรับสภาพด้วยวิธีการทางชีวภาพของวัสดุเศษเหลือประเภทโปรตีน

โปรตีนเป็นสารที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวนมากแต่ละโมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ (peptide bonds) ที่ต่อกันเป็นสายเพปไทด์ (peptide chain) โปรตีนบางชนิดที่มีกรดอะมิโนติดต่อกันเป็นสายยาวนั้นอาจพับไปพับมารวมเป็นกลุ่ม ซึ่งโปรตีนสามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์โปรติเอส (EC 3.4.21) เป็นเอนไซม์ที่สิ่งมีชีวิตผลิตขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีน (Figure 5) ให้ได้เปปไทด์สายสั้นๆ หรือเป็นกรดอะมิโนอิสระโดยการสลายพันธะเปปไทด์ในสภาวะที่มีน้ำอยู่ในสารละลาย ซึ่งมีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์เป็นอย่างมาก โดย

ปกติเอนไซม์โปรติเอสเมื่อสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่จะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ ซึ่งเรียกว่า proenzyme หรือ zymogen เพื่อป้องกันการย่อยสลายโปรตีนภายในเซลล์ และจะอยู่ในรูปแบบที่เร่งปฏิกิริยาได้เมื่ออยู่ในสภาพที่เหมาะสม (นิตยา ตันติวา และนพพล เล็กสวัสดิ์, 2557)

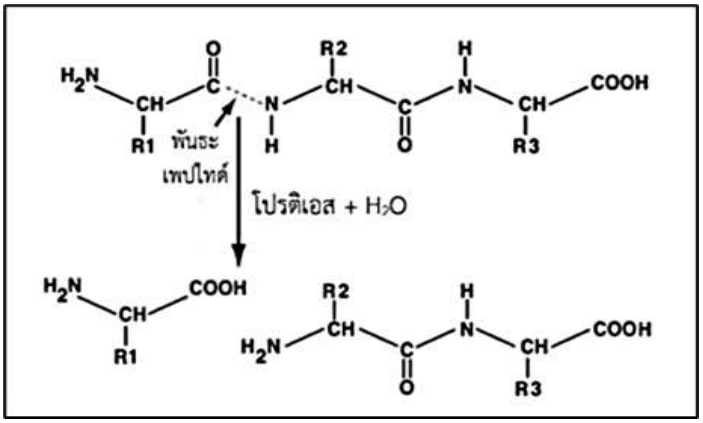


Figure 5 Protein hydrolysis by protease.
ที่มา: ธรรมรัตน์ ก้าวสมบัติ, (2544)

จากรายงานของ Merrylin และคณะ (2013) ทำการปรับปรุงกระบวนการบำบัดทางชีวภาพโดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการย่อย municipal solid waste (MSW) ก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สมีเทน ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการและดำเนินการในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกึ่งต่อเนื่อง ซึ่งมีปริมาตรรวมเท่ากับ 5 ลิตรและใช้ปริมาตรหมักจริงเท่ากับ 3 ลิตร โดยทำการศึกษาอัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ (OLRs) พบว่า ที่ OLR 0.84 kgSS/m^3 – day เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำงานของเครื่องปฏิกรณ์ การปรับสภาพ MSW ก่อนการย่อยแบบไม่ใช้ออกซิเจนทำให้สารแขวนลอยเพิ่มขึ้น 55 เปอร์เซ็นต์ และ ลดของแข็งที่ระเหยได้ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีการปรับปรุงการผลิตแก๊สชีวภาพ 57 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าการปรับสภาพของกากตะกอนด้วย *B. licheniformis* ซึ่งใช้พลังงานน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิคการปรับสภาพอื่น ๆ อาจเป็นวิธีการที่ประหยัดต้นทุนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมในการผลิตก๊าซมีเทนจากขยะมูลฝอยชุมชน

7. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ

ระบบการหมักแบบไร้อากาศจะต้องมีความเสถียร จึงทำให้แก๊สชีวภาพที่ผลิตได้มีคุณภาพและมีปริมาณมากขึ้นจนถึงระดับที่สามารถใช้งานได้ ปัจจัยที่เหมาะสมมีผลต่อประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพเนื่องจากจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการมีความไวต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อ

ป้องกันการล้มเหลวของระบบ การย่อยสลายสารอินทรีย์และการผลิตแก๊สชีวภาพมีปัจจัยต่าง ๆ เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

7.1 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio)

แบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายต้องการธาตุอาหารสำหรับการเจริญ ซึ่งธาตุอาหารที่จำเป็นประกอบไปด้วยธาตุหลัก 2 ชนิด คือ คาร์บอนและไนโตรเจน ทั้งสองธาตุเป็นธาตุอาหารหลักของแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ต้องการอากาศโดยที่แบคทีเรียใช้คาร์บอนเพื่อสร้างพลังงานและใช้ไนโตรเจนเพื่อสร้างโครงสร้างของเซลล์ ปกติแบคทีเรียสามารถใช้คาร์บอนได้เร็วกว่าไนโตรเจน 25 ถึง 30 เท่า ดังนั้นอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนจึงเป็นปัจจัยที่จำเป็นในการผลิตแก๊สชีวภาพ โดยมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ 25:1 และ 30:1 (ไพเชษฐ์ ธรรมภาณ, 2549) กรณีที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนน้อยเกินไป แบคทีเรียจะไม่สามารถสร้างเอนไซม์ออกมาได้ ซึ่งเอนไซม์มีความจำเป็นในการย่อยสลายคาร์บอนแต่ในกรณีที่มีปริมาณไนโตรเจนมากเกินไป โดยเฉพาะในรูปของแอมโมเนียจะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในระบบได้ ทำให้อัตราการเกิดเซลล์จุลินทรีย์ลดลงและปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตได้ก็ลดลงเช่นกัน (สุธรรม ปทุมสวัสดิ์, 2545)

7.2 หัวเชื้อ (Inoculum)

หัวเชื้อที่เหมาะสมคือกุญแจสำคัญในของสภาวะการเริ่มต้นระบบแบบไร้อากาศ โดยทั่วไปการผลิตแก๊สชีวภาพและอัตราการใช้สารตั้งต้นในบ่อหมักแบบไร้อากาศจะแสดงแนวโน้มผกผันเมื่อมีการเพิ่มสารตั้งต้นให้กับหัวเชื้อ (substrate to inoculum; S/I) การใช้หัวเชื้อน้อยเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการย่อยสลายของวัตถุดิบที่ไม่สมบูรณ์และเกิดปัญหาในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสะสมของกรดไขมันระเหยง่าย ดังนั้นจึงเกิดการยับยั้งและทำให้มีอัตราการผลิตก๊าซมีเทนที่ช้าลง (Sarker และคณะ, 2019) จากรายงานของชุติมน ตั้งพงศ์เสถียร และนันทิชา ภักดีไทย (2560) ศึกษาศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนจากตะกอนลอยไขมันโรงงานแปรรูปอาหารทะเล โดยศึกษาอัตราส่วน Inoculums to substrate volatile solids ratio; ISRs เท่ากับ 1, 2 และ 3 (ความเข้มข้นของหัวเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นเท่ากับ 0.60 g.VS ต่อตะกอนลอยไขมันเท่ากับ 0.6, 0.3 และ 0.2 g•VS ตามลำดับ) ผลการทดลองพบว่า ตะกอนลอยไขมันมีศักยภาพในการผลิตก๊าซมีเทนสะสมสูงสุดเท่ากับ 200, 340, 315 LCH4/gVSadded ที่อัตราส่วน 1, 2 และ 3 ตามลำดับ โดยที่ ISR เท่ากับ 2 มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซมีเทนมากที่สุด ซึ่งมีค่าผลผลิตมีเทนจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 24.5 mL/day โดยการใช้ปริมาณตะกอนลอยไขมันที่สูงเกินไปในอัตราส่วนที่ไม่เหมาะสมในระบบ อาจจะส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่อการผลิตก๊าซชีวภาพได้

7.3 อุณหภูมิ (temperature)

เป็นปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศซึ่งมีผลโดยตรงต่ออัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์ แบคทีเรียผลิตแก๊สมีเทนจะหยุดทำงานเมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป อุณหภูมิสูงสุดที่เมทาโนเจนทำงานอยู่ได้คือ 35 องศาเซลเซียส และถ้าอุณหภูมิลดต่ำลงถึงระดับ 10 องศาเซลเซียส กระบวนการผลิตแก๊สจะหยุดโดยสิ้นเชิง (จุฑาภรณ์ ชนะถาวร, 2560) โดยทั่วไปอัตราการผลิตแก๊สมีเทนและอัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์ระเหยง่ายจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สมีเทนจะอยู่ในช่วง 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส เรียกช่วงอุณหภูมินี้ว่ามีโซฟิลิค (mesophilic range) ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมไม่จำเป็นต้องเสียค่าใช้จ่ายในการให้ความร้อนหรือพลังงานแก่ระบบ (จิรวัฒน์ ชาลีวรรณ, 2546)

7.4 ความเป็นกรด–ด่าง (pH)

จุลินทรีย์ในกลุ่มสร้างกรด (acid forming bacteria) จะเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดและสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดได้ถึงพีเอช 4.5 ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรียที่สร้างแก๊สมีเทน (methane producing bacteria) จะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด–ด่าง ซึ่งไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ถ้าค่าพีเอชต่ำกว่า 6.5 นอกจากนั้นเมื่อกระบวนการย่อยดำเนินไป ความเข้มข้นของแอมโมเนียจะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการย่อยไนโตรเจนของจุลินทรีย์จะไปเพิ่มค่าพีเอช ให้สูงกว่า 8 แต่เมื่อการสร้างมีเทนมีระดับที่คงที่มากขึ้น ค่าพีเอชจะอยู่ระหว่าง 7-8 (จุฑาภรณ์ ชนะถาวร, 2560) ช่วงพีเอชที่ 6.8-7.4 เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์สร้างกรดและจุลินทรีย์สร้างทีเทนซึ่งสามารถทำงานร่วมกันได้ดีทำให้ผลิตแก๊สมีเทนได้มากขึ้น

7.5 ความเป็นด่าง (alkalinity)

ความเป็นด่าง หมายถึง ความสามารถในการรักษาระดับความเป็นกรด-ด่างของระบบ หากค่าความเป็นด่างมีค่าต่ำจะมีแนวโน้มเป็นกรดได้ง่าย ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศเมื่อน้ำเสียเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสีย สารอินทรีย์ในน้ำเสียจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์จึงมีผลทำให้กรด-ด่างในน้ำเสียลดลง หากค่าความเป็นด่างของน้ำเสียอยู่ในระดับต่ำจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดและกลุ่มสร้างมีเทน (สัดทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2552) ซึ่งความเป็นด่างที่เหมาะสมต่อระบบหมักมีค่าประมาณ 1,000 ถึง 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในรูปของแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

7.6 กรดไขมันมันระเหยง่าย (volatile fatty acid, VFA)

การย่อยสลายแบบไร้อากาศจะมีกรดอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นสารตัวกลางโดยเฉพาะกรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก ซึ่งในสภาวะที่เป็นกลางกรดเหล่านี้จะอยู่ในรูปของอะซิเตต บิวทีเรต โพรพิโอเนต ที่มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทนน้อยกว่าในรูปของอิสระ ปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นตัวชี้ให้เห็นสภาพการทำงานของระบบย่อยที่แท้จริง ปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายไม่ถือว่าเป็นสาเหตุแรกที่ทำให้ระบบล้มเหลว แต่เป็นตัวช่วยเสริมทำให้ระบบล้มเหลวเร็วขึ้น ระบบที่ทำงานเป็นปกติจะมีค่าความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายไม่เกิน 2,000 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร แต่ถ้าความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นปริมาณ 8,000 ถึง 10,000 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร จะทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ผลิตมีเทน (จารุพัฒน์ กาญจนรงค์, 2554)

7.7 สารยับยั้งและสารพิษ (Inhibiting and toxic materials)

ประจุแร่ โลหะหนัก สารซักฟอก เป็นสารพิษที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในถังหรือบ่อหมักปริมาณประจุแร่หรือแร่ธาตุเพียงเล็กน้อย เช่น โซเดียม โปแตสเซียม แคลเซียม แมกนิเซียม แอมโมเนีย ซัลเฟอร์ จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แต่ถ้ามีความเข้มข้นสูงจะเริ่มเป็นสารพิษต่อจุลินทรีย์ ซึ่งจะกระทบต่ออัตราการผลิตแก๊ส (จุฑาภรณ์ ชนะถาวร, 2560) ตัวอย่างเช่น ความเป็นพิษของแอมโมเนีย แอมโมเนียจะเกิดขึ้นในกระบวนย่อยสลายซึ่งมีผลกระทบต่อแบคทีเรีย ในขณะที่โปรตีนถูกย่อยสลายไนโตรเจนจะถูกปล่อยออกมาในรูปของแอมโมเนีย, ออกซิเจน ในกรณีที่มีออกซิเจนทำให้ยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มสร้างมีเทน ซัลไฟด์ถูกสร้างขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงซัลเฟตในสารละลาย โดยการย่อยสลายของโปรตีนซัลไฟด์จะถูกดูดซึมผ่านไปในเซลล์แบคทีเรีย ในกรณีที่มีมากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียจะหยุดการเจริญ โลหะหนักจะมีความเป็นพิษกับแบคทีเรียโดยทั่วไปไม่เกิดผลกระทบมากนักเนื่องจากโลหะจะไปจับกับซัลไฟด์ (สุรศักดิ์ บุญรุ่ง, 2555)

7.8 อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ (organic loading rate; OLR)

การย่อยสลายแบบไร้อากาศหากในระบบมีอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์สูงสุดแล้วจะทำให้การผลิตแก๊สมีเทนลดลงเนื่องจากกรดไขมันระเหยง่ายจะถูกสร้างและสะสมไว้ในระบบมากเกินไป ในขั้นตอนการย่อยสลายสารอินทรีย์และการสร้างกรดระเหยง่ายของแบคทีเรียชนิดที่ไม่สร้างมีเทน ทำให้ค่าพีเอชของตัวอย่างลดลงจึงเกิดการยับยั้งของแบคทีเรียกลุ่มสร้างมีเทน ประกอบกับแบคทีเรียกลุ่มสร้างมีเทนที่มีอัตราการเจริญช้ากว่าแบคทีเรียสร้างกรดถึง 4 เท่า ทำให้ไม่สามารถเจริญและใช้กรดไขมันระเหยง่ายเพื่อผลิตมีเทนได้ทัน ซึ่งอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ของระบบที่

เหมาะสมของการย่อยสลายแบบไร้อากาศโดยทั่วไปควรอยู่ในช่วงประมาณ 1.5 กิโลกรัมบีโอดีต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน (จารุพัฒน์ กาญจนรงค์, 2554) อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่สุดที่จะกำหนดความสามารถในการบำบัดน้ำเสีย ในการปรับอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ให้มีค่าแตกต่างกันสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนอัตราการไหลของเสียที่ผ่านถังหรือเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของแข็งหรือความเข้มข้นของสารอินทรีย์ที่ใส่ลงไปซึ่งการเปลี่ยนอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์มีผลต่อระยะเวลากักเก็บสารอินทรีย์ด้วย (สุชาดา สุวรรณสะอาด, 2555)

7.9 ระยะเวลากักเก็บสารอินทรีย์ (hydraulic retention time; HRT)

ระยะเวลาทั้งหมดที่สารอินทรีย์อยู่ในระบบซึ่งระยะเวลากักเก็บที่เหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตแก๊สมีเทนเจริญได้และมีปริมาณมากพอ ถ้ามีระยะเวลากักเก็บนานเกินไปจะทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการสร้างถังหมัก เนื่องจากต้องใช้ถังหมักที่มีขนาดใหญ่และเปลืองค่าใช้จ่ายในการเดินระบบ (จารุพัฒน์ กาญจนรงค์, 2554)

7.10 ปริมาณของแข็งในระบบ (total solid)

การผลิตแก๊สชีวภาพจากของเสียที่มีลักษณะกึ่งของแข็งและของเหลวซึ่งมีรูปแบบการหมัก 2 รูปแบบ โดยแบ่งตามปริมาณของแข็งที่มีอยู่ในถังหมัก ได้แก่ การผลิตแก๊สชีวภาพแบบของเหลวต่ำ (low solid anaerobic digestion) เป็นการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีของแข็งอยู่ในช่วงร้อยละ 4 ถึง 10 ของวัตถุดิบ และมีความชื้นร้อยละ 90 ถึง 96 และรูปแบบที่ 2 คือ การผลิตแก๊สชีวภาพแบบของแข็งสูง (high solid anaerobic digestion) เป็นการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีของแข็งอยู่ในช่วงร้อยละ 22 ถึง 50 ของวัตถุดิบ และมีความชื้นร้อยละ 50 ถึง 78 (ชยันต์ กินยงค์, 2545)

7.11 การกวนผสม (mixing)

การกวนเป็นสิ่งสำคัญในระบบการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไร้อากาศ เป็นการทำให้วัตถุดิบที่อยู่ในระบบผสมกัน และเกิดการสัมผัสกันอย่างทั่วถึง มีส่วนช่วยในการกระจายความร้อนให้อุณหภูมิเท่ากันตลอด ทำให้เกิดการสัมผัสกันระหว่างสารอาหารกับแบคทีเรีย และป้องกันการเกิดการสะสมของสารอินทรีย์ตามจุดต่างๆ ของถังหมัก และทำให้วัตถุดิบภายในถังหมักผสมกันจนมีสภาพเป็นเนื้อเดียวกัน (จุฑาภรณ์ ชนะถาวร, 2560) การกวนยังสามารถทำให้ระบบมีความเสถียรและทำให้ไม่เกิดฝ้าที่ระดับผิว เนื่องจากช่วยให้อุณหภูมิในถังมีความสม่ำเสมอแล้วยังช่วยให้เกิดการกระจายของสารพิษเบาลงและสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้สูงกว่าที่ไม่มีการกวนผสม ซึ่งการกวนต่อเนื่องตลอดเวลาอย่างช้า ๆ จะให้ผลดีกว่าการกวนเร็ว วิธีในการกวนของเหลวในถังหมักมีหลายวิธี

เช่น ใช้เครื่องสูบผ่านท่อน้ำ (pumping draft tube) ใช้เครื่องกวน (mechanical mixing) หมุนเวียนตะกอนด้วยปั๊ม (recycling of sludge by pump) เป็นต้น (สมฤดี ฤทธิ์ยากุล, 2551)

8. การผลิตปุ๋ยหมัก

ปุ๋ยหมัก คือ ปุ๋ยอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่เกิดจากการใช้เศษพืชในไร่นา หรือของเหลือใช้ทางการเกษตรหรือจากโรงงานอุตสาหกรรมและวัชพืชต่าง ๆ มาร่วมกับมูลสัตว์และปุ๋ยเคมี พร้อมด้วยสารเร่งจุลินทรีย์ที่ช่วยให้การย่อยสลายเร็วขึ้น (ธนาวุฒิ หนูทองแก้ว, 2555) ซึ่งในการทำปุ๋ยหมักอาศัยกระบวนการทางชีววิทยาของจุลินทรีย์โดยเฉพาะพวกที่ต้องการอากาศในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในวัสดุเศษเหลือ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในด้านความชื้น อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน หมักเป็นระยะเวลา 1 ถึง 2 เดือนจึงสามารถนำไปใช้เป็นสารปรับคุณภาพดินได้ หรือเพื่อความสะดวกในการหว่านสามารถนำปุ๋ยหมักที่ผ่านมาตรฐานแล้วมาทำเป็นปุ๋ยอัดเม็ดได้ กากที่เหลือทั้งของแข็งและของเหลวซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่มีประโยชน์อีกอย่างหนึ่งที่ได้จากกระบวนการหมัก นำไปผลิตเป็นปุ๋ยหมักชีวภาพและน้ำหมักชีวภาพที่สามารถนำไปปรับปรุงบำรุงดินได้เป็นอย่างดี กากที่เหลือจากกระบวนการหมักนี้อยู่ในหลายรูปแบบ กากที่เป็นของแข็งน้ำหนักเบาจะลอยเป็นฝ้าอยู่ด้านบน กากเหล่านี้มักจะเป็นส่วนประกอบของกากใย กากที่เป็นของเหลวและน้ำจะอยู่ที่ระดับกลางของถังหมัก ส่วนที่ข้นเหนียวจะอยู่ด้านล่างซึ่งเป็นกากที่แท้จริง จะมีของแข็งบางส่วนที่มีน้ำหนักอยู่ที่ก้นถังหมักจะเป็นพวกกากอาจจะมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน มีการแยกชั้นไม่มาก (จุฑาภรณ์ ชนะถาวร, 2560)

8.1 มาตรฐานปุ๋ยหมัก

ปุ๋ยหมักที่ทำจากวัสดุเหลือใช้ต่าง ๆ จะมีคุณสมบัติบางประการแตกต่างกัน ดังนั้นทางโครงการปรับปรุงดินด้วยอินทรียวัตถุ กรมพัฒนาที่ดิน (2551) จึงได้กำหนดคุณภาพ และมาตรฐานเป็นแนวทางพอที่จะยึดเป็นหลักเกณฑ์ของปุ๋ยหมักที่ดี และเมื่อใส่ลงในดินแล้วไม่ทำให้พืชเป็นอันตราย ซึ่งอาจจะพิจารณาได้ ดังนี้ คือ

1.) อัตราส่วนสารประกอบคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ไม่มากกว่า 20:1
2.) เกรดปุ๋ยไม่ควรต่ำกว่า 1 – 0.5 –0.5 (เปอร์เซ็นต์ ของ N-P_2O_5-K_2O ตามลำดับ)
3.) ความชื้นของปุ๋ยหมักไม่ควรมากกว่า 35 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก
4.) ปริมาณอินทรียวัตถุประมาณ 25 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก
5.) ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ประมาณ 6.0 ถึง 7.5

เนื่องด้วยในปัจจุบันมีการส่งเสริมให้เกษตรกรใช้ปุ๋ยอินทรีย์ในการการปรับปรุงบำรุงดิน ตลอดจนมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการบำรุงและปรับปรุงดิน เพิ่มคุณค่าของธาตุอาหารพืชทำให้ทำให้มีการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เพิ่มมากขึ้น จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการควบคุมมาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์เพื่อเป็นการรักษาผลประโยชน์ของเกษตรกร กรมวิชาการเกษตรจึงกำหนดมาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ แสดงดัง (Table 6)

Table 6 Standard criteria of the properties of compost

Properties	Standard criteria
Size of the compost	< 12.5×12.5 mm
Moisture and volatile substances	< 35 %
Rock and gravel	> 5 mm and < 5 %
Glass, plastic and other metals	None
Organic matter	> 30 %
pH	5.5 – 8.5
C/N ratio	< 20:1
Electrical Conductivity	< 6 dS/m
Nutrient content (by weight)	- total N > 1.0 %
	- total P_2O_5 > 0.5 %
	- total K_2O > 0.5 %
Complete degradation	> 80 %
Arsenic	< 50 mg/kg
Cadmium	< 5 mg/kg
Chromium	< 300 mg/kg
Copper	< 500 mg/kg
Lead	< 500 mg/kg
Mercury	< 2 mg/kg

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร, (2548)

8.2 การผลิตปุ๋ยหมักจากกากตะกอนหลังกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ

กากตะกอนที่ผ่านการบำบัดด้วยระบบผลิตแก๊สชีวภาพ สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพซึ่งเป็นทั้งแหล่งของสารอาหาร (nutrient source) สำหรับพืชและเป็นสารปรับปรุงดิน (soil

conditioner) กากตะกอนมีคุณสมบัติเป็นปุ๋ยได้ดีกว่ามูลสุกรที่ไม่ได้ผ่านการบำบัดด้วยระบบผลิตแก๊สชีวภาพ เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์แบบไร้อากาศ (anaerobic digestion) คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนจะถูกนำไปใช้ในการผลิตแก๊สมีเทน ขณะที่ธาตุอาหารหลักของพืช (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม) และธาตุอาหารรองต่างๆ ยังคงอยู่ในปริมาณเดิม ทำให้กากตะกอนมีสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนแคบลง แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มคุณค่าของความเป็นปุ๋ย นอกจากนั้นการย่อยสลายอินทรียวัตถุของจุลินทรีย์ยังทำให้เกิดสารอินทรีย์ที่ถูกย่อยสลายแล้ว รวมทั้งผลผลิตของจุลินทรีย์ เช่น วิตามิน และจุลินทรีย์ในบ่อหมักจะช่วยทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นโทษไข่ และหนอนพยาธิ ไปได้ส่วนหนึ่ง นอกจากนั้นการย่อยสลายอินทรียวัตถุนี้สมบูรณ์จะทำให้กากตะกอนไม่มีกลิ่นเหม็น และไม่ดึงดูดแมลงวัน ให้ไปวางไข่ สำหรับปริมาณธาตุอาหารหลักในกากตะกอนซึ่งมีความสำคัญในการคำนวณอัตราการให้ปุ๋ยแก่พืชชนิดต่าง ๆ

สุริยะ สะวานนท์ และสมชัย จันทร์สว่าง (2539) มีรายงานว่า กากตะกอนจากระบบผลิตแก๊สชีวภาพแบบหมักช้ามีปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม เท่ากับ 2.14, 8.17 และ 0.83 เปอร์เซ็นต์ (ของน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ และกากตะกอนจากระบบผลิตแก๊สชีวภาพแบบหมักเร็ว มีปริมาณไนโตรเจนฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม เท่ากับ 2.45, 7.58, และ 0.68 (ของน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ซึ่งกากตะกอนที่ได้หลังจากระบบผลิตแก๊สชีวภาพ มีสารอาหารผ่านตามมาตรฐานการผลิตปุ๋ย

ทรงกฤติ ก่ำบุญเรือง และญาณวุฒิ สุพิชญางกูร (2559) มีรายงานว่า กากตะกอนของเสียที่ผ่านระบบการผลิตแก๊สชีวภาพนั้นมีความเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดและปุ๋ยน้ำหมัก เป็นการจัดการของเสียได้อย่างดี โดยพบว่ากากตะกอนตากแห้งจากระบบผลิตแก๊สชีวภาพมีธาตุไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม เท่ากับ 2.45, 5.78 และ 0.22 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อพืชและสามารถนำไปทำเป็นปุ๋ยอัดเม็ดได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการย่อยสลายตะกอนลอยไขมันเบื้องต้นด้วย *Bacillus subtilis* AH73
2. เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสจากตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันของโรงงานทูน่ากระป๋องในการปรับสภาพตะกอนสำหรับการผลิตแก๊สชีวภาพ
3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้และศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนจากตะกอนลอยไขมันที่ผ่านการปรับสภาพ (Biochemical Methane Potential, BMP) ในระบบการหมักแบบกะและกึ่งต่อเนื่อง
4. เพื่อศึกษาผลของการปรับสภาพด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้และศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนจากตะกอนลอยไขมันที่ผ่านการปรับสภาพโดยใช้ระบบการหมักแบบกะในถังหมักขนาดใหญ่
5. เพื่อศึกษาความเป็นไปในการผลิตปุ๋ยหมักจากกากตะกอนที่เหลือหลังจากการผลิตแก๊สชีวภาพ

ขอบเขตการวิจัย

การปรับสภาพตะกอนลอยไขมันจากอุตสาหกรรมทูน่ากระป๋องด้วยวิธีการทางชีวภาพเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตแก๊สชีวภาพ จะศึกษาการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสจากตัวอย่างตะกอนลอยไขมันโรงงานอุตสาหกรรมผลิตทูน่ากระป๋อง โดยมีตัวอย่าง 4 แหล่ง ได้แก่ หัวเชื้อดับกลิ่นของโรงงาน ตะกอนลอยจากบ่อดักไขมัน น้ำเสียบ่อดักไขมัน และหัวเชื้อจากบ่อย่อย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 agar (ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปส), Rhodamine B agar (ตรวจสอบและยืนยันการผลิตเอนไซม์ไลเปส) และ Skimmed milk agar (ทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส) ศึกษาการย่อยสลายตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้และดูการลดลงของปริมาณของแข็งแขวนลอยที่มากที่สุดเพื่อคัดเลือกไปใช้ในการปรับสภาพตะกอนลอยไขมัน ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้และศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนจากตะกอนลอยไขมันที่ผ่านการปรับสภาพในระบบการหมักแบบกะและกึ่งต่อเนื่อง และศึกษาการปรับสภาพตะกอนลอยไขมันโดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้ต่อการผลิตแก๊สมีเทนโดยใช้ระบบการหมักแบบกะในถังหมัก 200 ลิตร และ 1000 ลิตร หลังจากสิ้นสุดกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพนำกากตะกอนที่เหลือไปศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตปุ๋ยหมัก

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

ตะกอนลอยจากบ่อดักไขมัน และน้ำเสียจากบ่อดักไขมัน ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท โชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต จำกัด จังหวัดสงขลา เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตแก๊สชีวภาพและปุ๋ยหมักชีวภาพ เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. จุลินทรีย์

หัวเชื้อผลิตมีเทนจากระบบ Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ห้องเย็นโชติวัฒน์อุตสาหกรรม จำกัด จังหวัดสงขลา เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตแก๊สชีวภาพ (Figure 6A)

จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปส *Bacillus subtilis* AH73 แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานปลากระป๋องโดย พักตร์พิมล อึ่งเจริญวิวัฒน์ (2552) (Figure 6B)

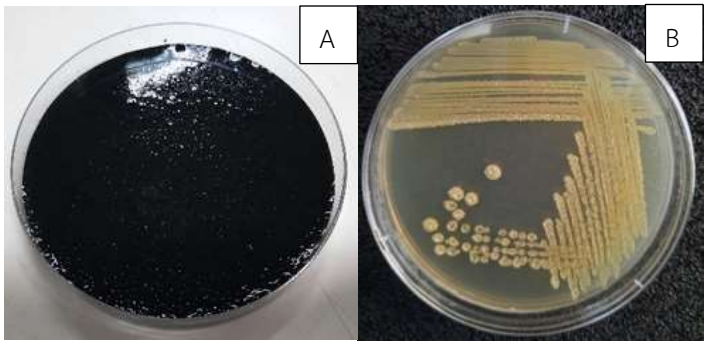


Figure 6 Methane producing bacteria (A) and *B. subtilis* AH73 (B) from upflow anaerobic sludge blanket (UASB).

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- สูตรอาหาร NB (nutrient broth) ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย ประกอบไปด้วย peptone 5.0 กรัม, NaCl 5.0 กรัม, beef extract 1.5 กรัม และ yeast extract 1.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 7

- สูตรอาหาร Tween 80 agar ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส ประกอบไปด้วย peptone 10.0 กรัม, NaCl 5.0 กรัม, $CaCl_2$ 0.1 กรัม, Tween 80 10 มิลลิลิตร และ Agar 15.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 7 (ดัดแปลงจาก ปณิตา, 2545)

- สูตรอาหาร Rhodamine B agar ใช้ในการยืนยันการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย ประกอบไปด้วย yeast extract 2.0 กรัม, palm oil 10 มิลลิลิตร, NaCl 2.0 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 กรัม, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.7 กรัม, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5 กรัม, KH_2PO_4 1.0 กรัม, K_2HPO_4 1.8 กรัม, $(NH_4)_2 SO_4$ 5.0 กรัม, gum arabic 3.0 กรัม, Rhodamine B 0.01 กรัม และ Agar 15.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 7 (Kumar และคณะ, 2012)

- สูตรอาหาร skimmed milk ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียผลินเอนไซม์โปรติเอส ประกอบไปด้วย peptone 1.0 กรัม, skim milk 100.0 กรัม และ Agar 15.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 7 (ดัดแปลงจาก Shaik และคณะ, 2017)

4. อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

Instruments	Series	Suppliers
pH meter	320	Mettler Toledo, China
Balances	BSA	Sartorius, Germany
Hot air oven	UNB-400	Memmert, Germany
Muffle furnace	FHP-14	Wise Therm, Korea
Gas chromatography-TCD	GD-8A	Shimadza, Japan
Centrifuge	CF-10	Wise Spin, Korea
Spectrophotometer	U-2000	Technical Cooperation, USA
Automatic titrator	TL-5000	TitroLine, Entech Company

- ถังหมักขนาด 6.5 ลิตร

ก่อนการผลิตแก๊สชีวภาพจะทำการปรับสภาพตะกอนลอยในถังหมักขนาด 6 ลิตร และมีการใช้ air pump ในการให้อากาศ หลังจากการปรับสภาพจะทำการผลิตแก๊สชีวภาพในถังหมักขนาด 6.5 ลิตร ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15.3 เซนติเมตร ความสูง 57 เซนติเมตร และติดใบพัดขนาดความยาว 11.5 เซนติเมตร เพื่อช่วยในการกวนผสม (Figure 7) ในชุดการทดลองที่ไม่มีการปรับสภาพจะไม่มีถังหมักปรับสภาพ

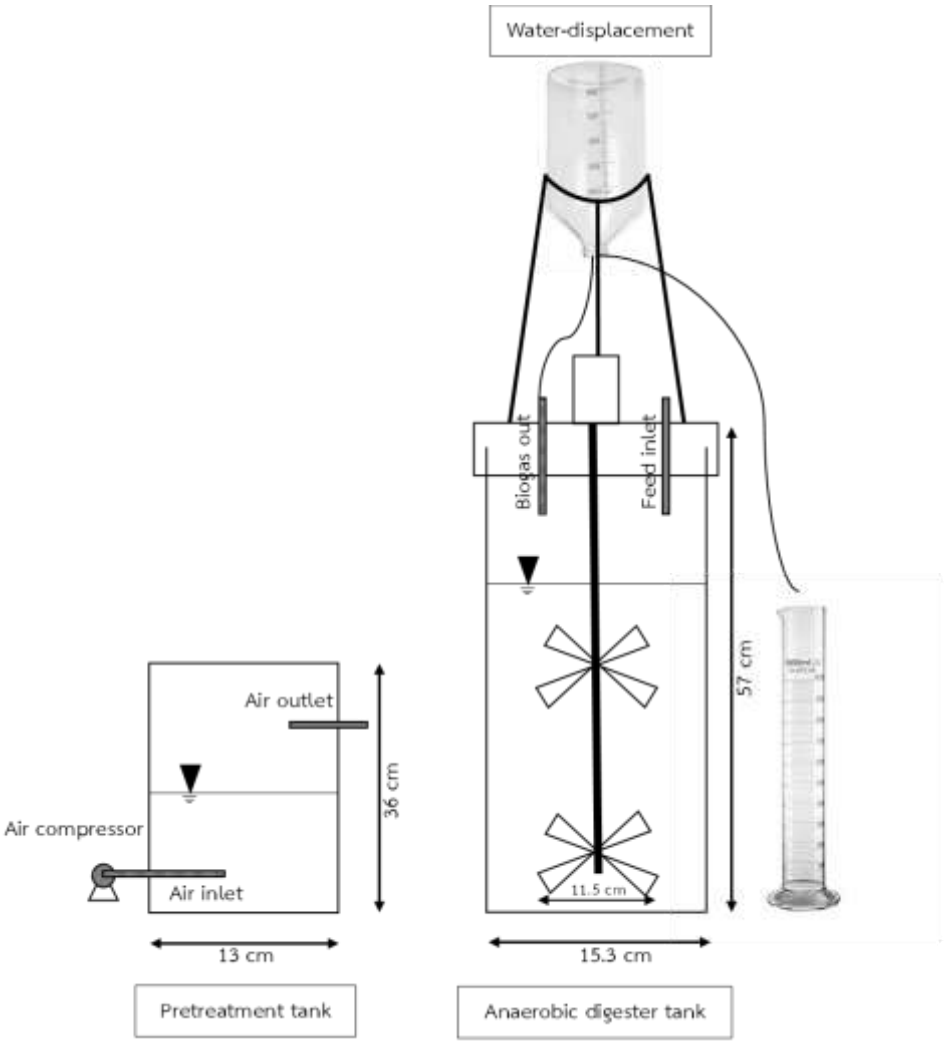


Figure 7 Schematic diagram of 6.5 L fermentation tank for anaerobic digestion.

- ถังหมักขนาด 200 ลิตร

ถังปรับสภาพและผลิตแก๊สชีวภาพ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 65 เซนติเมตร ความสูง 90 เซนติเมตร สำหรับการปรับสภาพมีการให้อาการโดยใช้ air pump ผ่านท่อ PVC ที่มีการเจาะรูและติดตั้งอยู่ใต้ถังหมัก หลังปรับสภาพจะทำการผลิตแก๊สชีวภาพภายในถังเดียวกัน โดยทำการปิด air pump และเปิด mixing pump เพื่อกวนผสมตัวอย่างภายในถังหมัก (Figure 8) โดยในชุดการทดลองที่ไม่มีการปรับสภาพจะไม่มี air pump และท่อ PVC ที่มีการเจาะรูและติดตั้งอยู่ใต้ถังหมัก

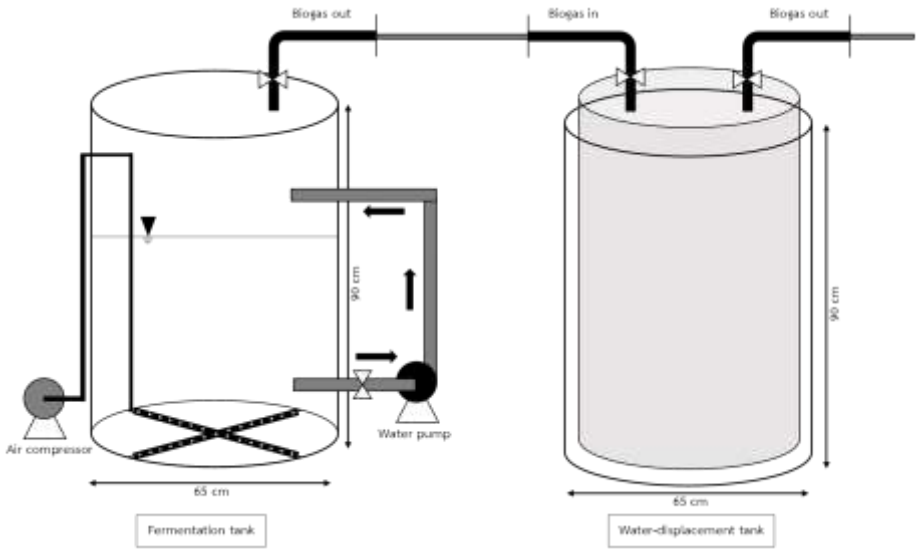


Figure 8 Schematic diagram of 200 L fermentation tank for anaerobic digestion.

- ถังหมักขนาด 1000 ลิตร

ถังปรับสภาพและผลิตแก๊สชีวภาพ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 92 เซนติเมตร ความสูง 180 เซนติเมตร สำหรับการปรับสภาพมีการให้อาการโดยใช้ air pump ผ่านท่อ PVC ที่มีการเจาะรูและติดตั้งอยู่ใต้ถังหมัก หลังปรับสภาพจะทำการผลิตแก๊สชีวภาพภายในถังเดียวกัน โดยทำการปิด air pump และเปิด mixing pump เพื่อกวนผสมตัวอย่างภายในถังหมัก นอกจากนี้ยังมีท่อ PVC (mixing pipe) สูบตัวอย่างจากด้านบนและวนกลับสู่ใต้ถังหมักผ่านท่อ PVC เดียวกันกับท่อที่ใช้พ่นอากาศทำให้การกวนผสมดียิ่งขึ้น (Figure 9)

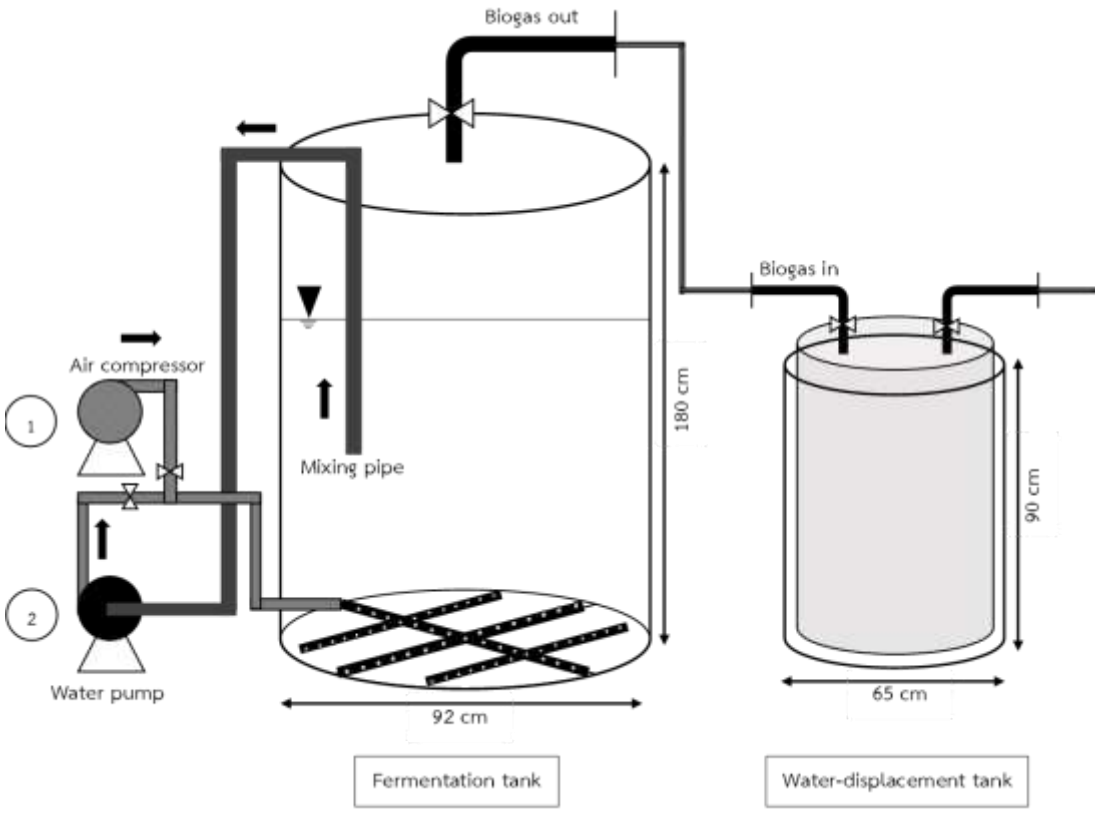


Figure 9 Schematic diagram of 1000 L fermentation tank for anaerobic digestion.

1. Air compressor switched on during pretreatment.
2. Water pump switched on during biogas production.

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ค่าซีโอดี (APHA, AWWA and WEF, 1998)

การวิเคราะห์ซีโอดีด้วยวิธี closed reflux ทำการเจือจางตัวอย่างให้มีค่าซีโอดีอยู่ในช่วงที่เหมาะสม (สำหรับการวิเคราะห์ซีโอดีละลายน้ำ ให้นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที) ล้างหลอดซีโอดีด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 20 เติมตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นแล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วหยดเฟอร์โรอีน (อินดิเคเตอร์) 2-3 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 นอร์มัล เมื่อถึงจุดยุติตัวอย่างจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินปนเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง (แบลงค์ให้ทำเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง) คำนวณหาค่าซีโอดีได้โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{tCOD หรือ sCOD (mg/L)} = \frac{(A-B) \times N \times 8{,}000}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (ml)}}$$

โดยที่ A คือ เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทแบลงค์ (ml)
B คือ เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (ml)
N คือ นอร์มัลลิตี้ของเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต

2. การวิเคราะห์ความเป็นด่างและกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมด (Alkalinity and Total volatile fatty acid)

การวิเคราะห์ความด่างและกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมดด้วยวิธีการไตเตรท โดยใช้เครื่องไตเตรทอัตโนมัติ (TitroLine 5000) เริ่มจากการนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสใส่ในบีกเกอร์ 20 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเท่ากับ 50 มิลลิลิตร ใส่ magnetic bar ลงในบีกเกอร์ตัวอย่างและหมุนเพื่อทำการปั่นกวนตัวอย่าง จากนั้นเลื่อนหัววัด pH และหัวบิวเรตสำหรับหยด titrant ลงมา โดยให้หัววัด pH จุ่มลงไปในตัวอย่าง และปรับให้หัวบิวเรตอยู่เหนือสารละลาย กดเลือกคำสั่งการวิเคราะห์จากหน้าจอ แล้วกดคำสั่งเริ่ม จากนั้นเครื่องจะทำการไตเตรตและรอจนกว่าจะถึงจุดยุติปฏิกิริยาเครื่องจะหยุดการไตเตรตและคำนวณผลให้อัตโนมัติ

3. การวิเคราะห์ของแข็ง (APHA, AWWA and WEF, 1998)

- ปริมาณของแข็งทั้งหมด; TS (Total solid)

อบถ้วยกระเบื้องที่อุณหภูมิ 105±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดสิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักก่อนใส่ตัวอย่างแล้วจดบันทึก จากนั้นตวงตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยกระเบื้องแล้วนำไประเหยให้แห้งด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ หลังจากระเหยตัวอย่างจนแห้ง นำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 105±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดสิกเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักหลังอบถ้วยกระเบื้องที่มีตัวอย่าง คำนวณหาปริมาณของแข็งทั้งหมดได้โดยใช้สูตร ดังนี้

$$TS\ (mg/L) = \frac{(A-B) \times 10^6}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (ml)}}$$

โดยที่ A คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องหลังการอบตัวอย่าง (g)
B คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องก่อนใส่ตัวอย่าง (g)

- ปริมาณของแข็งระเหยง่าย; VS (Volatile solid)

นำถ้วยกระเบื้องพร้อมตัวอย่างที่ได้จากการหา TS ไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550±50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักและจดบันทึก คำนวณปริมาณของแข็งระเหยง่ายโดยใช้สูตร ดังนี้

$$VS\ (mg/L) = \frac{(A-B) \times 10^6}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (ml)}}$$

โดยที่ A คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องที่ได้จากการหา TS ก่อนเผาตัวอย่าง (g)
B คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องหลังเผาตัวอย่าง (g)

- ปริมาณของแข็งแขวนลอย; SS (Suspended solid)

เตรียมกระดาษกรองใยแก้ว (GF/C รูพรุน 0.45 ไมครอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร) อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักและจดบันทึกน้ำหนักกระดาษกรองก่อนทดลอง จากนั้นนำกระดาษกรองใส่ในกรวยกรองบุคเนอร์ แล้วตวงตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร เทลงไปบนกระดาษกรอง เปิดปั๊มสุญญากาศจนระเหยน้ำออกจนหมด นำกระดาษกรองพร้อมตัวอย่างอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105±2 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (A กรัม) คำนวณปริมาณของแข็งแขวนลอยได้โดยใช้สูตร ดังนี้

$$SS\ (mg/L) = \frac{(A-B) \times 10^6}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (ml)}}$$

โดยที่ A คือ น้ำหนักกระดาษกรองหลังการทดลอง (g)
B คือ น้ำหนักกระดาษกรองก่อนการทดลอง (g)

- ปริมาณของแข็งแขวนลอยระเหยง่าย; VSS (Volatile suspended solid) หรือปริมาณอินทรีย์สารที่เป็นของแข็งที่ระเหยได้; MLVSS (Mixed liquid volatile suspended solids)

นำกระดาษกรองใยแก้วและตัวอย่างจากการหา SS ไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิ 550±50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักและจดบันทึกแ คำนวณปริมาณของแข็งแขวนลอยระเหยง่ายได้โดยใช้สูตร ดังนี้

$$VSS \text{ หรือ } MLVSS\ (mg/L) = \frac{(A-B) \times 10^6}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (ml)}}$$

โดยที่ A คือ น้ำหนักกระดาษกรองใยแก้วจากการหา SS ก่อนเผาตัวอย่าง (g)
B คือ น้ำหนักกระดาษกรองใยแก้วหลังเผาตัวอย่าง (g)

4. วิเคราะห์องค์ประกอบแก๊สชีวภาพ (Gas chromatography)

เก็บตัวอย่างใส่ vacuum serum tube วิเคราะห์องค์ประกอบตัวอย่างแก๊สด้วย Gas chromatography (Shimadza GC-8A) Thermal Conductivity Detector (TCD) ซึ่งมีสภาวะดังนี้

Inlet/Detector temperature	100 °C
Oven temperature	40 °C
Carrier gas	Helium 100 KPa
Current	100 mA
Column	Porapak Q (ethylvinylbenzene - divinylbenzene polymer) length 1 m, 0.32 mm I.D

5. วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Kwon และ Rhee, 1986)

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Cupric acetate ทำได้โดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ 15 นาที ดูดน้ำตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดใหม่ เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 มิลลิลิตร และเติมสับสเตรท 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 นาที และเติม 6 โมลาร์ ของกรดไฮโดรคลอริก 0.2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วทิ้งให้แยกชั้น ดูดส่วนใสด้านบน 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดใหม่ เจือจางด้วยไอโซออกเทน 0.9 มิลลิลิตร เติม cupric acetate 0.4 มิลลิลิตร เขย่าด้วยวอร์เท็กแล้วดูดส่วนใสด้านบนเพื่อไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร ทำแบลงค์ด้วยวิธีเดียวกันแต่ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนตัวอย่าง (ชุดควบคุมจะทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 6 โมลาร์ ของกรดไฮโดรคลอริก 0.2 มิลลิลิตร ก่อนเขย่าที่อุณหภูมิ 30 นาที แล้วจึงเติมซับสเตรท 0.5 มิลลิลิตร) เอนไซม์หนึ่งหน่วยหมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มและปล่อยกรดไขมันอิสระให้เป็นกรดพลามิติก 1 ไมโครโมลต่อนาที

$$\text{Lipase activity (U/ml)} = \frac{(A-B) \times C \times D}{X \times E \times t}$$

โดยที่ A คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง
B คือ ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุม
X คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน
C คือ ปริมาตรทั้งหมดที่ทำปฏิกิริยา (ml)
D คือ อัตราการเจือจาง
t คือ เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (min)
E คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ (ml)

6. วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (สุกานดา วิชิตพันธุ์ และคณะ, 2561)

นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ 15 นาที ดูดตัวอย่างเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 2% (w/v) casein ที่ละลายใน 0.1 M citrate phosphate buffer, pH 7 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.4 M Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมกับ 0.4 M Na_2CO_3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 1 N folin-ciocateu reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คำนวณหา

กิจกรรมของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ 1 ยูนิต (U) หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยเคซีนให้ไปเป็นไทโรซีน 1 ไมโครโมลต่อนาที

$$\text{Protease activity (U/ml)} = \frac{(A-B) \times C \times D}{X \times E \times t}$$

โดยที่ A คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง
B คือ ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุม
X คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน
C คือ ปริมาตรทั้งหมดที่ทำปฏิกิริยา (ml)
D คือ อัตราการเจือจาง
t คือ เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (min)
E คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ (ml)

7. การวัดค่าพีเอช ใช้เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาลักษณะของตะกอนลอยและน้ำเสียจากบ่อดักไขมัน

ทำการเก็บตัวอย่างแบบจ้วงของตะกอนลอยและน้ำเสียจากบ่อดักไขมันจากระบบบำบัดน้ำเสีย บริษัทโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิตจำกัด เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ลักษณะของตัวอย่าง โดยจะทำการวิเคราะห์ค่าซีโอดีทั้งหมด ซีโอดีละลายน้ำ ปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งระเหยง่าย ปริมาณของแข็งแขวนลอย ปริมาณของแข็งแขวนลอยระเหยง่าย ตามวิธีของ APHA, AWWA and WEF (1998) และค่าพีเอช การวิเคราะห์น้ำมันและไขมัน (partition-gravimetric method) ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (photometric method) ค่า C/N ratio (combustion method) และค่าไนโตรเจนในรูปทีเคเอ็น (total kjeldahl method) ทำการส่งวิเคราะห์กับศูนย์บริการตรวจสอบและรองรับมาตรฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. ศึกษาการย่อยสลายตะกอนลอยเบื้องต้นด้วย *Bacillus subtilis* AH73 เพื่อการผลิตแก๊สชีวภาพ

2.1 การย่อยสลายตะกอนลอยเบื้องต้นด้วย *B. subtilis* AH73

ทำการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* AH73 ในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วัด OD. 660 nm = 1) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น จากนั้นทำการปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันโดยทำการทดลองในขวดซีรั่มขนาด 1000 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรหมักจริง 800 มิลลิลิตร เติมตะกอนลอยปริมาตร 720 มิลลิลิตร (ปริมาณของตะกอนลอยเริ่มต้นเท่ากับ 100) หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร (ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10) บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนหัวเชื้อ หลังสิ้นสุดการปรับสภาพตะกอนลอยจะทำการวัดค่าพีเอชและกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

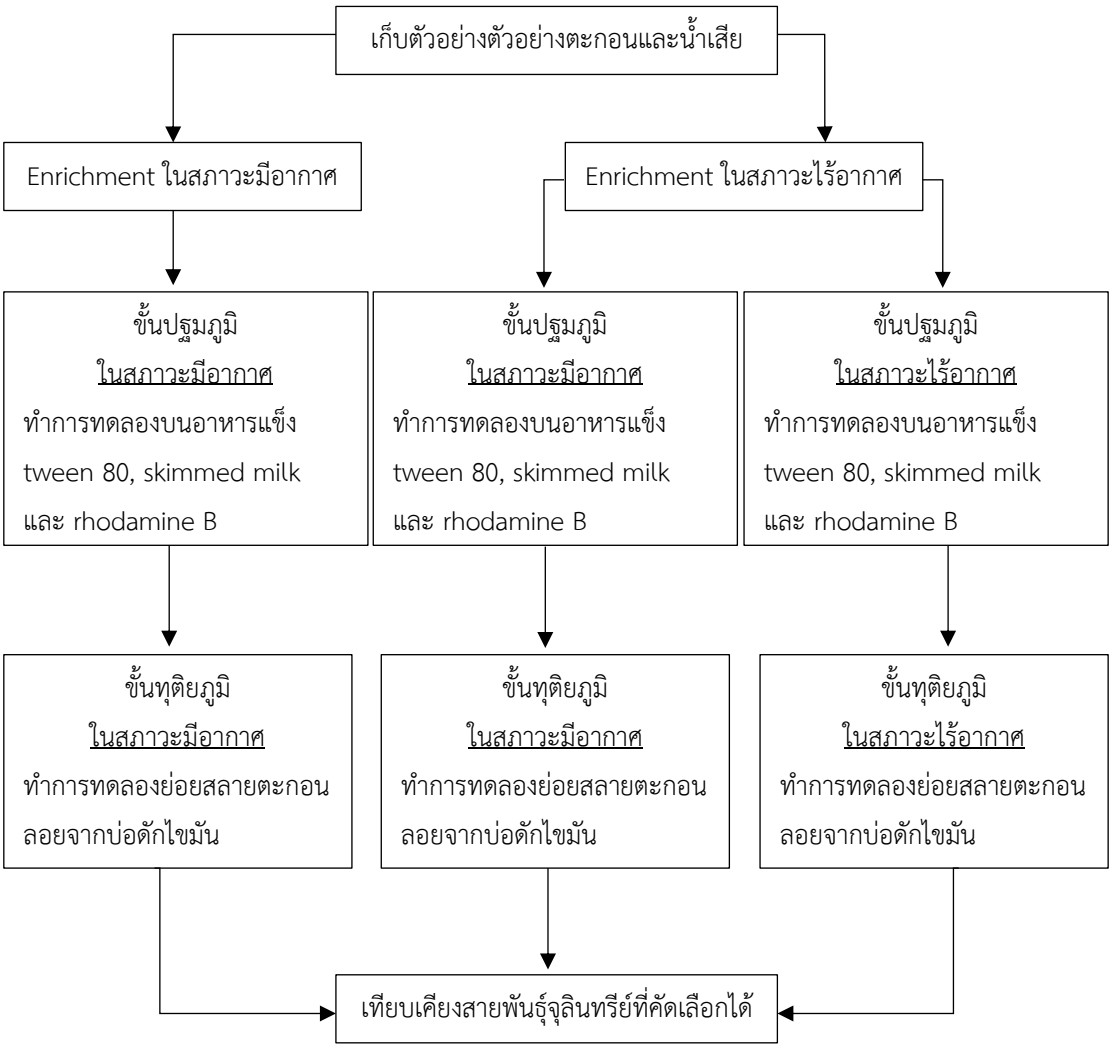
2.2 การผลิตแก๊สชีวภาพจากตะกอนลอยที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* AH73

นำตะกอนลอยที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* AH73 ปริมาตร 720 มิลลิลิตร มาเติมหัวเชื้อมีเทน 180 มิลลิลิตร (กระตุ้นหัวเชื้อมีเทนโดยเลี้ยงกับน้ำเสียจากบ่อดักไขมันในอัตราส่วนร้อยละ 50:50 ก่อนนำไปใช้จะวัดองค์ประกอบแก๊สชีวภาพทุกครั้งโดยต้องมีปริมาณมีเทนอยู่ในช่วงร้อยละ 50-60) ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ และทำการไล่อากาศในขวดหมักด้วยแก๊ส

ไนโตรเจนเป็นเวลา 2-3 นาที ก่อนปิดขวดด้วยฝา septum บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นและองค์ประกอบแก๊สชีวภาพทุกวันด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี จนกว่าไม่มีการผลิตแก๊ส

3. การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสและเทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

ทำการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสและเทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ดังแผนการทดลอง ดังนี้



3.1 ขั้นปฐมภูมิ

3.1.1 การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสภายใต้สภาวะมีอากาศ

ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสจากตัวอย่างตะกอนและน้ำเสีย 4 แหล่ง ได้แก่ หัวเชื้อดับกลิ่นของโรงงาน (Effective microorganism or EM for smell reduction), ตะกอนจากบ่อรวบรวมตะกอน (sludge from collecting sludge pond), น้ำเสียจากบ่อดักไขมัน (wastewater from oil trap) และตะกอนลอยจากบ่อดักไขมัน (scum from oil trap) จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต นำตัวอย่างไปทำให้เชื้อเคยชินกับตะกอนภายใต้สภาวะมีอากาศและไร้อากาศ (โดยการเขย่าและไม่เขย่า) บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-6} ใน NaCl ร้อยละ 0.85 จากนั้นใช้ปิเปตดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ที่ความเจือจาง 10^{-4}-10^{-6} ไปทำการ spread plate บนจานอาหารแข็ง Tween 80 และบนอาหารแข็ง skimmed milkบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่แตกต่างกันและมีการเกิดโซนขุ่น (บนอาหาร Tween 80) และโซนใส (บนอาหาร skimmed milk) ไปลงบนอาหารแข็งจานใหม่ ได้แก่ อาหารแข็ง tween 80 (เพื่อดูความสามารถในการการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากโซนขุ่นรอบโคโลนี) และอาหารแข็ง rhodamine B (เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยมีลักษณะโคโลนีสีชมพูอมส้ม เมื่อส่องภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต หรือภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์) นอกจากนี้ยังลงในอาหารจานใหม่บนอาหารแข็ง skimmed milk (เพื่อดูความสามารถในการการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากโซนใสรอบโคโลนี) บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นหาค่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์โดยวิธีการหาค่าดัชนีเอนไซม์ โดยประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ใช้วิธีการวัดบริเวณโซนใสและขนาดของโคโลนีดังนี้

$$\text{ดัชนีเอนไซม์} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณโซนใส}}$$

หมายเหตุ :
- (+) คือ degree of hydrolysis ช่วง 0-0.9
- (++) คือ degree of hydrolysis ช่วง 1.0-1.9
- (+++) คือ degree of hydrolysis ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป

คัดเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถในการย่อยสลายที่ระดับ (+++) ทำการ re-streak ให้เชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยวเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสในสภาวะไร้อากาศ

ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสจากตัวอย่างตะกอนและน้ำเสีย 3 แหล่ง ได้แก่ ตะกอนจากบ่อรวบรวมตะกอน น้ำเสียจากบ่อดักไขมันและตะกอนลอยจากบ่อดักไขมัน จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต ทำให้เชื้อเคยชินกับตะกอนภายใต้สภาวะไร้อากาศ (ไม่มีการเขย่า) ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-6} ใน NaCl ร้อยละ 0.85 จากนั้นใช้ปิเปตดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ที่ความเจือจาง 10^{-4}-10^{-6} ไปทำการ spread plate บนจานอาหารแข็ง Tween 80 และบนอาหารแข็ง skimmed milk บ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่แตกต่างกันและมีการเกิดโซนขุ่น (บนอาหาร Tween 80) และโซนใส (บนอาหาร skimmed milk) ไปลงบนอาหารแข็ง tween 80 (เพื่อดูความสามารถในการการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากโซนขุ่นรอบโคโลนี) พร้อมอาหารแข็ง rhodamine b (เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยมีลักษณะโคโลนีสีชมพูอมส้ม เมื่อส่องภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต หรือภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์) และอาหารแข็ง skimmed milk (เพื่อดูความสามารถในการการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากโซนใสรอบโคโลนี) บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นหาค่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์โดยวิธีการหาค่าดัชนีเอนไซม์ โดยประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ใช้วิธีการวัดบริเวณโซนใสและขนาดของโคโลนีดังนี้

$$\text{ดัชนีเอนไซม์} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณโซนใส}}$$

หมายเหตุ :
- (+) คือ degree of hydrolysis ช่วง 0-0.9
- (++) คือ degree of hydrolysis ช่วง 1.0-1.9
- (+++) คือ degree of hydrolysis ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป

คัดเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถในการย่อยสลายที่ระดับ (+++) ทำการ re-streak ให้เชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยวเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.1 ขั้นทุติยภูมิ

3.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสภายใต้สภาวะมีอากาศ

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสที่คัดเลือกได้จากขั้นตอน primary screening (ข้อ 3.1.1) มาทำการคัดเลือกอีกครั้ง โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วัด OD. 660 nm = 1) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมัน ทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตะกอนลอยปริมาตร 45 มิลลิลิตร (ปริมาณของตะกอนลอยเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 80 ต่อน้ำเสีย 20) ที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10) บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนหัวเชื้อ หลังสิ้นสุดการปรับสภาพตะกอนลอยจะทำการวัดปริมาณตะกอน SVI (sludge volume index), ค่าพีเอช, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, ปริมาณของแข็งแขวนลอย , ค่าซีโอดีละลายน้ำ, กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส เพื่อตรวจดูความสามารถในการย่อยสลายตะกอนลอยของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.1.1 และคัดเลือกไอโซเลตที่มีการลดลงของปริมาณของแข็งแขวนลอยมากที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

3.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสภายใต้สภาวะไร้อากาศ

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสที่คัดเลือกได้จากขั้นตอน primary screening (ข้อ 3.1.2) มาทำการคัดเลือกอีกครั้ง โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร NB บ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วัด OD. 660 nm = 1) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมัน ทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตะกอนลอยปริมาตร 45 มิลลิลิตร (ปริมาณของตะกอนลอยเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 80 ต่อน้ำเสีย 20) ที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10) บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนหัวเชื้อ หลังสิ้นสุดการปรับสภาพตะกอนลอยจะทำการวัดปริมาณตะกอน SVI (sludge volume index), ค่าพีเอช, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, ปริมาณของแข็งแขวนลอย, ค่าซีโอดีละลายน้ำ, กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส เพื่อตรวจดูความสามารถในการย่อยสลายตะกอนลอยของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.1.2 และคัดเลือกไอโซเลตที่มีการลดลงของปริมาณของแข็งแขวนลอยมากที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

3.3 การเทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกเพื่อใช้ในการย่อยสลายตะกอนลอยจากบ่อดักไขมัน

หลังทำการจากการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสจากตัวอย่างตะกอนและน้ำเสียบ่อดักไขมันจากโรงงานปลาทูน่ากระป๋องได้แล้ว นำมาจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA โดยใช้ Universal primer คือ 27F, 518F และ 1099F ในเชื้อที่คัดเลือกได้ โดยทำการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

4. ศึกษาผลการปรับสภาพตะกอนลอย (pretreatment) ด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้และศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนจากตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันที่ผ่านการปรับสภาพ (Biochemical Methane Potential, BMP) ในระดับขวดทดลองโดยใช้ระบบการหมักแบบกะ

4.1 ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพแบบ biostimulation และ bioaugmentation ต่อการย่อยตะกอนและการผลิตแก๊สชีวภาพ

ขั้นตอนการปรับสภาพ

ทำการทดลองเพื่อปรับสภาพตะกอนลอยโดยเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 3 ในอาหาร NB (เลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วัด OD. 660 nm = 1) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมัน ทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งใช้ปริมาตรหมักจริง 50 มิลลิลิตร เติมตะกอนลอยปริมาตร 45 มิลลิลิตร (ปริมาณของตะกอนลอยต่อน้ำเสียจากบ่อดักไขมัน เท่ากับ 80:20) ที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10) โดยเลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3 เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนหัวเชื้อ เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 5, และ 7 เพื่อทำการวัดค่าซีโอดีละลายน้ำ, ค่าพีเอช, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, ปริมาณของแข็งแขวนลอย,กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส หลังจากการปรับสภาพที่ 3, 5 และ 7 วัน นำไปศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนในการทดลองถัดไป

ขั้นตอนการผลิตแก๊สมีเทน

ทำการทดลองศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนจากตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพโดยใช้ขวดซีรั่มขนาด 120 มิลลิลิตร ซึ่งใช้ปริมาตรหมักจริง 50 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อผลิตมีเทน (กระตุ้นหัวเชื้อมีเทนโดยเลี้ยงกับน้ำเสียจากบ่อดักไขมันในอัตราส่วนร้อยละ 50:50 ก่อนนำไปใช้จะวัด

องค์ประกอบแก๊สชีวภาพทุกครั้งโดยต้องมีปริมาณมีเทนอยู่ในช่วงร้อยละ 50-60) ปริมาตรเท่ากับ 15 มิลลิลิตร เติมตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วที่ระยะเวลาปรับสภาพ 3, 5 และ 7 วัน ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ และทำการไล่อากาศในขวดหมักด้วยแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 2-3 นาที ก่อนปิดขวดด้วยฝา septum บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นและองค์ประกอบแก๊สชีวภาพทุกวันด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-TCD) จนกว่าไม่มีการผลิตแก๊ส เก็บตัวอย่างก่อนและหลังวิเคราะห์ค่าซีโอดี (tCOD และ sCOD) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) และวิเคราะห์ค่าของแข็งระเหยง่าย (VS) สามารถคำนวณหาศักยภาพของตะกอนลอยจากผลผลิตมีเทนที่ได้ (Methane yield) ดังต่อไปนี้

$$\text{Methane yield} = \frac{\text{Cumulative methane (ml)}}{\text{Volatile solid of lipid solid waste removed (gVS)}}$$

คัดเลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพต่อการผลิตแก๊สชีวภาพสูงสุด (Methane yield) เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

4.2 ผลของอัตราส่วนระหว่างตะกอนลอยและน้ำเสียต่อการปรับสภาพและการผลิตแก๊สชีวภาพ

<u>ขั้นตอนการปรับสภาพ</u>

ทำการทดลองเพื่อปรับสภาพตะกอนลอยโดยเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 3 ในอาหาร NB (เลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วัด OD. 660 nm = 1) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมัน ทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งใช้ปริมาตรหมักจริง 50 มิลลิลิตร เติมตะกอนลอยที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียจากบ่อดักไขมันเท่ากับร้อยละ 90:10, 80:20 และ 70:30 ที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ปริมาตร 45 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10) โดยเลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3 และใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 4.1 ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนหัวเชื้อ เก็บตัวอย่างก่อนและหลัง เพื่อทำการวัดค่าซีโอดีละลายน้ำ, ค่าพีเอช, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, ปริมาณของแข็งแขวนลอย,กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส หลังจากการปรับสภาพแล้วนำไปศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนในการทดลองถัดไป

ขั้นตอนการผลิตแก๊สมีเทน

ทำการทดลองศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนจากตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพโดยใช้ขวดซีรั่มขนาด 120 มิลลิลิตร ซึ่งใช้ปริมาตรหมักจริง 50 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อผลิตมีเทน (กระตุ้นหัวเชื้อมีเทนโดยเลี้ยงกับน้ำเสียจากบ่อดักไขมันในอัตราส่วนร้อยละ 50:50 ก่อนนำไปใช้จะวัดองค์ประกอบแก๊สชีวภาพทุกครั้งโดยต้องมีปริมาณมีเทนอยู่ในช่วงร้อยละ 50-60) ปริมาตรเท่ากับ 15 มิลลิลิตร เติมตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับร้อยละ 90:10, 80:20 และ 70:30 ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ และทำการไล่อากาศในขวดหมักด้วยแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 2-3 นาที ก่อนปิดขวดด้วยฝา septum บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นและองค์ประกอบแก๊สชีวภาพทุกวันด้วยแก๊สโครมาโตกราฟีจนกว่าไม่มีการผลิตแก๊ส เก็บตัวอย่างก่อนและหลังวิเคราะห์ค่าซีโอดี ปริมาณของแข็งทั้งหมดและวิเคราะห์ค่าของแข็งระเหยง่ายสามารถคำนวณหาศักยภาพของตะกอนลอยจากผลผลิตมีเทนที่ได้คัดเลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพต่อการผลิตแก๊สชีวภาพสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

5. การปรับสภาพตะกอนลอยและการผลิตแก๊สชีวภาพในถังหมักขนาด 6.5 ลิตร โดยใช้ระบบการหมักแบบกะและกึ่งต่อเนื่อง

การหมักแบบกะ

ทำการทดลองเพื่อปรับสภาพตะกอนลอยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 3.6 ลิตร (เลือกผลการทดลองที่ดีที่สุดจากข้อ 4) เติมหัวเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 3 ปริมาตร 0.4 ลิตร (ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10 การเตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 4) ทำการทดลองศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนจากตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพโดยใช้ถังหมักแบบปิดขนาด 6.5 ลิตร ปริมาตรหมักจริง 5 ลิตร เติมหัวเชื้อผลิตมีเทนปริมาตรเท่ากับ 1.5 ลิตร (กระตุ้นหัวเชื้อมีเทนโดยเลี้ยงกับน้ำเสียจากบ่อดักไขมันในอัตราส่วนร้อยละ 50:50 ก่อนนำไปใช้จะวัดองค์ประกอบแก๊สชีวภาพทุกครั้งโดยต้องมีปริมาณมีเทนอยู่ในช่วงร้อยละ 50-60) เติมตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วปริมาตร 3.5 ลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการปรับสภาพตะกอนลอย ทำการไล่อากาศในถังหมักด้วยแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 5 นาที ก่อนปิดถังหมัก บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นและองค์ประกอบแก๊สชีวภาพทุกวันด้วยแก๊สโครมาโตกราฟีจนกว่าไม่มีการผลิตแก๊ส เก็บตัวอย่างก่อนและหลังวิเคราะห์ค่ากรดไขมันระเหยง่าย ความเป็นด่าง ปริมาณค่าซีโอดี และวิเคราะห์ค่าของแข็งระเหยง่าย สามารถคำนวณหาศักยภาพของตะกอนลอยจากผลผลิตมีเทนที่ได้

การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

ทำการทดลองในถังหมักชนิด CSTR (Continuous stirred tank reactor) ขนาด 6.5 ลิตร (Figure 10) ปริมาตรใช้งาน 5 ลิตร หลังสิ้นสุดกระบวนการหมักแบบกะ (ปริมาณแก๊สสะสมเริ่มคงที่) จะทำการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องโดยถ่ายอาหารเก่าออกปริมาตร 2 ลิตร และเติมอาหารใหม่ (ตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพเช่นเดียวกับการหมักแบบกะ) 2 ลิตร ทุก 7 วัน (คิดเป็นอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 3.2-5.6 g COD/L.d และมีระยะเวลากักเก็บเท่ากับ 17.5 d) บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ทำการกวน 150 รอบต่อนาที ทำการวัดปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นและองค์ประกอบแก๊สชีวภาพทุกวันด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-TCD) เก็บตัวอย่างก่อนและหลังวิเคราะห์ค่ากรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acids, VFA) ความเป็นด่าง (Alkalinity) ปริมาณค่าซีโอดี (tCOD และ sCOD) และวิเคราะห์ค่าของแข็งระเหยง่าย (VS) สามารถคำนวณหาศักยภาพของตะกอนลอยจากผลผลิตมีเทนที่ได้ (Methane yield)

1. ถังหมักสำหรับปรับสภาพ
2. ปั๊มลมสำหรับให้อากาศ
3. ทางอากาศเข้า
4. ทางอากาศออก
5. ถังหมัก 6.5 ลิตร สำหรับผลิตแก๊สชีวภาพ
6. ทางออกแก๊สชีวภาพ
7. ชุดแทนที่น้ำ

Figure 10 Anaerobic digestion system of pretreated scum in 6.5 L fermentor.

6. การปรับสภาพตะกอนลอยและการผลิตแก๊สชีวภาพในถังหมักขนาด 200 ลิตร โดยใช้ระบบการหมักแบบกะ

การเตรียมหัวเชื้อ

ทำการเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (เลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วัด OD. 660 nm = 1) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น แล้วถ่ายลงในอาหารใหม่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลร้อยละ 1 โดยใช้หัวเชื้อร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงขยาย scale ใหญ่อีกครั้งในอาหารใหม่ ปริมาตร 10 ลิตร ประกอบด้วยน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลร้อยละ 1 โดยใช้หัวเชื้อร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3

ขั้นตอนการปรับสภาพ

ทำการปรับสภาพตะกอนลอยในถังหมักขนาด 200 ลิตร ใช้ปริมาตรหมักจริงเท่ากับ 100 ลิตร โดยเติมตะกอนลอยที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียที่เหมาะสมจากข้อ 4 ปริมาตร 90 ลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาตร 10 ลิตร คิดเป็นปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10 ทำการเลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3 เก็บตัวอย่างระหว่างการปรับสภาพทุกวันเพื่อวิเคราะห์ค่าซีโอดีละลายน้ำ, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, ปริมาณของแข็งแขวนลอย, ค่าพีเอชและกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส

ขั้นตอนการผลิตแก๊สชีวภาพ

ทำการทดลองศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนในถังหมักขนาด 200 ลิตร (Figure 11) โดยใช้ปริมาตรหมักจริง 150 ลิตร เติมตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพ ปริมาตร 100 ลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อผลิตมีเทนปริมาตร 50 ลิตร (กระตุ้นหัวเชื้อมีเทนโดยเลี้ยงกับน้ำเสียจากบ่อดักไขมันในอัตราส่วนร้อยละ 50:50 ก่อนนำไปใช้จะวัดองค์ประกอบแก๊สชีวภาพทุกครั้งโดยต้องมีปริมาณมีเทนอยู่ในช่วงร้อยละ 50-60) หลังจากปรับพีเอชเริ่มต้นให้เท่ากับ 7 แล้วจะทำการจุดไฟเพื่อไล่อากาศในถังหมักก่อนปิดฝาถัง เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่มีการปรับสภาพ ทำการวัดปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นทุกวันจนกว่าจะไม่มีการผลิตแก๊สและวัดองค์ประกอบแก๊สชีวภาพ 5 วันด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี เก็บตัวอย่างก่อนและหลังวิเคราะห์ค่ากรดไขมันระเหยง่าย ความเป็นด่าง ปริมาณค่าซีโอดี ปริมาณของแข็งทั้งหมดและวิเคราะห์ค่าของแข็งระเหยง่าย สามารถคำนวณหาศักยภาพของตะกอนลอยจากผลผลิตมีเทนที่ได้ คัดเลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพต่อการผลิตแก๊สชีวภาพสูงสุด เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

1. ถังหมักสำหรับปรับสภาพและผลิตแก๊สชีวภาพ
2. ท่อ PVC เจาะรูสำหรับให้อากาศ
3. ปั๊มลมให้อากาศ
4. ปั๊มสำหรับกวนผสม
5. ทางออกแก๊สชีวภาพ
6. ชุดแทนที่น้ำ
7. ทางเข้าแก๊สชีวภาพ

Figure 11 Anaerobic digestion of pretreated scum in 200 L fermentor.

7. การปรับสภาพตะกอนลอยและการผลิตแก๊สชีวภาพในถังหมักขนาด 1000 ลิตร โดยใช้ระบบการหมักแบบกะ

<u>การเตรียมหัวเชื้อ</u>

ทำการเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วัด OD. 660 nm = 1) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น แล้วถ่ายลงในอาหารใหม่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลร้อยละ 1 โดยใช้หัวเชื้อเท่ากับร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงขยาย scale ในอาหารใหม่ ปริมาตร 10 ลิตร ประกอบด้วยน้ำเสียที่เติมกากน้ำตาลร้อยละ 1 โดยใช้หัวเชื้อเท่ากับร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เลี้ยงตาม

สภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเลี้ยงขยาย scale ใหญ่ในอาหารใหม่อีกครั้ง โดยใช้อาหารปริมาตร 50 ลิตร เติมหัวเชื้อปริมาตร 5 ลิตร (จากหัวเชื้อ scale 10 ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ขั้นตอนการปรับสภาพ

ทำการปรับสภาพตะกอนลอยในถังหมักขนาด 1000 ลิตร ใช้ปริมาตรหมักจริงเท่ากับ 500 ลิตร โดยเติมตะกอนลอยที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียที่เหมาะสมจากข้อ 4ปริมาตร 450 ลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 ลิตร (คิดเป็นปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10) ทำการเลี้ยงตามสภาวะที่คัดเลือกมาจากข้อ 3 เก็บตัวอย่างระหว่างการปรับสภาพทุกวันเพื่อวิเคราะห์ค่าซีโอดีละลายน้ำ, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, ปริมาณของแข็งแขวนลอย, ค่าพีเอชและกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส

ขั้นตอนการผลิตแก๊สชีวภาพ

ทำการทดลองศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนในถังหมักขนาด 1000 ลิตร (Figure 12) โดยใช้ปริมาตรหมักจริง 750 ลิตร เติมตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพ ปริมาตร 500 ลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อผลิตมีเทนปริมาตร 250 ลิตร (กระตุ้นหัวเชื้อมีเทนโดยเลี้ยงกับน้ำเสียจากบ่อดักไขมันในอัตราส่วนร้อยละ 50:50 ก่อนนำไปใช้จะวัดองค์ประกอบแก๊สชีวภาพทุกครั้งโดยต้องมีปริมาณมีเทนอยู่ในช่วงร้อยละ 50-60) หลังจากปรับพีเอชเริ่มต้นให้เท่ากับ 7 แล้วจะทำการการจุดไฟเพื่อไล่อากาศในถังหมักก่อนปิดฝาถัง ทำการวัดปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นทุกวันจนกว่าจะไม่มีการผลิตแก๊สและวัดองค์ประกอบแก๊สชีวภาพ 3 วันด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-TCD) เก็บตัวอย่างก่อนและหลังวิเคราะห์ค่ากรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acids, VFA) ความเป็นด่าง (Alkalinity) ปริมาณค่าซีโอดี (tCOD และ sCOD) ปริมาณของแข็งทั้งหมดและวิเคราะห์ค่าของแข็งระเหยง่าย (VS) สามารถคำนวณหาศักยภาพของตะกอนลอยจากผลผลิตมีเทนที่ได้

1. ถังหมักสำหรับปรับสภาพและผลิตแก๊สชีวภาพ
2. ท่อ PVC เจาะรูสำหรับให้อากาศ
3. ท่อ PVC สูบตัวอย่างจากด้านบนวนกลับไปด้านล่างถังหมักเพื่อกวนผสม
4. ปั๊มลมให้อากาศ
5. ปั๊มสำหรับกวนผสม
6. ทางออกแก๊สชีวภาพ
7. ชุดแทนที่น้ำ
8. ทางเข้าแก๊สชีวภาพ

Figure 12 Anaerobic digestion of pretreated scum in 1000 L fermentor.

8. ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตปุ๋ยจากกากตะกอนที่เหลือหลังกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ

นำกากตะกอนลอยก่อนและหลังกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพไประเหยน้ำออก และวิเคราะห์ตามมาตรฐานปุ๋ย ได้แก่ การหาความชื้น ค่า C/N ratio ปริมาณอินทรียวัตถุ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณโพแทสเซียม ปริมาณฟอสฟอรัสและค่าพีเอช โดยการส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และนำมาเปรียบเทียบกับค่าตามมาตรฐานปุ๋ย

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การศึกษาลักษณะของตะกอนลอยและน้ำเสียจากบ่อดักไขมัน

ในการทดลองการปรับสภาพตะกอนลอยเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ มีการใช้สารตั้งต้นสองชนิด ได้แก่ ตะกอนลอยและน้ำเสียจากบ่อดักไขมัน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต จำกัด Table 7 แสดงผลการศึกษาลักษณะของตะกอนลอยในทุกครั้งที่มีการเก็บตัวอย่าง พบว่ามีค่าพีเอชอยู่ในช่วงเป็นกลาง 5.90-6.96 ค่าซีโอดีทั้งหมดและซีโอดีละลายน้ำอยู่ในช่วง 43.5-188.8 กรัมต่อลิตร และ 21.3-52.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งระเหยได้อยู่ในช่วง 54.56 - 188.9 กรัมต่อลิตร และ 50.7-186.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณของแข็งแขวนลอยและปริมาณของแข็งแขวนลอยระเหยได้อยู่ในช่วง 50.7-186.1 กรัมต่อลิตร และ 49.2-184.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า มีค่าทีเคเอ็นเท่ากับ 502.7 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำมันและไขมันเท่ากับ 18 กรัมต่อลิตร ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดอยู่ในช่วง 96.8–109.9 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 22.33 ซึ่งมากกว่ารายงานของชุติมน ตั้งพงศ์เสถียรและนันทิชา ภักดีไทย (2560) ที่ทำการวิเคราะห์ลักษณะของตะกอนจากบ่อดักไขมันโรงงานงานทูน่ากระป๋อง พบว่า มีอัตราส่วน C/N ที่ได้เฉลี่ยเท่ากับ 16.69 อย่างไรก็ตามอัตราส่วน C/N ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการย่อยสลายแบบไร้อากาศควรอยู่ระหว่าง 20-30 หรือระหว่าง 20-35 โดยอัตราส่วน 25 เป็นอัตราส่วนที่พบว่ามีการใช้บ่อยที่สุด (Mao และคณะ, 2015)

สำหรับน้ำเสียจากบ่อดักไขมัน พบว่ามีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.58-6.90 ค่าซีโอดีทั้งหมดและซีโอดีละลายน้ำอยู่ในช่วง 1.49-1.74 กรัมต่อลิตร และ 1.07-1.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งระเหยได้อยู่ในช่วง 1.63-3.41 กรัมต่อลิตร และ 0.28-0.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณของแข็งแขวนลอยและปริมาณของแข็งแขวนลอยระเหยได้อยู่ในช่วง 0.28–0.35 กรัมต่อลิตร และ 0.14–0.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า มีค่าทีเคเอ็นเท่ากับ 18.2 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำมันและไขมันเท่ากับ 0.003 กรัมต่อลิตร ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.021 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 11.11 ในการทดลองนี้จะนำน้ำเสียจากบ่อดักไขมันมาใช้ร่วมกับตะกอนลอยเพื่อช่วยในเรื่องของการกวนผสมได้ดียิ่งขึ้น จะเห็นได้ว่าตะกอนลอยนอกจากจะจับตัวเป็นก้อนแล้วยังมีความเข้มข้นของค่าซีโอดีสูงบ่งบอกถึงปริมาณของสารอินทรีย์ที่สูงเช่นกัน จึงควรนำไปปรับสภาพด้วยวิธีการทางชีวภาพก่อนเข้าสู่กระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศ ซึ่งกระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศถือได้ว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่

น่าสนใจ เนื่องจากสารอินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถถูกย่อยสลายและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเชื้อเพลิงที่มีประโยชน์ นั่นคือ แก๊สชีวภาพ ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่ แก๊สมีเทน แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แอมโมเนีย และและอื่นๆ (Nasir และคณะ, 2013)

Table 7 Characteristics of scum and wastewater from the oil trap of wastewater treatment system of tuna canning industry

Parameters	Scum slurry	Wastewater
pH	5.90 - 6.96	6.58 – 6.90
tCOD	43.57 – 188.8 g/L	1.49 – 1.74 g/L
sCOD	21.33 – 52.62 g/L	1.07 – 1.39 g/L
Total Solids	54.56 – 188.9 g/L	1.63 – 3.41 g/L
Suspended Solids	50.72 – 186.1 g/L	0.28 – 0.35 g/L
Volatile Solids	49.14 – 184.5 g/L	1.11 – 2.28 g/L
Volatile Suspended Solids	49.22 – 184.9 g/L	0.14 – 0.21 g/L
Total Kjeldahl Nitrogen	502.7 g/L	18.2 g/L
Oil and grease	18 g/L	0.003 g/L
Total phosphorus	96.8 – 109.9 g/L	0.021 g/L
C/N ratio	22.33	11.11

2. ศึกษาการย่อยสลายตะกอนลอยเบื้องต้นด้วย *Bacillus subtilis* AH73 เพื่อการผลิตแก๊สชีวภาพ

2.1 การย่อยสลายตะกอนลอยเบื้องต้นด้วย *B. subtilis* AH73

จากการทดลองการย่อยสลายตะกอนลอยโดยใช้ *B. subtilis* AH73 ซึ่งเป็นแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทำการทดลองในขวดซีรั่มขนาด 1 ลิตร โดยใช้ปริมาตรหมักจริง 800 มิลลิลิตร เติมตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันและหัวเชื้อ *B. subtilis* AH73 (หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10) เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติม *B. subtilis* AH73 (control) บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ค่าพีเอชระหว่างการย่อยสลายตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันอยู่ในช่วง 6.46 - 6.65 โดยไม่มีความแตกต่างกันระหว่างการเติมและไม่เติม *B. subtilis* AH73 (Figure 13A) อย่างไรก็ตามการเติม *B. subtilis* AH73 ทำให้เกิดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในระหว่างการย่อยสลายสูงสุดในวันที่ 1 เท่ากับ 57.87 ยูนิตต่อลิตร (Figure 13B) ซึ่งมีค่าต่ำกว่า

รายงานของ Cristian (2019) ที่ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *B. subtilis* AH73 โดยใช้น้ำนึ่งปลาทูน่ากระป๋องเป็นแหล่งอาหารในการเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 38.68 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อมีการเติมส่วนประกอบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ yeast extract ร้อยละ 0.892 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, $CaCl_2$ ร้อยละ 0.022 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และน้ำมันปาล์ม ร้อยละ 2.125 โดยปริมาตรต่อปริมาตร

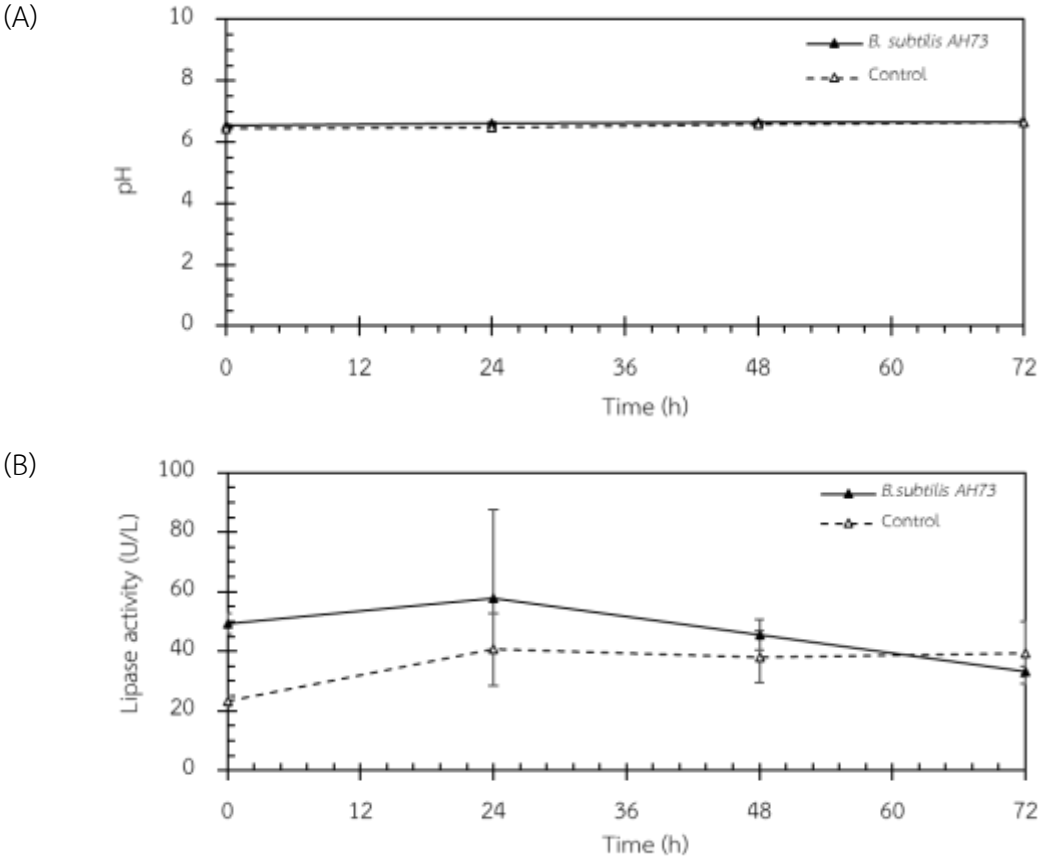


Figure 13 pH profile (A) and lipase production (B) during the digestion of scum from oil trap using *Bacillus subtilis* AH73.

2.2 การผลิตแก๊สชีวภาพจากตะกอนลอยที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* AH73

หลังการย่อยสลายตะกอนลอยด้วย *B. subtilis* AH73 แล้วนำมาเติมหัวเชื้อมีเทนบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส พบว่า การใช้ตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* AH73 มีการผลิตแก๊สชีวภาพสูงที่สุดในวันที่ 25 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการย่อยสลายก่อนสามารถผลิตแก๊สชีวภาพในช่วงแรกได้น้อยกว่าชุดที่มีการเติม *B. subtilis* AH73 และ

สามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้สูงที่สุดในวันที่ 34 (Figure 14A) จะเห็นได้ว่าการผลิตแก๊สชีวภาพค่อนข้างต่ำในช่วงแรก อาจเนื่องมาจากซับสเตรตที่ใช้ในการทดลองนอกจากจะมีปริมาณของแข็งสูงแล้วยังมีโครงสร้างที่ซับซ้อนซึ่งยากต่อการย่อยสลาย ดังนั้นเมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักแบบไร้อากาศจุลินทรีย์กลุ่มไฮโดรไลติกจึงต้องใช้ระยะเวลานานในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Labatut และคณะ, 2011) ส่งผลให้มีช่วง lag phase เป็นเวลานานถึง 23 วัน อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการทดลองเมื่อวันที่ 60 ชุดการทดลองที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* AH73 สามารถผลิตแก๊สชีวภาพสะสมเท่ากับ 1857 และ 1994 มิลลิลิตร ตามลำดับ (Figure 14B) ถึงแม้ชุดการทดลองที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* AH73 สามารถผลิตแก๊สชีวภาพสะสมได้น้อยกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* AH73 แต่เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สชีวภาพ พบว่า ในวันที่ 60 ชุดการทดลองที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* AH73 สามารถผลิตแก๊สชีวภาพที่มีมีเทนเท่ากับร้อยละ 65.4 และ 59.2 ตามลำดับ โดยชุดการทดลองที่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* AH73 สามารถผลิตแก๊สมีเทนสะสมได้เท่ากับ 1030 มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วย *B. subtilis* AH73 เล็กน้อย (947 มิลลิลิตร) (Figure 14C) จากการทดลองเมื่อมีการย่อยสลายตะกอนลอยด้วยจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักแบบไร้อากาศสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตมีเทนได้ แต่ผลจากการทดลองผลิตแก๊สชีวภาพมีค่าต่ำกว่ารายงานของ มาริสา ทองน้อยและวิสสุตา แก้วทอง (2561) ที่ศึกษาการใช้ *B. subtilis* AH73 ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพจากน้ำเสียโรงงานผลิตปลาทูน่ากระป๋องร่วมกับการใช้กากตะกอนลอยในขวดซีรั่มขนาด 120 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรหมักจริง 70 มิลลิลิตร พบว่า หลังมีการชักนำให้ *B. subtilis* AH73 มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหาร NB ที่มีกากตะกอนลอยทูน่า 2% นำไปบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 7.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมให้มีการผลิตมีเทนสูงสุดเท่ากับ 830.86 ลิตรCH_4 ต่อกรัม VS_{add} โดยมีระยะเวลาการหมักเพียง 27 วัน

อย่างไรก็ตามการย่อยสลายตะกอนลอยด้วย *B. subtilis* AH73 พบว่า ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่ำ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดลองโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสชนิดอื่นเพื่อนำมาย่อยสลายตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันและทำการให้อากาศหรือเขย่าในการทดลองถัดไป Affes และคณะ (2017) พบว่า เมื่อผลิตแก๊สชีวภาพจากไขมันที่เป็นของเสียมาจากโรงงานสัตว์ปีก โดยใช้ความเข้มข้นของซับสเตรทเท่ากับร้อยละ 100 ให้ผลผลิตแก๊สชีวภาพต่ำที่สุด เนื่องมาจากเกิดการสะสมของกรดไขมันสายยาวในระบบซึ่งเป็นตัวยับยั้งที่สำคัญของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ โดยเฉพาะกลุ่มเมทาโนเจน หรือกลุ่มที่ผลิตมีเทน โดยกลุ่มเมทาโนเจนจะดูดซับกรดไขมันสายยาวเข้าสู่เซลล์ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์และเกิดการยับยั้งการขนส่งสารอาหารผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ (Mendes และคณะ, 2006; Long และคณะ, 2012) ในการ

ทดลองถัดไปจึงมีการเริ่มต้นใช้ตะกอนลอยร่วมกับน้ำเสียในอัตราส่วนร้อยละ 80:20 (ดัดแปลงจาก Chandra และคณะ, 2006)

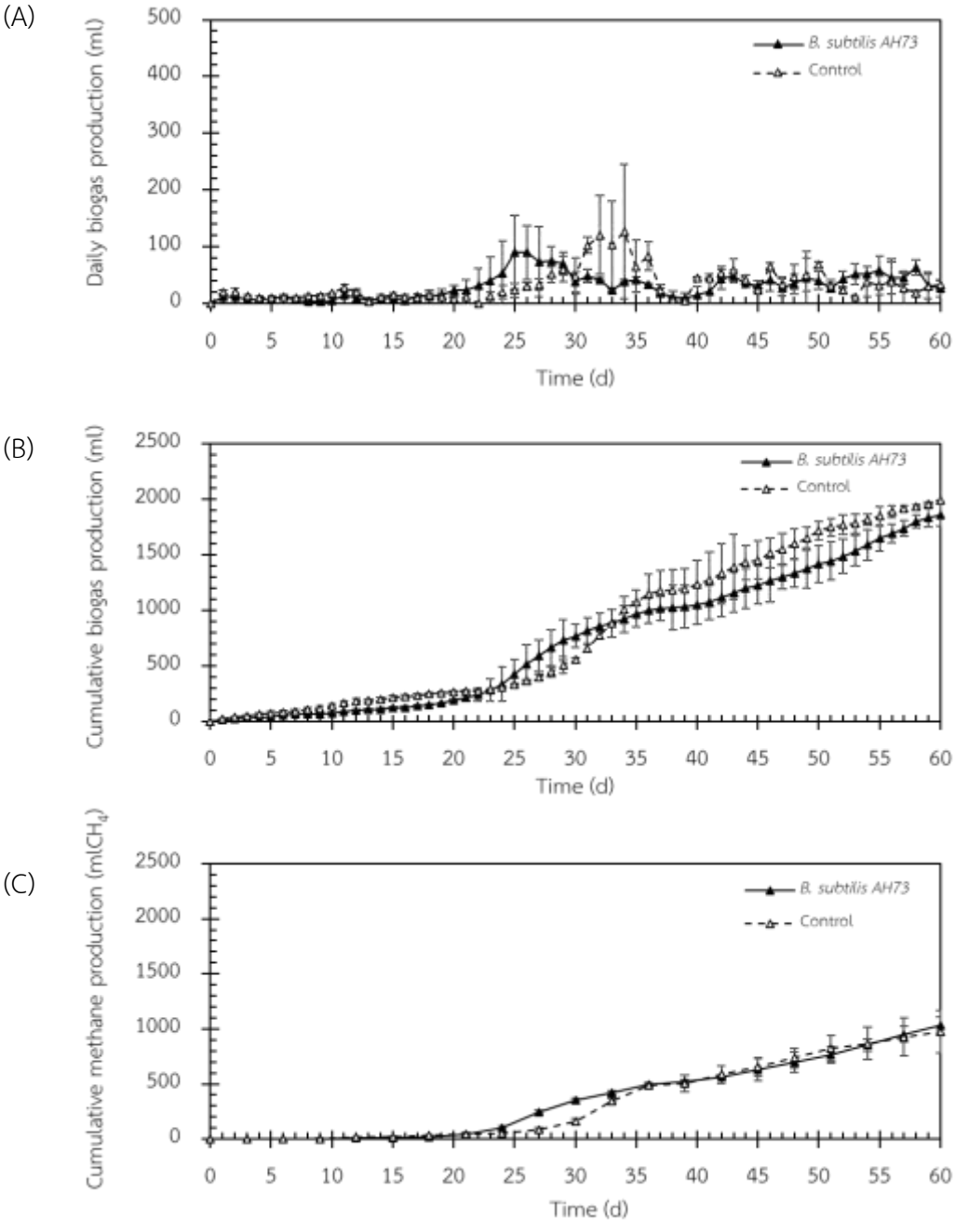


Figure 14 Daily biogas production (A), cumulative biogas production (B), and cumulative methane production (C) of scum from oil trap with pretreatment by *B. subtilis* AH73 for 72 h and without pretreatment (control).

3 การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส

3.1 ขั้นปฐมภูมิ

3.1.1 การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสภายใต้สภาวะมีอากาศ

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสภายใต้สภาวะมีอากาศโดยการเขย่า จากตัวอย่างตะกอนและน้ำเสีย 4 แหล่ง ได้แก่ หัวเชื้อดับกลิ่นของโรงงาน (Effective microorganism or EM for smell reduction), ตะกอนจากบ่อรวบรวมตะกอน (sludge from microorganisms collecting sludge pond), น้ำเสียจากบ่อดักไขมัน (wastewater from oil trap) และตะกอนลอยจากบ่อดักไขมัน (scum from oil trap) จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต (Figure 15) บนอาหารแข็ง Tween 80 (lipase activity; LA) และ skimmed milk (protease activity; PA) (Figure 16) บ่มในสภาวะมีอากาศที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (แสดงผลการตั้ง code name ดัง Table 8) พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสโดยดูผลจากการเกิดโซนขุ่นบนอาหาร tween 80 agar (ผลิตเอนไซม์ไลเปส) และโซนใสบนอาหาร skimmed milk agar (ผลิตเอนไซม์โปรติเอส) ได้ทั้งหมด 41 ไอโซเลต (Table 9) จากการหาค่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยวิธีการหาค่าดัชนีเอนไซม์ ซึ่งประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ใช้วิธีการวัดบริเวณโซนใสและขนาดของโคโลนีแสดงดัง Table 10 พบว่า มีค่าดัชนีเอนไซม์อยู่ในช่วง 0.2-2.7 เซนติเมตร จากการคัดแยกบนอาหารแข็ง LA และ rodamine b สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ 41 ไอโซเลต โดยมี 40ไอโซเลต ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยเกิดโซนขุ่นรอบโคโลนี เมื่อวัดค่าดัชนีของกิจกรรมเอนไซม์พบ 3ไอโซเลต ที่มีค่าดัชนีเอนไซม์ >2 เซนติเมตร เมื่อพิจารณาค่าดัชนีเอนไซม์ของการเลือกในอาหาร PA ใน 2nd media พบว่ามี 33 ไอโซเลต ที่เกิดโซนใส แต่มีเพียง 4 ไอโซเลต ที่มีค่าดัชนีเอนไซม์ >2 เซนติเมตร จากงานวิจัยที่พบว่า ค่าดัชนีเอนไซม์ที่ได้มีค่าสูงกว่ารายงานของ de Oliveira และคณะ (2006) ที่ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก central amazon สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ 67 ไอโซเลต แต่กิจกรรมไลเปสตรวจพบเพียงร้อยละ 4.5 ของไอโซเลตที่คัดแยกได้ เมื่อวัดค่าดัชนีของกิจกรรมเอนไซม์พบว่า มีค่าต่ำกว่า 2 เซนติเมตร ในขณะที่ Castro และคณะ (2014) คัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์จากกิ่งไม้ของต้นโกงกาง พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลสร้อยละ 45 แบคทีเรียผลิตไลเปสร้อยละ 52.5 และแบคทีเรียผลิตโปรติเอสร้อยละ 75 ของไอโซเลตที่ทดสอบ เมื่อวัดค่าดัชนีของกิจกรรมเอนไซม์ พบว่า อยู่ในช่วง 1.15-2.78, 1.35-5.13 และ 1.15-2.53 เซนติเมตร ตามลำดับ ทั้งนี้ค่าดัชนีของกิจกรรมเอนไซม์มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการคัดแยก

เนื่องจากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างตะกอนลอยที่ถูก enrichment โดยการเขย่า ทำให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในระบบมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าเพราะเกิดการถ่ายเทอากาศทำให้มีออกซิเจนละลายน้ำเพิ่มขึ้น จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่ม aerobes เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้ทั้งเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส อย่างไรก็ตามถ้าพิจารณาจากค่าดัชนีเอนไซม์จะเห็นว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสอย่างเดียว (โดยไม่มีการผลิตไลเปส) 19 ไอโซเลต ผลิตเอนไซม์ไลเปสอย่างเดียว (โดยไม่มีการผลิตโปรติเอส) 8 ไอโซเลต และสามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส 14 ไอโซเลต (Table 11) เนื่องจากแหล่งของตัวอย่างที่นำมาคัดแยกอุดมไปด้วยสารอินทรีย์ที่มีองค์ประกอบของโปรตีนและไขมันเป็นหลัก ทำให้แบคทีเรียสามารถใช้ประโยชน์จากซับสเตรตเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส โดยที่การย่อยสลายของโปรตีนจะแตกต่างกันไปตามชนิดของไอโซเลตที่คัดแยกได้ (Dube และคณะ, 2001)

ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสขั้นปฐมภูมิภายใต้สภาวะมีอากาศ พบว่า มีเพียง 7 ไอโซเลต ได้แก่ SSP1, ISP3, OTSP2, ISL1, ISL2, ISL3 และ ISL4 (Table 11) ที่มีระดับการย่อยสลายสูงสุด โดยเลือกจากไอโซเลตที่มีการย่อยสลายระดับสามบวก (+++) ซึ่งมีค่าดัชนีเอนไซม์ > 2 เซนติเมตร ซึ่งไอโซเลตเหล่านี้จะถูกนำไปคัดเลือกต่อในขั้นทุติยภูมิเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

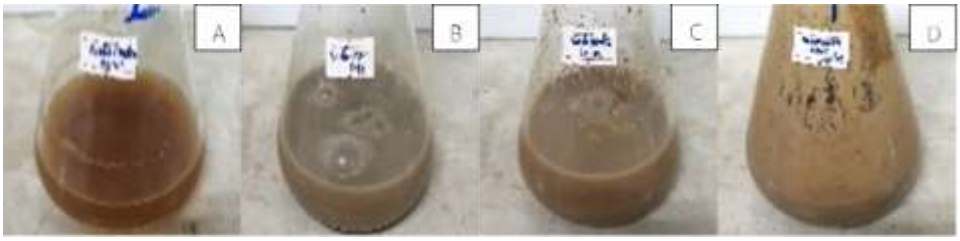


Figure 15 Sample sources from tuna canning industry for isolation of lipase and protease producing (EM for smell reduction (A), sludge from microorganisms collecting sludge pond (B), wastewater from oil trap (C), and scum from oil trap (D)).

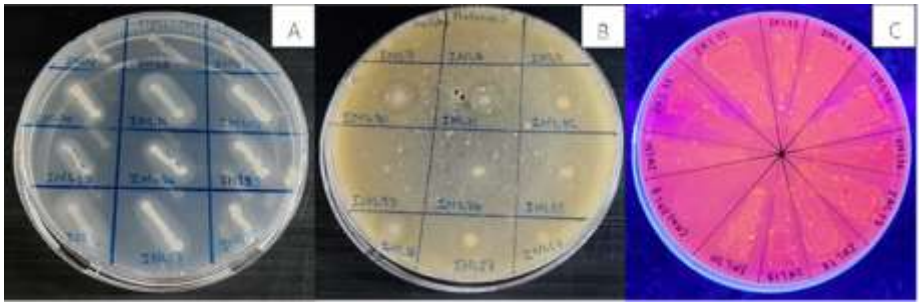


Figure 16 Lipase production on tween 80 agar (A), Protease production on skimmed milk agar (B), and confirm lipase production on rhodamine B agar (C) of bacteria isolated from wastewater treatment system of tuna canning industry.

Table 8 Code name of lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment and cultured on media under aerobic condition for 48 h

Source	Code name for isolates grown in media*	
	LA	PA
EM for smell reduction	SSL	SSP
Sludge from microorganisms collecting sludge pond	ISL	ISP
Wastewater from oil trap	OTSL	OTSP
Scum from oil trap	OFSL	OFSP

Note: * LA was Tween 80 agar for screening lipase activity, PA was skimmed milk agar for screening protease activity

Table 9 Primary screening of lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment and cultured on media under aerobic condition for 48 h

Source	1st media*	Total of isolates grown in 1st media	Number of isolates with enzyme activity after screening using 1st and 2nd media**		Total of isolates with enzyme activity
			LA	PA	
EM for smell reduction	PA	2	2	2	2
	LA	4	4	4	4
Sludge from collecting	PA	8	8	8	8
sludge pond	LA	11	10	4	10
Wastewater from oil	PA	4	0	0	4
trap	LA	4	0	0	4
Scum from oil trap	PA	0	0	0	0
	LA	9	2	0	9
	Total	42	41	33	41

Note: * LA was Tween 80 agar for screening lipase activity, PA was skimmed milk agar for screening protease activity

** LA= Lipase activity with enzymatic index > 0.1 cm, PA= Protease activity with enzymatic index > 0.1 cm

Table 10 Enzymatic index of lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment and cultured on media under aerobic condition for 48 h

Source	1st media*	Isolate codes	Enzymatic index in 2nd media (cm) and (degree of hydrolysis**)	
			LA	PA
EM for smell reduction	PA	SSP1	0.4 (+)	2.0 (+++)
		SSP2	0.6 (+)	1.0 (++)
	LA	SSL1	0.3 (+)	1.2 (++)
		SSL2	0.5 (+)	0.6 (+)
		SSL3	0.3 (+)	1.4 (++)
		SSL4	0.3 (+)	1.5 (++)
Sludge from microorganisms collecting sludge pond	PA	ISP1	0.2 (+)	1.0 (++)
		ISP2	0.5 (+)	0.7 (+)
		ISP3	0.6 (+)	2.0 (+++)
		ISP4	0.5 (+)	1.0 (++)
		ISP5	0.8 (+)	0.7 (+)
		ISP6	0.7 (+)	1.0 (++)
		ISP7	1.0 (++)	1.0 (++)
		ISP8	0.6 (+)	1.0 (++)
	LA	ISL1	1.8 (++)	2.3 (+++)
		ISL2	2.0 (+++)	1.5 (++)
		ISL3	2.7 (+++)	1.8 (++)
		ISL4	2.3 (+++)	1.5 (++)
		ISL5	0.7 (+)	0 (-)
		ISL6	1.0 (++)	0 (-)
		ISL7	0 (-)	-
		ISL8	0.8 (+)	0 (-)
		ISL9	0.8 (+)	0 (-)
		ISL10	0.6 (+)	0 (-)

Source	1st media*	Isolate codes	Enzymatic index in 2nd media (cm) and (degree of hydrolysis**)	
			LA	PA
		ISL11	0.7 (+)	0 (-)
Wastewater from oil trap	PA	OTSP1	0.8 (+)	1.0 (++)
		OTSP2	0.3 (+)	2.0 (+++)
		OTSP3	0.3 (+)	0.7 (+)
		OTSP4	1.0 (++)	1.0 (++)
	LA	OTSL1	0.6 (+)	0.2 (+)
		OTSL2	0.3 (+)	1.5 (++)
		OTSL3	0.6 (+)	1.2 (++)
		OTSL4	0.2 (+)	0.4 (+)
Scum from oil trap	PA	ND	-	-
	LA	OFSL1	0.7 (+)	1.2 (++)
		OFSL2	0.8 (+)	1.2 (++)
		OFSL3	0.8 (+)	1.75 (++)
		OFSL4	0.6 (+)	1.5 (++)
		OFSL5	1.0 (++)	1.5 (++)
		OFSL6	0.8 (+)	1.2 (++)
		OFSL7	0.5 (+)	0.6 (+)
		OFSL8	1.0 (++)	0 (-)
		OFSL9	0.7 (+)	0 (-)

Note: * LA and PA were media for screening lipase and protease activities, respectively

** Degree of hydrolysis (+) = 0-0.9 cm, (++) = 1.0-1.9 cm, (+++) > 2.0 cm

ND = not detected, - (dash) = no experiment

Table 11 Lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment and cultured on media under aerobic condition for 48 h

Microbial groups	Isolates*	Isolates**
Protease producing bacteria (no lipase production)	SSP2 SSL1, SSL3, SSL4 ISP1, ISP4, ISP6, ISP8 OTSP1 OTSL2, OTSL3 OFSL1, OFSL2, OFSL3, OFSL4, OFSL6	SSP1 ISP3 OTSP2
Lipase producing bacteria (no protease production)	ISL5, ISL6, ISL8, ISL9, ISL10, ISL11 OFSL8, OFSL9	-
Protease and lipase producing bacteria	SSL2 ISP2, ISP5, ISP7 OTSP3, OTSP4 OTSL1, OTSL4 OFSL5, OFSL7	ISL1, ISL2, ISL3, ISL4

Note: *Microbial groups were defined from enzyme activity with enzymatic index = 0.1-1.9 cm

**Microbial groups were defined from enzyme activity with enzymatic index > 2 cm

3.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสภายใต้สภาวะไร้อากาศ

การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ ซึ่งการย่อยสลายในสภาวะมีอากาศมีข้อเสียเปรียบคือ สารอินทรีย์บางชนิดไม่สามารถย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยมีส่วนประกอบที่ไม่ทำปฏิกิริยาทางชีวภาพ ส่วนใหญ่ประกอบด้วยวัสดุที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ คิดเป็นร้อยละ 70 ของซีโอดีทั้งหมด อีกทั้งการเจริญเติบโตแบบใช้ออกซิเจนจำเป็นต้องให้อากาศที่เพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรีย (Christy และคณะ, 2014) อย่างไรก็ตามการให้อากาศยังถือเป็นการเพิ่มต้นทุนในกระบวนการผลิต ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสภายใต้สภาวะไร้อากาศโดยไม่มีการเขย่าเพื่อลดต้นทุนของการเติมอากาศก่อนการผลิตแก๊สชีวภาพ โดยใช้ตัวอย่างตะกอนและน้ำเสีย 4 แหล่ง ได้แก่ หัวเชื้อดับกลิ่นของโรงงาน (Effective microorganism or EM for smell reduction), ตะกอนจากบ่อรวบรวมตะกอน (sludge from microorganism collecting sludge pond), น้ำเสียจากบ่อดักไขมัน (wastewater from oil trap) และตะกอนลอยจากบ่อดักไขมัน (scum from oil trap) จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานโชติวัฒน์อุตสาหกรรม โดยการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองแรกเลี้ยงบนอาหารแข็ง LA และ PA บ่มภายใต้สภาวะมีอากาศและชุดการทดลองที่สองเลี้ยงบนอาหารแข็ง LA และ PA บ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (แสดงผลการตั้ง code name ดัง Table 12) พบว่า เมื่อบ่มภายใต้สภาวะมีอากาศสามารถคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสโดยดูผลจากการเกิดโซนขุ่นบนอาหาร LA (ผลิตเอนไซม์ไลเปส) และโซนใสบนอาหาร PA (ผลิตเอนไซม์โปรติเอส) ได้ทั้งหมด 59 ไอโซเลต (Table 13) จากการหาค่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยวิธีการหาค่าดัชนีเอนไซม์ ซึ่งประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ใช้วิธีการวัดบริเวณโซนใสและขนาดของโคโลนีแสดงดัง Table 14 พบว่า มีค่าดัชนีเอนไซม์อยู่ในช่วง 0.2-2.8 เซนติเมตร อย่างไรก็ตามถ้าพิจารณาจากค่าดัชนีเอนไซม์ จะเห็นว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ 22 ไอโซเลต สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพียงอย่างเดียว 21 ไอโซเลต ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพียงอย่างเดียวและ 8 ไอโซเลต สามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส (Table 15) ในขณะที่เมื่อบ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศ สามารถคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสได้ทั้งหมด 68 ไอโซเลต ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารบนอาหารแข็ง พบว่ามีเพียง 30 ไอโซเลต (Table 13) ที่มีการแสดงกิจกรรมการย่อยสลายสารอาหาร และจากการหาค่าดัชนีเอนไซม์โดยวัดบริเวณโซนใสและขนาดของโคโลนีแสดงดัง Table 14 พบว่า มีค่าดัชนีเอนไซม์ อยู่ในช่วง 0.1-2.7 เซนติเมตร นอกจากนี้แบคทีเรียที่คัดแยกได้เมื่อพิจารณาจากค่าดัชนีเอนไซม์ พบ 5 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพียงอย่างเดียว 25 ไอโซเลต ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพียงอย่างเดียวและไม่พบไอโซเลตที่สามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส (Table 15)

อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าจากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างตะกอนลอยที่ถูก enrichment โดยไม่มีการเขย่า ทำให้จุลินทรีย์ยังคงคุ้นชินกับสภาวะแวดล้อมเดิมในระบบ เมื่อนำมาคัดแยกบนอาหารแข็งที่บ่มภายใต้สภาวะมีอากาศ จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็งส่วนใหญ่มักเป็นกลุ่ม facultative anaerobes ในขณะที่การคัดแยกบนอาหารแข็งที่บ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศ ส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม anaerobes เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มเกิดการปรับตัวให้ทนต่อสภาพแวดล้อมนั้น ๆ และสามารถเจริญบนอาหารแข็งได้ (Dube และคณะ, 2001) เมื่อเปรียบเทียบการทดลองโดยมีการ enrichment ในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ พบว่าการ enrichment ในสภาวะไร้อากาศสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ได้มากกว่า อาจเนื่องมาจากแหล่งของตัวอย่างที่นำมาคัดแยกอุดมไปด้วยสารอินทรีย์ที่มีองค์ประกอบของโปรตีนและไขมันเป็นหลัก ทำให้แบคทีเรียสามารถใช้ประโยชน์จากซับสเตรตเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส โดยที่การย่อยสลายของโปรตีนจะแตกต่างกันไปตามชนิดของไอโซเลตที่คัดแยกได้ และแหล่งตัวอย่างที่นำมาคัดแยกในสภาวะเดิมจากระบบของโรงงาน ส่วนใหญ่ไม่มีการเติมอากาศเข้าสู่ระบบ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จึงมักเป็นกลุ่ม facultative anaerobes และกลุ่ม anaerobes

จากการทดลองจึงสรุปได้ว่าการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสขั้นปฐมภูมิพบ 9 ไอโซเลต ได้แก่ SNL1, INP4, INP6, OFNP2, OFNP4, OFNL15, INL11, INL16 และ INL23 เมื่อบ่มภายใต้สภาวะมีอากาศ และพบ 2 ไอโซเลต ได้แก่ IANP8 และ IANL6 เมื่อบ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Table 15) ที่มีระดับการย่อยสลายสูงสุด โดยเลือกจากไอโซเลตที่มีการย่อยสลายระดับสามบวก (+++) ซึ่งมีค่าดัชนีเอนไซม์ > 2 เซนติเมตร

ดังนั้นในการทดลองขั้นทุติยภูมิได้ไอโซเลตจากข้อ 3.1.1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งบ่มในสภาวะมีอากาศ 7 ไอโซเลต และจากข้อ 3.1.2 ได้จากสภาวะมีอากาศ 9 ไอโซเลต และไร้อากาศ 2 ไอโซเลต จะมีการศึกษาการย่อยสลายตะกอนลอยภายใต้สภาวะมีอากาศทั้งหมด 16 ไอโซเลต และการย่อยสลายตะกอนลอยภายใต้สภาวะไร้อากาศเพียง 2 ไอโซเลต

Table 12 Code name of lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment under anaerobic condition and cultured on media under aerobic and anaerobic conditions for 48 h

Source	Cultured conditions on media	Code name for isolates grown in media*	
		LA	PA
EM for smell reduction	aerobic	SNL	SNP
	anaerobic	SANL	SANP
Sludge from microorganisms collecting sludge pond	aerobic	INL	INP
	anaerobic	IANL	IANP
Wastewater from oil trap	aerobic	OTNL	OTNP
	anaerobic	OTANL	OTANP
Scum from oil trap	aerobic	OFNL	OFNP
	anaerobic	OFANL	OFANP

Note: * LA was Tween 80 agar for screening lipase activity, PA was skimmed milk agar for screening protease activity

Table 13 Primary screening of lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment under anaerobic condition and cultured on media under aerobic and anaerobic conditions for 48 h

Source	Cultured conditions on media	1st media*	Total of isolates grown in 1st media	Number of isolates with enzyme activity after screening using from 1st and 2nd media**		Total of isolates with enzyme activity
				LA	PA	
EM for smell reduction	aerobic	PA	1	1	1	1
		LA	1	1	1	1
	anaerobic	PA	0	0	0	0
		LA	0	0	0	0
Sludge from collecting sludge pond	aerobic	PA	8	5	6	6
		LA	23	20	11	20
	anaerobic	PA	8	0	1	1
		LA	27	19	0	19
Wastewater from oil trap	aerobic	PA	0	0	0	0
		LA	0	0	0	0
	anaerobic	PA	15	0	4	4
		LA	9	2	0	2
Scum from oil trap	aerobic	PA	7	6	7	7
		LA	19	16	6	16
	anaerobic	PA	1	0	0	0
		LA	8	4	0	4
		Total	127	74	37	81

Note: * LA was Tween 80 agar for screening lipase activity, PA was skimmed milk agar for screening protease activity

** LA= Lipase activity with enzymatic index > 0.1 cm, PA= Protease activity with enzymatic index > 0.1 cm

Table 14 Enzymatic index of lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment under anaerobic condition and cultured on media under aerobic and anaerobic conditions for 48 h

Source	Cultured conditions on media	1st media*	Isolate codes	Enzymatic index in 2nd media (cm) and (degree of hydrolysis**)	
				LA	PA
EM for smell reduction	aerobic	PA	SNP1	0.5 (+)	1.0 (++)
		LA	SNL1	0.6 (+)	2.0 (+++)
	anaerobic	PA	ND	-	-
		LA	ND	-	-
Sludge from microorganisms collecting sludge pond	aerobic	PA	INP1	-	0 (-)
			INP2	-	0 (-)
			INP3	0.3 (+)	1.5 (++)
			INP4	0 (-)	1.0 (+++)
			INP5	0.4 (+)	1.5 (++)
			INP6	0.3 (+)	2.0 (+++)
			INP7	0.4 (+)	1.5 (++)
			INP8	0.4 (+)	1.0 (++)
		LA	INL1	0.3 (+)	1.2 (++)
			INL2	0.8 (+)	1.2 (++)
			INL3	1.4 (++)	1.2 (++)
			INL4	0.3 (+)	1.0 (++)
			INL5	0.6 (+)	0.5 (+)
			INL6	0.7 (+)	1.2 (++)
			INL7	0 (-)	-
			INL8	0 (-)	-
			INL9	0 (-)	-
			INL10	0.6 (+)	1.2 (++)
			INL11	1.8 (++)	2.0 (+++)
			INL12	1.0 (++)	0 (-)
			INL13	1.0 (++)	0 (-)

Source	Cultured conditions on media	1st media*	Isolate codes	Enzymatic index in 2nd media (cm) and (degree of hydrolysis**)	
				LA	PA
			INL14	0.4 (+)	0 (-)
			INL15	0.6 (+)	0 (-)
			INL16	2.7 (+++)	1.3 (++)
			INL17	0.4 (+)	0 (-)
			INL18	0.4 (+)	0 (-)
			INL19	1.5 (++)	0.5 (+)
			INL20	1.5 (++)	0 (-)
			INL21	0.2 (+)	0 (-)
			INL22	0.5 (+)	0 (-)
			INL23	2.8 (+++)	1.7 (++)
	anaerobic	PA	IANP1	-	0 (-)
			IANP2	-	0 (-)
			IANP3	-	0 (-)
			IANP4	-	0 (-)
			IANP5	-	0 (-)
			IANP6	-	0 (-)
			IANP7	-	0 (-)
			IANP8	0 (-)	2.7 (+++)
		LA	IANL1	0.6 (+)	0 (-)
			IANL2	0 (-)	-
			IANL3	0 (-)	-
			IANL4	0 (-)	-
			IANL5	0 (-)	-
			IANL6	2.0 (+++)	0 (-)
			IANL7	0 (-)	-
			IANL8	0 (-)	-
			IANL9	0.6 (+)	0 (-)
			IANL10	0.4 (+)	0 (-)
			IANL11	0.7 (+)	0 (-)

Source	Cultured conditions on media	1st media*	Isolate codes	Enzymatic index in 2nd media (cm) and (degree of hydrolysis**)	
				LA	PA
			IANL12	0.7 (+)	0 (-)
			IANL13	0.3 (+)	0 (-)
			IANL14	0.3 (+)	0 (-)
			IANL15	0.1 (+)	0 (-)
			IANL16	0 (-)	-
			IANL17	0.4 (+)	0 (-)
			IANL18	0 (-)	-
			IANL19	1.0 (++)	0 (-)
			IANL20	1.0 (++)	0 (-)
			IANL21	1.0 (++)	0 (-)
			IANL22	1.0 (++)	0 (-)
			IANL23	1.0 (++)	0 (-)
			IANL24	1.0 (++)	0 (-)
			IANL25	1.0 (++)	0 (-)
			IANL26	1.0 (++)	0 (-)
			IANL27	1.0 (++)-	0 (-)
Wastewater from oil trap	aerobic	PA	ND	-	-
		LA	ND	-	-
	anaerobic	PA	OTANP1	-	0 (-)
			OTANP2	0 (-)	1.0 (++)
			OTANP3	0 (-)	1.3 (++)
			OTANP4	-	0 (-)
			OTANP5	-	0 (-)
			OTANP6	-	0 (-)
			OTANP7	-	0 (-)
			OTANP8	-	0 (-)
			OTANP9	-	0 (-)
			OTANP10	0 (-)	1.5 (++)
			OTANP11	-	0 (-)

Source	Cultured conditions on media	1st media*	Isolate codes	Enzymatic index in 2nd media (cm) and (degree of hydrolysis**)	
				LA	PA
			OTANP12	-	0 (-)
			OTANP13	-	0 (-)
			OTANP14	-	0 (-)
			OTANP15	0 (-)	0.4 (++)
		LA	OTAN1	0 (-)	-
			OTAN2	0 (-)	-
			OTAN3	0 (-)	-
			OTAN4	0 (-)	-
			OTAN5	0 (-)	-
			OTAN6	0 (-)	-
			OTAN7	1.0 (++)	0 (-)
			OTAN8	0 (-)	-
			OTAN9	0.7 (+)	0 (-)
Scum from oil trap	aerobic	PA	OFNP1	0 (-)	1.0 (++)
			OFNP2	0.8 (+)	2.0 (+++)
			OFNP3	0.6 (+)	1.0 (++)
			OFNP4	0.1 (+)	2.0 (+++)
			OFNP5	0.7 (+)	1.5 (++)
			OFNP6	0.5 (+)	1.3 (++)
			OFNP7	0.4 (+)	1.3 (++)
		LA	OFNL1	0.4 (+)	0 (-)
			OFNL2	0 (-)	-
			OFNL3	0.8 (+)	0 (-)
			OFNL4	0 (-)	-
			OFNL5	1.0 (++)	0 (-)
			OFNL6	0 (-)	-
			OFNL7	1.3 (++)	0 (-)
			OFNL8	0.6 (+)	0 (-)
			OFNL9	0.3 (+)	0 (-)

Source	Cultured conditions on media	1st media*	Isolate codes	Enzymatic index in 2nd media (cm) and (degree of hydrolysis**)	
				LA	PA
			OFNL10	0.3 (+)	0 (-)
			OFNL11	0.6 (+)	1.3 (++)
			OFNL12	1.5 (++)	1.5 (++)
			OFNL13	0.8 (+)	1.3 (++)
			OFNL14	0.6 (+)	0 (-)
			OFNL15	2.0 (+++)	0 (-)
			OFNL16	0.2 (+)	1.2 (++)
			OFNL17	0.3 (+)	0 (-)
			OFNL18	0.5 (+)	1.0 (++)
			OFNL19	1.0 (++)	1.2 (++)
	anaerobic	PA	OFANP1	-	0 (-)
		LA	OFANL1	0 (-)	-
			OFANL2	0.6 (+)	0 (-)
			OFANL3	0 (-)	-
			OFANL4	0 (-)	-
			OFANL5	0.7 (+)	0 (-)
			OFANL6	0 (-)	-
			OFANL7	0.5 (+)	0 (-)
			OFANL8	0.5 (+)	0 (-)

Note: * LA and PA were media for screening lipase and protease activities, respectively

** Degree of hydrolysis (+) = 0-0.99 cm, (++) = 1.0-1.9 cm, (+++) > 2.0 cm

ND = not detected, - (dash) = no experiment

Table 15 Lipase and protease producing bacteria isolated from the wastewater treatment system of tuna canning industry by enrichment under anaerobic condition and cultured on media under aerobic and anaerobic conditions for 48 h

Microbial groups	Cultured conditions on media	Isolates*	Isolates**
Protease producing bacteria (no lipase production)	aerobic	SNP1 INP5, INP7, INP8 INL4, INL6, INL10 OFNP1, OFNP3, OFNP5, OFNP6, OFNP7 OFNL11, OFNL13, OFNL16, OFNL18	SNL1 INP4, INP6 OFNP2, OFNP4
	anaerobic	OTANP2, OTANP3, OTANP10, OTANP15	IANP8
Lipase producing bacteria (no protease production)	aerobic	INL1, INL2, INL12, INL13, INL14, INL15, INL17, INL18, INL19, INL20, INL21, INL22 OFNL1, OFNL3, OFNL5, OFNL7, OFNL8, OFNL9, OFNL10, OFNL14, OFNL17	OFNL15
	anaerobic	IANL1, IANL9, IANL10, IANL11, IANL12, IANL13, IANL14, IANL15, IANL17, IANL19, IANL20, IANL21, IANL22, IANL23, IANL24, IANL25, IANL26, IANL27 OTANL7, OTANL9 OFANL2, OFANL5, OFANL7, OFANL8	IANL6
Protease and lipase producing bacteria	aerobic	INP3 INL3, INL5 OFNL12, OFNL19	INL11, INL16, INL23
	anaerobic	-	-

Note: *Microbial groups were defined from enzyme activity with enzymatic index = 0.1-1.9 cm

**Microbial groups were defined from enzyme activity with enzymatic index > 2 cm

3.2 ขั้นทุติยภูมิ

3.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสเพื่อใช้ย่อยตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันในสภาวะมีอากาศ

จากการนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสที่คัดเลือกได้จากขั้นปฐมภูมิในสภาวะมีอากาศทั้งหมด 16 ไอโซเลต ได้แก่ SSP1, SNL1, ISP3, ISL1, ISL2, ISL3, ISL4, INP4, INP6, INL11, INL16, INL23, OTSP2, OFNP2, OFNP4 และ OFNL15 เปรียบเทียบกับการไม่เติมเชื้อ (Control) มาทำการคัดเลือกอีกครั้ง โดยศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสเพื่อใช้ย่อยตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันในสภาวะมีอากาศโดยมีการเขย่าที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับร้อยละ 80:20 ที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนหัวเชื้อ หลังสิ้นสุดการปรับสภาพตะกอนลอยจะทำการวัดค่าปริมาณตะกอน SVI, ค่าพีเอช, ปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งแขวนลอย, ค่าซีโอดีละลายน้ำ, กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส เพื่อตรวจดูความสามารถในการย่อยสลายตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

1) ผลต่อปริมาณตะกอนจากการวัดค่า SVI (sludge volume index)

Figure 17 แสดงผลของปริมาณตะกอนจากการวัดค่า SVI (sludge volume index) หลังทำการทดลองย่อยสลายตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันเป็นเวลา 3 วัน พบว่า ทั้งชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนลอย เมื่อย่อยสลายตะกอนด้วยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสไม่สามารถหาค่า SVI ได้ แต่ลักษณะของตะกอนเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม คือ มีลักษณะเป็นของเหลวมากขึ้นและมีปริมาณของแข็งลดน้อยลงหรือปริมาณตะกอนลดลง เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าและเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ แต่จากการวัดผลของปริมาณตะกอนนี้ไม่สามารถบอกได้ว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้นไอโซเลตใดสามารถย่อยสลายตะกอนได้ดีกว่ากัน ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจวัดพารามิเตอร์อื่นๆ เพื่อยืนยันและคัดเลือกหาไอโซเลตที่สามารถย่อยสลายตะกอนได้ดีที่สุด

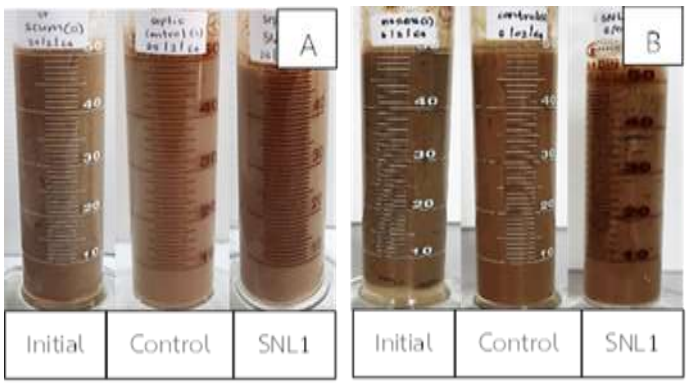


Figure 17 SVI values before and after the digestion of scum from oil trap using lipase and protease producing bacteria with shaking at 150 rpm for 72 h under sterile conditions (A), and non-sterile conditions (B) (scum is the initial value before digestion; control is the value after digestion without microorganism addition).

2) ผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (pH)

เมื่อพิจารณาผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช พบว่าชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนลอย มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 5.71 ไปจนถึง 5.96 ถึง 6.43 เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ของการหมัก ในขณะที่ชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนมีค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 5.96 ไปจนถึง 5.93 ถึง 6.55 จะเห็นว่า OTSP2 ซึ่งจัดว่าเป็น protease producing bacteria ให้ค่าพีเอชที่สูงขึ้นอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพื่อย่อยสลายโปรตีนทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมีมากขึ้นตามการย่อยสลายไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าพีเอชในระบบเพิ่มมากขึ้น แสดงผลดัง (Figure 18A)

3) ผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) และปริมาณของแข็งแขวนลอย (SS)

หลังจากทำการย่อยตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง Figure 18B, 18C แสดงผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งแขวนลอยพบว่า ในชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน ปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งแขวนลอยมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับตะกอนเริ่มต้น ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นมีการเจริญและย่อยสลายของแข็งในตะกอนเพื่อใช้ในการเจริญ แต่ในชุดการทดลองที่มีการผ่านฆ่าเชื้อตะกอนเมื่อเติมแบคทีเรียที่คัดแยกได้ พบว่าปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งแขวนลอยมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับตะกอนเริ่มต้น แสดงให้เห็นว่าชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่า

เชื้อตะกอนเมื่อเติมแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพิ่มลงไปในระบบอาจจะเจริญได้ไม่ดีเท่ากับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ประจำถิ่น อย่างไรก็ตามจากการสังเกตด้วยตาจะเห็นว่าการเติมจุลินทรีย์จะช่วยทำให้ความข้นและหนืดของสารตั้งต้นลดลง ดังนั้นผลของปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งแขวนลอยจึงไม่สามารถบอกได้ว่าเชื้อไอโซเลตใดที่ย่อยตะกอนได้ดีกว่ากันจึงต้องมีการวัดค่าซีโอดีละลายน้ำในการทดลองถัดไป

4) ผลของต่อการเปลี่ยนแปลงค่าซีโอดีละลายน้ำ (sCOD)

Figure 19A แสดงผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าซีโอดีละลายน้ำ พบว่า ชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน สามารถลดปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งแขวนลอยจึงทำให้ค่าซีโอดีละลายน้ำลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดเริ่มต้น อาจเป็นเพราะว่าเมื่อสารอินทรีย์ถูกออกซิไดซ์ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ จึงทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้ของจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อยู่ในตะกอน หรืออาจเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์บางกลุ่มสามารถออกซิไดซ์สารอินทรีย์และปลดปล่อยเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีการฆ่าเชื้อตะกอน ค่าซีโอดีละลายน้ำเพิ่มขึ้น เนื่องจากสารอินทรีย์ในรูปของแข็งถูกออกซิไดซ์ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้หรือเมื่อถูกความร้อนจึงทำให้ไขมันเกิดการแตกตัว เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่า ไอโซเลต INL11 มีปริมาณค่าซีโอดีละลายน้ำสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 17.02 กรัมต่อลิตร เนื่องจากแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสออกมาย่อยตะกอนที่มีองค์ประกอบของโปรตีนและไขมันเป็นหลัก ทำให้ของแข็งถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของซีโอดีละลายน้ำ แต่ในการใช้งานจริงจำเป็นที่จะต้องใช้แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายตะกอนลอยได้ในระบบบำบัดน้ำเสียซึ่งเป็นการยากที่จะฆ่าเชื้อในตะกอนลอยทั้งบ่อ นอกจากนี้ยังเป็นการสิ้นเปลืองพลังงานไฟฟ้าอีกด้วย ดังนั้นจึงต้องมีการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสในการทดลองถัดไป

5) กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity) และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (Protease activity)

จากการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสจากการย่อยสลายตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันด้วยแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้เป็นระยะเวลา 3 วัน ของชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนลอย พบว่า ทุกไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์โปรติเอสได้ โดยไอโซเลต SNL1 มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 177.45 ยูนิตต่อลิตร และ 1,695 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ ไอโซเลต INL11 ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 149.28 ยูนิตต่อลิตร และมีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส เท่ากับ 158.39 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ (Figure 19B, 19C) นอกจากนี้ในชุดการ

ทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนลอย พบว่า ทุกไอโซเลตมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสเช่นเดียวกัน โดยไอโซเลต SNL1 มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 368.99 ยูนิตต่อลิตร และ 2,063.83 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนลอย พบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสต่ำกว่าชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ อาจเป็นเพราะมีจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่ด้วยจึงเกิดการแย่งอาหารกันทำให้จุลินทรีย์ที่เติมลงไปเจริญได้ช้า หรืออาจจะเกิดจากการใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่น้อยเกินไป

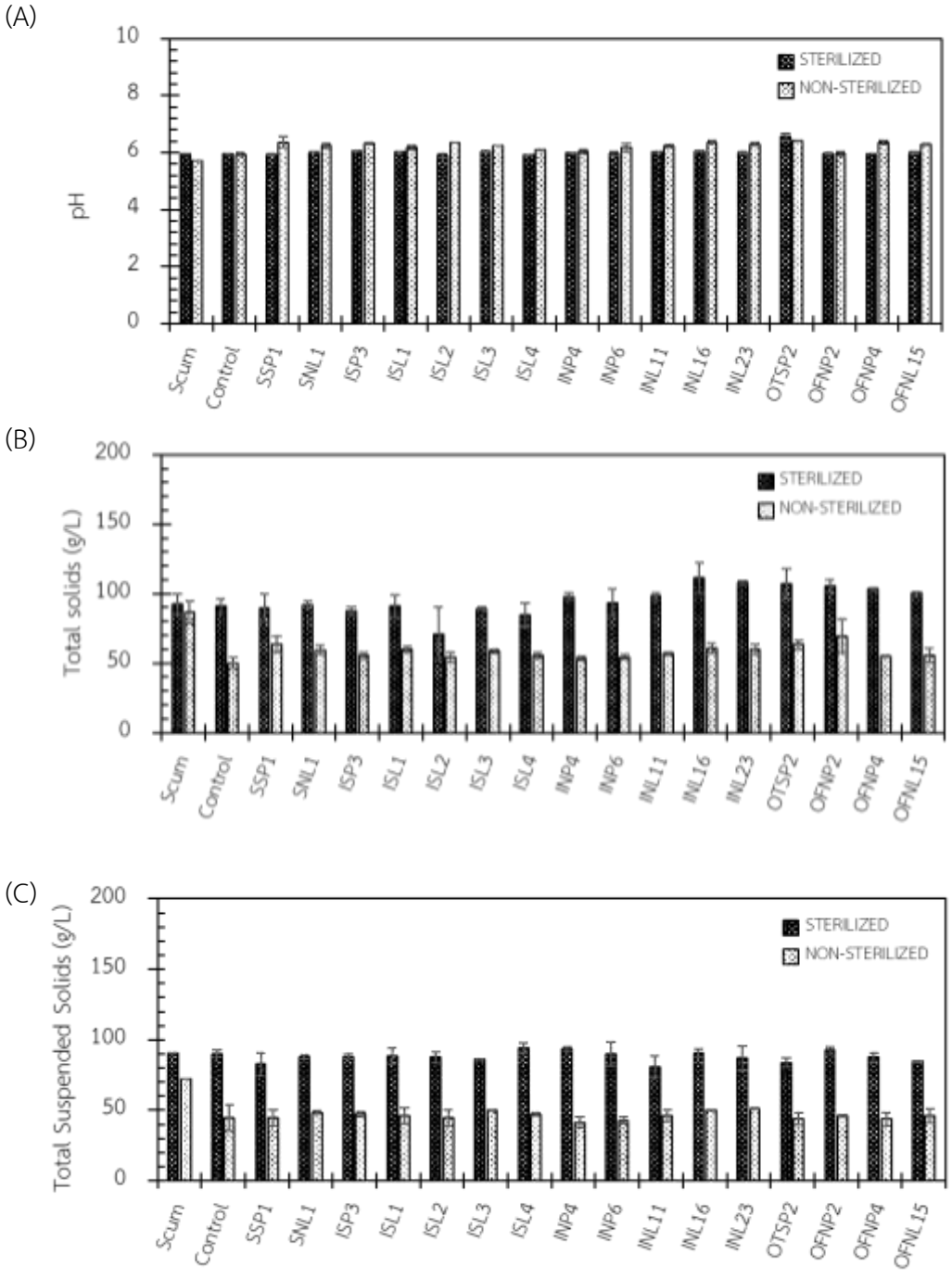


Figure 18 pH (A), total solids (B), and total suspended solids (c) before and after the digestion of scum from oil trap using lipase and protease producing bacteria under sterile and non-sterile conditions with shaking at 150 rpm for 72 h (scum is the initial value before digestion; control is the value after digestion without microorganism addition).

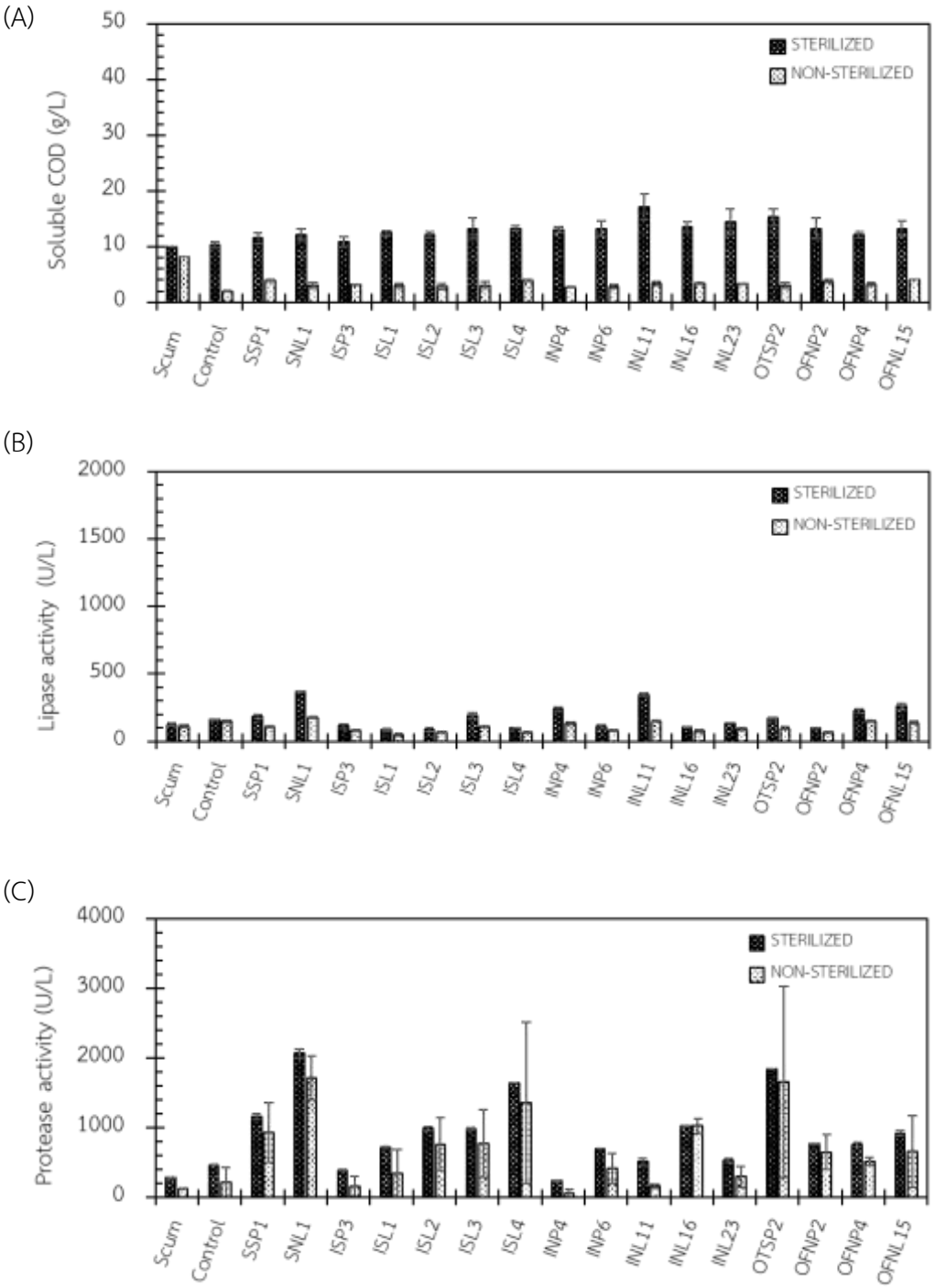


Figure 19 Soluble COD (A), lipase activity (B), and protease activity (c) before and after the digestion of scum from oil trap using lipase and protease producing bacteria under sterile and non-sterile conditions with shaking at 150 rpm for 72 h (scum is the initial value before digestion; control is the value after digestion without microorganism addition).

3.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสเพื่อใช้ย่อยตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันในสภาวะไร้อากาศ

จากการนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสที่คัดเลือกได้จากขั้นปฐมภูมิทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ IANP8 และ IANL6 เปรียบเทียบกับการไม่เติมเชื้อ (Control) มาทำการคัดเลือกอีกครั้ง โดยศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสเพื่อใช้ย่อยตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันในสภาวะไร้อากาศโดยไม่มีการเขย่าที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับร้อยละ 80:20 ที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนหัวเชื้อ หลังสิ้นสุดการปรับสภาพตะกอนลอยจะทำการวัดค่าปริมาณตะกอน SVI, ค่าพีเอช, ปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งแขวนลอย, ค่าซีโอดีละลายน้ำ, กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส เพื่อตรวจดูความสามารถในการย่อยสลายตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

1) ผลต่อปริมาณตะกอนจากการวัดค่า SVI (sludge volume index)

Figure 20 แสดงผลของปริมาณตะกอนจากการวัดค่า SVI หลังทำการทดลองย่อยสลายตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันเป็นเวลา 3 วัน พบว่า ทั้งชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน เมื่อย่อยสลายตะกอนด้วยเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส ไม่สามารถหาค่า SVI ได้ แต่ลักษณะของตะกอนเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม คือ มีลักษณะเป็นของเหลวและมีความหนืดมากขึ้น แต่ปริมาณของแข็งลดน้อยลง หรือ ปริมาณตะกอนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า แต่เมื่อเทียบกับชุดที่ย่อยสลายในสภาวะมีอากาศ (ข้อ 3.2.1 ข้อ 1 ย่อย) พบว่า การกวนให้อากาศเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ตะกอนลดลงมากกว่าเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า แสดงว่าการให้อากาศจะทำให้เกิดการย่อยสลายได้ดีขึ้น Agostinho และคณะ (2022) รายงานว่า การกวนให้อากาศหรือการเติมอากาศเป็นหนึ่งในขั้นตอนที่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากที่สุดในการบำบัด แต่ทำให้การขนส่งของเหลวเกิดประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

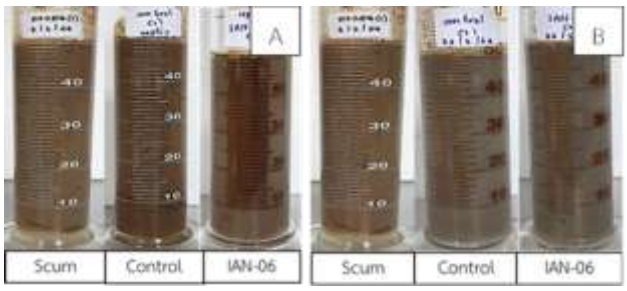


Figure 20 SVI values before and after the digestion of scum from oil trap using lipase and protease producing bacteria without shaking for 72 h under sterile conditions (A), and non-sterile conditions (B) (scum is the initial value before digestion; control is the value after digestion without microorganism addition).

2) ผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (pH)

เมื่อพิจารณาผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช พบว่า หลังทำการทดลองย่อยสลายตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันในสภาวะไร้อากาศเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่าเมื่อย่อยสลายตะกอนด้วยเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสในชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนพีเอชมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 5.98 ไปจนถึง 7.18-7.21 เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ของการหมัก ในขณะที่ชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนมีค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 5.98 ไปจนถึง 6.75-7.19 แสดงผลดัง (Figure 21A) เมื่อพิจารณาผลเปรียบเทียบกับชุดที่ย่อยสลายในสภาวะมีอากาศ (ข้อ 3.2.1 ข้อ 2 ย่อย) พบว่าการย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศมีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชสูงมากกว่าอาจเป็นเพราะเชื้อในกลุ่มไร้อากาศกำลังทำการย่อยสลายได้ดีเนื่องจากเคยชินกับตะกอนลอยในระบบบำบัดอยู่แล้ว

3) ผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) และปริมาณของแข็งแขวนลอย (SS)

เมื่อพิจารณาผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งแขวนลอย หลังจากทำการย่อยตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันเป็นระยะเวลา 3 วัน ในสภาวะไร้อากาศแสดงดัง (Figure 21B, 21C) พบว่า ในชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน ปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งแขวนลอยมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับตะกอนเริ่มต้น ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นมีการเจริญและย่อยสลายของแข็งในตะกอนเพื่อใช้ในการเจริญ แต่ในชุดการทดลองที่มีการผ่านฆ่าเชื้อตะกอน พบว่าปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งแขวนลอยมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับตะกอนเริ่มต้น แสดงให้เห็นว่าการจุลินทรีย์ที่เติมเพิ่มลงไปในระบบอาจจะเจริญได้ไม่ดีเท่ากับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ประจำถิ่น อย่างไรก็ตามจากการสังเกตด้วยตาจะเห็นว่าการเติม

จุลินทรีย์จะช่วยทำให้ความข้นและหนืดของสารตั้งต้นลดลง เมื่อพิจารณาผลเปรียบเทียบกับชุดที่ย่อยสลายในสภาวะมีอากาศ (ข้อ 3.2.1 ข้อ 3 ย่อย) พบว่า ปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งแขวนลอยเมื่อมีการเขย่าให้อากาศสามารถลดได้ดีกว่าไม่มีการเขย่าให้อากาศ อาจเป็นผลมาจากมีการถ่ายเทออกซิเจนมากกว่าส่งผลให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตจึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายของแข็ง

4) ผลของต่อการเปลี่ยนแปลงค่าซีโอดีละลายน้ำ (sCOD)

Figure 22A แสดงผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าซีโอดีละลายน้ำ พบว่า หลังทำการย่อยตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันในสภาวะไร้อากาศโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสเป็นระยะเวลา 3 วัน ในชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน ค่าซีโอดีละลายน้ำ เพิ่มขึ้นจาก 9.41 กรัมต่อลิตร ไปจนถึง 16.86 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ในรูปของแข็งให้อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ที่สามารถละลายน้ำได้ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน พบว่า IANP8 และ IANL6 มีค่าซีโอดีละลายน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและค่าเริ่มต้น อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียที่เติมลงไปช่วยส่งเสริมการย่อยสลายร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น เมื่อพิจารณาผลเปรียบเทียบกับชุดที่ย่อยสลายในสภาวะมีอากาศ (ข้อ 3.2.1 ข้อ 4 ย่อย) พบว่า ตะกอนลอยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีค่าซีโอดีละลายน้ำลดลงมากกว่า อาจเนื่องมาจากออกซิเจนละลายน้ำสูงขึ้นเพราะมีการเขย่าส่งผลให้แบคทีเรียกลุ่มต้องการอากาศมีการเจริญเติบโตและเกิดการย่อยสลายของแข็งเป็นซีโอดีละลายน้ำและง่ายต่อจุลินทรีย์บางกลุ่มที่สามารถใช้ซีโอดีละลายน้ำเพื่อการเจริญต่อไปหรือมีจุลินทรีย์บางกลุ่มซึ่งสามารถออกซิไดซ์สารอินทรีย์และปลดปล่อยเป็นคาร์บอนไดออกไซด์

5) กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity) และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (Protease activity)

จากการย่อยสลายตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันด้วยแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในสภาวะไร้อากาศเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่า ในชุดการทดลองที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนลอย ทั้งสองไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์โปรติเอสได้ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ของการย่อยสลาย (Figure 22B, 22C) เมื่อพิจารณาการประสิทธิภาพการย่อยบนอาหารแข็งพบว่ามีค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส ≥ 2 เซนติเมตร เนื่องจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งมีองค์ประกอบของสารอาหารที่สามารถนำไปใช้ได้ง่ายกว่าตะกอนลอยที่มีองค์ประกอบเชิงซ้อน เมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยตะกอนลอยในสภาวะมีอากาศพบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสสูงถึง 3 และ 10 เท่า ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าองค์ประกอบของ

ซับสเตรทมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ โดยที่ตัวอย่างตะกอนลอยมีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 22.33 ซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย รวมถึงสภาวะที่เพาะเลี้ยงก็มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เช่นกัน ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหารกับการให้อากาศและการเขย่า ดังนั้นการให้อากาศระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจึงสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปติเอสจากขั้นทุติยภูมิจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถย่อยสลายและผลิตเอนไซม์ในสภาวะให้อากาศได้ดีกว่าในสภาวะไร้อากาศ เมื่อสังเกตจากลักษณะของตะกอน พบว่า มีลักษณะเหลวขึ้นเมื่อทำการย่อยสลายผ่านไป 3 วัน ในขณะที่ผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งทั้งหมดและของแข็งแขวนลอยไม่สามารถบอกได้ว่าไอโซเลตมีประสิทธิภาพการย่อยสลายตะกอนลอยได้ดีกว่ากัน จึงพิจารณาผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าซีโอดีละลายน้ำ พบว่า ไอโซเลต INL11 มีค่าซีโอดีละลายน้ำสูงที่สุด (ในชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนลอย) และจากการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส พบว่า ไอโซเลต SNL1 ให้กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสสูงที่สุด จะเห็นได้ว่าทั้งสองไอโซเลตที่คัดแยกได้มาจากแหล่งตัวอย่าง คือ ตะกอนจากบ่อรวบรวมตะกอน และหัวเชื้อดับกลิ่นของโรงงาน ตามลำดับ โดยตัวอย่างตะกอนจากบ่อรวบรวมตะกอนทางโรงงานจะมีการให้อากาศภายในบ่อวันละ 2 ชั่วโมง จึงคาดว่าจะพบจุลินทรีย์กลุ่ม facultative anaerobes เป็นส่วนใหญ่ และเมื่อนำมา enrichment ภายใต้สภาวะไร้อากาศที่เลี้ยงบนอาหารแข็งกลุ่ม facultative anaerobes จึงสามารถเจริญได้เมื่อบ่มภายใต้สภาวะมีอากาศ ดังนั้นจึงเลือกไอโซเลต SNL1 และ INL11 ที่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobes นำไปศึกษาการปรับสภาพก่อนการผลิตแก๊สชีวภาพในขั้นตอนต่อไป

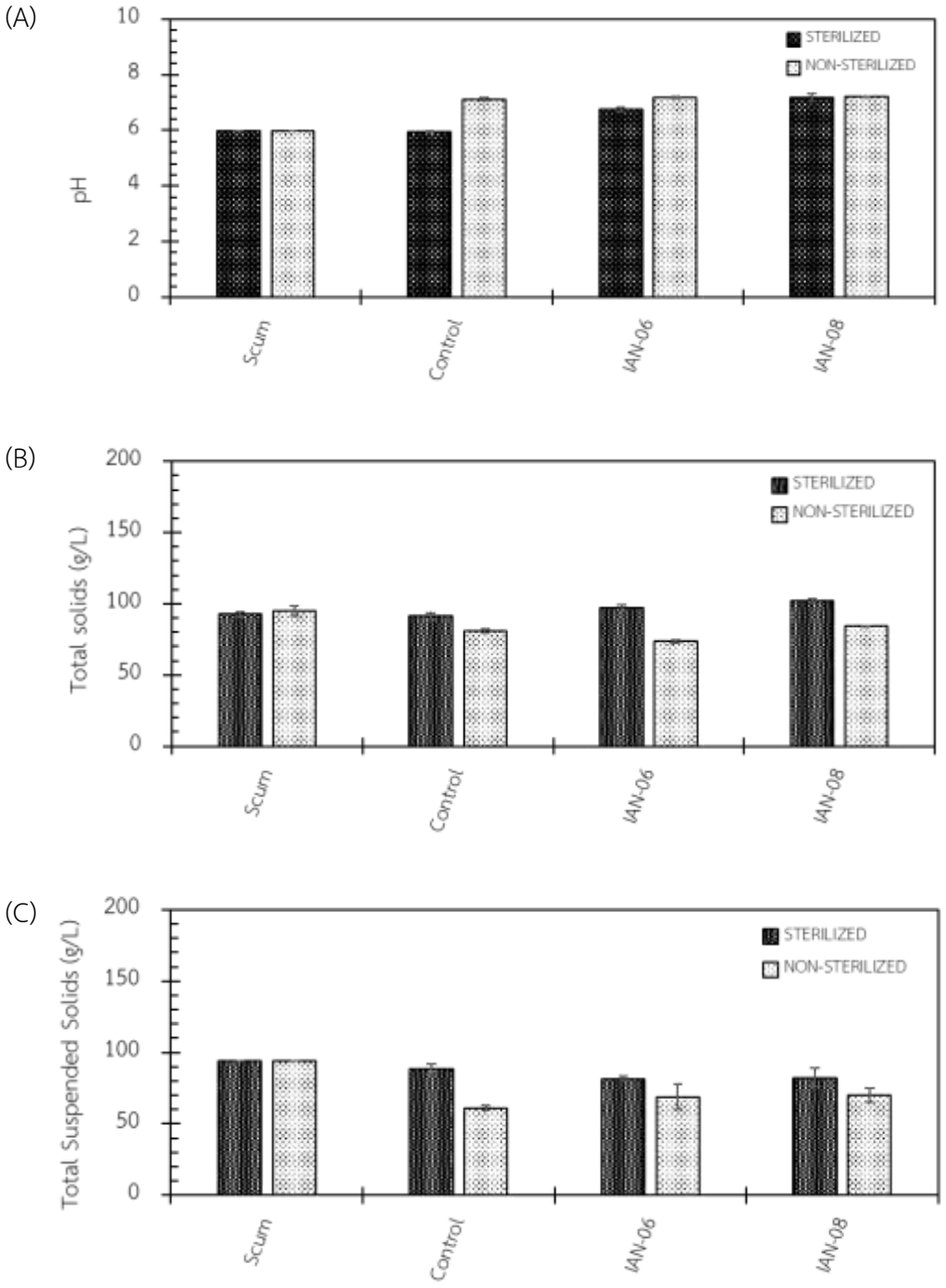


Figure 21 pH (A), total solids (B), and total Suspended Solids (c) before and after the digestion of scum from oil trap using lipase and protease producing bacteria under sterile and non-sterile conditions without shaking for 72 h (scum is the initial value before digestion; control is the value after digestion without microorganism addition).

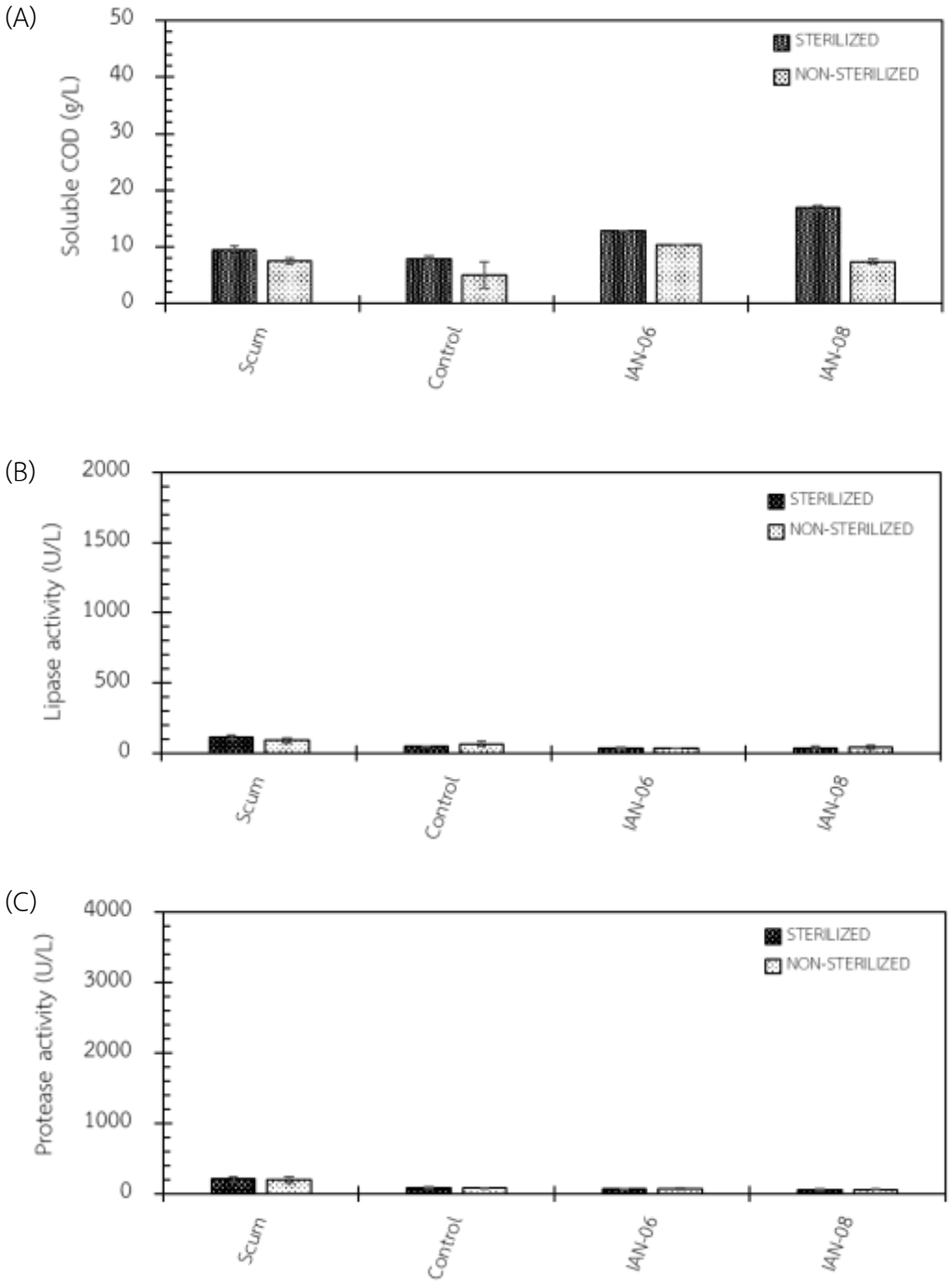


Figure 22 Soluble COD (A), lipase activity (B), and protease activity (c) before and after the digestion of scum from oil trap using lipase and protease producing bacteria under sterile and non-sterile conditions without shaking for 72 h (scum is the initial value before digestion; control is the value after digestion without microorganism addition).

3.3 การเทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกเพื่อใช้ในการย่อยสลายตะกอนลอยจากบ่อดักไขมัน

จากการคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสจากตัวอย่างตะกอนและน้ำเสียบ่อดักไขมันจากโรงงานปลาทูน่ากระป๋อง สามารถคัดเลือกได้ 2 ไอโซเลต ได้แก่ SNL1 และ INL11 นำมาจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA โดยใช้ Universal primer คือ 27F, 518F และ 1099F ในเชื้อไอโซเลต SNL1 และ 11F, 518F และ 1099F ในเชื้อไอโซเลต INL11 ซึ่งทำการส่งผลวิเคราะห์ตัวอย่างที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต SNL1 มีความเหมือนกับ *Bacillus cereus* (Identities) เท่ากับร้อยละ 100 ทั้งหมด 1465 คู่เบส และแบคทีเรียไอโซเลต INL11 มีความเหมือนกับ *Aeromonas caviae* (Identities) เท่ากับร้อยละ 100 ทั้งหมด 1434 คู่เบส (Table 16) ซึ่งทั้งสองไอโซเลตเป็นแบคทีเรียจัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobes อีกทั้งยังเป็นเชื้อก่อโรคอีกด้วย อย่างไรก็ตามยังคงมีการนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้ในการศึกษาอยู่เช่น รายงานของ Karim และคณะ (2019) ที่ทำการประเมินศักยภาพของ *Bacillus cereus* ในการสะสมไขมันและการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มโดยใช้ระบบการหมักแบบกะ เจือจางน้ำทิ้งที่ร้อยละ 25 50 75 และ 100 เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเลี้ยงเชื้อและการสะสมไขมัน พบว่า การเจือจางน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตรต่อปริมาตร มีศักยภาพในการเติบโตของมวลชีวภาพสูงสุด 8.09 กรัมต่อลิตร และมีการสะสมของไขมันเท่ากับ 1.46 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณไขมันร้อยละ 18.04 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีพบการกำจัดสูงถึงร้อยละ 79.35 และจากรายงานของ Rozitis และ Strade (2015) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากตะกอนเร่งของกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางอุตสาหกรรม Grindeks ของ JSC และทำการประเมินประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีของแต่ละไอโซเลต ผลการทดลองพบว่า สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ 65 ไอโซเลต และเมื่อทดสอบความสามารถในการกำจัดซีโอดีในน้ำเสียซึ่งมีซีโอดีเท่ากับ 2300-3500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า กลุ่มของเชื้อรา ได้แก่ *Fusarium udum* และ *F. solani* สามารถกำจัดซีโอดีได้สูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 88.7 และร้อยละ 89.4 ตามลำดับ รองลงมาคือกลุ่มแบคทีเรีย ได้แก่ *A. caviae* และ *Sphingobacterium thalpophilum* โดยมีการกำจัดซีโอดีเท่ากับร้อยละ 78.1 และร้อยละ 75.9 ตามลำดับ

Table 16 16S rDNA gene identification of lipase and protease producing bacteria

Source	Isolate	DDBJ Accession number	Species	Identity (%)
EM for smell reduction	SNL1	-	*Bacillus cereus*	100
Sludge from collecting sludge pond	INL11	-	*Aeromonas caviae*	100

อย่างไรก็ตามยังพบว่า ทั้งสองไอโซเลตเป็นแบคทีเรียที่มีสามารถผลิตเอนไซม์ได้อีกด้วย โดยรายงานของ Demirkan และคณะ (2021) ในการศึกษานี้คัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดินบนอาหารแข็ง tributyrin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบเพียงหนึ่งไอโซเลตที่มีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 2 เมื่อนำไปเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับ 16S rRNA พบว่าเป็น *B. cereus* ATA179 เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันมะกอกร้อยละ 1 เป็นสารเหนี่ยวนำในการผลิตเอนไซม์ไลเปส บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 6.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Schmidt-Dannert และคณะ (1997) พบ *B. thermocatenulatus* ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่เวลา 16 ชั่วโมง สำหรับงานวิจัยของ Sharma และคณะ (2002) รายงานว่า *Bacillus* RSJ1 ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ในขณะที่สายพันธุ์ *Bacillus*, *B. cereus* และ *B. coagulans* ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง (Sarkar และคณะ, 1998) และ *B. methylotrophicus* PS3 ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่เวลา 60 ชั่วโมง (Sharma และคณะ, 2017) นอกจากนี้รายงานของ Rathakrishnan และ Nagarajan (2011) ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. cereus* โดยใช้เปลือกถั่วแดงเป็นซับสเตรตและใช้การหมักแบบอาหารแข็ง (Solid-State Fermentation; SSF) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 262 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรต ที่เวลา 48 ชั่วโมง จากรายงานของ Datta และ Varughese (2017) ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากตัวอย่างดินบนอาหารแข็ง milk-NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบเพียงหนึ่งไอโซเลตที่มีการย่อยสลายบนอาหารแข็ง เมื่อนำไปเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับ 16S rRNA พบว่าเป็น *A. caviae* P-1-1 เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของ fructose ร้อยละ 1, yeast extract ร้อยละ 1, NH_4SO_4 ร้อยละ 0.1, NaCl ร้อยละ 3, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ร้อยละ 0.1, glycine ร้อยละ 1, vitamin E ร้อยละ 0.1, และ

tween 40 ร้อยละ 0.1 ที่พีเอช บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 0.128 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ O'reilly และ Day (1983) พบ *A. hydrophila* ผลิตเอนไซม์โปรตอเอสสูงสุดเมื่อใช้ yeast extract และ tryptone ร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งไนโตรเจน ในขณะที่งานวิจัยของ Mehta และคณะ (2006) รายงานว่า *Streptomyces sp.* ผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเมื่อใช้ tryptone, yeast extract และ peptone ร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งไนโตรเจน อีกทั้งแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* และ Aeromonas ยังสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มไฮโดรไลติกชนิดอื่น ได้แก่ อะไมเลส เซลูเลส ไซลาเนส อินนูลิเนสและเพกทิเนส เป็นต้น (Karray และคณะ, 2018; Aarti และคณะ, 2020)

4. ศึกษาผลการปรับสภาพตะกอนลอย (pretreatment) ด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้และศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนจากตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันที่ผ่านการปรับสภาพ (Biochemical Methane Potential, BMP) ในระดับขวดทดลองโดยใช้ระบบการหมักแบบกะ

4.1 ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพแบบ biostimulation และ bioaugmentation ต่อการย่อยตะกอนและการผลิตแก๊สชีวภาพ

จากการทดลองการปรับสภาพที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับร้อยละ 80:20 บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

Figure 23 แสดงผลการปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile condition) (Figure 23A) และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (non-sterile condition) (Figure 23B) ตะกอน โดยทำการปรับสภาพแบบ biostimulation (มีการกวนให้อากาศแต่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย) และ bioaugmentation (เติมแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากขั้นทุติยภูมิ) พบว่า ในชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนหลังจากการปรับสภาพเป็นระยะเวลา 7 วัน การปรับสภาพโดย biostimulation มีค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในช่วง 6.43-6.54 และจากการปรับสภาพโดย bioaugmentation ของ SNL1 พบค่าพีเอชลดลงจาก 6.54 เป็น 6.24 เนื่องจาก SNL1 มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภทไขมัน ส่งผลให้ค่าพีเอชในระบบลดลงเพราะมีความเป็นกรด ในขณะที่ INL11 พบค่าพีเอชเพิ่มขึ้น (อยู่ในช่วง 6.69-6.88) จากการปลดปล่อยแอมโมเนียที่มากขึ้นตามการย่อยสลายของไนโตรเจน เนื่องมาจาก INL11 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพื่อย่อยสารอินทรีย์ประเภทโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน พบพีเอชเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการปรับสภาพจากการทดลองทั้งแบบ biostimulation และ bioaugmentation (biostimulation มีพีเอชอยู่ในช่วง 6.68-7.05, bioaugmentation ด้วย SNL1 และ INL11 มีพีเอชอยู่ในช่วง 6.76-7.37 และ 6.78-7.32 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 (6.53) ของการปรับสภาพ) เนื่องมาจากเกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นควบคู่ไปกับการกวนให้อากาศ ในขณะที่เมื่อมีการเติม SNL1 และ INL11 แบคทีเรียเหล่านี้อาจส่งเสริมการทำงานหรือทำงานร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นจึงส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชสูงกว่า ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่มโปรติโอไลติกเป็นหลัก อย่างไรก็ตามช่วงพีเอชจากการทดลองซึ่งอยู่ในช่วง 6-7 เป็นช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์

นอกจากนี้ผลของค่าซีโอดีละลายน้ำของชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนหลังจากปรับสภาพเป็นเวลา 7 วัน ของทั้งสองแบบ พบว่า มีค่าซีโอดีละลายน้ำเพิ่มขึ้นจาก 6.35 กรัมต่อลิตร โดย bioaugmentation มีค่าซีโอดีละลายน้ำสูงสุดในวันที่ 5 (10.6 (SNL1) และ 12.4

(INL11) กรัมต่อลิตร) ในขณะที่การปรับสภาพโดย biostimulation (9.11 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7) จำเป็นต้องใช้เวลาพอสมควรเพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์เนื่องจากมีเพียงการกวนให้อากาศเพียงอย่างเดียวจึงส่งผลให้การย่อยสลายเกิดขึ้นได้ช้ากว่าชุดที่มีการเติมแบคทีเรีย (Orts และคณะ, 2019) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนพบค่าซีโอดีลดลงจาก 12.5 กรัมต่อลิตร อาจเนื่องมาจากมีจุลินทรีย์บางกลุ่มในตะกอนลอยใช้สารอินทรีย์ละลายน้ำเหล่านี้เพื่อการเจริญ หรือออกซิไดซ์สารอินทรีย์และปลดปล่อยเป็นคาร์บอนไดออกไซด์

จากการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ของตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพในชุดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน พบว่า เมื่อผ่านการปรับสภาพโดย biostimulation และ bioaugmentation ด้วย SNL1 และ INL11 พบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสสูงสุดในวันที่ 7 ของการย่อยสลาย (เอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 140.8, 169.0 และ 166.2 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ และเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 195.9, 196.4 และ 716.9 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนพบว่า การปรับสภาพโดย biostimulation พบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในวันที่ 5 (405.6 ยูนิตต่อลิตร) และพบค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรตเอสต่ำ อย่างไรก็ตาม biostimulation แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยกว่า การปรับสภาพด้วย bioaugmentation ของ INL11 มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสสูงสุดในวันที่ 5 โดยมีค่าเท่ากับ 325.6 และ 80.3 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ SNL1 ยังแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลปเปสสูงสุดเท่ากับ 605.6 ยูนิตต่อลิตร (วันที่ 5) แต่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่ำ เนื่องมาจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อยู่ในตะกอนลอยมีการย่อยสลายองค์ประกอบของไขมันก่อนการย่อยสลายโปรตีนส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำกว่าเอนไซม์ไลเปส เมื่อพิจารณาปริมาณของแข็งทั้งหมดและของแข็งแขวนลอยหลังจากปรับสภาพตะกอนลอย (Table 17) พบว่า bioaugmentation สามารถลดปริมาณของแข็งได้ดีกว่า biostimulation ทั้งในชุดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (พบการย่อยสลายทางชีวภาพเท่ากับร้อยละ 37.8 (INL11), 20.1 (SNL1) และ 18.7 ตามลำดับ) และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน (การย่อยสลายทางชีวภาพเท่ากับร้อยละ 30.0 (SNL1), 20.8 (INL11) และ 18.0 ตามลำดับ) ซึ่งการย่อยสลายทางชีวภาพของตะกอนลอยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อในการศึกษานี้ (ร้อยละ 18-37) สูงกว่าการย่อยสลายทางชีวภาพของไขมันที่เป็นของเสียจากโรงงานสัตว์ปีกที่รายงานโดย Affes และคณะ (2017) ที่พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง Staphylococcus xylosus เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส ที่อัตราเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 วัน มีการย่อยสลายทางชีวภาพของไขมันเพียงร้อยละ 5

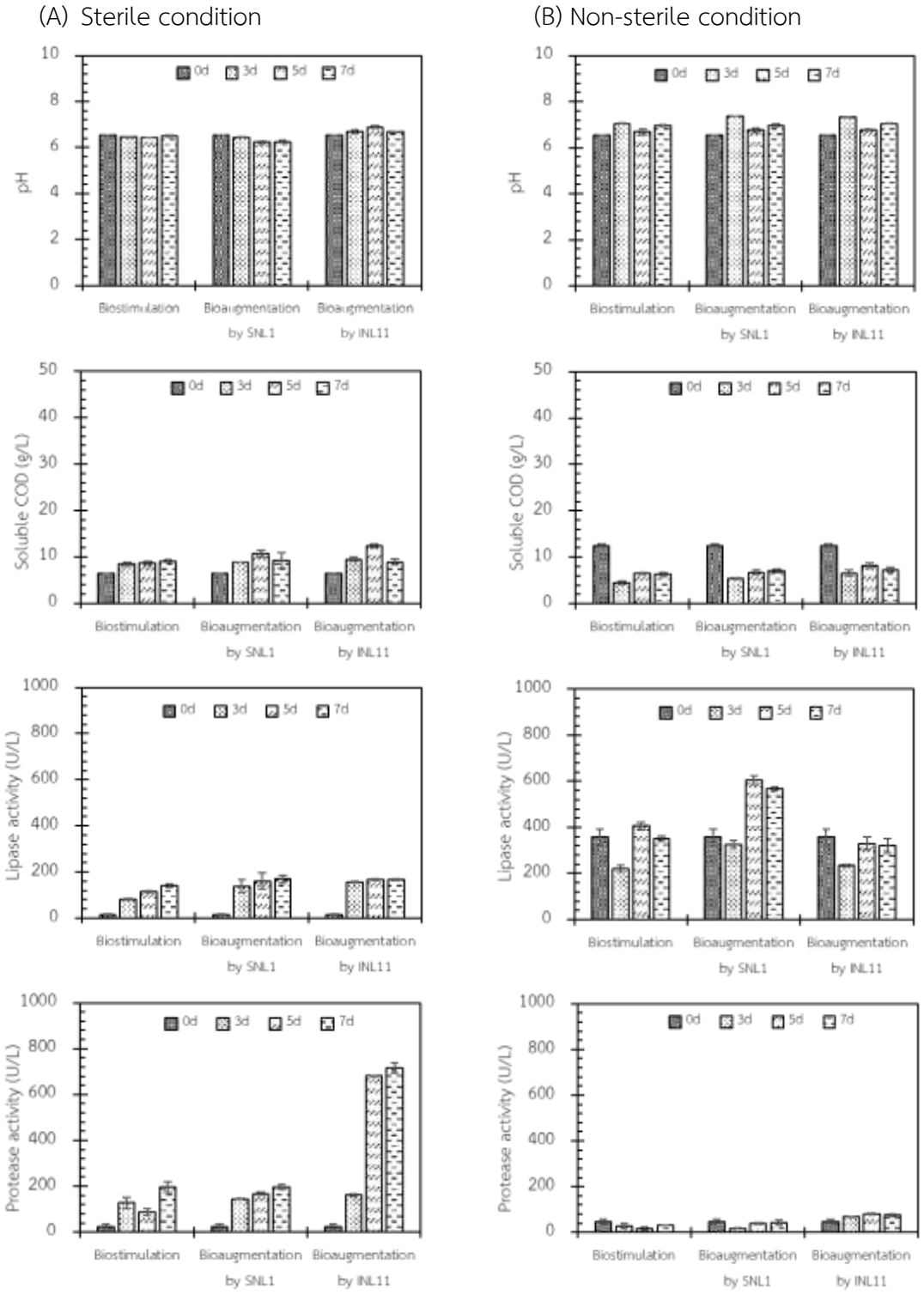


Figure 23 pH, soluble COD, lipase activity, and protease activity before and after the pretreatment of scum from oil trap without (control) and with using lipase and protease producing bacteria SNL1 and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking at 150 rpm for 3, 5 and 7 days.

Table 17 Pretreatment performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) using biostimulation without microbial inoculation and bioaugmentation by SNL1 and INL1 1 under sterile and non-sterile conditions with shaking at 150 rpm for 7 days

Parameters	Pretreatment of scum slurry under sterile condition for 7 days			
	Initial	Biostimulation	Bioaugmentation by SNL1	Bioaugmentation by INL11
TS (g/L)	119±2.58	96.8±13.1	95.1±5.23	74.0±2.56
TSS (g/L)	91.4±8.66	83.6±3.11	75.7±2.05	81.4±6.51
Biodegradation (%)	0.00	18.65	20.08	37.81
Parameters	Pretreatment of scum slurry under non-sterile condition for 7 days			
	Initial	Biostimulation	Bioaugmentation by SNL1	Bioaugmentation by INL11
TS (g/L)	112±7.28	92.6±7.71	79.0±12.3	89.4±5.13
TSS (g/L)	91.7±1.80	89.0±3.04	76.3±6.15	79.1±8.84
Biodegradation (%)	0.00	18.00	30.00	20.80

Note: Biodegradation based on total solid

หลังการปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันโดย biostimulation และ bioaugmentation ด้วย SNL1 และ INL11 ที่ 3, 5 และ 7 วัน ทำการทดลองผลิตแก๊สชีวภาพในขวดซีรั่มขนาด 120 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส Figure 24-27 แสดงผลการผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนสะสมที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศของตะกอนลอยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile condition) และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (non-sterile condition) พบว่า ในชุดการทดลองที่มีการฆ่าเชื้อตะกอน การปรับสภาพตะกอนลอยโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 และ INL11 ที่ระยะเวลาปรับสภาพ 5 วัน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนสะสมได้สูงกว่า biostimulation และ unpretreatment เนื่องมาจาก SNL1 และ INL11 ผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสเพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ ทำให้มีซีโอดีละลายน้ำเพิ่มขึ้นจากขั้นตอนการปรับสภาพและส่งผลให้จุลินทรีย์กลุ่มผลิตมีเทนนำสารอินทรีย์เหล่านี้มาใช้ได้ง่ายในขั้นตอนผลิตแก๊สชีวภาพ นอกจากนี้ตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพด้วย INL11 ให้ผลผลิตแก๊สชีวภาพสะสมและแก๊สมีเทนสะสมสูงสุดในวันที่ 45 เมื่อปรับสภาพระยะเวลา 5 วัน (421 mL และ 262 $mLCH_4$ ตามลำดับ) เช่นเดียวกับ ชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนที่พบการผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนสะสมสูงสุดเมื่อมีการปรับสภาพตะกอนลอยมันโดย bioaugmentation โดยชุดการทดลองของตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพด้วย INL11 เป็นระยะเวลา 5 วัน ให้การผลิตมีเทนสูงสุดเท่ากับ 916 $mLCH_4$

อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการปรับสภาพที่นานขึ้นจาก 5 วัน เป็น 7 วัน ไม่ได้เพิ่มผลผลิตแก๊สมีเทนแต่สามารถช่วยเร่งกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพให้เกิดได้เร็วกว่าเดิมในช่วงเริ่มต้นของการหมักเล็กน้อย โดยชุดการทดลองที่ผ่านการปรับสภาพด้วย SNL1 สามารถเร่งการผลิตแก๊สชีวภาพได้เร็วกว่าชุดการทดลองที่ผ่านการปรับสภาพด้วย INL11 เนื่องมาจากในช่วงเริ่มต้นการผลิตแก๊สชีวภาพอาจเกิดการแข่งขันแย่งอาหารกันของ INL11 และกลุ่ม facultative anaerobes อื่น ๆ ในระบบส่งผลให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ช้า ในขณะที่ SNL1 มีการปรับตัวและเจริญเติบโตได้เร็วกว่าในช่วงเริ่มต้นส่งผลให้มีการผลิตแก๊สชีวภาพได้เร็วกว่า

นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการกำจัดของแข็งทั้งหมดและค่าซีโอดีทั้งหมดจากการทดลองแสดงใน Table 18 พบว่า มีการกำจัดค่าซีโอดีที่สูงอย่างมีนัยสำคัญในชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน (tCOD เท่ากับร้อยละ 73-81) เมื่อผ่านการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 และ INL11 เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งพบการกำจัด COD ที่สูงในชุดการทดลองที่ผ่านการบำบัดด้วย INL11 โดยมีความสัมพันธ์กับปริมาณมีเทนที่สูงขึ้น (ร้อยละ 64) อย่างไรก็ตาม SNL1 ให้การผลิตมีเทนสูงสุดด้วยผลผลิตมีเทนเท่ากับ 586.09 $mLCH_4/gVS$ ในขณะที่ชุดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนพบ

การกำจัด COD ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างการปรับสภาพโดย biostimulation และ bioaugmentation สำหรับประสิทธิภาพโดยรวมพบว่า ผลผลิตมีเทนและการลดลงของสารอินทรีย์ของตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพด้วย bioaugmentation และ biostimulation นั้นสูงกว่าตะกอนลอยที่ไม่มีการปรับสภาพ (unpretreatment)

การศึกษานี้พบว่า การปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วยแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสและโปรติเอส (SNL1 และ INL11) ช่วยเพิ่มการผลิตมีเทนด้วยประสิทธิภาพที่สูงกว่าการปรับสภาพโดย biostimulation เมื่อให้ออกซิเจนเพียงอย่างเดียว เนื่องจากการผลิตเอนไซม์ของ SNL1 และ INL11 ช่วยเพิ่มการย่อยสลายของไขมันจากโครงสร้างที่มีความซับซ้อนให้เป็นโครงสร้างอย่างง่าย ในระหว่างขั้นตอนการปรับสภาพ ทำให้สามารถถูกใช้ได้ง่ายโดยแบคทีเรียที่ผลิตแก๊สมีเทน อย่างไรก็ตาม ผลผลิตมีเทนจากตะกอนลอยในการศึกษานี้สูงกว่าการศึกษาโดย Eiroa และคณะ (2012) โดยมีรายงานว่าผลผลิตมีเทนที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศของเศษปลาที่เป็นของแข็ง มีค่าเท่ากับ 260 $mLCH_4/gVS$ สาเหตุอาจมาจากลักษณะที่แตกต่างกันของของเสียและอัตราส่วนของเสียต่อหัวเชื้อ รวมถึงอัตราการโหลดของเสียที่สูงส่งผลให้เกิดการสะสมของกรดไขมันระเหยง่ายและกรดไขมันสายยาวจึงทำให้เกิดการผลิตแก๊สมีเทนต่ำ

จากการทดลองผลของระยะเวลาในการปรับสภาพตะกอนลอยต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ จะเห็นได้ว่าการปรับสภาพตะกอนลอยโดย bioaugmentation ด้วยแบคทีเรีย SNL1 ช่วยเพิ่มผลผลิตมีเทนได้สูงกว่าการปรับสภาพโดย biostimulation ด้วยการกวนให้อากาศเพียงอย่างเดียว โดยใช้ระยะเวลาปรับสภาพที่ 7 วัน ส่งผลให้เกิดการผลิตแก๊สได้รวดเร็วและมีความเหมาะสมสำหรับการย่อยสลายของตะกอนลอยเบื้องต้น ดังนั้นจึงมีการใช้ระยะเวลาการปรับสภาพที่ 7 วัน ในการทดลองถัดไป

(A) Sterile condition (B) Non-sterile condition

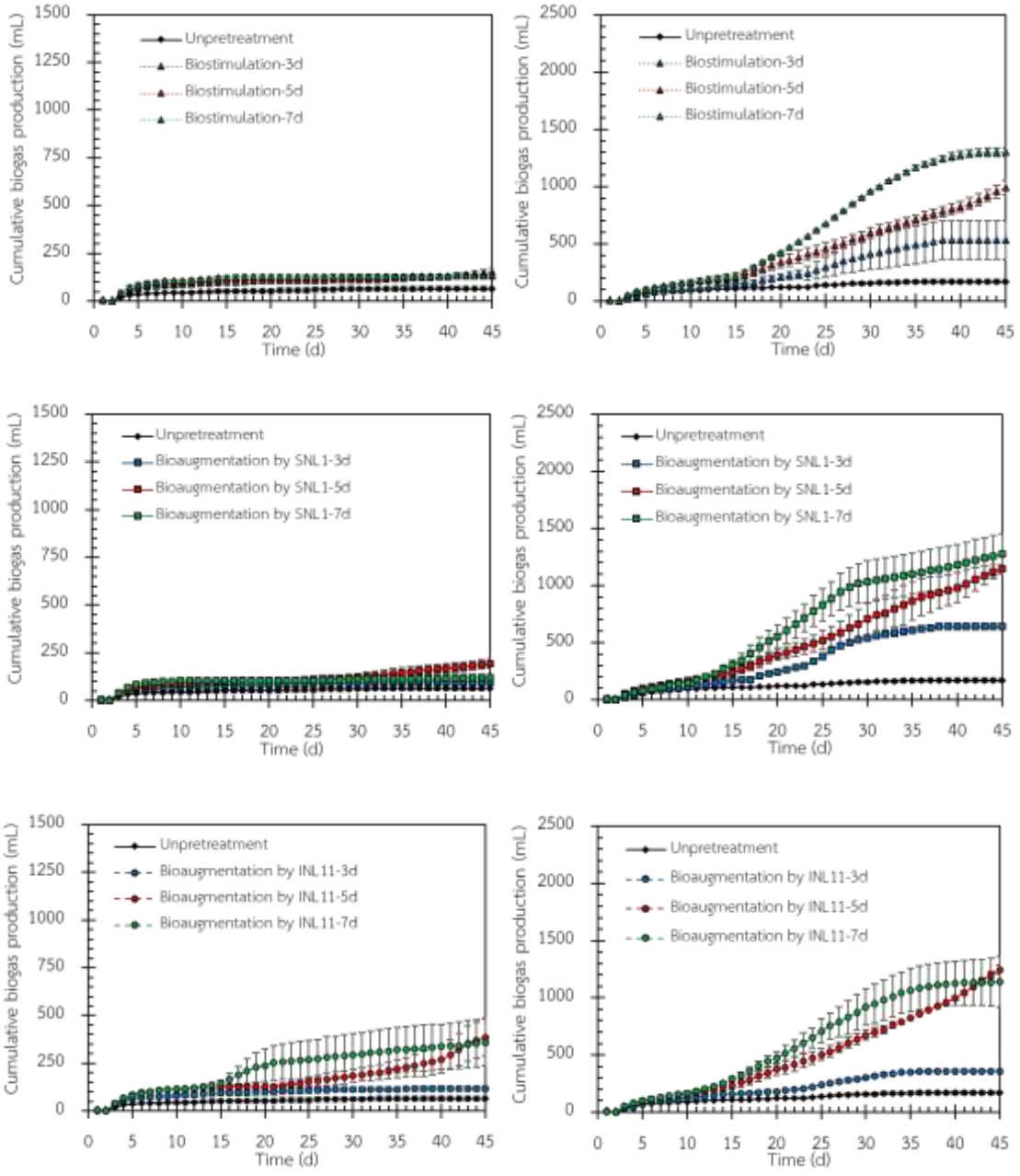
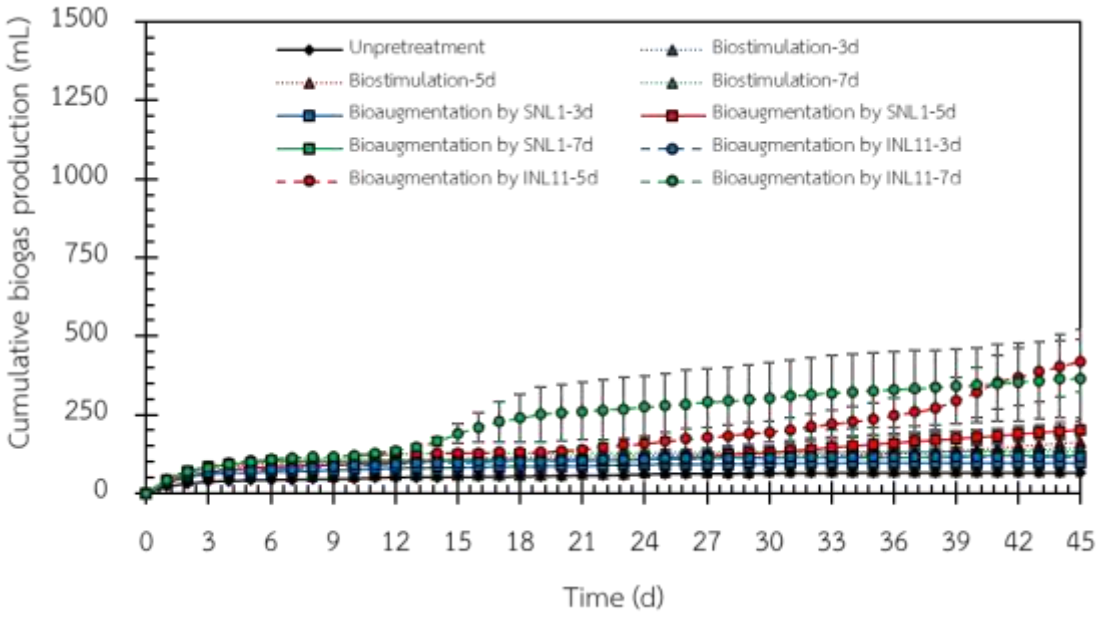


Figure 24 Cumulative biogas production of scum slurry pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.

(A) Sterile condition



(A) Non-sterile condition

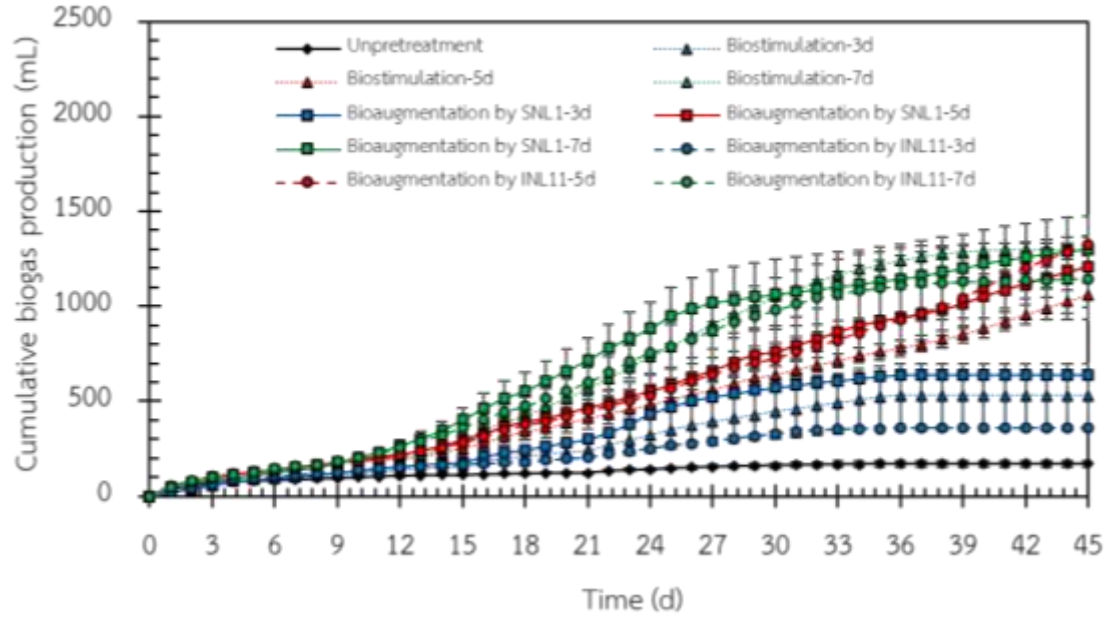


Figure 25 Overview of cumulative biogas production of scum slurry pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.

(A) Sterile condition (B) Non-sterile condition

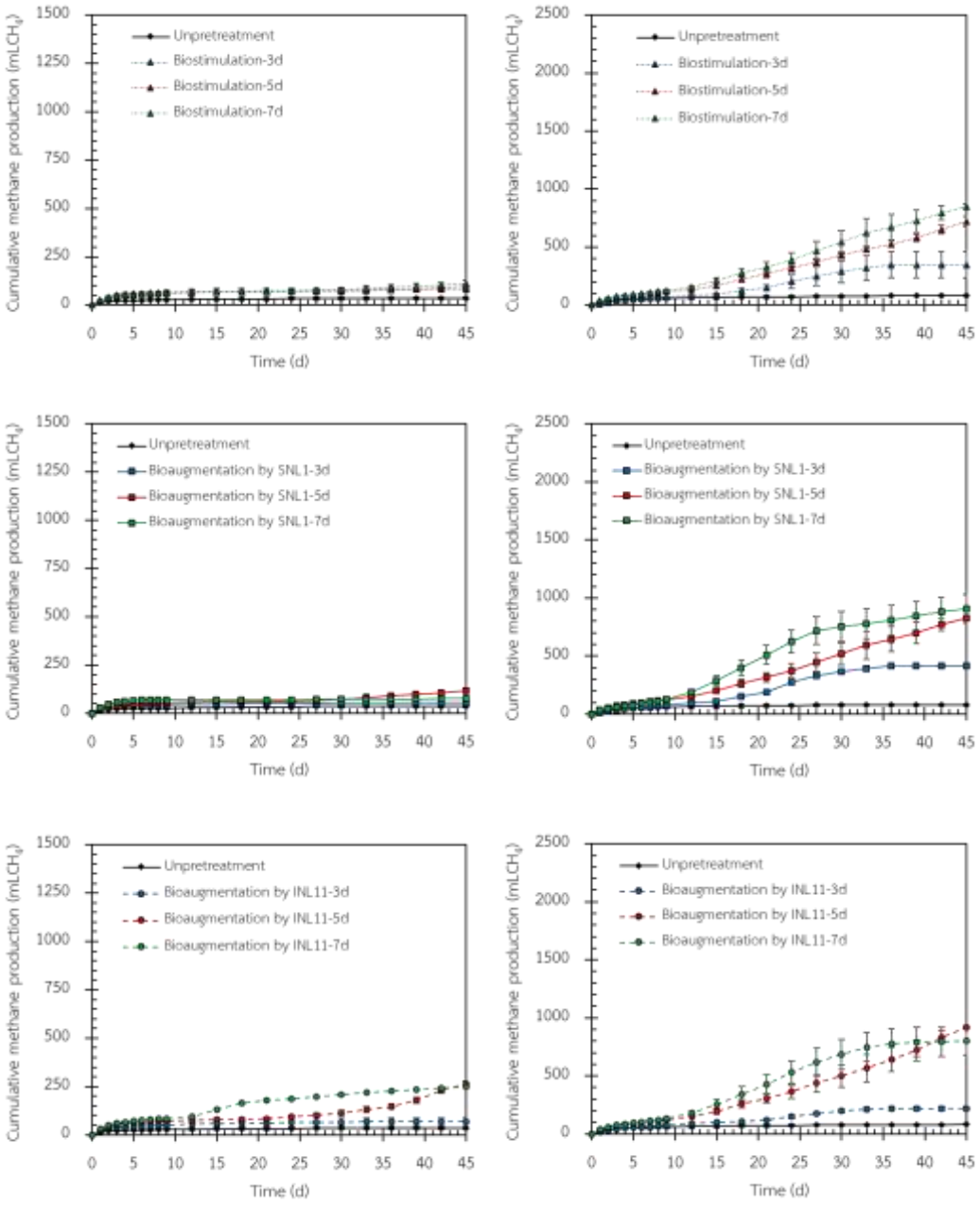
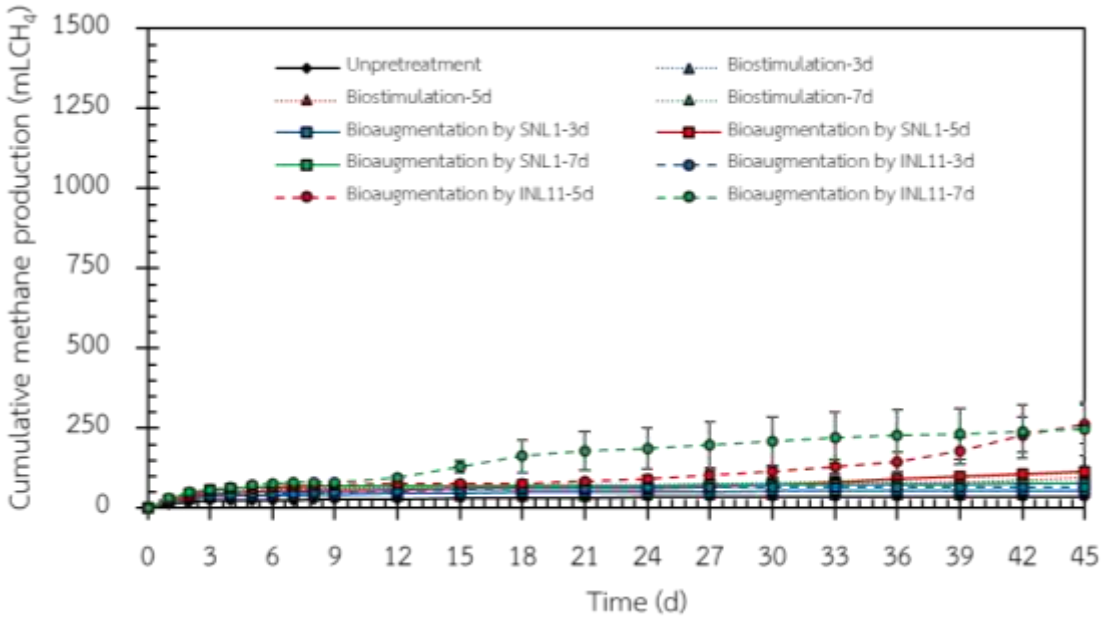


Figure 26 Cumulative methane production of scum slurry pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.

(A) Sterile condition



(A) Non-sterile condition

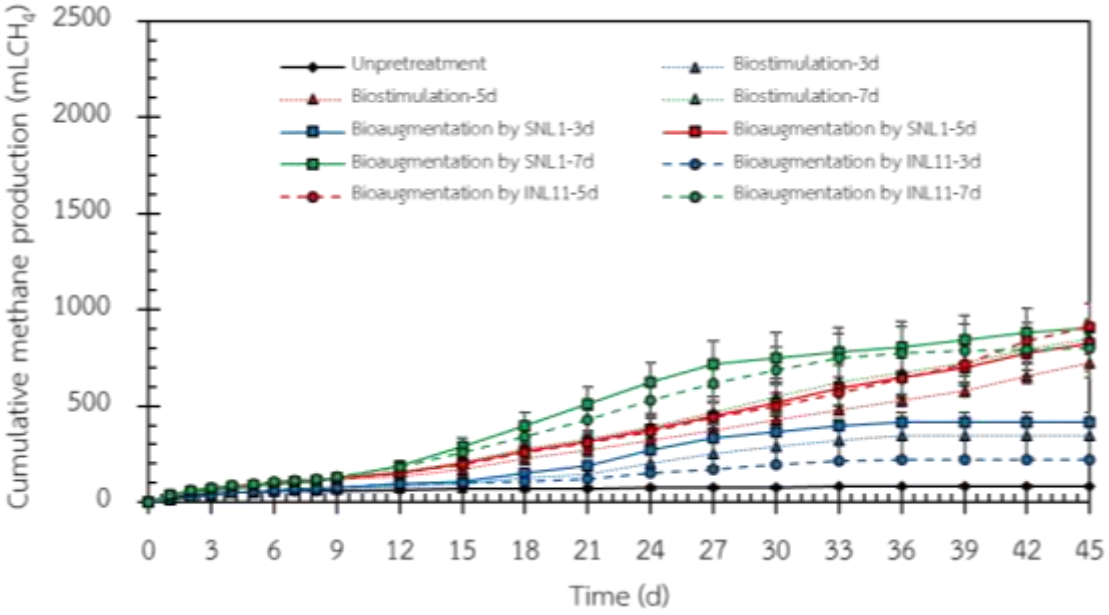


Figure 27 Overview of cumulative methane production of scum slurry pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.

Table 18 Biogas performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) using biostimulation without microbial inoculation and bioaugmentation by SNL1 and INL11 under sterile and non-sterile conditions with shaking at 150 rpm for 7 days

Conditions	Sterile condition			
	% Removal		Methane yield ($mLCH_4/gVS$)	Methane content (%)
	TS	tCOD		
Unpretreated scum	44.5±3.94	51.6±0.00	13.6	40.0
Biostimulation for 7 d	45.3±8.20	52.9±6.87	57.8	46.8
Bioaugmentation by SNL1 for 7 d	39.3±0.67	26.3±14.6	38.5	56.5
Bioaugmentation by INL11 for 7 d	50.2±2.29	32.9±2.11	140	62.4
Conditions	Non-sterile condition			
	% Removal		Methane yield ($mLCH_4/gVS$)	Methane content (%)
	TS	tCOD		
Unpretreated scum	46.7±3.75	54.1±5.30	31.2	56.2
Biostimulation for 7 d	64.8±0.79	73.2±0.43	321	62.3
Bioaugmentation by SNL1 for 7 d	59.6±3.02	81.3±8.11	586	63.8
Bioaugmentation by INL11 for 7 d	65.4±4.30	84.4±2.95	348	64.1

Note: Performance parameters of scum for pretreatment time 7 days

4.2 ผลของอัตราส่วนตะกอนลอยและน้ำเสียต่อการปรับสภาพตะกอนลอยและการผลิตแก๊สชีวภาพ

อัตราส่วนตะกอนลอยและน้ำเสียถือเป็นปัจจัยที่สำคัญของการปรับสภาพตะกอนลอยและการผลิตแก๊สชีวภาพ หากใช้ความเข้มข้นของซับสเตรทร้อยละ 100 จะทำให้เกิดการสะสมของกรดไขมันสายยาวในระบบซึ่งเป็นตัวยับยั้งของจุลินทรีย์ผลิตมีเทนในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ จึงทำการทดลองการปรับสภาพที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับร้อยละ 90:10, 80:20 และ 70:30 บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

Figure 28 แสดงผลอัตราส่วนตะกอนลอยและน้ำเสียน้ำต่อการการปรับสภาพตะกอนลอยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile condition) (Figure 28A) และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (non-sterile condition) (Figure 28B) ตะกอน โดยทำการปรับสภาพแบบ biostimulation และ bioaugmentation ด้วย SNL1 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของตะกอนเพิ่มขึ้นส่งผลให้มีค่าพีเอชในระบบเพิ่มขึ้นทั้งในชุดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน

เมื่อพิจารณาผลของค่าซีโอดีละลายน้ำพบว่า ที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับร้อยละ 90:10 หลังจากปรับสภาพเป็นเวลา 7 วัน ในชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนเมื่อผ่านการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 มีค่าซีโอดีละลายน้ำสูงที่สุดเท่ากับ 22.9 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ในชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน การปรับสภาพด้วย biostimulation มีค่าซีโอดีละลายน้ำสูงสุดเท่ากับ 30.4 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเมื่อเติม SNL1 เข้าสู่ระบบทำให้เกิดการแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในระบบ จึงส่งผลให้การปรับสภาพโดย bioaugmentation มีค่าซีโอดีละลายน้ำต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับร้อยละ 80:20 และ 70:30 มีค่าซีโอดีละลายน้ำลดลงเพราะมีอัตราส่วนที่เป็นของแข็งน้อยกว่าทำให้จุลินทรีย์ในระบบสามารถย่อยสลายของแข็งโมเลกุลขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลงและง่ายต่อการนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางกลุ่ม

จากการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ของตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพในชุดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน พบว่า ที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับร้อยละ 70:30 พบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 597.1 ยูนิตต่อลิตร จากการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของตะกอนที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 และพบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าการปรับสภาพด้วย biostimulation เพราะความเข้มข้นของตะกอนที่สูงขึ้นบ่งบอกถึงสารอินทรีย์ที่มีมากขึ้นในระบบ ทำให้เมื่อเติม SNL1 ซึ่งเป็น

แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส สามารถใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่พร้อมกับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในระบบโดยไม่ต้องเกิดการแข่งขันกัน นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสต่ำทั้งในชุดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน เพราะว่าในตะกอนมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ประเภทไขมันเป็นหลัก

เมื่อพิจารณาปริมาณของแข็งทั้งหมดและของแข็งแขวนลอยหลังจากปรับสภาพตะกอนลอย (Table 19) พบว่า ที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับร้อยละ 90:10 และ 80:20 มีปริมาณของแข็งแขวนลอยไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามอาจเกิดข้อจำกัดของการเก็บตัวอย่างตะกอนจากโรงงานในแต่ละรอบ ซึ่งมีปริมาณของตะกอนลอยที่แตกต่างกันในแต่ละรอบของการกักเก็บตะกอน จึงทำให้ยากต่อการควบคุม จากรายงานของ Tay และ Hung (2006) พบปริมาณของแข็งแขวนลอยจากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานทูน่ากระป๋องมีค่าอยู่ในช่วง 400-800 มิลลิกรัมต่อลิตร จากชุดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน ที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับร้อยละ 90:10 พบว่าการปรับสภาพด้วย bioaugmentation ของ SNL1 มีการย่อยสลายทางชีวภาพร้อยละ 44.4 ซึ่งมากกว่าอัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับร้อยละ 80:10 ถึง 1.5 เท่า เนื่องจากความเข้มข้นของตะกอนที่สูงทำให้จุลินทรีย์ในตะกอนยิ่งมากขึ้นจึงเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพสูง

Table 20 แสดงผลของอัตราส่วนระหว่าง C/N พบว่า ที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับ 90:10, 80:20 และ 70:30 มีค่า C/N อยู่เท่ากับ 19.24, 20.25 และ 18.81 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่อัตราส่วนของตะกอนต่อน้ำเสียเท่ากับ 80:20 มีค่า C/N อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อกระบวนการไร้อากาศซึ่งมีรายงานว่าจะต้องไม่ต่ำกว่า 20-35 หากซับสเตรทที่นำมาใช้มีค่า C/N มากกว่า 35 เมื่อเข้าสู่กระบวนการไร้อากาศจะทำให้เกิดการสะสมของกรดไขมันระเหยง่ายในระบบ และหากมีค่า C/N น้อยกว่า 20 จะเกิดการสะสมของแอมโมเนียซึ่งเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สร้างมีเทน (Mao และคณะ, 2015)

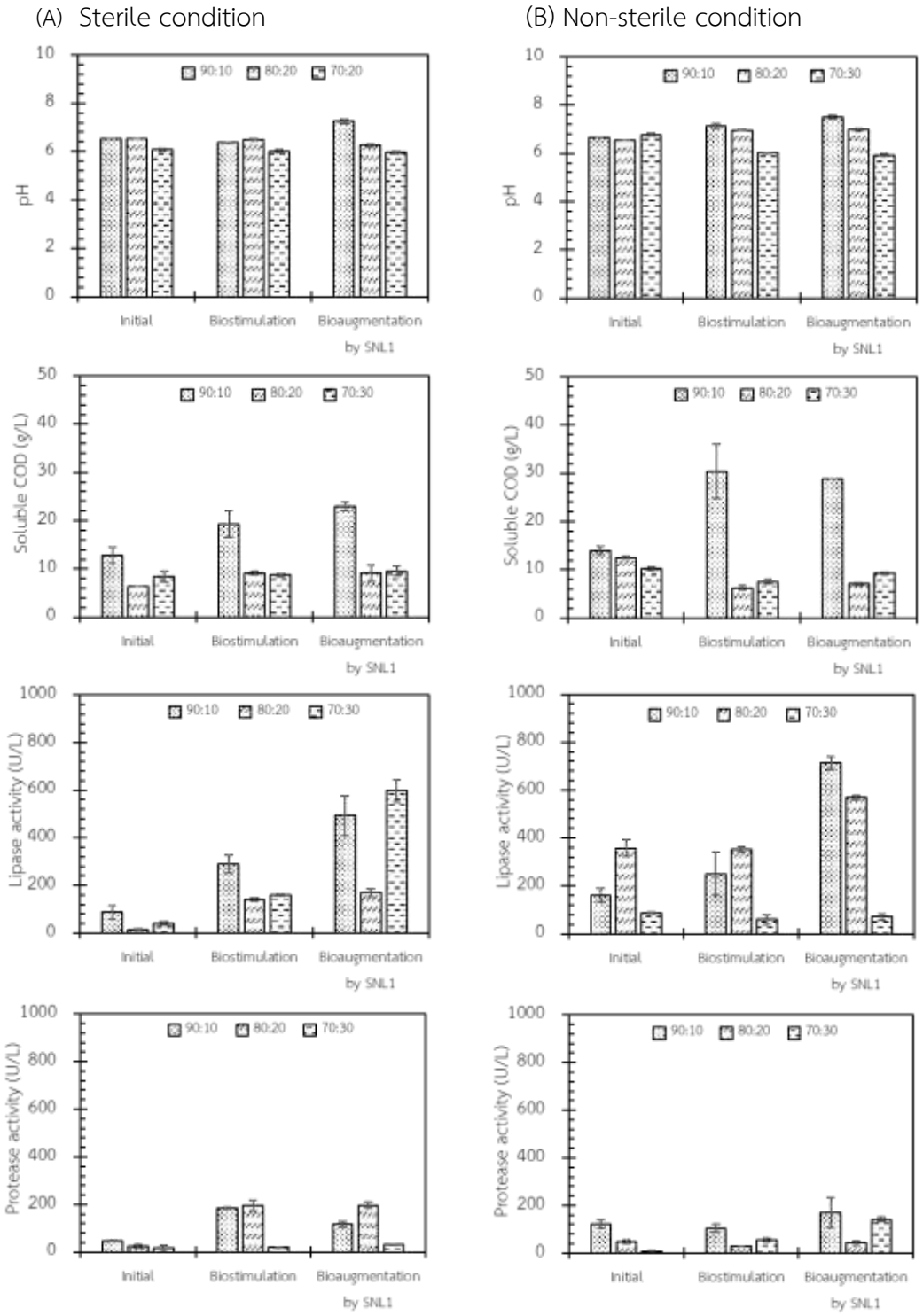


Figure 28 pH, soluble COD, lipase activity, and protease activity before and after the pretreatment of scum from oil trap at the different ratio without (control) and with using lipase and protease producing bacteria SNL1 and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking at 150 rpm for 3, 5 and 7 days.

Table 19 Performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 90:10, 80:20 and 70:30) by bioaugmentation (with the inoculation of SNL1) and biostimulation without microbial inoculation (control) under sterile and non-sterile conditions with shaking at 150 rpm for 7 days

Parameters	pretreatment of scum under sterile conditions for 7 days								
	90:10			80:20			70:30		
	Initial	Biostimulation	Bioaugmentation by SNL1	Initial	Biostimulation	Bioaugmentation by SNL1	Initial	Biostimulation	Bioaugmentation by SNL1
TS (g/L)	127±14.3	80.3±2.08	81.6±3.96	119±2.58	96.8±13.1	95.1±5.23	74.4±12.4	66.3±2.60	66.9±0.49
TSS (g/L)	91.9±3.47	77.9±0.71	67.6±0.57	91.4±8.66	83.6±3.11	75.7±2.05	70.7±7.35	64.9±6.50	63.9±8.06
Biodegradation (%)	0.00	37.0	35.7	0.00	18.6	20.1	0.00	10.8	10.1
Parameters	pretreatment of scum under non-sterile conditions for 7 days								
	90:10			80:20			70:30		
	Initial	Biostimulation	Bioaugmentation by SNL1	Initial	Biostimulation	Bioaugmentation by SNL1	Initial	Biostimulation	Bioaugmentation by SNL1
TS (g/L)	150±7.07	91.6±9.83	83.4±4.31	112±7.28	92.6±7.71	79.0±12.3	73.0±1.27	64.1±4.70	67.1±5.58
TSS (g/L)	93.3±9.48	76.3±5.79	77.3±2.26	91.7±1.80	89.0±3.04	76.3±6.15	64.9±0.67	54.2±0.00	53.3±2.98
Biodegradation (%)	0.00	38.9	44.4	0.00	18.00	30.00	0.00	12.2	8.08
C/N ratio	19.24	-	-	20.25	-	-	18.81	-	-

Note: Biodegradation based on total solid

หลังจากผ่านการปรับสภาพที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียที่ร้อยละ 90:10, 80:20 และ 70:30 โดย biostimulation และ bioaugmentation ด้วย SNL1 เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการทดลองผลิตแก๊สชีวภาพในขวดซีรั่มขนาด 120 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส Figure 29-32 แสดงผลการผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนสะสมที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศของตะกอนลอยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile condition) และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (non-sterile condition) พบว่า ในชุดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียร้อยละ 80:20 เมื่อผ่านปรับตะกอนลอยโดย biostimulation พบการผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนสะสมสูงสุดเท่ากับ 141.5 mL และ 110.9 $mLCH_4$ ตามลำดับ แต่เมื่อผ่านการปรับสภาพตะกอนลอยโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 พบการผลิตแก๊สชีวภาพสูงสุดที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียร้อยละ 90:10 นอกจากนี้ยังพบการผลิตแก๊สมีเทนสะสมสูงสุดที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียร้อยละ 80:20 (134.5 mL และ 76.5 $mLCH_4$) อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์กลุ่มผลิตมีเทนนำสารอาหารไปใช้ได้โดยตรงในการผลิตมีเทนเพราะผ่านการย่อยสลายเบื้องต้นโดย SNL1 แต่ที่อัตราส่วนตะกอนลอยลอยต่อน้ำเสียร้อยละ 90:10 อาจมีกลุ่มไฮโดรไลติกใช้สารอินทรีย์และเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ไปบางส่วน ส่งผลให้ปริมาณมีเทนเกิดได้น้อย ในขณะที่การผ่านปรับสภาพตะกอนลอยโดย biostimulation ในอัตราส่วนตะกอนลอยต่อไขมัน 80:20 การย่อยสลายเกิดขึ้นโดยการกวนให้อากาศเพียงอย่างเดียวจึงมีค่าซีโอดีเพิ่มขึ้น เมื่อเข้าสู่กระบวนการไร้อากาศส่งผลให้จุลินทรีย์กลุ่มผลิตมีเทนนำสารอาหารไปใช้ได้อย่างเต็มที่โดยไม่ต้องมีการแข่งขันกันกับเชื้อที่เพิ่มเข้าไปในระบบ

เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน พบว่า ที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียร้อยละ 80:20 ที่ผ่านการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 มีการผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนสะสมสูงสุดเท่ากับ 1301 mL และ 908.4 $mLCH_4$ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการผลิตมีเทนที่ได้จาก biostimulation และ unpretreatment (1299 $mLCH_4$ และ 170 $mLCH_4$ ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสีย 70:30 ไม่จำเป็นต้องผ่านการปรับสภาพก่อนผลิตมีเทน เนื่องมาจากมีสารอาหารที่เพียงพอต่อการผลิตอยู่ในช่วงเหมาะสม หากผ่านการปรับสภาพก่อนทำให้สารอาหารเหล่านี้ถูกใช้ไปในขั้นตอนการย่อยสลายเมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักแบบไร้อากาศส่งผลให้การผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนต่ำ ในขณะที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียร้อยละ 90:10 มีความเข้มข้นของตะกอนสูง ทำให้มีสารอินทรีย์มากขึ้น เมื่อผ่านการปรับสภาพตะกอนลอยซึ่งมีจุลินทรีย์กลุ่มโปรติโอไลติกและลิโปไลติกที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภทโปรตีนและไขมัน ทำให้มีค่าซีโอดีละลายน้ำสูงเมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักแบบไร้อากาศจุลินทรีย์กลุ่มผลิตกรดนำสารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปซีโอดีละลายน้ำไปใช้ได้โดยตรงพร้อมกับจุลินทรียที่เติมลงไปและจุลินทรีย์ประจำถิ่นส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียจำพวก

facultative anaerobic ที่เป็นกลุ่มไฮโดรไลติกทำการย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ที่เหลือจากการปรับสภาพต่อไป ทำให้สารอาหารที่มีอยู่ในระบบมากเกินความจำเป็นของแบคทีเรียส่งผลให้พีเอชสูงขึ้น จึงเกิดการสะสมแอมโมเนียและยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ผลิตมีเทนทำให้มีการผลิตมีเทนได้น้อย อย่างไรก็ตามที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียร้อยละ 80:20 พบว่ามีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตแก๊สชีวภาพเนื่องจากมีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20.25 ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อกระบวนการไร้อากาศ (Mao และคณะ, 2015)

สำหรับประสิทธิภาพโดยรวมในการกำจัดของแข็งทั้งหมดและค่าซีโอดีทั้งหมดจากการทดลองแสดงใน Table 20 พบว่า มีการกำจัดค่าซีโอดีที่สูงในชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียที่ร้อยละ 90:10, 80:20 และ 70:30 เมื่อผ่านการปรับสภาพ โดย biostimulation และ bioaugmentation ด้วย SNL1 เป็นระยะเวลา 7 วัน (tCOD เท่ากับร้อยละ 22-81) นอกจากนี้ ผลผลิตมีเทนจากชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนลอยที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (unpretreatment) พบว่า ที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียร้อยละ 90:10 มีผลผลิตมีเทนน้อยกว่าที่อัตราส่วน 80:20 และ 70:30 (7.4, 13.6 และ 114.9 $mLCH_4/gVS$ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ผ่านการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 พบว่า อัตราส่วน 90:10 มีผลผลิตมีเทนมากกว่า 18.5 เท่า รองลงมาคือ อัตราส่วน 80:20 มีผลผลิตมีเทนมากกว่า 2.8 เท่า ในขณะที่อัตราส่วน 70:30 มีผลผลิตมีเทนต่ำกว่า unpretreatment (18.5 $mLCH_4/gVS$) อาจเนื่องมาจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหาร การปรับสภาพเบื้องต้นจึงเป็นสิ่งสำคัญในการเพิ่มปริมาณมีเทนเพราะเมื่อเข้าสู่กระบวนการไร้อากาศจุลินทรีย์กลุ่มถัดไปจะนำสารอาหารที่ถูกย่อยเบื้องต้นไปใช้ได้โดยตรงส่งผลให้มีผลผลิตมีเทนสูง ในขณะที่เมื่อลดความเข้มข้นของสารอาหารลงทำให้สารอาหารเหล่านี้ถูกใช้ไปในกระบวนการย่อยสลายมากเกิน เมื่อเข้าสู่กระบวนการไร้อากาศจุลินทรีย์กลุ่มผลิตมีเทนมีสารอาหารที่ใช้ในการเจริญไม่เพียงพอส่งผลให้มีผลผลิตมีเทนต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอน พบว่า ที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียร้อยละ 90:10 ที่ unpretreatment และผ่านการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 พบผลผลิตมีเทนต่ำกว่าชุดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนโดยมีค่าเท่ากับ 4.4, 68.6 $mLCH_4/gVS$ ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากเมื่อฆ่าเชื้อตะกอนลอยสารอาหารบางส่วนถูกย่อยสลายองค์ประกอบเชิงซ้อนให้เป็นองค์ประกอบที่ใช้ได้ง่ายด้วยความร้อนจึงถูกใช้ได้ง่ายด้วยจุลินทรีย์ส่งผลให้มีมีเทนสูงกว่าชุดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อหรือเกิดการสะสมของแอมโมเนียเนื่องจากมีจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่สามารถช่วยย่อยสลายในกระบวนไร้อากาศส่งผลให้มีการยับยั้งจุลินทรีย์ผลิตมีเทน ในขณะที่อัตราส่วน 80:20 ของ unpretreatment และ bioaugmentation ด้วย SNL1 พบผลผลิตมีเทนสูงกว่าชุดที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยมีค่าเท่ากับ 31.2, 586.1 $mLCH_4/gVS$ ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากมีความเข้มข้นของสารอาหารลดลงและเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ส่งผลให้มีผลผลิตมีเทนสูงกว่า

นอกจากนี้ยังพบว่า ที่อัตราส่วน 70:30 ของชุดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนของชุดที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพโดย biostimulation และ bioaugmentation ด้วย SNL1 พบว่ามีผลผลิตมีเทนไม่แตกต่างกันและจะเห็นได้ว่าที่อัตราส่วน 70:30 ไม่จำเป็นต้องมีการปรับสภาพก่อนการผลิตมีแทนเนื่องจากมีปริมาณสารอาหารน้อยอยู่แล้ว และจาการทดลองพบว่า ที่อัตราส่วน 80:20 ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนและที่ผ่านการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 พบผลผลิตมีเทนสูงสุด (586.1 $mLCH_4/gVS$) อาจเป็นเพราะว่าจุลินทรีย์ในระบบการหมักแบบไร้อากาศกับจุลินทรีย์ที่เติมลงไปสามารถส่งเสริมการทำงานร่วมกันเป็นอย่างดี อีกทั้งมีสารอาหารที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งสามารถลดปัญหาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและลดปัญหาที่เกิดจากตัวยับยังการทำงานในระบบได้

นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ จากรายงานของ Wijesinghe (2016) ที่ศึกษาการผลิตแก๊สชีวภาพจากตัวอย่างขยะมูลฝอยและน้ำเสียในเขตเทศบาล ที่อัตราส่วนร้อยละ 50:50, 60:40 และ 80:20 โดยทำการทดลองในขวดซีรั่มขนาด 1000 มิลลิลิตร จาการทดลองพบการผลิตมีเทนสะสมสูงสุดจากอัตราส่วนขยะมูลฝอยต่อน้ำเสียร้อยละ 80:20 เท่ากับ 2957.8 $mLCH_4$ มีประสิทธิภาพในการกำจัดปริมาณของแข็งทั้งหมดและซีโอดีสูงสุดที่ร้อยละ 57.32 และ 36.85 ตามลำดับ ในขณะที่ Srikanlayanukul และ Suksabye (2020) ที่ศึกษาอัตราส่วนระหว่างเศษอาหารต่อหญ้าแฝก ที่เหมาะสำหรับการผลิตแก๊สชีวภาพโดยใช้กระบวนการหมักแบบกะและเพิ่มความเสถียรของกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ โดยทำการศึกษา 9 ส่วนผสม คือ 100:0, 80:20, 75:25, 66.67:33.33, 50:50, 33.33:66.67, 25:75, 20:80 และ 0 :100 มีปริมาตรการทำงานเท่ากับ 1.8 ลิตร และใช้เวลาในการย่อยสลาย 60 วัน ที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่าที่อัตราส่วนของเศษอาหารต่อหญ้าแฝกเท่ากับ 80:20 ให้ผลผลิตมีเทนจำเพาะสูงสุดที่ 0.30 L/gVS ซึ่งมีอัตราส่วน C/N ที่ 28.20 และพบว่า มีประสิทธิภาพในการกำจัดค่าซีโอดี, ปริมาณของแข็งระเหยง่ายและ ปริมาณของแข็งทั้งหมดสูงที่สุดด้วยอีกด้วย ทั้งนี้อัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สขึ้นอยู่กับซับสเตรทที่นำมาใช้ในการทดลองเช่นกัน ดังนั้น จากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าผลของอัตราส่วนระหว่างตะกอนลอยและน้ำเสียต่อการผลิตแก๊สชีวภาพที่เหมาะสมที่สุดได้แก่ อัตราส่วนตะกอนต่อน้ำเสียเท่ากับ 80:20 อย่างไรก็ตามการผลิตแก๊สชีวภาพได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับซับสเตรทที่ใช้ในกระบวนการหมัก โดยการศึกษาอัตราส่วนที่ใช้อาจจะอยู่ในรูปของซับสเตรทที่เป็น ของแข็งต่อของแข็ง ของแข็งต่อของเหลวหรือของเหลวต่อของเหลว ก็เป็นได้ ทั้งนี้ซับสเตรตที่ใช้ต้องมีค่า C/N ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ

ดังนั้นการศึกษาผลการปรับสภาพตะกอนลอยด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้และศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนจากตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันที่ผ่านการปรับสภาพในระดับขวดทดลองโดยใช้ระบบการหมักแบบกะ พบว่า เมื่อใช้อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียร้อยละ 80:20 ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตะกอนและผ่านการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 เป็นระยะเวลา 7 วันช่วยเพิ่มการผลิตมีเทนด้วยประสิทธิภาพที่สูงกว่าการปรับสภาพโดย biostimulation ด้วยการให้อากาศเพียงอย่างเดียว และ unpretreatment จึงมีการทดลอง การปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1, biostimulation และ unpretreatment ในถังหมักขนาด 6.5 ลิตร โดยใช้ระบบการหมักแบบกะและกึ่งต่อเนื่องในการทดลองถัดไป

(A) Sterile condition (B) Non-sterile condition

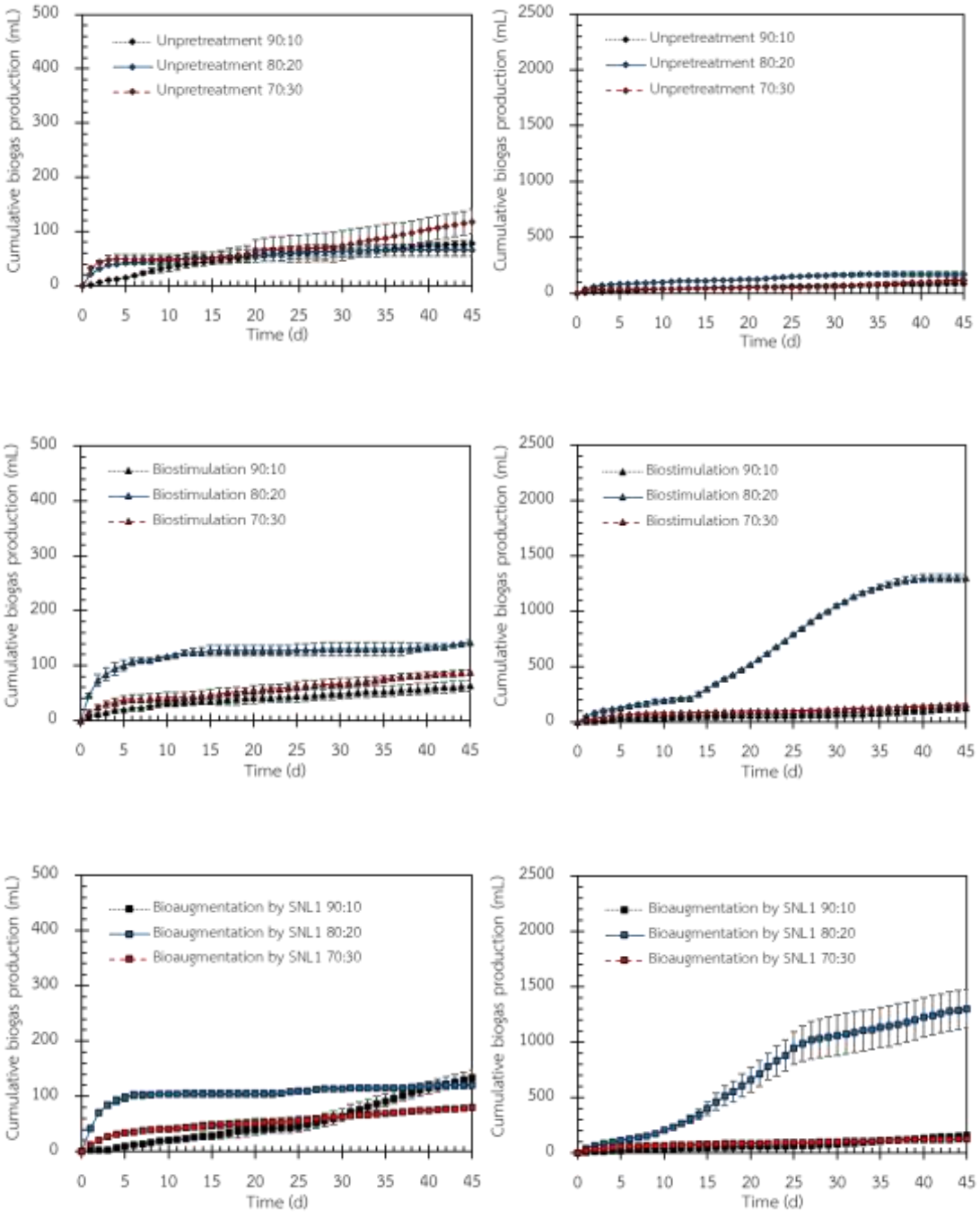
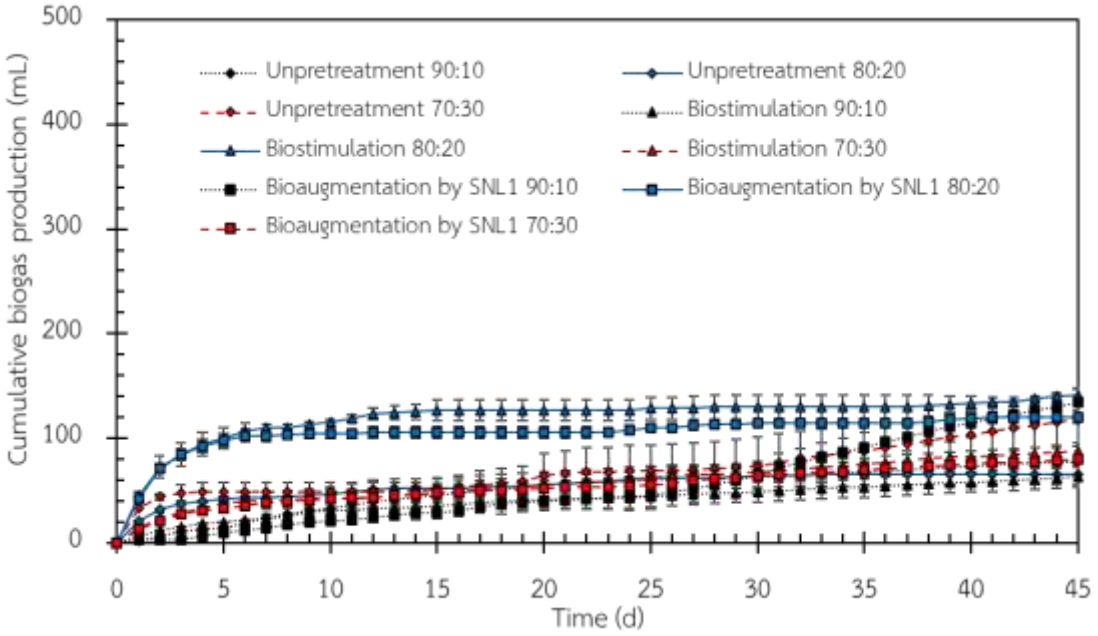


Figure 29 Cumulative biogas production of scum slurry at the different ratio pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.

(A) Sterile condition



(A) Non-sterile condition

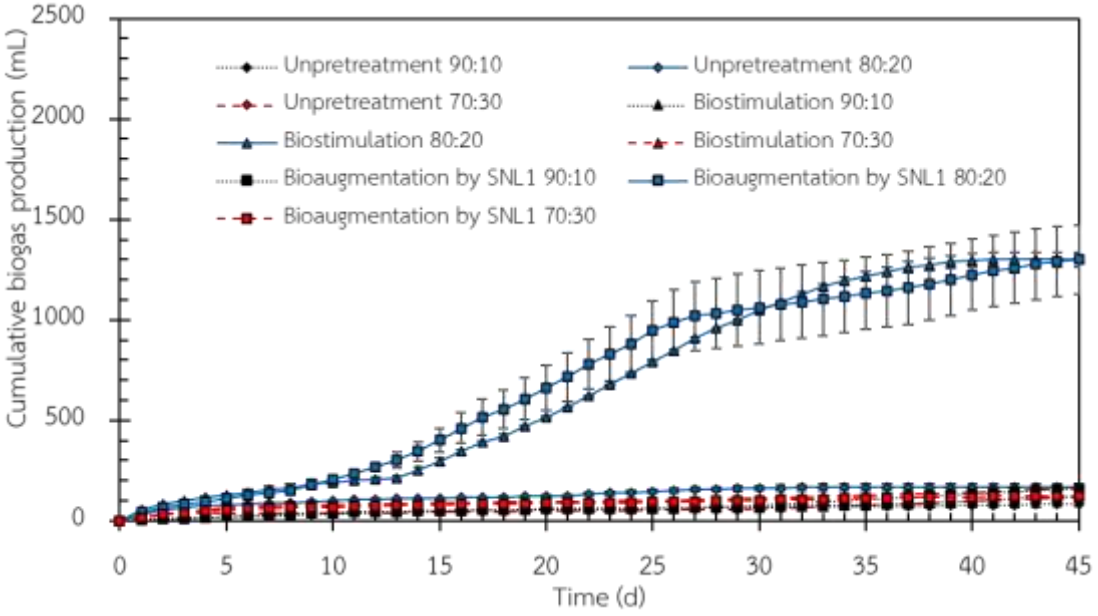


Figure 30 Overview of cumulative biogas production of scum slurry at the different ratio pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.

(A) Sterile condition (B) Non-sterile condition

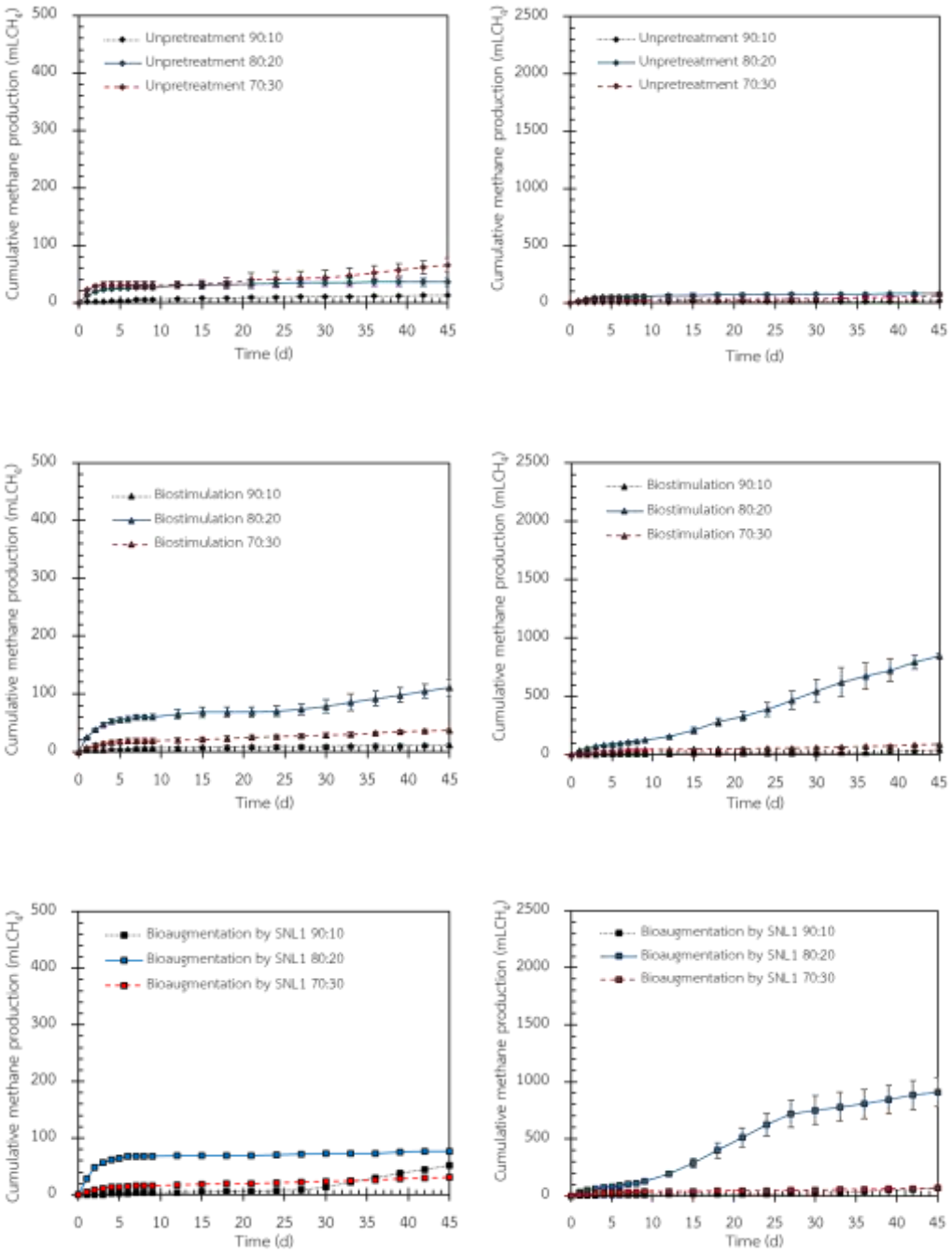
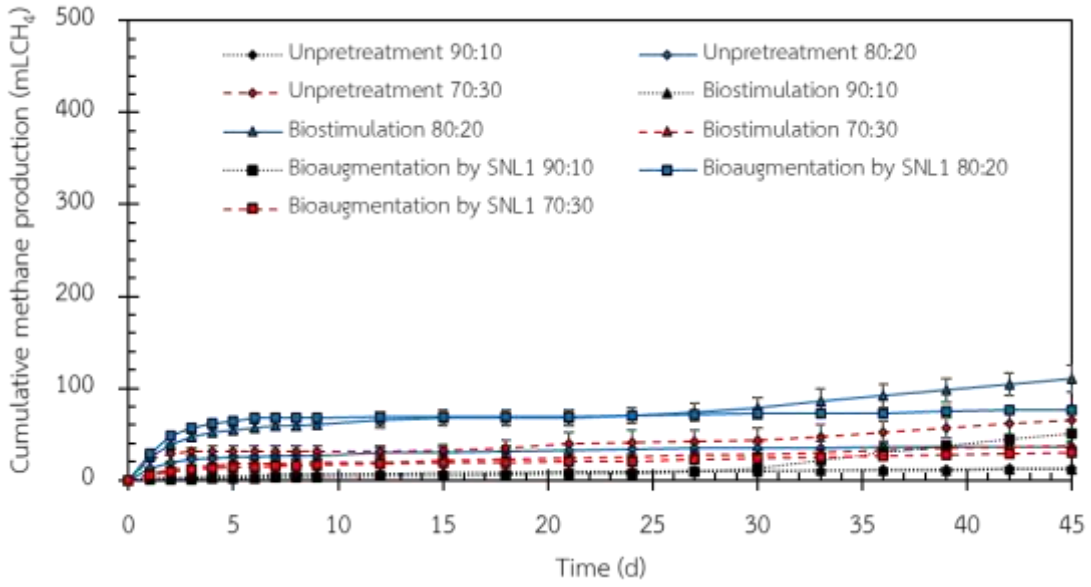


Figure 31 Cumulative methane production of scum slurry at the different ratio pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.

(A) Sterile condition



(A) Non-sterile condition

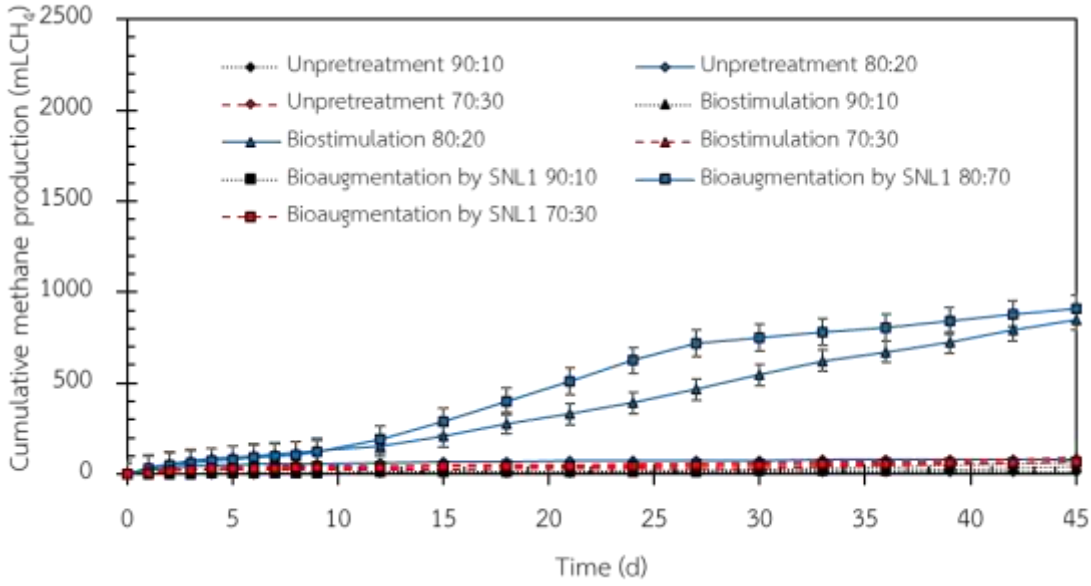


Figure 32 Overview of cumulative methane production of scum slurry at the different ratio pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1, and INL11 under sterile (A) and non-sterile (B) conditions with shaking 150 rpm for 3, 5, and 7 days and unpretreated scum.

Table 20 Biogas performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 90:10, 80:20 and 70:30) using biostimulation without microbial inoculation and bioaugmentation by SNL1 under sterile and non-sterile conditions with shaking at 150 rpm for 7 days

Conditions	Sterile condition				Non-sterile condition			
	% Removal		Methane yield	Methane	% Removal		Methane yield	Methane
	TS	tCOD	($mLCH_4/gVS$)	content (%)	TS	tCOD	($mLCH_4/gVS$)	content (%)
90:10 Unpretreatment	28.0±1.36	53.8±7.99	7.43	19.0	46.8±2.36	28.3±5.87	4.36	19.8
90:10 Biostimulation	7.93±2.67	19.6±6.10	37.1	15.6	36.8±2.75	44.7±7.10	25.4	51.6
90:10 Bioaugmentation by SNL1	9.15±0.13	8.29±7.86	137	56.6	23.3±3.83	21.6±9.52	68.6	56.2
80:20 Unpretreatment	44.5±3.94	51.6±0.00	13.6	40.0	46.7±3.75	54.1±5.30	31.2	56.2
80:20 Biostimulation	45.3±8.20	52.9±6.87	57.5	46.8	64.8±0.79	73.2±0.43	321	62.3
80:20 Bioaugmentation by SNL1	39.3±0.67	26.3±14.6	38.5	56.5	59.6±3.02	81.3±8.11	586	63.8
70:30 Unpretreatment	9.48±3.27	25.1±5.30	114.9	51.9	3.73±0.00	20.5±0.65	147	53.2
70:30 Biostimulation	34.7±0.94	23.5±1.05	27.3	50.7	32.1±4.92	22.5±5.32	53.0	63.4
70:30 Bioaugmentation by SNL1	37.4±5.90	18.9±0.00	18.5	47.9	42.0±0.52	42.1±3.12	40.6	62.2

Note: Performance parameters of scum for pretreatment time 7 days

5. การปรับสภาพตะกอนลอยและการผลิตแก๊สชีวภาพในถังหมักขนาด 6.5 ลิตรโดยใช้ระบบการหมักแบบกะและกึ่งต่อเนื่อง

จากการทดลองการปรับสภาพตะกอนลอยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับร้อยละ 80:20 บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ที่อัตราการให้อากาศ 0.4 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน Figure 33 แสดงผลของการปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันโดยการปรับสภาพแบบ biostimulation และ bioaugmentation ด้วยเชื้อ SNL1 พบว่า หลังจากการปรับสภาพตะกอนลอยเป็นระยะเวลา 7 วัน ค่าพีเอชในระบบลดลงจาก 7.25 (วันที่ 0) เป็น 6.45 และ 6.35 ตามลำดับ ในขณะที่ค่าซีโอดีละลายน้ำสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ของการปรับสภาพ (8.98 กรัมต่อลิตร) โดย biostimulation และ bioaugmentation ด้วย SNL1 พบค่าซีโอดีละลายน้ำเท่ากับ 9.60 กรัมต่อลิตร และ 10.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการตรวจวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ของตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสมากกว่า (เอนไซม์ไลเปส 2984 ยูนิตต่อลิตร และเอนไซม์โปรติเอส 60.43 ยูนิตต่อลิตร) ชุดที่มีการปรับสภาพโดย biostimulation ด้วยการให้อากาศเพียงอย่างเดียว (เอนไซม์ไลเปส 2652 ยูนิตต่อลิตร และเอนไซม์โปรติเอส 31.8 ยูนิตต่อลิตร) เมื่อผ่านการย่อยสลายในวันที่ 7 แต่มีค่ากิจกรรมเอนไซมไลเปสน้อยกว่าวันที่ 0 (5173 ยูนิตต่อลิตร) (Figure 33C, D) อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของสารอาหารที่มาจากตะกอนลอย มีไขมันเป็นสารอาหารหลักส่งผลให้จุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีอยู่เดิมในระบบมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสมากกว่าเอนไซม์โปรติเอสและมีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าชุดที่ผ่านการปรับสภาพเมื่อผ่านการย่อยสลายเป็นระยะเวลา 7 วัน ทำให้การปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 และ biostimulation มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเนื่องมาจากสารอาหารในระบบถูกย่อยสลายและออกซิไดซ์ของแข็งเป็นซีโอดีละลายน้ำทำให้มีค่าซีโอดีสูง และจะเห็นได้ว่าการปรับสภาพโดย bioaugmentation มีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่า biostimulation เพราะมีการเติม SNL1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสพร้อมกับมีการเติมอากาศจึงส่งผลให้เกิดการย่อยสลายได้ดีกว่าการเติมอากาศเพียงอย่างเดียว

จาก Table 21 เมื่อพิจารณาผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งแขวนลอย พบว่า การปรับสภาพโดย biostimulation ที่ให้อากาศเพียงอย่างเดียวสามารถลดปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งแขวนลอยได้ดีที่สุด (จาก 79.8 กรัมต่อลิตร เป็น 53.2 กรัมต่อลิตร, 71.0 กรัมต่อลิตร เป็น 49.7 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) เท่ากับร้อยละ 33.6 และสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีการปรับสภาพด้วย SNL1 (ร้อยละ 24.8) อาจเนื่องมาจากการเติมให้อากาศเพียง

อย่างเดียว มีจุลินทรีย์กลุ่ม aerobes ที่เจริญและช่วยส่งเสริมการย่อยสลายส่งผลให้มีการบำบัดตะกอนลอยได้ดีกว่า (Ahn และคณะ, 2014) ในขณะที่การปรับสภาพด้วยการเติม SNL1 และมีการให้อากาศส่งเสริมให้เกิดการย่อยสลายได้ดีเช่นกันแต่ที่เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพที่น้อยกว่า อาจเนื่องมาจากมีการเพิ่มจำนวณของแบคทีเรียที่เติมลงไปในระบบส่งให้ปริมาณของแข็งในระบบลดได้ไม่ดีเท่ากับ biostimulation

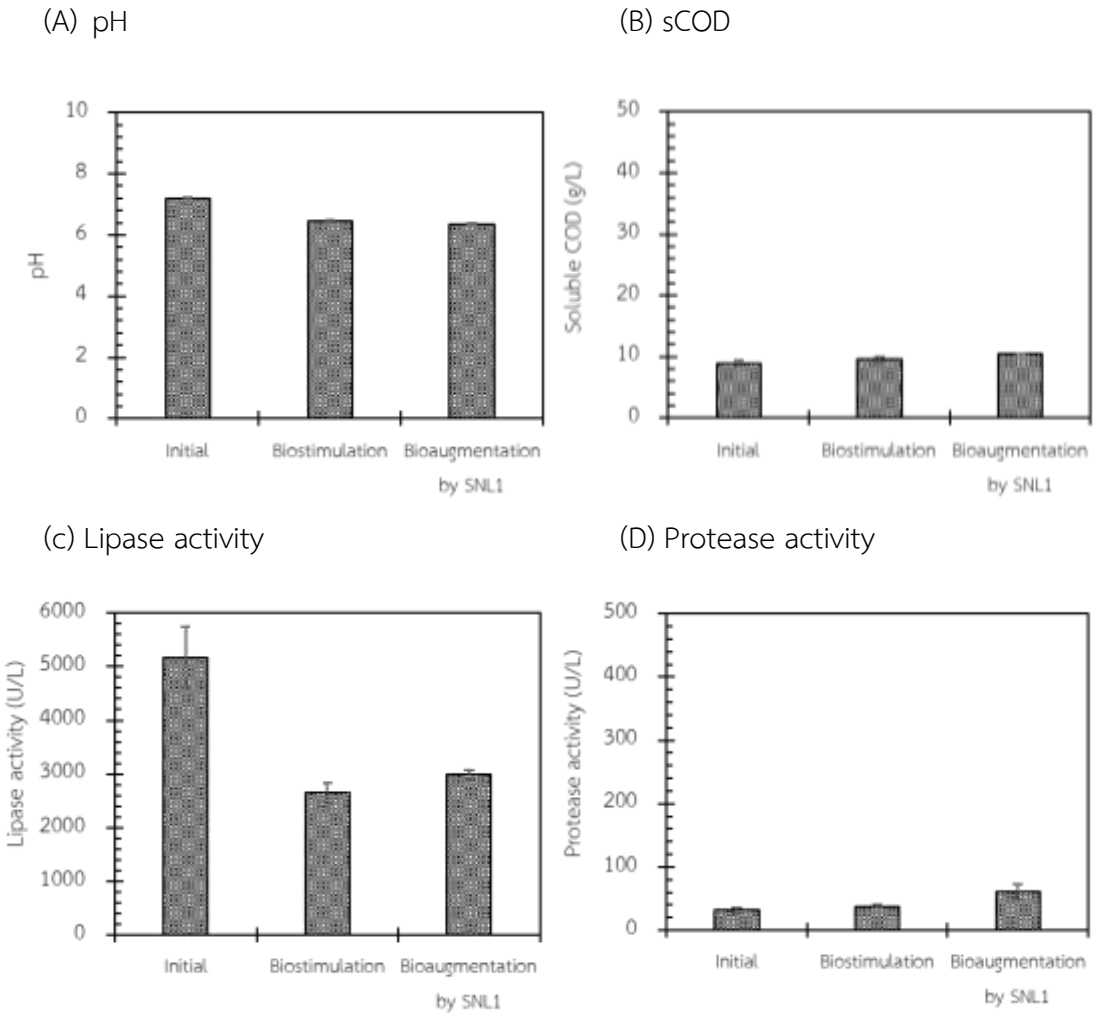


Figure 33 pH, soluble COD, lipase activity, and protease activity before and after the pretreatment of scum from oil trap without (control) and with using lipase and protease producing bacteria SNL1 under non-sterile condition with aeration at 0.4 vvm for 7 days.

Table 21 Performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) by bioaugmentation (with the inoculation of SNL1) and biostimulation without microbial inoculation (control) under non-sterile conditions with aeration at 0.4 vvm for 7 days in 6L reactor

Parameters	Pretreatment of scum for 7 days in batch mode		
	Initial	Biostimulation	Bioaugmentation by SNL1
TS (g/L)	79.8±9.10	53.2±3.96	60.0±2.47
TSS (g/L)	71.0±0.75	49.7±1.00	55.7±4.45
Biodegradation (%)	0.00	33.6	24.8
Parameters	Pretreatment of scum for 7 days in semi-continuous mode		
	Initial	Biostimulation	Bioaugmentation by SNL1
pH	7.32-7.48	6.48-6.67	6.32-6.57
sCOD (g/L)	7.30-12.2	5.41-8.34	5.90-10.3
Lipase activity (U/L)	676-963	563-828	833-991
Protease activity (U/L)	230-273	202-349	450-535
TS (g/L)	73.6-98.2	51.4-69.3	53.0-65.9
TSS (g/L)	67.5-81.2	47.7-64.7	47.8-61.8
Biodegradation (%)	0.00	29.4-30.0	11.0-28.2

Note: Biodegradation based on total solid

จากการศึกษาผลของการผลิตแก๊สชีวภาพหลังการปรับสภาพตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันโดยทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ชนิด CSTR (Continuous stirred tank reactor) ขนาด 6.5 ลิตร ปริมาตรใช้งาน 5 ลิตร Figure 34 แสดงผลการผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนสะสมโดยใช้ตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 และ biostimulationโดยมีการให้อากาศแต่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการปรับสภาพ (unpretreatment) พบว่า การผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนสะสมมีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการหมักแบบกะ ซึ่งการปรับสภาพตะกอนลอยช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตมีเทนจาก 10,897 เป็น 14,759 mLCH_4 ซึ่งสูงกว่าการผลิตมีเทนที่ได้จากชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (unpretreatment) (8,470 mLCH_4) เป็นเพราะเมื่อไม่มีการปรับสภาพทำให้จุลินทรีย์กลุ่มผลิตกรดและกลุ่มถัดไปต้องรอสารอาหารที่ใช้ได้ง่ายจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างเชิงซ้อนเป็นโครงสร้างอย่างง่ายโดยจุลินทรีย์กลุ่มไฮโดรไลติกก่อน ซึ่งในระหว่างนั้นอาจมีการเจริญของแบคทีเรีย fermentative ทำให้เมื่อมีการย่อยสลายเป็นสารอินทรีย์ที่ใช้ได้ง่ายส่งผลให้แบคทีเรีย fermentative บางกลุ่มนำสารอาหารเหล่านี้ไปผลิตเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจนได้เร็วกว่า ในขณะที่กลุ่มจุลินทรีย์ผลิตกรดนำสารอาหารเหล่านี้ไปใช้ในการผลิตมีเทนได้ช้าทำให้จุลินทรีย์ผลิตมีเทนเจริญได้ช้าเนื่องมาจากมีสารอาหารไม่เพียงพอ (Abanades และคณะ, 2021) จึงส่งผลให้ชุดที่ไม่ผ่านการปรับสภาพมีการผลิตแก๊สชีวภาพสะสมได้มากแต่มีการผลิตมีเทนได้น้อย โดยพบการผลิตแก๊สชีวภาพสะสมสูงสุด เท่ากับ 27,480 mL นอกจากนี้ยังพบว่า ชุดการทดลองที่ผ่านการปรับสภาพโดย bioaugmentation ที่เติม SNL1 ให้การผลิตมีเทนสะสมสูงสุดมีค่าเท่ากับ 14,759 mLCH_4 ในวันที่ 60 และมีสะสมเท่ากับ 24,860 mL ซึ่งสูงกว่า biostimulation (10,897mLCH_4 และ 22,370 mL ตามลำดับ) เนื่องมาจากการผ่านการย่อยสลายด้วยแบคทีเรีย SNL1 และเติมอากาศส่งผลให้มีสารอาหารที่ใช้ได้ง่ายมากกว่าชุดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย biostimulation

ผลการเดินระบบแบบกึ่งต่อเนื่อง (Figure 34) จะการเปลี่ยนถ่ายสารอาหาร 2 ลิตร ทุก 7 วัน (HRT=17.5) โดยเติมตะกอนลอยที่ปรับสภาพแล้วเช่นเดียวกันกับการเดินระบบแบบกะ พบว่า หลังจากเดินระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องโดยมีการเปลี่ยนถ่ายสารอาหารจำนวน 5 ครั้ง การปรับสภาพโดย bioaugmentation ของ SNL1 ให้ผลผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนสะสมมากกว่า (40,790 mL และ 25,984 mLCH_4) ตะกอนที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (unpretreatment) (39,400 mL และ 17,523 mLCH_4) และการปรับสภาพด้วยการเติมอากาศเพียงอย่างเดียว (37,190 mL และ 21,362 mlCH_4) อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารต่อไปชุดการทดลองที่มีการปรับสภาพโดยการเติมอากาศเพียงอย่างเดียวมีแนวโน้มที่จะผลิตแก๊สชีวภาพได้มากกว่าชุดที่ไม่มีการปรับสภาพตะกอน ในขณะที่เป็นการเดินระบบกะ ตะกอนที่ไม่ผ่านการบำบัดให้การผลิตแก๊สชีวภาพสูงสุดแต่เมื่อเข้าสู่ระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง กลับให้ผลผลิตของแก๊สชีวภาพสะสมที่ต่ำกว่า อาจเป็นเพราะ

อาหารที่ป้อนเข้าออกระบบไม่มีการปรับสภาพจึงมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแก๊สอย่างช้าๆ แต่ในชุดที่มีการปรับสภาพด้วย SNL1 เมื่อมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารเข้าออกระบบ ทำให้จุลินทรีย์ได้รับสารอาหารใหม่เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญ เนื่องมาจากมีการเติมเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์และชุดที่มีการปรับสภาพด้วยการเติมอากาศเพียงอย่างเดียวยังสามารถช่วยย่อยสลายตะกอนเบื้องต้นทำให้สารอาหารเปลี่ยนแปลงไปเป็นโครงสร้างที่ใช้ได้ง่ายกว่าชุดที่ไม่ผ่านการบำบัด

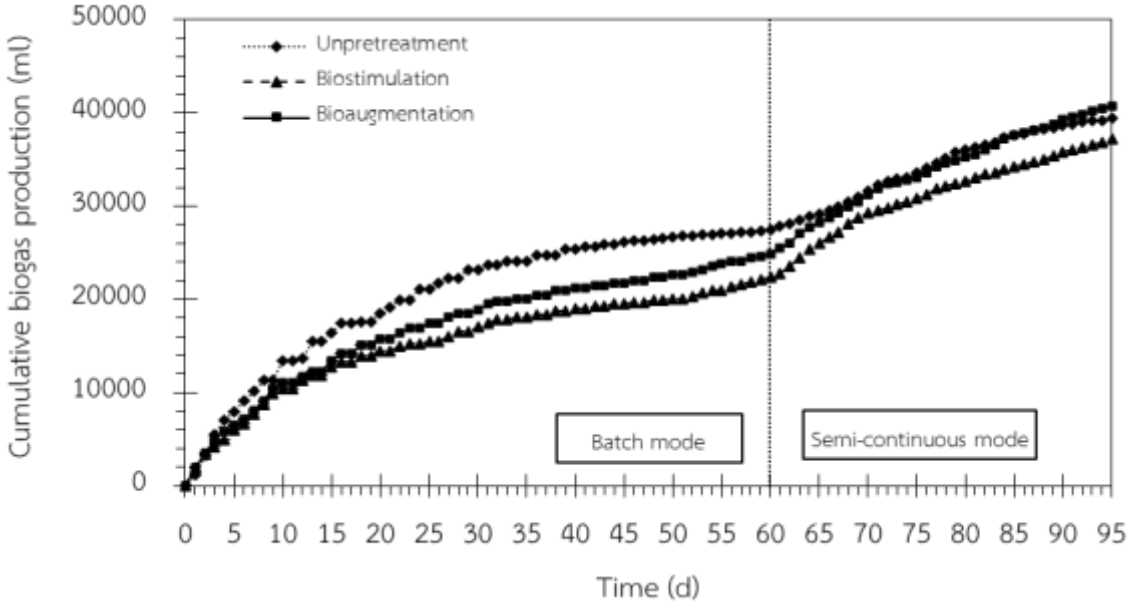
สำหรับประสิทธิภาพโดยรวมพบว่า ผลผลิตมีเทนและการลดลงของสารอินทรีย์ของตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 และการปรับสภาพด้วย biostimulation นั้นสูงกว่าตะกอนลอยที่ไม่มีการปรับสภาพ (unpretreatment) Table 22 แสดงประสิทธิภาพโดยรวมในการกำจัดของแข็งทั้งหมดและค่าซีโอดีทั้งหมดแสดงในการปรับสภาพด้วยวิธีการทางชีวภาพ พบว่า มีการกำจัดของแข็งทั้งหมดและค่าซีโอดีที่สูงอย่างมีนัยสำคัญ (TS เท่ากับร้อยละ 17.6-60.9) (tCOD เท่ากับร้อยละ 35.6-71.8) ทั้งในการเดินระบบแบบกะและการเดินระบบแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยมีความสัมพันธ์กับปริมาณมีเทนที่สูงขึ้นเท่ากับร้อยละ 67.5-81.9 จะเห็นได้ว่าปริมาณมีเทนที่ได้ถึงร้อยละ 81 อาจเกิดจากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ละลายน้ำทำให้มีปริมาณมีเทนสูง อย่างไรก็ตาม หลังสิ้นสุดกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ SNL1 ให้การผลิตมีเทนสูงสุดด้วยผลผลิตมีเทนเท่ากับ 125-259 $mLCH_4/gVS$ การใช้ระบบการหมักแบบกะเพื่อผลิตแก๊สชีวภาพเป็นระบบที่คนส่วนใหญ่มักจะใช้กัน เนื่องจากว่ามีการใช้งานและการบำรุงรักษาที่เรียบง่าย แต่ในระหว่างกระบวนการหมักจะต้องระวังการสะสมของกรดไขมันระเหยง่ายเพราะจะเป็นพิษกับกลุ่มจุลินทรีย์ผลิตมีเทน ซึ่งการผลิตแก๊สชีวภาพโดยใช้ระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องจะมีการเติมวัตถุดิบเข้าและออกอย่างต่อเนื่องทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สได้สูงขึ้น แต่ในทางกลับกันจะเสียค่าซ้อมบำรุงรักษาหรือค่าใช้จ่ายมากกว่า (Uddin และ Wright, 2022) ดังนั้นจึงมีการทดลองการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่เติมหัวเชื้อและชุดที่ไม่มีการปรับสภาพ ในถังหมักขนาด 200 ลิตร ในการทดลองถัดไป

เมื่อพิจารณาถึงความหลากหลายของชุมชนจุลินทรีย์ซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่มีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพจึงมีการวิเคราะห์ next-generation sequencing ของชุดการทดลอง unpretreatment, biostimulation และ bioaugmentation โดย SNL1 ในวันที่ 0 และหลังจากการผลิตแก๊สชีวภาพวันที่ 60 โดยใช้ระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นเชื้อแบคทีเรียที่หลากหลายอย่างมีนัยสำคัญในระดับจีนัส (Figure 35) โดยพบกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ ได้แก่ Methanobacterium, Brachymonas, Pavacoccus, Sporanaerobacter, Pseudochrobactrum, Petrimuonas, Bacteroidetes_vadinHA 17, Comamonas, Fastidiosipila, JGI-0000079-D21 และ Other ตามลำดับ เมื่อดูจากการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์หลังจากการหมักแก๊สชีวภาพ 60 วัน พบว่า มี 3 จีนัส ที่มีการเจริญเติบโตของอย่างเห็นได้ชัด คือ

Methanobacterium, Sporanaerobacter และ Pseudochrobactrum ในขณะที่ Other มีประชากรจุลินทรีย์ลดลงเพียง 1.1 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 อย่างไรก็ตามจากการทดลองจะเห็นได้ว่าการหมักแบบกะ พบการผลิตแก๊สชีวภาพสูงที่สุดชุดการทดลองที่ไม่มีการปรับสภาพ เนื่องมาจากในวันเริ่มต้นของการหมักพบกลุ่มจุลินทรีย์ Methanobacterium สูงกว่า (ร้อยละ 33.5) ชุดที่ผ่านการปรับสภาพโดย biostimulation และ bioaugmentation ด้วย SNL1 อาจเกิดจากลักษณะของหัวเชื้อมีเทนเริ่มต้นที่มีลักษณะเป็นเม็ดแกรนูล จึงยากต่อการควบคุมปริมาณของกลุ่มจุลินทรีย์ แม้จะเติมในปริมาตรที่เท่ากัน เมื่อพิจารณาหลังจากการหมักแก๊สชีวภาพ 60 วัน พบการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ Methanobacterium มากถึง 2.4 เท่า ในชุดการทดลองที่ผ่านการปรับสภาพ โดย bioaugmentation ด้วย SNL1 ซึ่งมีความสอดคล้องกับปริมาณแก๊สมีเทนสะสมที่ผลิตได้สูงที่สุดในระบบ อีกทั้งเมื่อเติมเชื้อ SNL1 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสเพื่อย่อยสลายตะกอนลอยจากบ่อดักไขมัน สามารถเปลี่ยนรูปอาหารที่มีโครงสร้างเชิงซ้อนเป็นโครงสร้างอย่างง่าย จึงทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตมีเทนและทำให้ประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่ม Other ที่คาดว่ามีเชื้อ SNL1 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Other สูงร้อยละ 57.9 ในวันที่ 0 ของการทดลอง และเมื่อผ่านไป 60 วัน ประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่ม Other มีการเจริญลดลง 1.3 เท่า อาจเนื่องมาจาก มีการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์ผลิตกรดทำให้ในระบบมีสภาวะที่เป็นกรด ส่งผลต่อเชื้อ SNL1 ที่เติมลงไปในระบบไม่สามารถปรับตัวในสภาวะที่เป็นกรด ทำให้การอยู่รอดของเชื้อลดลง

จากงานวิจัยของ Lee และคณะ (2017) ที่ศึกษาการปรับปรุงประสิทธิภาพของกระบวนการย่อยแบบไร้อากาศร่วมกับเซลล์อิเล็กโทรไลซิสของจุลินทรีย์ (MEC) และการผลิตแก๊สชีวภาพ เมื่อตรวจสอบกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ของกากตะกอนที่เหลือในระบบผ่านการวิเคราะห์ 454-pyrosequencing พบกลุ่ม Methanobacterium beijingense และ Methanobacterium Petrolearium เป็นสายพันธุ์ archaeal ที่โดดเด่นในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ ในขณะที่ Methanosrcina thermophila และ Methanobacterium formicicum มีความโดดเด่นในกระบวนการย่อยแบบไร้อากาศร่วมกับเซลล์อิเล็กโทรไลซิสของจุลินทรีย์ จะเห็นได้ว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในสายพันธุ์แบคทีเรียที่โดดเด่น อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถกระตุ้นประชากรของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในการผลิตก๊าซมีเทน นอกจากนี้จากรายงานของ Yang และคณะ (2022) ที่ศึกษาแหล่งของประชากรจุลินทรีย์ผลิตมีเทนในระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศที่อุณหภูมิต่ำ พบว่า Methanobacterium beijingense เป็นจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่หลักสำหรับการผลิตแก๊สมีเทนในกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่ากระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศมีการใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อการผลิตแก๊สชีวภาพพร้อม ๆ กับการบำบัดของเสียที่อุดมไปด้วยสารอินทรีย์

(A) Cumulative biogas production



(B) Cumulative methane production

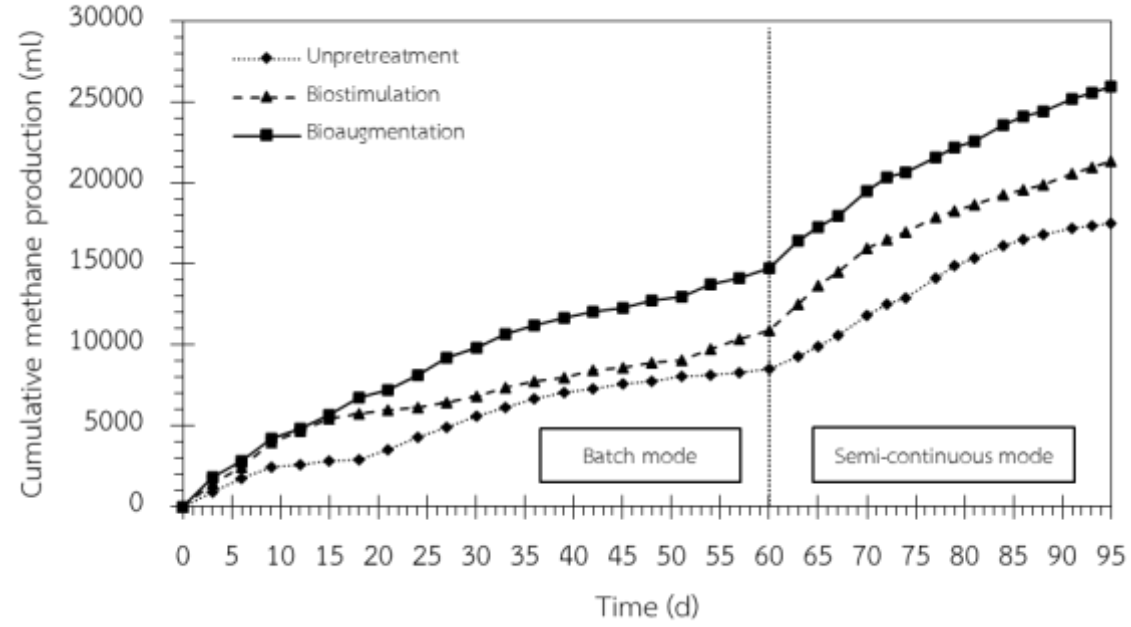


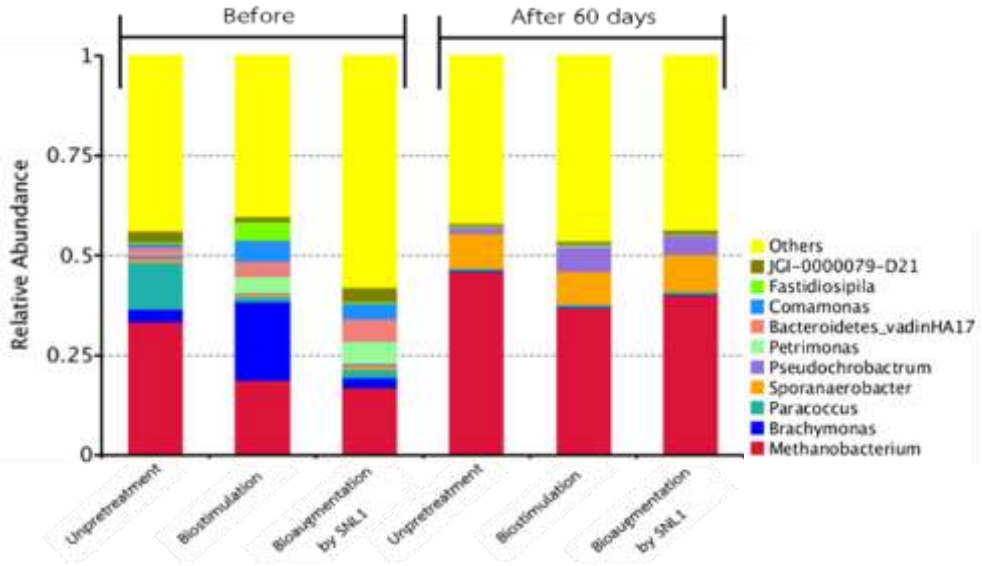
Figure 34 Cumulative biogas production (A) and cumulative methane production (B) of scum slurry pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1 under non-sterile condition with aeration at 0.4 vvm for 7 days and unpretreated scum.

Table 22 Biogas performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) using biostimulation without microbial inoculation and bioaugmentation by SNL1 under non-sterile conditions with aeration at 0.4 vvm for 7 days

Conditions	Batch mode				Semi-continuous mode			
	% Removal		Methane yield	Methane	% Removal		Methane yield	Methane
	TS	tCOD	($mLCH_4/gVS$)	content (%)	TS	tCOD	($mLCH_4/gVS$)	content (%)
Unpretreatment	30.8±8.80	50.7±14.0	70.8	68.9	22.7-41.5	16.2-28.7	70.8-132.7	65.0
Biostimulation	48.6±9.43	66.6±14.4	71.9	73.7	17.6-44.9	35.6-46.2	93.4-221.9	67.5
Bioaugmentation by SNL1	60.9±6.07	71.8±1.57	82.9	80.9	26.1-41.1	50.3-63.2	125-259.8	68.8

Note: Performance parameters of scum for pretreatment time 7 days

(A) genus level



(B) genus tree

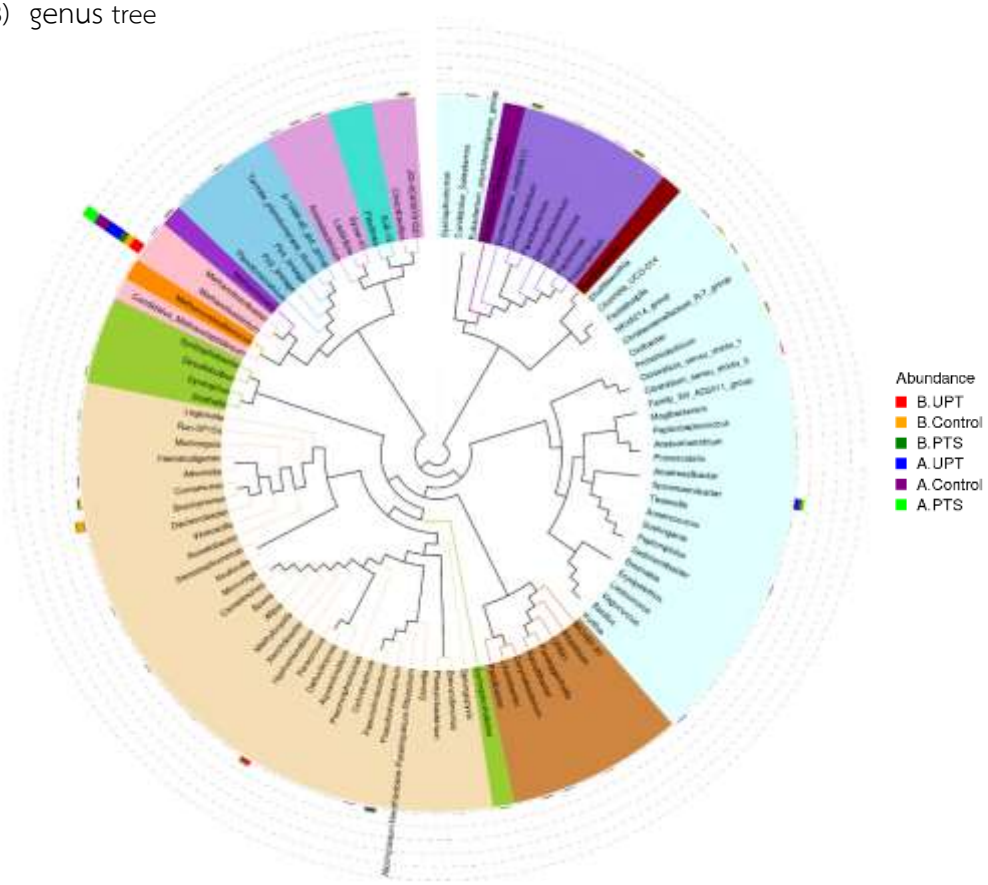


Figure 35 Composition and relative abundance of microbial flora during biogas production (at day 0 and 60) of scum slurry pretreated by the biostimulation and bioaugmentation by SNL1 under non-sterile condition with aeration at 0.4 vvm for 7 days and unpretreated scum.

6. การปรับสภาพตะกอนลอยและการผลิตแก๊สชีวภาพในถังหมักขนาด 200 ลิตรโดยใช้ระบบการหมักแบบกะ

จากการทดลองปรับสภาพตะกอนลอยในถังหมักขนาด 200 ลิตร ใช้ปริมาตรหมักจริงเท่ากับ 100 ลิตร โดยเติมตะกอนลอยที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับ 80:20ปริมาตร 90 ลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อ (เลี้ยงกระตุ้น SNL1 ในน้ำเสียจากบ่อดักไขมันที่เติมกากน้ำตาลร้อยละ 1) ปริมาตร 10 ลิตร และเปิดปั๊มลมเพื่อให้อากาศ โดยระยะเวลาในการปรับสภาพพิจารณาจากปริมาณของซีโอดีละลายน้ำที่เพิ่มขึ้น

Figure 36 แสดงผลของการปรับสภาพตะกอนลอยโดยการปรับสภาพแบบ bioaugmentation ด้วย SNL1 ที่มีการเติมอากาศก่อนการผลิตแก๊สมีเทนเป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่าพีเอชมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 6.13 ถึง 7.32 นอกจากนี้ค่าซีโอดีละลายน้ำ เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดจาก 6.95 ถึง 12.91 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของแข็งและปริมาณของแข็งแขวนลอยโดยมีค่าลดลงเท่ากับ 90.47 ไป 64.33 กรัมต่อลิตร และ 83.72 ไป 61.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เนื่องจากสารอินทรีย์ในรูปของแข็งถูกออกซิไดซ์ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้และง่ายต่อจุลินทรีย์ที่จะนำสารอินทรีย์เหล่านี้ไปใช้ นอกจากนี้การตรวจวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส หลังจากทำการย่อยสลายตะกอนเป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่า มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในวันที่ 0 โดยมีค่าเท่ากับ 1,859.0 ยูนิตต่อลิตร และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในวันที่ 3 โดยมีค่าเท่ากับ 23.07 ยูนิตต่อลิตร ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่สูงสุดในวันที่ 0 มีความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาเพื่อย่อยสลายตะกอนลอยตั้งแต่อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียร่วมกับ หัวเชื้อที่เติมลงไปซึ่งได้รับการกระตุ้นตั้งแต่การเตรียมหัวเชื้อ ดังนั้นการปรับสภาพตะกอนซึ่งมีองค์ประกอบของไขมันและโปรตีนเป็นหลัก จะทำให้โครงสร้างที่ซับซ้อนเปลี่ยนรูปให้เป็นโครงสร้างที่ง่ายขึ้นด้วยการย่อยสลายจากแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์จึงทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้ในกระบวนการไร้อากาศเพื่อผลิตแก๊สชีวภาพต่อไป

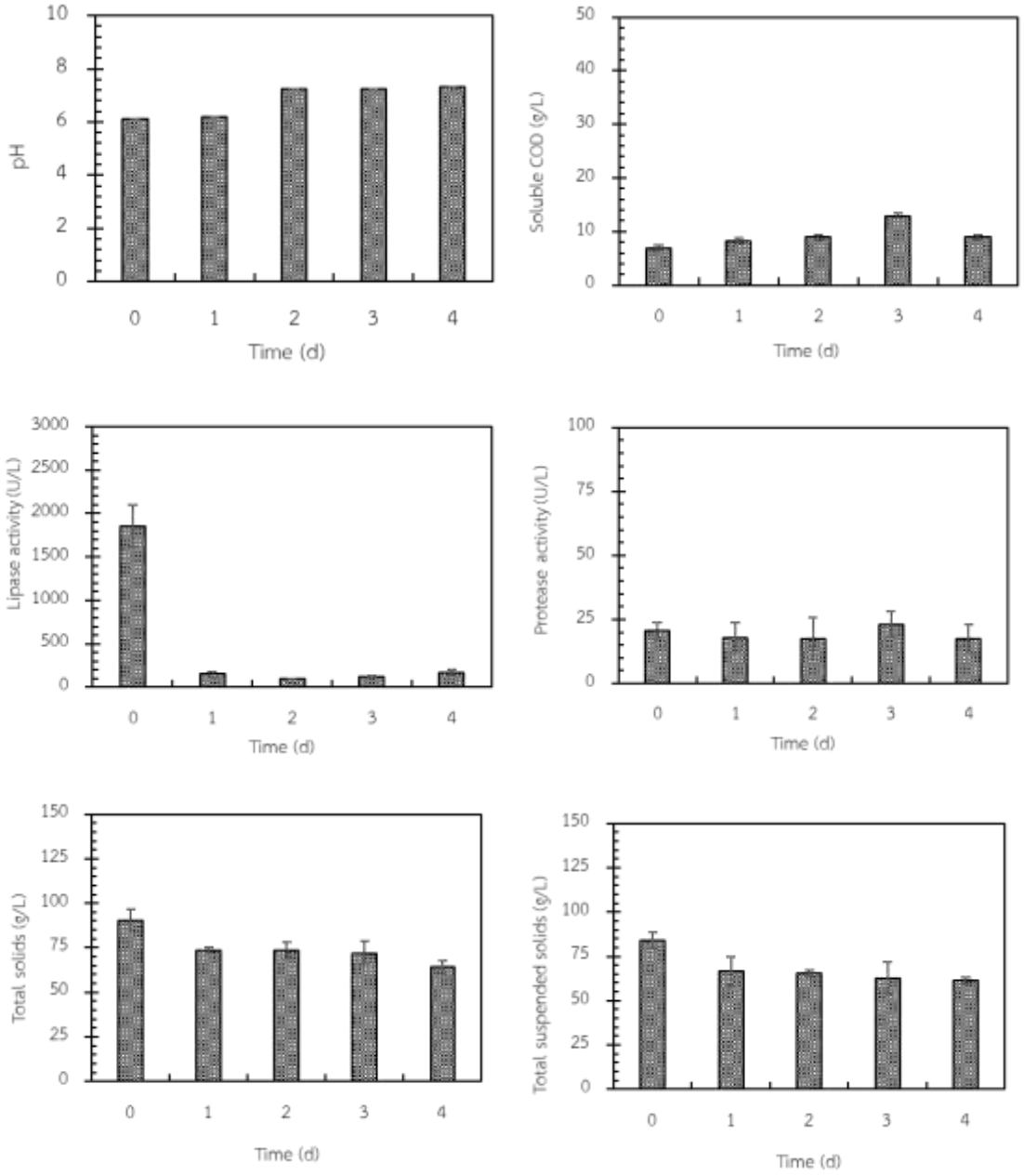


Figure 36 pH, soluble COD, lipase activity, protease activity, total solids and total suspended solids before and after the pretreatment of scum from oil trap with using lipase and protease producing bacteria SNL1 under non-sterile condition with aeration for 4 days.

หลังจากการปรับสภาพด้วย bioaugmentation ที่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ SNL1 และเติมอากาศแล้ว นำมาทดลองการผลิตแก๊สมีเทนในถังหมักขนาด 200 ลิตร โดยใช้ระบบการหมักแบบกะ เปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักกับชุดการทดลองที่ไม่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์และชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (Unpretreatment) ผลการทดลองพบว่า ควรเติมหัวเชื้อ SNL1 และเติมอากาศ (bioaugmentation) สามารถส่งเสริมการผลิตแก๊สชีวภาพโดยมีการผลิตแก๊สมีเทนสะสมสูงสุดได้มาจากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพเป็นเวลา 4 วัน จากชุดการทดลอง bioaugmentation มีค่าเท่ากับ 3.71 LCH_4 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์และชุดที่ไม่มีการปรับสภาพ มีค่าเท่ากับ 1.45 LCH_4 และ 0.76 LCH_4 ตามลำดับ นอกจากนี้ชุดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย bioaugmentation มีผลผลิตมีเทนสูงสุดเท่ากับ 25.8 $mLCH_4/gVS$ ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์และชุดที่ไม่มีการปรับสภาพ (21.1 $mLCH_4/gVS$ และ 4.7 $mLCH_4/gVS$ ตามลำดับ) (Figure 37 และ Table 23) แต่มีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการผลิตแก๊สชีวภาพในระดับขวดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร และขนาดถังหมัก 6.5 ลิตร เท่ากับ 22.7 และ 10.1 เท่า ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากการทดลองในระดับถังหมักขนาดเล็กสามารถควบคุมสภาวะการผลิตแก๊สชีวภาพได้ง่ายและลดความผิดพลาดของการทดลองได้ดีกว่า ในขณะที่การทดลองในถังหมักขนาดใหญ่พบว่าการกวนผสมนั้นควบคุมได้ยากส่งผลให้อุณหภูมิในถังหมักกระจายตัวได้ไม่ดีจึงมีการผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนต่ำ (Roubík และคณะ, 2018)

สำหรับประสิทธิภาพการกำจัดของเสียในรูปของของแข็งทั้งหมดและซีโอดีทั้งหมด Table 23 พบว่า Bioaugmentation มีการกำจัดของแข็งทั้งหมดสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 38 ในวันที่ 25 ของการหมัก รองลงมาคือชุดการทดลอง Unpretreatment และชุดที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 32 และ 20 ในวันที่ 30 ของการหมัก ส่วนการกำจัดซีโอดีทั้งหมดมีค่าสูงสุดอยู่ในชุดการทดลอง Bioaugmentation โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 34 ในวันที่ 25 ของการหมัก ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณมีเทน (ร้อยละ 29) ที่สูงที่สุด ในขณะที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์และ Unpretreatment มีการกำจัดซีโอดีทั้งหมดร้อยละ 38 และ 33 อยู่ในวันที่ 30 ของการหมัก

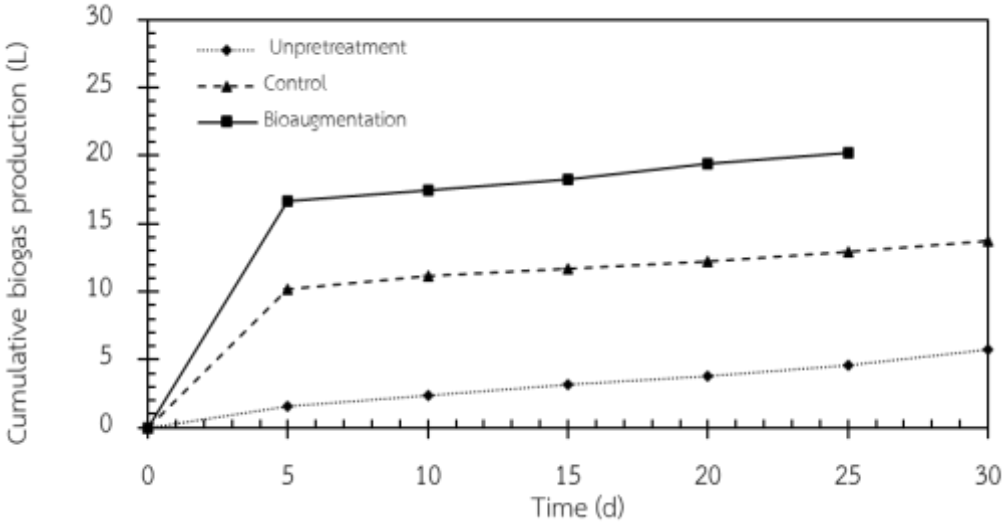
Figure 38 แสดงถึงปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมด (Total volatile fatty acids) และสภาพความเป็นด่าง (Alkalinity) พบว่า ทุกชุดการทดลองปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมดในระบบจะเพิ่มขึ้นในช่วงเริ่มต้น โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1087- 3178 มิลลิกรัมต่อลิตร เพราะว่าจุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรดย่อยสารอินทรีย์ในระบบและผลิตกรดไขมันระเหยง่าย โดยปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมดถูกผลิตสูงสุดในวันที่ 30 ของการหมัก จากชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการ

ปรับสภาพมีค่าเท่ากับ 3178 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณมีเทนเกิดขึ้นได้น้อย (ร้อยละ 17) เนื่องจากในระบบมีการสะสมกรดมากเกินไปจึงอาจทำให้เป็นพิษต่อจุลินทรีย์กลุ่มผลิตมีเทน (ชุดที่ไม่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ = 2381 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณมีเทนร้อยละ 14 ในวันที่ 30 ของการหมักและ Bioaugmentation = 2190 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณมีเทนร้อยละ 29 ในวันที่ 25 ของการหมัก) ในขณะที่สภาพความเป็นด่างในระบบของทุกชุดการทดลองนั้นมีค่าต่ำอยู่ในช่วง 37- 81 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจเป็นเพราะว่าในระบบช่วงแรกมีการสะสมกรดไขมันระเหยง่ายสูงมากกว่า

อย่างไรก็ตามหลังจากการหมักแบบไร้อากาศ 30 วัน พบว่า เกิดการผลิตแก๊สชีวภาพน้อยลงเนื่องจากไม่มีการกวนผสมกันภายในถังหมัก สาเหตุเกิดจากปั๊มสูบน้ำที่ใช้ในการกวนผสมตันเพราะปริมาณตะกอนในระบบ จึงทำให้เชื้อและอาหารไม่เกิดการสัมผัสกันหรือเป็นไปได้ว่าเมื่อไม่มีการกวนผสมทำให้ตะกอนที่ถูกย่อยไปบางส่วนแล้วเปลี่ยนเป็นโมเลกุลขนาดเล็กลงจึงมีน้ำหนักเบากว่าของเหลวที่อยู่ภายในถัง จึงทำให้ลอยขึ้นสู่เหนือผิวหน้าของเหลวและส่งผลทำให้การผลิตแก๊สชีวภาพเกิดได้น้อยลง Sarker และคณะ (2019) กล่าวว่าการกวนผสมจะส่งเสริมการสัมผัสกันระหว่างจุลินทรีย์ สารตั้งต้นและสารอาหาร และทำให้อุณหภูมิในถังหมักเกิดการกระจายตัวกันอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้การกวนผสมที่เพียงพอยังสามารถลดการตกตะกอนและลดอัตราการเกิดฟองที่เกิดจากไขมันลอยตัวที่มีฟองแก๊สเกาะติดอยู่หรือลดจุลินทรีย์ที่เป็นเส้นใย เช่น Microthrix หรือ Norcardia ในระบบลงได้

จากการทดลองการผลิตแก๊สมีเทนจากตะกอนลอยที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพในถังหมักขนาด 200 ลิตรโดยใช้ระบบการหมักแบบกะ โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ชุด ได้แก่ ชุดแรก bioaugmentation โดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ SNL1 และเติมอากาศ ชุดการทดลองที่สอง คือ ชุดที่ไม่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ SNL1และชุดการทดลองสุดท้าย คือ ไม่มีการปรับสภาพ พบว่า bioaugmentation นั้นให้ผลของการผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนสะสมมากที่สุด เนื่องมาจากการถูกปรับสภาพด้วยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสควบคู่ไปกับการเติมอากาศจึงส่งผลให้ในระบบเกิดการย่อยสลายของสารอินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้น ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของสารอาหารที่ใช้ได้ง่าย เมื่อเข้าสู่กระบวนไร้อากาศจุลินทรีย์กลุ่มผลิตแก๊สมีเทนจึงสามารถนำสารอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้โดยตรง ดังนั้นจึงเลือกชุดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย bioaugmentation เพื่อศึกษาในถังหมักขนาด 1000 ลิตรต่อไป

(A) Cumulative biogas production



(B) Cumulative methane production

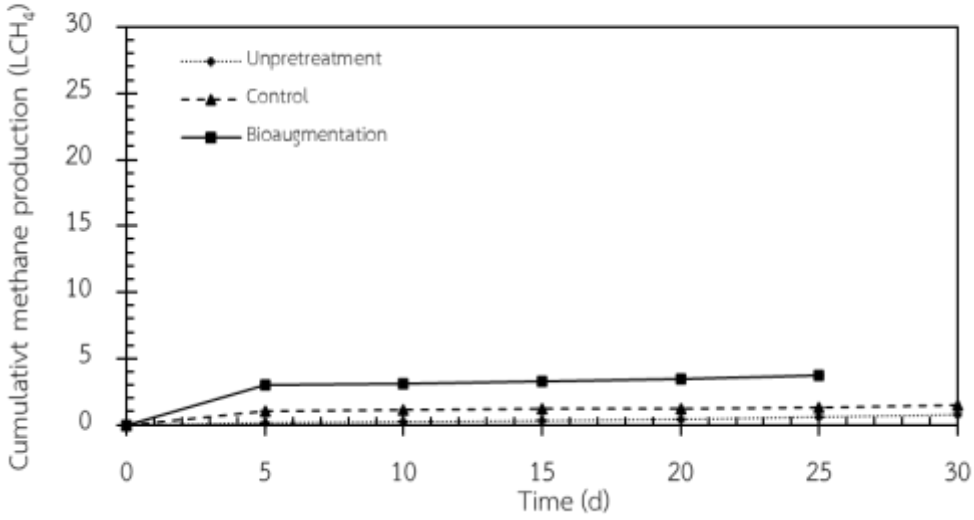
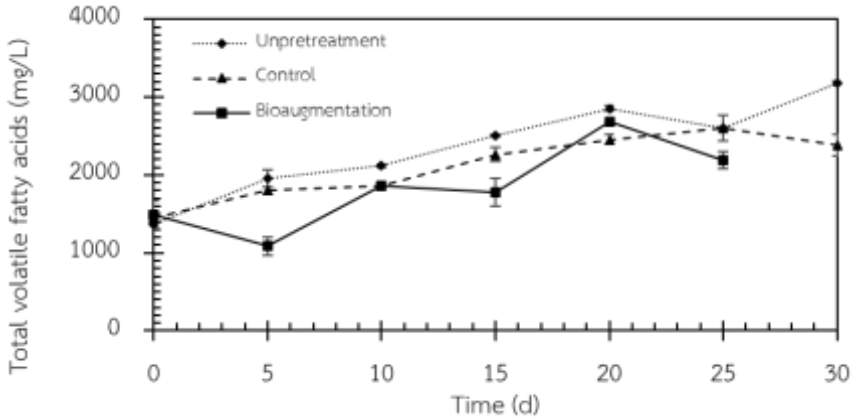


Figure 37 Cumulative biogas production (A) and cumulative methane production (B) of scum slurry pretreated by the bioaugmentation by SNL1 under non-sterile condition with aeration for 4 days.

Table 23 Biogas performance parameters of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) using without microbial inoculation and bioaugmentation by SNL1 under non-sterile conditions with aeration for 4 days

Conditions	% Removal		Methane yield ($mLCH_4/gVS$)	Methane content (%)
	TS	tCOD		
Bioaugmentation by SNL1	38.00 ± 0.87	34.47 ± 10.2	25.8	29.03
Control	20.99 ± 15.5	38.46 ± 10.9	21.1	14.48
Un-pretreatment	32.61 ± 6.15	33.93 ± 12.6	4.70	17.15

(A) Total volatile fatty acid



(B) Alkalinity

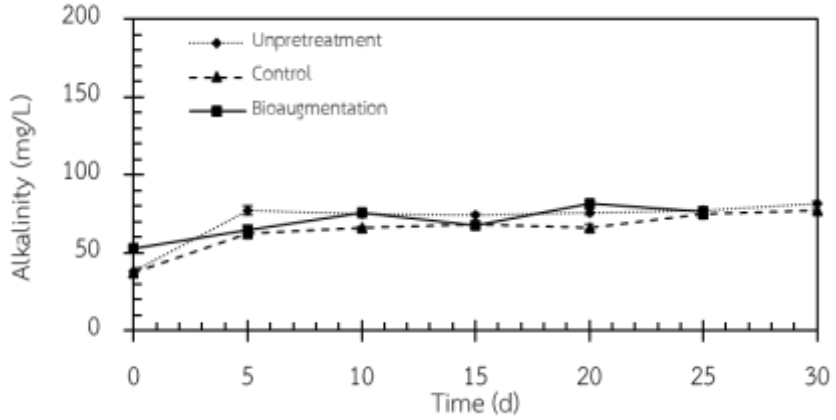


Figure 38 Total volatile fatty acid and alkalinity before and after the pretreatment of scum from oil trap with using lipase and protease producing bacteria SNL1 under non-sterile condition with aeration for 4 days.

7. การปรับสภาพตะกอนลอยและการผลิตแก๊สชีวภาพในถังหมักขนาด 1000 ลิตรโดยใช้ระบบการหมักแบบกะ

จากการทดลองการปรับสภาพตะกอนลอยในถังหมักขนาด 1000 ลิตร ใช้ปริมาตรหมักจริงเท่ากับ 500 ลิตร โดยเติมตะกอนลอยที่อัตราส่วนตะกอนลอยต่อน้ำเสียเท่ากับ 80:20 ปริมาตร 450 ลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อ SNL1 ปริมาตร 50 ลิตร และเปิดปั๊มลมเพื่อให้อากาศ โดยปรับสภาพเป็นระยะเวลา 3 วัน

Figure 39 แสดงผลของการปรับสภาพตะกอนลอยโดย bioaugmentation ด้วยการเติมแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส SNL1 และการเติมอากาศก่อนการผลิตแก๊สมีเทนเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่า พีเอชมีค่าลดลงเล็กน้อยจาก 6.95 ถึง 6.69 นอกจากนี้ค่าซีโอดีละลายน้ำเพิ่มขึ้นจาก 5.76 ถึง 11.84 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของแข็งและปริมาณของแข็งแขวนลอยที่ลดลง (จาก 52.74 ไป 43.42 กรัมต่อลิตร และ 48.63 ไป 40.69 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ และจากการตรวจวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส พบว่า มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในวันที่ 3 โดยมีค่าเท่ากับ 645 ยูนิตต่อลิตร และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในวันที่ 2 โดยมีค่าเท่ากับ 24 ยูนิตต่อลิตร ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่สูงสุดในวันที่ 3 สอดคล้องกับค่าพีเอชที่ลดลง (6.69) บ่งบอกได้ว่าเกิดการย่อยสลายของไขมันโดยไลเปสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมาเกิดเป็นกรดไขมันอิสระในระบบจึงทำให้ระบบการหมักมีความเป็นกรด อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการหมักที่ขนาด 200 ลิตร เนื่องมาจากองค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้ในแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันของความเข้มข้นตะกอน ซึ่งในการทดลองนี้มีค่าเริ่มต้นของแข็งเท่ากับ 52 กรัมต่อลิตร

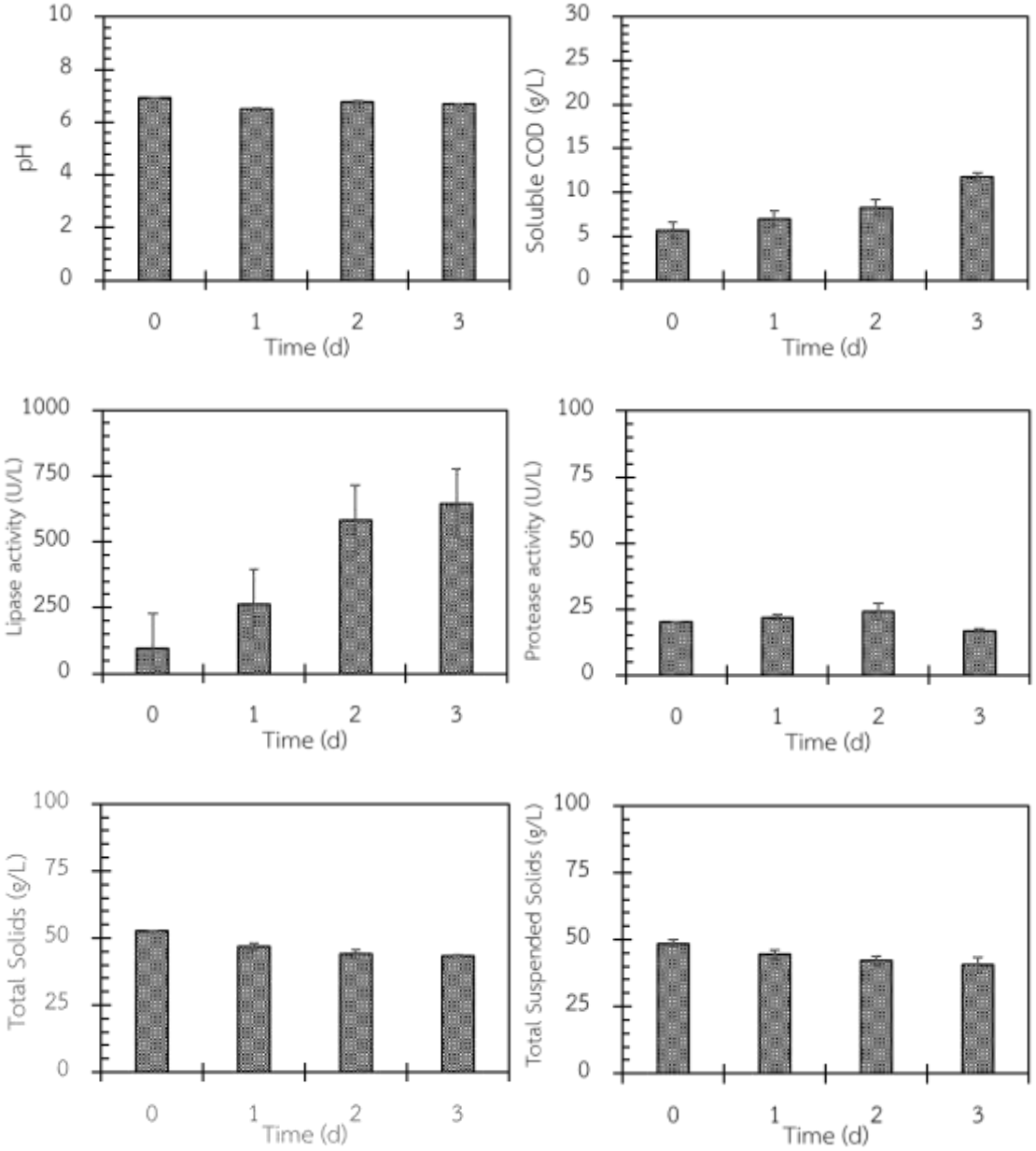


Figure 39 pH, Soluble COD, lipase activity, and protease activity total solids and total suspended solids before and after the digestion of scum from oil trap by using lipase and protease producing bacteria and aeration for 3 days.

หลังจากการปรับสภาพตะกอนลอยเป็นเวลา 3 วัน Figure 40 แสดงผลของการผลิตมีเทนในถังหมักขนาด 1000 ลิตร โดยใช้ปริมาณหมักจริง 750 ลิตร ที่เติมตะกอนลอยที่มีการปรับสภาพโดยการเติมเชื้อจุลินทรีย์ SNL1 และอากาศ 500 ลิตร และหัวเชื้อมีเทน 250 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า การผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนสะสมที่ได้จากการย่อยแบบไม่ใช้ออกซิเจนของตะกอนที่ผ่านการบำบัดแล้วช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพได้ดียิ่งขึ้น โดยมีค่าแก๊สชีวภาพสะสมและแก๊สมีเทนสะสมสูงสุดเท่ากับ 6124.33 L และ 1192.91 LCH_4 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า มีผลผลิตมีเทนเท่ากับ 1890 $mLCH_4/gVS$ ในวันที่ 81 ของการหมัก จะเห็นได้ว่าในช่วงระยะเวลาการหมักของวันที่ 9 ถึง 45 เกิดปริมาณแก๊สชีวภาพสะสมค่อนข้างคงที่ เนื่องมาจากจุลินทรีย์ในระบบใช้กากน้ำตาลที่หลงเหลืออยู่จากช่วงของการปรับสภาพสามารถทำให้จุลินทรีย์กลุ่มไฮโดรไรติกในระบบไร้อากาศเลือกใช้กากน้ำตาลเพื่อการเจริญก่อนเพราะในทางทฤษฎีแล้ว กลุ่มของน้ำตาลประกอบไปด้วยโมเลกุลของคาร์บอน 6 โมเลกุล ซึ่งสั้นกว่ากลุ่มของโปรตีนและไขมัน (16 โมเลกุล และ 50 โมเลกุล ตามลำดับ) (Leung และคณะ, 2016) และหลังจากวันที่ 46 ของการหมัก ปริมาณของแก๊สชีวภาพสะสมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อาจเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มไฮโดรไรติกในระบบไร้อากาศเริ่มใช้โปรตีนและไขมันที่อยู่ในระบบหลังจากใช้กากน้ำตาลหมดเพื่อเปลี่ยนรูปให้ไปอยู่ในรูปของกรดไขมันระเหยง่ายเพื่อให้จุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทนใช้เป็นอาหารต่อไป หรืออาจเนื่องมาจากการให้อากาศเพื่อปรับสภาพก่อนการผลิตแก๊สชีวภาพที่มากเกินไปเมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักแบบไร้อากาศจุลินทรีย์กลุ่ม facultative anaerobes ต้องใช้ระยะเวลานานในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ส่งผลให้มีช่วง lag phase เป็นเวลานานถึง 45 วัน (Labatut และคณะ, 2011) สำหรับประสิทธิภาพการกำจัดของเสียในรูปของของแข็งทั้งหมดและซีโอดีทั้งหมด (Table 24) พบว่า มีการกำจัดของแข็งทั้งหมดและซีโอดีทั้งหมดสูงสุดโดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 83 และ 87 ตามลำดับ และมีปริมาณมีเทนอยู่ในช่วงร้อยละ 50 ถึง 73 ตลอดระยะเวลาของการหมัก

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมด (Total volatile fatty acid) และสภาพความเป็นด่าง (Alkalinity) (Figure 41) พบว่า ปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมดในระบบเพิ่มขึ้น โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 709 - 1926 มิลลิกรัมต่อลิตร เพราะว่าจุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรดย่อยสารอินทรีย์ในระบบและผลิตกรดไขมันระเหยง่าย โดยปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมดถูกผลิตสูงสุดในวันที่ 48 ของการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2290 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วค่อย ๆ ลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มผลิตมีเทนใช้กรดที่สะสมอยู่ในระบบเพื่อการเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับผลของปริมาณแก๊สชีวภาพสะสมที่สูงขึ้นหลังจากวันที่ 48 ของการหมัก ส่งผลให้มีปริมาณมีเทน (Methane content เท่ากับร้อยละ 68-73) เพิ่มขึ้นในระบบ ในขณะที่สภาพความเป็นด่างในระบบมีค่าต่ำอยู่ในช่วง 32-96 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจเป็นเพราะว่าในระบบช่วงแรกมีการสะสมกรดไขมันระเหยง่ายสูงมากกว่า

จากการทดลองการผลิตแก๊สมีเทนจากตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพในถังหมักขนาด 1000 ลิตรโดยใช้ระบบการหมักแบบกะ พบว่า การเติมหัวเชื้อ SNL1 และเติมอากาศเข้าสู่ระบบเพื่อเป็นการปรับสภาพตะกอนลอย มีผลช่วยให้เพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนและสามารถลดระยะเวลาของการไฮโดรไลซิสในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศลงได้ นอกจากนี้กากน้ำตาลที่หลงเหลืออยู่จากช่วงของการปรับสภาพยังสามารถถูกใช้ในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศต่อได้

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการทดลองการปรับสภาพตะกอนลอยโดยวิธีการ bioaugmentation ด้วย SNL1 ในถังหมักแต่ละขนาด (Table 25) พบว่า การให้อากาศอาจมีผลดีในขั้นตอนการย่อยสลายเนื่องจากทำให้มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเพิ่มขึ้นส่งผลให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นกลุ่ม aerobes สามารถเจริญเติบโตได้อย่างเต็มและย่อยสลายตะกอนลอยให้อยู่ในรูปของซีโอดีละลายน้ำ ทั้งนี้จุลินทรีย์กลุ่ม facultative anaerobes ก็สามารถเจริญในสภาวะมีอากาศได้เช่นกัน เมื่อเข้าสู่กระบวนหมักแบบไร้อากาศในถังหมักขนาดใหญ่ที่ไม่ได้มีการพ่นแก๊สไนโตรเจนเพื่อไล่อากาศจึงยังคงมีออกซิเจนหลงเหลืออยู่ในถังหมักขนาดใหญ่มากกว่าถังหมักขนาดเล็ก ส่งผลให้จุลินทรีย์พวกที่เป็นไฮโดรไลติกกลุ่ม facultative anaerobes ปรับตัวได้ช้าและกลุ่มจุลินทรีย์ที่ต้องใช้สารอาหารต่อจากกลุ่มนี้มีสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตจึงทำให้มีช่วง lag phase นานและมีผลผลิตมีเทนต่ำ หากต้องการเพิ่มศักยภาพในการผลิตมีเทนและพัฒนาไปสู่การจัดการของเสียอย่างมีประสิทธิภาพ ควรมีการออกแบบระบบของถังหมักเป็นอย่างดีเพื่อลดความผิดพลาดของการวิจัยลงได้ เช่น ระบบการกวนผสมซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งของระบบไร้อากาศ นอกจากนี้ควรมีการศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มผลผลิตของแก๊สชีวภาพต่อไป

เมื่อทำการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของโครงการและความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ จากผลการทดลองพบว่า สามารถผลิตแก๊สมีเทนเท่ากับ 1.893 ลิตร/กรัม VS ของสารตั้งต้น = 1.893 ลบ.ม./กิโลกรัม VS ของสารตั้งต้น

1. การคำนวณค่าพลังงาน

จากการหมักสารตั้งต้นโดยใช้ scum: น้ำเสีย = 360:90 ลิตร (Total solid 58.7 กรัมน้ำหนักแห้ง/ลิตร หรือ 73.7 กรัมน้ำหนักเปียก/ลิตร, VS = 50.1 กรัมน้ำหนักแห้ง/ลิตร) หรือ scum 26.5 กิโลกรัม คิดเป็นการผลิตแก๊สมีเทน 34.1 ลบ.ม. หรือ 1.29 ลบ.ม./กิโลกรัมเปียก scum โดยทั่วไปแก๊สมีเทน 1 ลบ.ม.มีค่าความร้อนประมาณ 39.4 เมกะจูล และสามารถใช้แทนน้ำมันเตา 0.67 ลิตร ซึ่งเทียบเท่าพลังงานไฟฟ้า 9.7 กิโลวัตต์-ชม. (ข้อมูลจากสำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน) ดังนั้นการใช้ถังหมัก 1 ลบ.ม. สารตั้งต้น 500 ลิตร จะได้พลังงานทั้งหมดที่จะได้รับ 50.8 เมกะจูล สามารถทดแทนน้ำมันเตา 22.8 ลิตร

2. การคำนวณผลตอบแทน

2.1 Scenario 1

หากทำการหมักแบบ batchๆละ 1 เดือน โดยใช้ถังหมักขนาด 10 ลบ.ม.ต้องการ scum 265 กิโลกรัม (โรงงานมีปริมาณตะกอนเกิดขึ้นประมาณ 300 กิโลกรัมต่อวัน) เพื่อให้เพียงพอต่อการรับภาระปริมาณตะกอน ต้องใช้ถัง 30 ถัง โดยหลังจาก 1 เดือน สามารถนำแก๊สมาใช้ได้ทุกวัน 341 ลบ.ม. และมีการเปลี่ยนถ่ายสารตั้งต้นใหม่ทุกวัน (เปลี่ยนถังจนครบ 30 ถังภายใน 1 เดือน) จึงเป็นการประหยัดพลังงานไฟฟ้า 3,307.7 กิโลวัตต์-ชม. คิดเป็น 10,750 บาท/วัน (ในปัจจุบันค่าไฟต่อหน่วยมีราคา 3.25 บาท) หรือ 322,500 บาท/เดือน หรือ 3,870,000 บาท/ปี

2.2 Scenario 2

หากทำการหมักแบบ semi-continuous ใช้ถังหมักขนาด 75 ลบ.ม. (ปริมาตรใช้งาน 60 ลบ.ม.) ต้องการ scum เริ่มต้นประมาณ 2358 กิโลกรัม โดยเมื่อดำเนินการแบบbatch เป็นระยะเวลา 1 เดือน จะมีการเปลี่ยนสารตั้งต้นทุกวัน (HRT 17.5 วัน) มีการเปลี่ยนสารตั้งต้นใหม่ทุกวัน โดยใช้ scum ประมาณ 252 กิโลกรัมทุกวัน คาดว่าจะได้แก๊สมีเทน 341 ลบ.ม./วัน และมีการเปลี่ยนถ่ายสารตั้งต้นใหม่ทุกวัน (เปลี่ยนจากถังเดิม) จึงเป็นการประหยัดพลังงานไฟฟ้า 3,307.7 กิโลวัตต์-ชม. คิดเป็น 10,750 บาท/วัน (ในปัจจุบันค่าไฟต่อหน่วยมีราคา 3.25 บาท) หรือ 322,500 บาท/เดือน หรือ 3,870,000 บาท/ปี

3. การคำนวณค่าใช้จ่าย

3.1 Scenario 1:

<u>ต้นทุนคงที่</u> (ราคาขึ้นอยู่กับวัสดุที่ใช้และยี่ห้อ): รวมค่าใช้จ่าย 4,295,400 บาท

- ค่าปั๊มอากาศ 6,800 บาท × 3 ตัว = 20,400 บาท
- ค่าปั๊มน้ำเพื่อใช้ในการกวนผสม 2,500 บาท × 30 ตัว = 75,000 บาท
- ค่าถังในการปรับสภาพ ขนาด 10 ลบ.ม. = 100,000 บาท × 3 ชุด = 300,000 บาท
- ค่าถังหมัก ขนาด 10 ลบ.ม. = 100,000 บาท × 30 ชุด = 3,000,000 บาท
- ค่าถุงเก็บแก๊ส ขนาด 500 ลบ.ม. = 30,000 บาท × 30 ชุด = 900,000 บาท

<u>ต้นทุนแปรผัน</u>: (คิดการหมัก 1 เดือน/batch) รวมค่าใช้จ่าย 29,142 บาท/เดือน

- ค่าเตรียมหัวเชื้อ SNL 1 จำนวน 500 ลิตร เท่ากับ 382.9 บาท/ถัง/batch × 30 ถัง = 11,487 บาท/batch
- ค่าไฟปั๊มอากาศ Heilea Hap 0.045 กิโลวัตต์ในการให้อากาศระหว่างการปรับสภาพเป็นระยะเวลา 3 วันๆละ 8 ชั่วโมง เท่ากับ 0.045 กิโลวัตต์ × 3 วัน × 8 ชั่วโมง × 3.25 บาท/กิโลวัตต์ชั่วโมง = 3.51 บาท/ถัง/batch × 30 ถัง = 105.3 บาท/batch
- ค่าไฟของปั๊มน้ำ Electropump ยี่ห้อ VENZ ซึ่งมีกำลังงานไฟฟ้าเท่ากับ 0.75 กิโลวัตต์ 30 วันๆละ 8 ชั่วโมง เท่ากับ 0.75 กิโลวัตต์ × 30 วัน × 8 ชั่วโมง × 3.25 บาท/กิโลวัตต์ชั่วโมง = 585 บาท/ถัง/batch × 30 ถัง = 17,550 บาท/batch

3.2 Scenario 2:

<u>ต้นทุนคงที่</u> (ราคาขึ้นอยู่กับวัสดุที่ใช้และยี่ห้อ): รวมค่าใช้จ่าย 1,355,197 บาท

- ค่าปั๊มอากาศ 6,800 บาท × 3 ตัว = 20,400 บาท
- ค่าปั๊มน้ำเพื่อใช้ในการกวนผสม 2,500 บาท × 1 ตัว = 2,500 บาท
- ค่าถังในการปรับสภาพ ขนาด 10 ลบ.ม. = 100,000 บาท × 3 ชุด = 300,000 บาท
- ค่าถังหมัก ขนาด 75 ลบ.ม. = 1,000,000 บาท × 1 =ชุด = 1,000,000 บาท
- ค่าถุงเก็บแก๊ส ขนาด 500 ลบ.ม. = 30,000 บาท × 1 ชุด = 30,000 บาท
- ค่าเตรียมหัวเชื้อ SNL 1 จำนวน 3000 ลิตร (ครั้งแรก) เท่ากับ 2,297.40 บาท

<u>ต้นทุนแปรผัน</u>: (คิดการหมัก 1 เดือน/batch) รวมค่าใช้จ่าย 1,723 บาท/เดือน

- ค่าเตรียมหัวเชื้อ SNL 1 จำนวน 48 ลิตร/วัน (เติมอาหารใหม่ทุกวัน) เท่ากับ 36.76 บาท × 30 วัน = 1,103 บาท/เดือน

- ค่าไฟปั๊มอากาศ Heilea Hap 0.045 กิโลวัตต์ในการให้อากาศระหว่างการปรับสภาพเป็นระยะเวลา 30 วันๆละ 8 ชั่วโมง เท่ากับ 0.045 กิโลวัตต์ × 30 วัน × 8 ชั่วโมง × 3.25 บาท/กิโลวัตต์ชั่วโมง = 35.1 บาท/เดือน
- ค่าไฟของปั๊มน้ำ Electropump ยี่ห้อ VENZ ซึ่งมีกำลังงานไฟฟ้าเท่ากับ 0.75 กิโลวัตต์ 30 วันๆละ 8 ชั่วโมง เท่ากับ 0.75 กิโลวัตต์ × 30 วัน × 8 ชั่วโมง × 3.25 บาท/กิโลวัตต์ชั่วโมง = 585 บาท/เดือน

4. ระยะเวลาคืนทุน

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

โดยที่

ต้นทุนคงที่ทั้งหมด = ค่าใช้จ่ายที่จ่ายเพียงครั้งเดียวในช่วงแรกของการติดตั้งระบบ เช่น ค่าก่อสร้างถังหมักและค่าอุปกรณ์ต่างๆ

ต้นทุนแปรผันทั้งหมด = ค่าใช้จ่ายที่ต้องจ่ายตลอดช่วงเวลาที่เดินระบบ เช่น ค่าไฟฟ้า ค่าซ่อมบำรุง ค่าวัตถุดิบ เป็นต้น

รายได้ทั้งหมด = รายได้จากการนำแก๊สชีวภาพไปแปลงเป็นกระแสไฟฟ้าเพื่อขายให้กับการไฟฟ้าส่วนภูมิภาค หรือรายได้จากราคาพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

4.1 Scenario 1:

$$\text{ระยะเวลาคืนทุน (เดือน)} = \frac{4{,}295{,}400 \text{ บาท}}{322{,}500 \text{ บาท/เดือน} - 29{,}142 \text{ บาท/เดือน}}$$

$$= 14.6 \text{ เดือน}$$

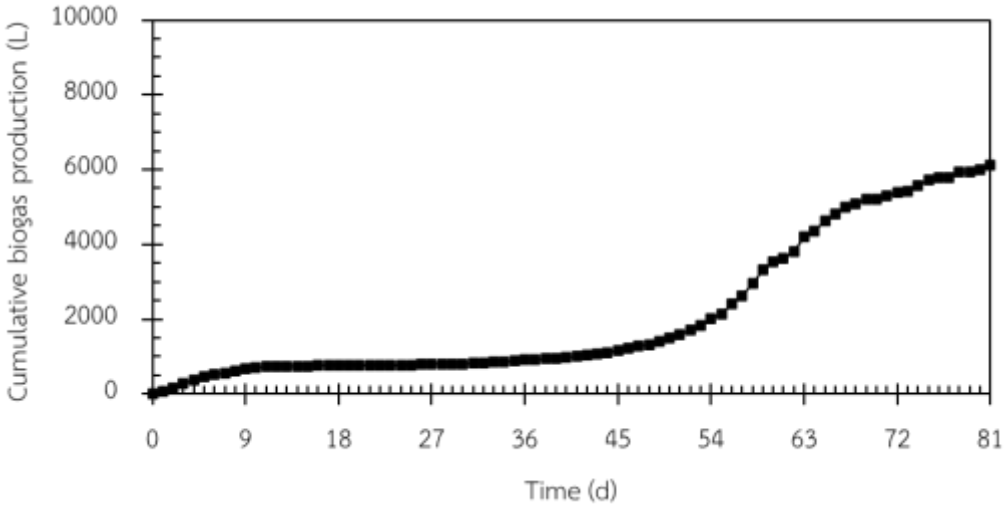
4.1 Scenario 2:

$$\text{ระยะเวลาคืนทุน (เดือน)} = \frac{1{,}355{,}197 \text{ บาท}}{322{,}500 \text{ บาท/เดือน} - 1{,}723 \text{ บาท/เดือน}}$$

$$= 4.22 \text{ เดือน}$$

จะเห็นว่าการเดินระบบแบบ semi-continuous จะใช้เงินลงทุนและค่าใช้จ่ายผันแปรน้อยกว่าการเดินระบบแบบ batch เมื่อเทียบกับผลตอบแทนที่เท่ากัน โดยการเดินระบบแบบ semi-continuous จะสามารถคืนทุนได้ภายใน 4 เดือน อย่างไรก็ตามควรหาสภาวะที่เหมาะสมในการเดินระบบ และการควบคุมถังหมักขนาดใหญ่อาจจะต้องการผู้ที่เชียวชาญโดยเฉพาะในช่วงแรกของระบบ

(A) Cumulative biogas production



(B) Cumulative methane production

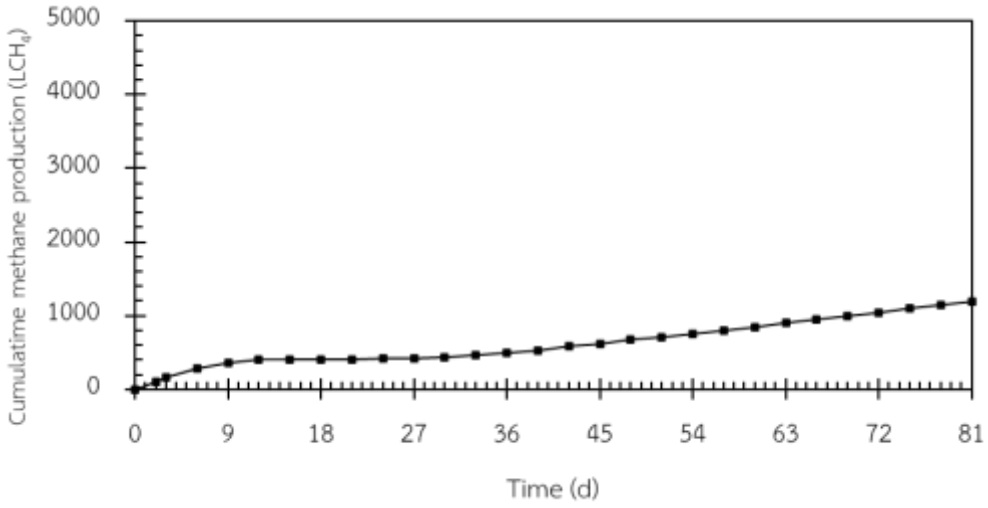


Figure 40 Cumulative biogas production and cumulative methane production of digestion of scum pretreated by the bioaugmentation of SNL1 and adding aeration for 3 days.

Table 24 Biogas performance of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) using bioaugmentation by SNL1 under non-sterile conditions with aeration for 3 days at batch mode in 1000 L fermentor

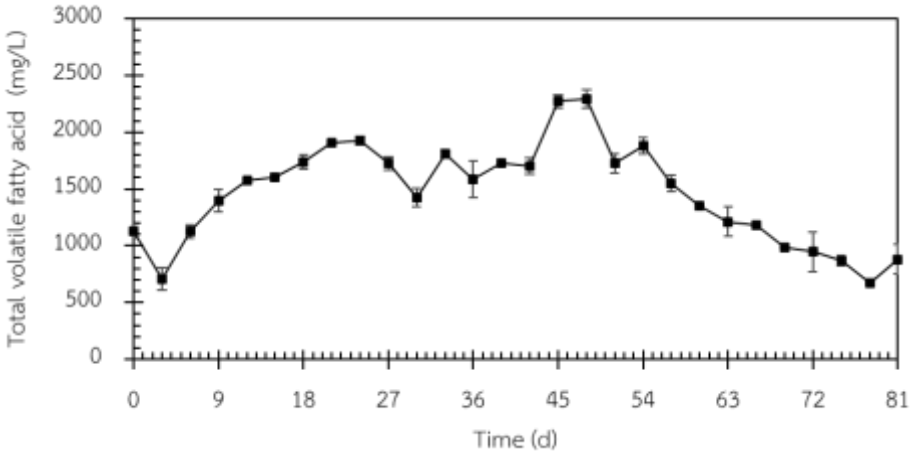
Parameters	Bioaugmentation by SNL1
TS_{day0} (g/L)	58.7±2.17
TS_{day81} (g/L)	9.77±0.19
TS removal (%)	83.4±0.94
$tCOD_{day0}$ (g/L)	93.9±6.99
$tCOD_{day81}$ (g/L)	11.7±0.00
tCOD removal (%)	87.6±0.93
Methane yield ($mLCH_4$/gVS)	1893

Table 25 Biogas performance of pretreated scum slurry (scum and wastewater at the ratio of 80:20) using bioaugmentation by SNL1 under non-sterile conditions at the different air of fermentor in batch mode

Volume fermentation tank	Working volume	Condition of aeration rate	Pretreatment time	Methane yield ($mLCH_4$/gVS)
250 mL	50 mL	Shanking 150 rpm	7 days	586
6.5 L	4 L	0.4 vvm	7 days	82.9
200 L	100 L	1.5 vvm*	8 h/d for 4 days	25.8
1000 L	500 L	0.5 vvm	8 h/d for 3 days	1893

Note: * The volume fermentation tank at 200 L causes clogs of the scum sludge in the aeration tube, resulting in low digestion even adding high aeration

(A) Total volatile fatty acid



(B) Alkalinity

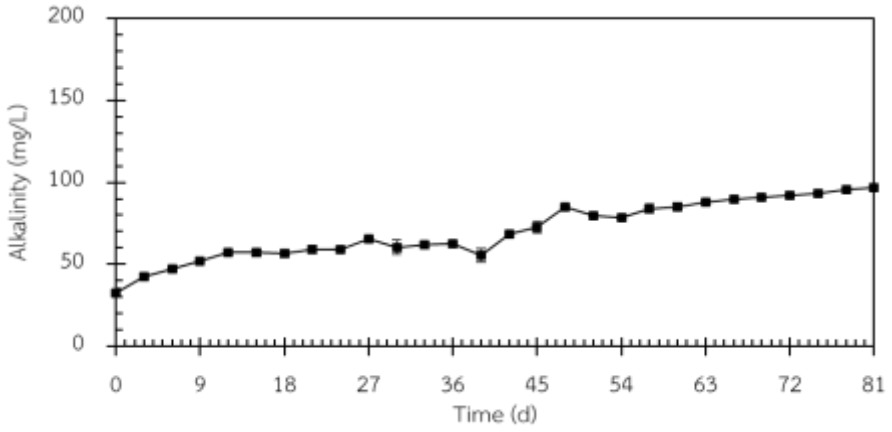


Figure 41 Total volatile fatty acid and alkalinity before and after the anaerobic digestion of pretreated scum from oil trap by using lipase and protease producing bacteria and aeration for 3 days.

8. ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตปุ๋ยจากกากตะกอนที่เหลือหลังกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ

ทำการทดลองโดยนำกากตะกอนลอยก่อนและหลังกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพขนาด 6.5 ลิตร และ 200 ลิตร โดยจะนำส่วนของแข็ง หรือ ตะกอนไประเหยน้ำออกและนำไปวิเคราะห์ตามมาตรฐานปุ๋ย ได้แก่ ค่าความชื้น ค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจน ปริมาณอินทรียวัตถุ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณโพแทสเซียม ปริมาณฟอสฟอรัสและค่าพีเอช เปรียบเทียบกับค่าตามมาตรฐานปุ๋ย จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตปุ๋ยของกากตะกอนที่เหลือหลังจากการผลิตแก๊สชีวภาพ โดยมีทั้งหมด 10 ชุดการทดลอง ได้แก่ ตะกอนก่อนการหมักแก๊สชีวภาพ (initial 80:20), ตะกอนหลังหมักแก๊สชีวภาพจากถังขนาด 200 ลิตร (UPT, control และ PTS), ตะกอนหลังการหมักแก๊สชีวภาพจากถังหมักขนาด 6.5 ลิตร เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแบบกะ (UPT-B, PTC-B และ PTS-B) และตะกอนหลังการหมักแก๊สชีวภาพจากถังหมักขนาด 6.5 ลิตร เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (UPT-S, PTC-S และ PTS-S) เมื่อทำการวิเคราะห์ตามมาตาฐานปุ๋ย พบว่า ทุกชุดการทดลอง (ยกเว้นชุดตะกอนเริ่มต้น 80:20 มีค่าโพแทสเซียมและค่าพีเอชต่ำกว่าที่มาตรฐานกำหนด) มีคุณสมบัติของความเป็นปุ๋ยหมัก เนื่องจากมีค่าอยู่ในช่วงที่ กรมพัฒนาที่ดิน (2551) กำหนด คือ อัตราส่วนสารประกอบคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20:1 (5.1-7.7) ค่าไนโตรเจน-ฟอสฟอรัส-โพแทสเซียม ต้องไม่น้อยกว่า 1-0.5-0.5 (3-5, 1-4, 0.5-0.9) ความชื้นของปุ๋ยหมักไม่ควรมากกว่าร้อยละ 35 โดยน้ำหนัก (5.19-7.49 ปริมาณอินทรียวัตถุประมาณต้องไม่น้อยกว่าร้อย 35 โดยน้ำหนัก (36-43) และความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ต้องอยู่ในช่วงประมาณ 5.5-8.5 (5.5-7.7) (Table 26) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปผลิตเป็นปุ๋ยหมักในอนาคต อย่างไรก็ตามเมื่อจำแนกประเภทปุ๋ยยังพบว่า ทุกชุดการทดลองมีคุณสมบัติในการนำไปผลิตเป็นปุ๋ยอินทรีย์ในรูปอัดเม็ดอีกด้วย (N-P-K=1-0.5-0.5)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาของการนำตะกอนหลังผลิตแก๊สชีวภาพไปใช้ในการผลิตปุ๋ยหมักได้ โดยรายงานของ สุเทพ ศิลปานันทกุล และคณะ (2558) ศึกษาการใช้กากตะกอนน้ำทิ้งจากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนหมักร่วมกับเศษผักและกากไขมัน เพื่อลดปริมาณขยะมูลฝอย โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุด ได้แก่ กากตะกอนน้ำทิ้ง:เศษผัก (ชุดที่ 1), กากตะกอนน้ำทิ้ง:กากไขมัน (ชุดที่ 2) และกากตะกอนน้ำทิ้ง:เศษผัก: กากไขมัน (ชุดที่ 3) โดยมีน้ำหนักรวมเริ่มต้นที่ 14 กิโลกรัม ผลการวิจัยพบว่า ประสิทธิภาพการย่อยสลายของการใช้กากตะกอนน้ำทิ้ง:เศษผัก ให้ผลดีที่สุด รองลงมา คือกากตะกอนน้ำทิ้ง:เศษผัก:กากไขมัน และลำดับสุดท้ายคือการใช้กากตะกอนน้ำทิ้ง:กากไขมัน เมื่อพิจารณาคุณภาพของปุ๋ยหมักจากธาตุอาหารหลักและโลหะหนัก (ทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว) ของทั้งสามชุดการทดลองตามเกณฑ์มาตรฐานของกรมพัฒนาที่ดิน ผลการศึกษา พบว่าชุดการทดลองที่ 1 และ 3 มีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นสารปรับปรุงคุณภาพดิน (ปริมาณไนโตรเจน-ฟอสฟอรัส-โพแทสเซียม เท่ากับ 1.58 - 2.32 - 2.19, 0.56 - 0.98 - 0.50 และ 1.52 - 1.96 - 2.00

ตามลำดับ) และรายงานโดยทรงกฤติ ก่ำบุญรุ่งเรือง และ ญาณวุฒิ สุพิชญางกูร (2559) ที่ศึกษาความเป็นไปได้ของตะกอนที่เหลือหลังจากกระบวนการหมักแก๊สชีวภาพจากตัวอย่างมูลสัตว์และของเสียในสวนสัตว์ดุสิต พบว่า มีปริมาณ N-P-K เท่ากับ 2.54, 5.78 และ 0.22 ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อพืช ดังนั้นจึงสามารถนำตะกอนที่เหลือเหล่านี้ไปใช้ในการผลิตปุ๋ยอัดเม็ดได้

Table 26 Comparison of nutrients in residual sludge after biogas production

Parameters	Standard compost	Residual sludge after biogas production									
		Initial	200 L*			6.5 L**					
		80:20	UPT	Control	PTS	UPT-B	PTC-B	PTS-B	UPT-S	PTC-S	PTS-S
Moisture	≤ 35 %	13.2±0.4	7.21±0.0	5.18±0.8	7.49±0.2	5.96±0.1	2.70±0.7	4.48±0.3	4.99±0.8	6.91±0.3	5.19±0.1
Organic Matters (OM)	≥ 35 %wt	41.9±0.1	41.7±0.4	43.2±0.6	42.1±0.4	38.9±0.1	43.1±0.1	38.4±0.7	36.5±0.1	36.5±0.3	37.3±0.3
pH	5.5 – 8.5	5.18±0.1	6.39±0.1	6.49±0.1	5.94±0.1	5.35±0.1	7.73±0.1	6.04±0.1	5.52±0.0	5.78±0.0	6.06±0.0
Carbon/Nitrogen ratio	≤ 20:1	7.71±0.0	7.11±0.1	6.23±0.1	6.24±0.0	6.79±0.0	5.12±0.0	6.01±0.1	6.00±0.0	6.29±0.1	5.82±0.0
total nitrogen (N)	≥ 1.0 %wt	3.16±0.0	3.41±0.0	4.04±0.1	3.93±0.1	3.33±0.0	4.89±0.0	3.71±0.0	3.54±0.0	3.37±0.0	3.72±0.0
total phosphorus (as P_2O_5)	≥ 0.5 %wt	1.18±0.0	1.87±0.0	2.69±0.0	2.18±0.0	2.11±0.0	3.76±0.0	2.12±0.0	1.45±0.0	1.49±0.0	1.55±0.0
total potassium (as K_2O)	≥ 0.5 %wt	0.18±0.0	0.49±0.0	0.74±0.0	0.53±0.0	0.60±0.0	0.98±0.0	0.62±0.0	0.52±0.0	0.45±0.0	0.57±0.0

Note: * Performance parameters of scum for pretreatment time 4 days in reactor 200 L (UPT = unpretreatment, biostimulation (Control), bioaugmentation of SNL1 (PTS)

**Performance parameters of scum for pretreatment time 7 days under batch (B) and semi-continuous (S) mode in reactor 6.5 L (UPT-B = unpretreatment , biostimulation (PTC), bioaugmentation of SNL1 (PTS)

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1.บทสรุป

1.1 การย่อยสลายตะกอนลอยเบื้องต้นด้วย *Bacillus subtilis* AH73 ซึ่งเป็นแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสก่อนการผลิตแก๊สชีวภาพพบการแสดงของค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำ โดยมีค่าเท่ากับ 57.87 ยูนิตต่อลิตร เมื่อผลิตแก๊สชีวภาพจากตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพสามารถผลิตแก๊สชีวภาพสะสมเท่ากับ 1,857 มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าชุดที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ 1.07 เท่า อย่างไรก็ตามหากใช้วัตถุดิบที่มีความเข้มข้นสูงอาจส่งผลให้มีการย่อยสลายและการผลิตมีเทนเกิดขึ้นได้ต่ำเช่นกัน

1.2 การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสเพื่อย่อยสลายตะกอนลอยโดยทำการแยกในสภาวะมีอากาศโดยการเขย่าและสภาวะไร้อากาศโดยไม่มีการเขย่า และเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มในสภาวะมีอากาศและไร้อากาศ พบว่า ไอโซเลต INL11 และ SNL1 มีระดับการย่อยสลายสูงสุด (+++) บนอาหารแข็ง และเมื่อทำการย่อยสลายตะกอนลอย พบว่า INL11 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าซีโอดีละลายน้ำมากที่สุด เท่ากับ 17.02 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ SNL1 มีการแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 177.45 ยูนิตต่อลิตร และ 1,695 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าทั้งสองไอโซเลทได้มาจากการแยกเชื้อในสภาวะไร้อากาศโดยไม่มีการเขย่าและสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มในสภาวะมีอากาศ เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือก พบว่า INL11 และ SNL1 มีความเหมือนกับ *Aeromonas caviae* และ *Bacillus cereus* ตามลำดับ ซึ่งจัดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่ม facultative anaerobes

1.3 จากการศึกษาผลการปรับสภาพตะกอนลอยด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้และศึกษาศักยภาพในการผลิตมีเทนจากตะกอนลอยจากบ่อดักไขมันที่ผ่านการปรับสภาพในระดับขวดทดลองโดยใช้ระบบการหมักแบบกะ พบว่า เมื่อปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 โดยใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพ 7 วัน และใช้อัตราส่วนตะกอนต่อน้ำเสียจากบ่อดักไขมันเท่ากับร้อยละ 80:20 ช่วยเพิ่มการผลิตมีเทนด้วยประสิทธิภาพที่สูงกว่าการปรับสภาพโดย biostimulation ด้วยการให้ออกซิเจนเพียงอย่างเดียว และเมื่อศึกษาการผลิตมีเทนจากตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพในถังหมักขนาด 6.5 ลิตรโดยใช้ระบบการหมักแบบกะและกึ่งต่อเนื่อง พบว่า มีการผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนสะสมมีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการหมักแบบกะ ในขณะที่การเดินระบบแบบกึ่งต่อเนื่องส่งผลให้มีการเพิ่มผลผลิตมีเทนจาก 82.9 mLCH_4/gVS เป็น 259.8 LCH_4/gVS ซึ่งได้มาจากการทดลองที่มีการปรับสภาพโดย bioaugmentation ด้วย SNL1 จะเห็นได้

ว่าการถ่ายสารอาหารเข้าและออก ทำให้มีการผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากจุลินทรีย์ในระบบได้รับสารอาหารใหม่

1.4 การปรับสภาพตะกอนลอยด้วยการเติมหัวเชื้อ SNL1 และมีการเติมอากาศเป็นเวลา 4 วัน ในถังหมักขนาด 200 ลิตร พบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในวันที่ 0 โดยมีค่าเท่ากับ 1,859.0 ยูนิตต่อลิตร อาจเกิดจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาเพื่อย่อยสลายตะกอนลอยตั้งแต่อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียร่วมกับหัวเชื้อที่เติมลงไปซึ่งได้รับการกระตุ้นตั้งแต่การเตรียมหัวเชื้อ นอกจากนี้พบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในวันที่ 3 โดยมีค่าเท่ากับ 23.07 ยูนิตต่อลิตร เมื่อผลิตแก๊สชีวภาพจากตะกอนลอยที่ผ่านการปรับสภาพ พบว่า ผลิตแก๊สมีเทนสะสมสูงสุด 3.71 LCH_4 ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์และชุดที่ไม่มีการปรับสภาพ อย่างไรก็ตามหลังจากการหมักแบบไร้อากาศ 30 วัน พบว่า เกิดการผลิตแก๊สชีวภาพน้อยลงเนื่องจากไม่มีการกวนผสมกันภายในถังหมัก

1.5 จากการทดลองในถังหมักขนาด 1000 ลิตร พบว่า การให้อากาศมีผลดีในขั้นตอนการย่อยสลายเนื่องจากทำให้มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเพิ่มขึ้นส่งผลให้จุลินทรีย์ สามารถเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่และย่อยสลายตะกอนลอยให้อยู่ในรูปของซีโอดีละลายน้ำ อย่างไรก็ตาม เมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักแบบไร้อากาศในถังหมักขนาดใหญ่ที่ไม่ได้มีการพ่นแก๊สไนโตรเจนเพื่อไล่อากาศจึงยังคงมีออกซิเจนหลงเหลืออยู่ในถังหมักขนาดใหญ่มากกว่าถังหมักขนาดเล็กส่งผลให้จุลินทรีย์พวกที่เป็นไฮโดรไลติกกลุ่ม facultative anaerobes ปรับตัวได้ช้าและกลุ่มจุลินทรีย์ที่ต้องใช้สารอาหารต่อจากกลุ่มนี้มีสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตจึงทำให้มีช่วง lag phase นานและมีผลผลิตมีเทนต่ำ

1.6 หลังจากการผลิตแก๊สชีวภาพและนำกากตะกอนที่เหลืออยู่ในระบบไประเหยน้ำออกจนแห้งแล้วนำไปวิเคราะห์ตามมาตรฐานปุ๋ยของตะกอนที่เหลือหลังการผลิตแก๊สชีวภาพ พบว่าทุกชุดการทดลองมีธาตุอาหาร N-P-K ผ่านมาตรฐานของปุ๋ยหมัก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปผลิตเป็นปุ๋ย เมื่อจำแนกประเภทปุ๋ยยังพบว่า ทุกชุดการทดลองมีคุณสมบัติในการนำไปผลิตเป็นปุ๋ยอินทรีย์ในรูปอัดเม็ด

2. ข้อเสนอแนะ

2.1 ควรมีการศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการปรับสภาพต่อการผลิตแก๊สชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตมีเทน

2.2 ควรมีปรับปรุงระบบของถังหมัก เช่น ระบบการกวนผสมและการควบคุมสภาวะไร้อากาศ

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2550. สำนักนิเทศและถ่ายทอดเทคโนโลยีการพัฒนาที่ดิน กรมพัฒนาที่ดินกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2548. มาตรฐานปุ๋ยหมัก. เอกสารเผยแพร่กรมวิชาการเกษตร กระทรวงการเกษตร. กรุงเทพฯ.

กำชัย รุ่งเพชรรัตน์. 2545. การแยกโปรตีนและสารปนเปื้อนในน้ำทิ้งจากโรงงานปลาทูน่ากระป๋องโดยใช้ฟองแก๊สแอฟรอนชนิดไม่มีประจุ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

จันทิมา เพียรผล. 2564. กลุ่มเศรษฐกิจการประมง.กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง. 1:1-7.

จารุพัฒน์ กาญจนรงค์. 2554. การผลิตและการทำบริสุทธิ์ก๊าซชีวภาพที่ได้จากการย่อยสลายแบบไร้อากาศโดยใช้น้ำเสียร่วมกับกากตะกอนดีแคนเตอร์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จิรวัฒน์ ชาลีวรรณ. 2546. ผลของระยะเวลาเก็บกักต่อการเกิดก๊าซชีวภาพในการหมักแบบไร้ออกซเจนอัตราการย่อยสูงของวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมผลไม้บรรจุกระป๋อง. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จุฑาภรณ์ ชนะถาวร. 2560. การผลิตก๊าซชีวภาพจากการหมักร่วมของวัสดุเหลือทิ้งคาร์บอนสูงและน้ำเสียจากการเตรียมเบดดิ้งไส้เดือน. วิทยาลัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ชยันต์ กิมยงค์. 2545. การพัฒนาการผลิตก๊าซชีวภาพจากมูลสุกรในถังปฏิกรณ์แบบสองขั้นตอนที่มีการไหลวนกลับของน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ชุติมน ตั้งพงศ์เสถียร และนันทิชา ภักดีไทย. 2560. การผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้ตะกอนไขมันหมักร่วมกับน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ทรงกฤติ ก่ำบุญเรือง และญาณวุฒิ สุพิชญางกูร. 2559. การศึกษาสมรรถนะระบบผลิตก๊าซชีวภาพในสวนสัตว์ดุสิต. ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล วิทยาลัยวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต.

ธนาวุฒิ หนูทองแก้ว. 2555. การใช้ประโยชน์จากกากตะกอนและน้ำทิ้งหลังการผลิตก๊าซชีวภาพผสมกันวัสดุเศษเหลือของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อผลิตปุ๋ยหมักและเอนไซม์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปณิตา โคกพระปรางค์. 2545. การคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อลดสารพิษในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เพ็ญศิริ ประชากิตติกุล. 2551. ผลของอุณหภูมิและสารอาหารต่อการผลิตแก๊สชีวภาพของกากตะกอนปาล์มจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ภัทรวรรณ อาวรณ์ และอรทัย ชวาลภาฤทธิ์. 2555. การใช้ตะกอนชีวภาพจากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตโอเลฟินส์เป็นวัสดุผลิตปุ๋ยหมักร่วม. การประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9: วิศวกรรมศาสตร์ วิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. 17-24.

มาริสา ทองน้อย และวิสสุตา แก้วทอง. 2560. การปรับปรุงการผลิตแก๊สชีวภาพจากกากตะกอนไขมันโดยแบคทีเรียผลิตไลเปส. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2558. กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส. คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ราตรี ชุ่ยหิรัญ. 2554. การผลิตก๊าซชีวภาพจากกากอุตสาหกรรมโรงงานเครื่องดื่มโดยการหมักร่วม. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศูนย์ประสานงานโครงการส่งเสริมเทคโนโลยีก๊าซชีวภาพ. 2551. เทคโนโลยีก๊าซชีวภาพ. (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.thaibiogas.net/th/biogas (15 สิงหาคม 2563)

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2552. ระบบบำบัดน้ำเสีย การเลือกใช้การออกแบบ การควบคุมและการแก้ปัญหา. สำนักพิมพ์ท้อป. กรุงเทพฯ.

สาวิกา กัลปพฤกษ์. 2014. การใช้สัตว์หน้าดินในการบำบัดฟื้นฟูทางชีวภาพของคุณภาพน้ำและดินตะกอนในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. Veridian E-journal Science and and Technology Silpakorn University. 1(5): 41-51.

สุกานดา วิชิตพันธุ์, สุภัทรษร ทับศรี และ คณิตา วิชิตพันธุ์. 2018. การเพิ่มศักยภาพการยับยั้งเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูด้วยสารสกัดหยาบไคติเนสและโปรติเอสร่วมกับเชื้อรา *Beauveria bassiana*. ว. เกษตร. 34(2): 205-214.

สุชาดา สุวรรณสะอาด. 2555. การผลิตก๊าซชีวภาพจากการหมักร่วมของกากตะกอนดีแคนเตอร์และน้ำทิ้งหลังการผลิตก๊าซชีวภาพของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุเทพ ศิลปานันทกุล, รัชกร นามกร, พิศิษฐ์วัฒน สมบูรณ์, และธวัช เพชรไทย. 2015. การผลิตปุ๋ยหมักร่วมจากกากตะกอนน้ำทิ้งเศษผักและกากไขมัน. ว. การพัฒนาชุมชนและ คุณภาพชีวิต 3(1): 95-103.

สุริยะ สะวานนท์ และสมชัย จันทร์สว่าง. 2539. ศึกษาการเปรียบเทียบการย่อยสลายมูลสุกรด้วยจุลินทรีย์อีเอ็มกับจุลินทรีย์ผลิตมีเทน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 34. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุรศักดิ์ บุญรุ่ง. 2555. การพัฒนากระบวนการบำบัดน้ำทิ้งหลังการผลิตก๊าซชีวภาพของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมฤดี ฤทธิ์ยากุล. 2551. ศักยภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ และผลพลอยได้จากการหมักมูลสุกรร่วมกับสาหร่ายหนามจากทะเลสาบสงขลา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. 2561. การพัฒนาอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์สู่อนาคตผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร. กรุงเทพฯ.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. ลิพิด. ในชีวเคมี. หน้า 187-217. กรุงเทพฯ: เค. ยู. เพลส์.

Aarti, C., Khusro, A., Agastian, P., Darwish, N. M. and Al Farraj, D. A. 2020. Molecular diversity and hydrolytic enzymes production abilities of soil bacteria. Saudi J. Biol. Sci. 27(12): 3235-3248.

Abanades, S., Abbaspour, H., Ahmadi, A., Das, B., Ehyaei, M. A., Esmaeilion, F. and Bani-Hani, E. H. 2021. A critical review of biogas production and usage with legislations framework across the globe. Int. J. Environ. Sci. Technol. 1-24.

Adulkar, V.T. and Rathod, V.K. 2013. Ultrasound assisted enzymatic pre-treatment of high fat content dairy wastewater. Ultrason Sonochem. 21(3): 1083-1089.

Affes, M., Aloui, F., Hadrich, F., Loukil, S. and Sayadi, S. 2017. Effect of bacterial lipase on anaerobic co-digestion of slaughterhouse wastewater and grease in batch condition and continuous fixed-bed reactor. Lipids Health Dis. 16: 195-204.

Agostinho, L. L., Pecnik, R., Woisetschläger, J., de Kroon, E., Şişcanu, N., van de Griend, M. V., Loiskandl, W. and Fuchs, E. C. 2022. Enhanced Oxygen Volumetric Mass Transfer in a Geometrically Constrained Vortex. Water. 14(5): 771.

Ahn, Y. M., Wi, J., Park, J. K., Higuchi, S. and Lee, N. H. 2014. Effects of Pre-aeration on the anaerobic digestion of sewage sludge. Environ. Eng. Res. 19(1): 59-66.

A.O.A.C. 1990. Official method of analysis of the association of official analytical chemists, 15th ed. The Association of Official Analytical Chemists Ins.

APHA, AWWA and WPCF. 1998. Standard method of the examination of the water and wastewater. 16th ed. American Public Health Association. Wastington, DC.

Balsam, J. 2006. Anaerobic Digestion of Animal Wastes: Factors to Consider. A publication of ATTRA-National Sustainable Agriculture Information Service.

Bougrier, C., Delgenes, J. P. and Carrère, H. 2006. Combination of thermal treatments and anaerobic digestion to reduce sewage sludge quantity and improve biogas yield. Process Saf. Environ. Prot. 84(4): 280-284.

Castro, R. A., Quecine, M. C., Lacava, P. T., Batista, B. D., Luvizotto, D. M., Marcon, J., Ferreira, A., Melo, I. S. and Azevedo, J. L. 2014. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. Springerplus. 3(1): 1-9.

Chandra, R., Vijay, V. K. and Subbarao, P. M. 2006. A study on biogas generation from non-edible oil seed cakes: potential and prospects in India. *In* The 2nd Joint International Conference on Sustainable Energy and Environment (pp. 21-23).

Cherif, S., Aloui, F., Carriere, F. and Sayadi, S. 2014. Lipase pre-hydrolysis enhance anaerobic biodigestion of soap stock from an oil refining industry. J. Oleo Sci. 63: 109-114.

da Silva, S., Gonçalves, I., Gomes de Almeida, F. C., Padilha da Rocha e Silva, N. M., Casazza, A. A., Converti, A. and Asfora Sarubbo, L. 2020. Soil bioremediation: Overview of technologies and trends. Energies. 13(18): 4664.

Datta, S., Menon, G. and Varughese, B. 2017. Production, characterization, and immobilization of partially purified surfactant–detergent and alkali-thermostable protease from newly isolated *Aeromonas caviae*. Prep. Biochem. Biotechnol. 47(4): 349-356.

de Oliveira, A. N., de OLIVEIRA, L. A., Andrade, J. S. and JÚNIOR, A. F. C. 2006. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. Ciênc. Tecnol. 26(4): 853-860.

Demirkan, E., Çetinkaya, A. A. and Abdou, M. 2021. Lipase from new isolate *Bacillus cereus* ATA179: optimization of production conditions, partial purification, characterization and its potential in the detergent industry. Turk. J. Biol. 45(3): 287-300.

Eiroa, M., Costa, J. C., Alves, M. M., Kennes, C. and Veiga, M. C. 2012. Evaluation of the biomethane potential of solid fish waste. J. Waste Manag. 32(7): 1347-1352.

Ferrer, I., Ponsá, S., Vázquez, F. and Font, X. 2008. Increasing biogas production by thermal (70 °C) sludge pre-treatment prior to thermophilic anaerobic digestion. Biochem. Eng. J. 42(2): 186-192.

Gavala, H.N.; Yenal, U.; Skiadas, I.V.; Westermann, P. and Ahring, B.K. 2003. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of pre-treatment at elevated temperature. Water Res. 37: 4561–4572.

Goel, R., Mino, T., Satoh, H. and Matsuo, T. 1998. Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor. Water Res. 32(7): 2081-2088.

Goswami, M., Chakraborty, P., Mukherjee, K., Mitra, G., Bhattacharyya, P., Dey, S. and Tribedi, P. 2018. Bioaugmentation and biostimulation: a potential strategy for environmental remediation. J. Microbiol. Exp. 6(5): 223-231.

Jensen, P.D., Mehta, C.M., Carney, C. and Bastone, D.J. 2016. Recovery of energy and nutrient resources from cattle paunch waste using temperature phased anaerobic digestion. Waste Manag. 51: 72–80.

Jeppu, G. P., Janardhan, J., Kaup, S., Janardhanan, A., Mohammed, S. and Acharya, S. 2022. Effect of feed slurry dilution and total solids on specific biogas production by anaerobic digestion in batch and semi-batch reactors. J. Mater. Cycles Waste Manag. 24(1): 97-110.

Karim, A., Islam, M. A., Yousuf, A., Khan, M. M. R. and Faizal, C. K. M. 2019. Microbial lipid accumulation through bioremediation of palm oil mill wastewater by *Bacillus cereus*. ACS Sustain. Chem. Eng. *7*(17): 14500-14508.

Karray, F., Ben Abdallah, M., Kallel, N., Hamza, M., Fakhfakh, M. and Sayadi, S. 2018. Extracellular hydrolytic enzymes produced by halophilic bacteria and archaea isolated from hypersaline lake. Mol. Biol. Rep. 45(5): 1297-1309.

Karthikeyana, O.P., Trablyb, E., Mehariyaa, S., Bernetb, N., Wonga, J.W.C. and Carrereb, H. 2018. Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review. Bioresour. Technol. 249: 1025-1039.

Klaucans, E. and Sams, K. 2018. Problems with fat, oil, and grease (fog) in food industry wastewaters and recovered fog recycling methods using anaerobic co-digestion: a short review. Key Eng. Mater. 762: 61-68.

Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Raina, C., Parshad, R. and Gupta, V. K. 2012. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. Arch. Appl. Sci. Res. 4(4): 1763-1770.

Kwon, D. Y. and Rhee, J. S. 1986. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. J. Am. Oil Chemists Soc. 63(1): 89-92.

Labatut, R. A., Angenent, L. T. and Scott, N. R. 2011. Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. Bioresour. Technol. 102(3): 2255-2264.

Lee, B., Park, J. G., Shin, W. B., Tian, D. J. and Jun, H. B. 2017. Microbial communities change in an anaerobic digestion after application of microbial electrolysis cells. Bioresour. Technol. 234: 273-280.

Lee, E.O., Min, Y.C., Lee, H.V., Rahman, N.A. and Joon, C.J. 2019. Mesoporous and other types of catalysts for conversion of non-edible oil to biogasoline via deoxygenation. J. Sustain. Bioenergy Syst. 9: 257-281.

Leung, D.Y. and Wang, J. 2016. An overview on biogas generation from anaerobic digestion of food waste. Int. J. Green Energy. 13: 119–131.

Long, J. H., Aziz, T. N., Francis III, L. and Ducoste, J. J. 2012. Anaerobic co-digestion of fat, oil, and grease (FOG): A review of gas production and process limitations. Process Saf. Environ. Prot. 90(3): 231-245.

Luz, B. D., Sarrouh, B., Bicas, J. L. and Lofrano, R. C. 2021. Lipase production by microorganisms isolated from the Serra de Ouro Branco State Park. An. Acad. Bras. Ciênc. 93(1): 1-12.

Mao, C., Feng, Y., Wang, X. and Ren, G. 2015. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. Renew. Sust. Energ. Rev. 45: 540-555.

Mehta, V. J., Thumar, J. T. and Singh, S. P. 2006. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. Bioresour. Technol. 97(14): 1650-1654.

Mendes, A. A., Pereira, E. B. and de Castro, H. F. 2006. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion. Biochem. Eng. J. 32(3): 185-190.

Merrylina, J., Kumara, S.A., Kaliappanb, S., Yeomc, I.C. and Banua, J.R. 2013. Biological pretreatment of non-flocculated sludge augments the biogas production in the anaerobic digestion of the pretreated waste activated sludge. Environ. Technol. 34(13-16): 2113-23.

Nasir, I. M., Ghazi, T. I. M., Omar, R. and Idris, A. 2013. Batch and semi-continuous biogas production from cattle manure. Int. J. Eng. Technol. 10: 16-21.

Ning, Z., Ji, J., He, Y., Huang, Y., Liu, G. and Chen, C. 2016. Effect of lipase hydrolysis on biomethane production from swine slaughterhouse waste in china. Energy Fuels. 10: 7326-7330.

O'reilly, T. and Day, D. F. 1983. Effects of cultural conditions on protease production by *Aeromonas hydrophila*. Appl. Environ. Microbiol. 45(3): 1132-1135.

Orts, Á., Tejada, M., Parrado, J., Paneque, P., García, C., Hernández, T. and Gómez-Parrales, I. 2019. Production of biostimulants from okara through enzymatic hydrolysis and fermentation with *Bacillus licheniformis*: comparative effect on soil biological properties. Environ. Technol. 40(16): 2073-2084.

Parmar, N., Singh, A. and Ward, O. P. 2001. Enzyme treatment to reduce solids and improve settling of sewage sludge. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26(6): 383-386.

Prasad, M.D. and Manjunath, M. 2011. Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. Indian J. Biotechnol. 10: 121-124.

Rai, M. and Ingle, A.P. 2019. Smart nanopackaging for the enhancement of food shelf life. Environ. Chem. Lett. 17(1): 277-290.

Raju, C. S., Sutaryo, S., Ward, A. J. and Møller, H. B. 2013. Effects of high-temperature isochoric pre-treatment on the methane yields of cattle, pig and chicken manure. Environ. Technol. 34(2): 239-244.

Rathakrishnan, P. and Nagarajan, P. 2011. Red gram husk: a potent substrate for production of protease by *Bacillus cereus* in solid-state fermentation. Int. J. Chemtech Res. 3(3): 1526-1533.

Roubík, H., Mazancová, J., Le Dinh, P., Dinh Van, D. and Banout, J. 2018. Biogas quality across small-scale biogas plants: A case of central Vietnam. Energies, 11(7):1794.

Rozitis, D. Z. and Strade, E. 2015. COD reduction ability of microorganisms isolated from highly loaded pharmaceutical wastewater pre-treatment process. J. Mater. Environ. Sci. 6: 507-512.

Rungphetcharat, K. 2002. Separation of protein and contaminated substance from pre-cooked wastewater of tuna canning by using nonionic colloidal gas aphrons. Doctoral dissertation, King Mongkut's University of Technology Thonburi.

Sarker, S., Lamb, J.J., Hjelme, D.R. and Lien, K.M. 2019. A Review of the Role of Critical Parameters in the Design and Operation of Biogas Production Plants. Appl. Sci. 9: 1915.

Sarkar, S., Sreekanth, B., Kant, S., Banerjee, R. and Bhattacharyya, B. C. 1998. Production and optimization of microbial lipase. Bioprocess Eng. 19(1): 29-32.

Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V. and Sumana, C. 2018. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. Biotechnol. Prog. 34(1): 5-28.

Schmidt-Dannert, C., Rúa, M. L. and Schmid, R. D. 1997. Two novel lipases from thermophile *Bacillus thermocatenulatus*: Screening, purification, cloning, overexpression, and properties. *In* Methods in enzymology Vol. 284. p. 194-220). Academic Press.

Shaik, M., Sankar, G. G., Iswarya, M. and Rajitha, P. 2017. Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10. J. Genet. Eng. Biotechnol. 15(1): 87-94.

Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R. M., Jolly, R. S., Gupta, L. K. and Gupta, J. K. 2002. Production of an extracellular alkaline lipase from a new *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis. Indian J. Microbiol. 42(1): 49-54.

Srikanlayanukul, M. and Suksabye, P. 2020. Effect of Mixture Ratio of Food Waste and Vetiver Grass on Biogas Production. Appl. Environ. Res. 42(3): 40-48.

Tang, Y., Yang, Y. L., Li, X. M., Yang, Q., Wang, D. B. and Zeng, G. M. 2012. The isolation, identification of sludge-lysing thermophilic bacteria and its utilization in solubilization for excess sludge. Environ. Technol. 33(8): 961-966.

Tay, J. H., Show, K. Y. and Hung, Y. T. 2006. Seafood processing wastewater treatment. Waste treatment in the food processing industry. 29-66.

Tongco, J. V., Kim, S., Oh, B. R., Heo, S. Y., Lee, J. and Hwang, S. 2020. Enhancement of hydrolysis and biogas production of primary sludge by use of mixtures of protease and lipase. Biotechnol. Bioprocess Eng. 25(1): 132-140.

Yang, B., Wang, C., Zhao, X., Liu, J., Yin, F. and Zhang, W. 2022. Determining the Microbial Source of Methane Production in Anaerobic Digestion Systems Through High-Throughput Sequencing Technology. Front. Energy Res. 9.

Yang, Q., Luo, K., Li, X. M., Wang, D. B., Zheng, W., Zeng, G. M. and Liu, J. J. 2010. Enhanced efficiency of biological excess sludge hydrolysis under anaerobic digestion by additional enzymes. Bioresour. Technol. 101(9): 2924-2930.

Uddin, M. M. and Wright, M. M. 2022. Anaerobic digestion fundamentals, challenges, and technological advances. Phys. Sci. Rev.

Wijesinghe, D. W. N. 2016. Optimization of bio-methane production process for combined treatment of sewage and municipal solid waste. Master of Science Thesis. KTH School of Industrial Engineering and Management Energy Technology.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

กราฟมาตรฐาน

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดปาล์มมิติก

เตรียมได้โดยชั่งกรดปาล์มมิติก 0.2564 กรัม แล้วละลายในไอโซออกเทน ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายของกรดปาล์มมิติกที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายกรดปาล์มมิติกปริมาตร 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 และ 0.8 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่นลงในแต่ละหลอดให้มีปริมาตรในหลอดรวม 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย cupric acetate-pyridine ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เวลา 10-15 วินาที ทิ้งให้แยกชั้น แล้วนำส่วนใสข้างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร

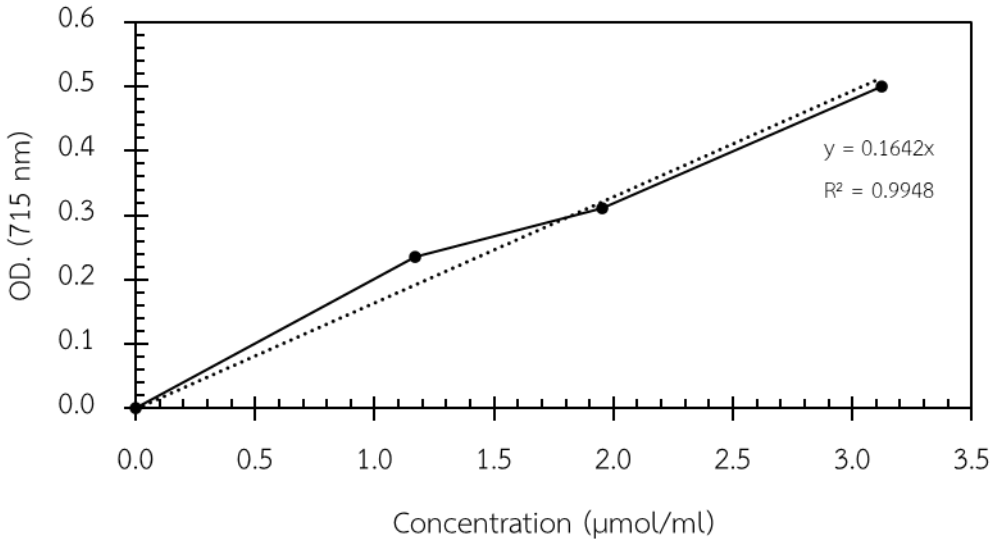


Figure 42 Standard curve of palmitic acid.

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซีน

เตรียมโดยชั่งไทโรซีน 0.2 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลายไทโรซีนเท่ากับ 1.1 มิลลิโมล จากนั้นดูดสารละลายไทโรซีนปริมาตร 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่นลงในแต่ละหลอด โดยปริมาตรสุดท้ายในหลอดมีเท่ากับ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายไทโรซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 625 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมโฟลินฟีนอล 125 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

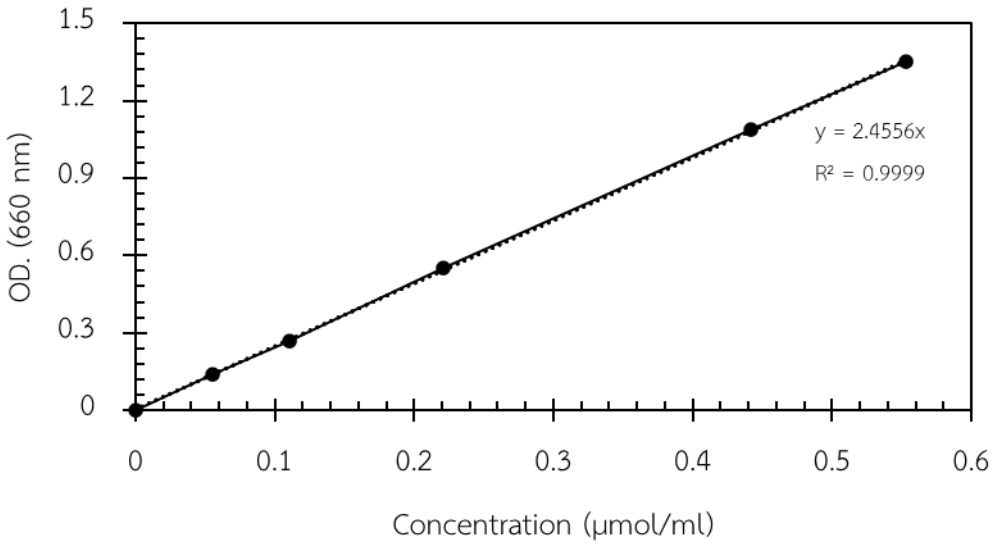


Figure 43 Standard curve of tyrosine.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวชุติมา ไทยประดิษฐ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6211020017

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม	2561

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Thaipradit, S., Cheirsilp, B., Suyotha, W., Duangsuwan, W. and Boonsawang, P. Effect of Biostimulation and Bioaugmentation for Pretreatment of Scum from Tuna Canning Industry on Methane Production. International conference. “ The 33rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2021)” 25th Nov 2021 Bangkok, Thailand (Oral and online presentation).