ตอนที่ 2 การผลิตกาซชีวภาพจากมูลสุกร

1. คำนำ

เนื่องจากมีการเลี้ยงสัตว์เพื่อเป็นอาหารกันมากขึ้น จึงเกิดของเสียที่สัตว์กำจัดออกมาได้แก่มูลสัตว์มาก ทำให้เกิดเป็นมลพิษตามพื้นดิน แหล่งน้ำ และยังให้กาซซึ่งมีกลิ่นไม่เป็นที่พึงปรารถนาเข้าสู่อากาศเป็นมลพิษในอากาศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมูลสุกร เป็นที่รังเกียจกับผู้อยู่อาศัยในบริเวณที่เลี้ยง การกำจัดโดยวิธีทำให้แห้ง เพื่อเอาไปทำปุ๋ย ก็ทำได้ยาก และยังคงส่งกลิ่นเมื่อเกิดการหมักในสภาพมีออกซิเจน และสูญเสียไนโตรเจน เพราะได้กาซไนโตรเจนกลับสู่อากาศ ได้มีการนำมูลสัตว์มาหมักในสภาพไร้ออกซิเจนได้กาซชีวภาพ มูลสัตว์ที่หมักแล้วไม่มีกลิ่นไม่เป็นแหล่งที่น่าสนใจของแมลงต่าง ๆ และยังใช้ประโยชน์ได้มากได้แก่ เป็นปุ๋ยที่ดีกว่ามูลสัตว์สด อาจใช้ปลูกพืชหรือเลี้ยงพวกสาหร่ายได้ ส่วนกาซชีวภาพใช้เป็นเชื้อเพลิงได้เกือบทุกรูปแบบ ตั้งแต่เป็นกาซหุงต้ม จนถึงเป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ จึงได้มีการศึกษากันมาก ในการพัฒนากลไกการหมักและถังหมัก เพื่อให้ได้กาซมาก ลงทุนน้อย สะดวกแก่การดูแล และนำผลที่เหลือจากการหมัก ไปใช้ประโยชน์ต่อไป ทางด้านวิทยาศาสตร์บริสุทธิ์ก็พยายามศึกษาปฏิกริยาเคมีที่เกิดขึ้น ในขบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจน และมีจุลินทรีย์อะไรที่เกี่ยวข้อง ทำให้เกิดกระบวนการเหล่านั้น

กาซชีวภาพ (Biogas, Bio = สิ่งมีชีวิต + gas = กาซ) เป็นกาซที่ได้จากการหมักสารอินทรีย์ที่ทิ้งแล้ว ในสภาพไม่มีอากาศ กาซที่ได้จะประกอบด้วย มีเทน (CH_4) คาร์บอนไดออกไซด์ ไอน้ำ และอาจมีกาซไฮโดรเจน ไนโตรเจน ไฮโดรเจนซัลไฟด์

ได้มีการสนใจค้นคว้าวิจัย เพื่อพัฒนาการผลิตกาซชีวภาพอย่างกว้างขวางทั่วโลก ด้วยจุดประสงค์ 2 ประการคือ

1. เพื่อหาพลังงานมาใช้ในการดำรงชีวิต ทดแทนพลังงานที่ได้จากทรัพยากรธรรมชาติ เช่น น้ำมัน ถ่านหิน ซึ่งหมดสิ้นไปเรื่อย ๆ และไม่สามารถเกิดขึ้นมาทดแทนได้ทันการใช้ของมนุษยชาติ

2. เพื่อใช้ของทิ้งสูญเปล่าให้เป็นประโยชน์ และกำจัดสิ่งปฏิกูล ที่ทำให้เกิดมลพิษขึ้นในสิ่งแวดล้อม เช่น มูลสัตว์ ขยะ

2. วัตถุประสงค์

1. ศึกษาส่วนประกอบของมูลสุกร
2. ศึกษาเกี่ยวกับการหมักกาซชีวภาพจากมูลสุกร
3. แยกแบคทีเรียที่อยู่ในการหมักหลังให้กาซชีวภาพ

3. การตรวจเอกสาร

Maramba (Maramba, 1971) และ McCarty (McCarty,1981) ได้รวบรวมเอกสารเกี่ยวกับการค้นพบ และการพัฒนาการผลิตการใช้ประโยชน์กาซชีวภาพ

ปี 1630 Van Helmont พบว่ามีกาซที่ติดไฟเกิดขึ้นในขณะที่มีสารอินทรีย์เกิดการเน่าเปื่อยสลายตัว

ปี 1667 Shirly ได้บรรยายเกี่ยวกับกาซที่ได้จากการสลายตัวของสารอินทรีย์อย่างละเอียด

Alessandro Volta ชาวอิตาลีได้เขียนจดหมายลงวันที่ 14 พฤศจิกายน 1776 เกี่ยวกับการเผาไหม้ของกาซที่ได้จากการกวนตะกอนที่อยู่ก้นบ่อใกล้เมือง Como ในภาคเหนือของอิตาลีและในทะเลสาบ Verbano เขาพบว่ามีการระเบิด เมื่อกาซนั้นผสมกับอากาศและติดไฟ จะระเบิดดังมากที่สุด เมื่อกาซผสมกับอากาศในปริมาณพอ ๆ กัน

ปี 1870 Joseph Priesley รายงานไว้ว่า กาซถูกผลิตโดยสารเน่าเปื่อยที่จมอยู่ในน้ำ

เกี่ยวกับมูลสัตว์ Humphrey Davy เป็นผู้รายงานเป็นคนแรกในคริสศตวรรษที่ 19 ถึงการเผาไหม้กาซที่เกิดจากการหมักของมูลสัตว์ในโรงนา Davy เป็นผู้ประดิษฐ์ตะเกียง สำหรับพวกขุดถ่านหินใช้เป็นเครื่องชี้ถึงความปลอดภัยในการเข้าไปขุดถ่านหิน ถ้ามีกาซติดไฟอยู่ จะได้หลบออกมาก่อนที่จะมีการระเบิด เช่นเดียวกับการจุดกาซชีวภาพ

ปี 1804 John Dalton ซึ่งได้รับยกย่องให้เป็นบิดาของทฤษฎีอะตอม ยืนยันว่ากาซชีวภาพนี้เป็นมีเทน ขณะนั้นมีเทนเป็นกาซที่กระตุ้นความสนใจของนักวิทยาศาสตร์ทั้งหลาย ไม่เฉียงแต่นักเคมีอย่าง John Dalton,Humphrey Davy,

Joseph Priestley นักฟิสิคส์ เช่น Alessandro Volta และ Willium Henry ก็ยังสนใจกาซมูลสัตว์ (muck gas) Henry พยายามสังเคราะห์กาซติดไฟให้แสงเช่นเดียวกับมีเทนในปี 1806 ทำให้นักฟิสิคส์และนักเคมีมีความรู้เกี่ยวกับกาซชีวภาพมากขึ้น นักจุลชีววิทยา เช่น Louis Pasteur เริ่มหันมาสนใจ Bechamp ซึ่งเป็นลูกศิษย์ของ Pasteur ได้พยายามแสดงว่ามีจุลินทรีย์เกี่ยวข้องในการเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้เป็นกาซมีเทนในปี 1868 แต่ยังไม่ได้รับความเชื่อถือ Tappeiner พยายามพิสูจน์ ต่อมาระหว่าง 1882 - 1884 Gayon ลูกศิษย์อีกคนหนึ่งของ Pasteur สามารถผลิตกาซชีวภาพมาใช้จุดให้แสงสว่างและความร้อน

John Dalton ได้กำหนดว่า กาซชีวภาพเป็นกาซมีเทน Bechamp และ Tappeiner พิสูจน์ว่ามีจุลินทรีย์ในธรรมชาติเป็นตัวทำให้เกิดกาซชีวภาพ

M.Louis Mouras ได้ลงพิมพ์ในวารสาร Cosmos ของฝรั่งเศส เดือนกันวาคม 1881 และเดือนมกราคม 1882 ในหัวข้อ "Mouras' Automatic Scavenger" บรรยายเกี่ยวกับการพัฒนาถังที่ไม่ให้อากาศเข้าบรรจุสารอินทรีย์ที่เป็นน้ำทิ้ง ต่างจากถังส้วมและที่เก็บของกำจัดทิ้งทั่วไป ซึ่งไม่สนใจกับการที่อากาศจะเข้าหรือออก นับเป็นถังหมักที่ประดิษฐ์ขึ้นเป็นครั้งแรก

ปี 1894 มีรายงานของ The Massachusetts State Board of Health ชี้ถึงส่วนดีของที่พักของเสียที่มีของแข็งผสมอยู่ชั่วระยะเวลาหนึ่ง แบคทีเรียจะทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ เปลี่ยนเป็นกาซที่ไม่น่ารังเกียจ และของแข็งก็สลายปนรวมกันเป็นของเหลว ผ่านออกไปกับของเสีย ถังที่หมักไม่ควรจะมีการทำความสะอาด ถ้าไม่มีเหตุจำเป็น เช่นการอุดตัน เพราะจะเป็นการทำลายแบคทีเรียที่ช่วยในการย่อยสลาย

ปี 1895 Donald Cameron แห่ง Exeter ประเทศอังกฤษ ได้สร้างถังคล้าย Mouras'automatic scavenger เพื่อจัดการกับของเสียประมาณ 60,000 แกลลอน ต่อวัน เรียก septic tank มีการจดทะเบียนลิขสิทธิ์ไว้ Cameron เป็นผู้นำในการศึกษาพัฒนาทางด้านวิศวกรรมของระบบการกำจัดของเสียไปอย่างมาก เพราะจากความสำเร็จนี้ ทำให้ The Local Government Board of the City of Exeter ปี 1897 ยอมรับการกำจัดของเสียของเมืองโดยวิธีนี้ จากเอกสารรายงานว่าได้มีการใช้กาซที่ผลิตจากของโสโครก มาให้ความ

สว่างตามถนนใน Exeter เมื่อปี 1896

ปี 1894 A.N.Talbot ได้สร้างถังแบบไม่ให้อากาศเข้าสำหรับเมือง Urbana รัฐอิลลินอยส์ สหรัฐอเมริกา และสร้างให้เมือง Champeign รัฐเดียวกัน ในปี 1897 เรียก Talbot tank เป็นถังในแนวตั้งอยู่ต่ำกว่าระดับของเสียที่จะกำจัดประมาณ 2 - 3 ฟุต ทำให้ส่วนบนของถังไม่ว่าง

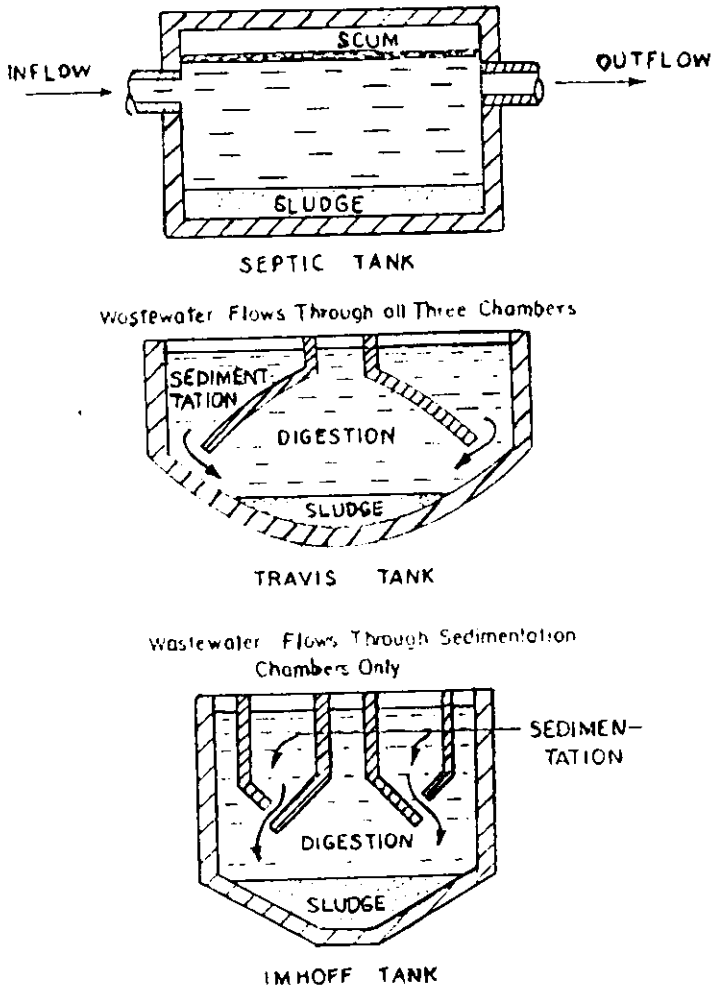
จากบันทึกของ Boruff and Bushwell ซึ่งบันทึกในปี 1930 ได้มีการสร้างถังหมักกาซชีวภาพที่กลุ่มคนโรคเรื้อนที่ Matunga ในเมืองบอมเบย์ ประเทศอินเดีย ซึ่งปัจจุบันเป็นที่รู้จักกันในนาม Acworth Leprosy Hospital เมือง Wadals กาซที่ผลิตได้นำมาใช้ในการทำงานของเครื่องยนต์ที่ใช้กาซ ได้พัฒนาเอามูลคนมาผลิตกาซชีวภาพในปี 1900 เป็นการกำจัดสิ่งสกปรกที่มีกลิ่นน่ารังเกียจให้หมดไป ที่เหมาะสมและได้ประโยชน์

ขณะที่ septic tank ช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับการกำจัดของสกปรก แต่ยังมีปัญหาเกี่ยวกับสารอินทรีย์ที่ควรจะต้องมีการย่อยต่อ เพราะมีการอุดตัน Harry W. Clark ที่ Lawrence, แมสซาจูเซทท์ ได้ยกปัญหานี้ขึ้นมาในปี 1899 และเริ่มให้มีการหมักต่อ โดยแยกถังหมักต่อไปก่อนจะปล่อยออก ทำให้มีผลดีขึ้น

ปี 1904 Willium O. Travis เจ้าหน้าที่สาธารณสุขท้องถิ่น ซึ่งทำหน้าที่จัดการเกี่ยวกับการกำจัดน้ำเสียของเมือง Hampton ได้ทำถังหมักเป็นกระบวนการ 2 ขั้นตอน ในขณะที่ของแข็งที่ปนอยู่ ถูกแยกจากน้ำเสีย แล้วผ่านต่อไปยัง hydrolyzing chamber มีเครื่องกันอยู่ใน chamber เพื่อแยกเอาของแข็งที่ปนอยู่ออก Travis ยังรู้สึกว่าน้ำเสียจำเป็นจะต้องผ่าน hydrolyzing chamber แต่ก็มีปัญหาเกี่ยวกับของแข็งที่ปนอยู่ และน้ำที่ปล่อยออกไปยังมีสภาพสกปรก จึงได้สร้าง Travis tank ที่ Emscher ในปี 1905 Karl Imhoff ได้รับหน้าที่เป็นวิศวกรกำจัดของเสียที่ Emscher Drainage District Board ต่อมาได้ดัดแปลงมาเป็น Emscher or Imhoff tank โดยน้ำเสียไม่ต้องผ่าน hydrolyzing chamber แต่ให้ sludge พักอยู่ในถังจาก 2 - 3 สัปดาห์ ถึงหลายเดือน จนมีสภาพที่ไม่น่ารังเกียจ จึงไม่ทำให้เกิดความเดือดร้อน Imhoff tank ทำให้ลดค่าใช้จ่ายและเป็นที่นิยมอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสหรัฐ-อเมริกา ซึ่งมีโอกาสเลือกแทน septic tank ในปลายปี 1914 ประมาณ 75

เมือง และหลายสถาบันในสหรัฐอเมริกา ได้รับอนุญาตให้ใช้ Imhoff tank

Imhoff tank มีส่วนที่ตกตะกอน (sedimentation) ไว้ด้านบนของส่วนที่ย่อยสลาย (digestion) ทำให้ถังสูง จึงมีการพัฒนาต่อมาโดยการแยกเป็นถังย่อยสลาย และถังตกตะกอน เปรียบเทียบ septic tank, Travis tank และ Imhoff tank ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 เปรียบเทียบ septic tank, Travis tank และ Imhoff tank (McCarty, 1981)

ปี 1927 ได้มีการอุ่นถังย่อย ซึ่งแยกต่างหากจากถังตกตะกอน ในโรงกำจัดของเสียที่ Essen-Relling hausen ทำให้การย่อยมีประสิทธิภาพสูง และเป็นที่นิยมอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในเมืองใหญ่ ๆ ที่มีอุณหภูมิต่ำ ขณะที่

Rudolfs ได้ทดลองให้เห็นว่าจะได้กาซมากขึ้น ถ้าหมักที่อุณหภูมิสูงขึ้น ในช่วงเวลานี้ Fair and Moore ได้แสดงว่ามีอุณหภูมิเหมาะสมที่หมักให้กาซปริมาณมากอยู่ 2 ช่วง คือ อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic range) 28-33°C และอุณหภูมิสูง (Thermophilic range) 55-60°C และในช่วงเวลาเดียวกันนี้หลายเมืองในเยอรมันได้ผลิตกาซชีวภาพ และอัดเก็บไว้ในถังเหล็กสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงเครื่องยนต์

เกี่ยวกับการผลิตกาซชีวภาพจากของทิ้งจำพวกเซลลูโลส ในปี 1914 ชาวฮอลันดา (Dutch) ได้พยายามผลิตกาซชีวภาพจากฟางข้าวในอินโดนีเซีย ซึ่งเป็นเมืองขึ้นของประเทศฮอลแลนด์ หลังสงครามโลกครั้งที่ 1 ในปี 1918 ชาวอังกฤษสนใจผลิตกาซมีเทนจากของทิ้งในฟาร์ม

ปี 1930 Boruff and Bushwell จากรัฐอิลลินอยส์ในสหรัฐ-อเมริกา ได้พิมพ์ผลิตผลของมีเทนจากฟาร์ม โดยใช้ซังข้าวโพด

ปี 1852 Jacobs and Levine จากรัฐไอโอวา สหรัฐอเมริกา ได้ดำเนินการพัฒนาใช้กาซชีวภาพจากเซลลูโลส ที่เป็นของทิ้งจากฟาร์มเป็นเชื้อเพลิง

ปี 1940 หลายเขตเทศบาลในสหรัฐอเมริกาได้ใช้วิธีกำจัดของเสียโดยสร้างถังหมักไร้ออกซิเจนในการกำจัดของเสียของเทศบาล และใช้มีเทนที่ได้ในการผลิตไฟฟ้า เป็นเครื่องชี้ว่ากระบวนการหมักไร้ออกซิเจน เป็นการควบคุมของเสียได้ผลดี โดยได้กาซที่มีประโยชน์เป็นผลพลอยได้

ระหว่างปี 1940 - 1951 ชาวฝรั่งเศสได้พยายามพัฒนาถังผลิตกาซชีวภาพในอัฟริกาตอนเหนือ โดย G.Ducellier and M.Isman ได้พัฒนาถังหมักต้นแบบใน French North Africa เมื่อปี 1937 โดยมีเรื่องเกี่ยวกับงานนี้ลงพิมพ์ในวารสารฝรั่งเศส

การพัฒนากาซชีวภาพในเยอรมัน ไม่ค่อยอำนวยในแง่พลังงานที่ได้ เพราะอากาศเย็น กาซที่ได้จึงได้ประโยชน์ไม่เต็มที่ เพราะต้องนำกาซบางส่วนไปใช้ให้ความร้อนแก่ถังหมัก มีที่กำจัดของเสียโดยการหมักกาซชีวภาพ 48 แห่ง ในเยอรมันตะวันตก ผลิตกาซได้มากกว่า 16 ล้านลูกบาศก์เมตร 3.4 % ใช้เป็นพลังงานในการผลิต 16.7 % ใช้ในการทำให้ถังหมักอุ่น 28.5 % ใช้เป็นพลังงานสำหรับเมือง 51.4 % ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับพาหนะ

หลังสงครามโลกครั้งที่ 2 ได้มีการพัฒนาการผลิตกาซชีวภาพในหลายประเทศ เช่น อัฟริการใต้ โรดีเซีย เคนยา อูกันดา รัสเซีย ออสเตรเลีย อิตาลี เกาหลี ไต้หวัน ญี่ปุ่น อิสราเอล อินเดีย สหรัฐอเมริกา และฟิลิปปินส์

การพัฒนากาซชีวภาพในอินเดีย ได้เริ่มทำการค้นคว้าตั้งแต่ปี 1939 แต่มาเริ่มใช้ปี 1951 ได้มีการพัฒนามาอย่างช้าๆ จนกระทั่งปี 1961 เมื่อ Indian Khadi and Village Industries Commission มาดำเนินงาน ถังหมักประมาณ 7000 ถัง ได้ตั้งขึ้นในระหว่างปี 1973 - 1974 และได้เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าในปี 1974 - 1975 ทั้งนี้เนื่องจากถังหมักได้มีการพัฒนาให้สะดวกต่อการสร้าง การดูแลให้ผลิตกาซ และประโยชน์ในการใช้กาซได้มากขึ้น นอกจากใช้ในการประกอบอาหารแล้ว ยังให้แสงสว่าง และใช้กับเครื่องยนต์ต่าง ๆ การขยายงานเกี่ยวกับการผลิตกาซชีวภาพในอินเดีย อาจแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือระหว่างปี 1937 - 1950 เป็นระยะทดลอง ระหว่างปี 1950 - 1963 เป็นระยะทดลองติดตั้ง และติดตั้งใช้เต็มที่ตั้งแต่ปี 1964 เป็นต้นมา

ในปี 1965 Chung Po ชาวไต้หวัน ได้นิมน์การออกแบบถังหมักขนาดครอบครัว และใช้ของเหลวที่กำจัดออกมาจากถังหมัก (sludge) เป็นปุ๋ยและเลี้ยง chlorella

สำหรับประเทศไทย ได้เริ่มศึกษาการผลิตกาซชีวภาพเมื่อ พ.ศ.2513 ดำเนินการโดยกองสุขาภิบาล กระทรวงอุตสาหกรรม และกองเกษตรวิศวกรรม ต่อมาได้มีอีกหลายหน่วยงานที่สนใจส่งเสริมให้ประชาชนผลิต โดยมีวัตถุประสงค์ต่าง ๆ กันเช่น

1. ได้พลังงานใช้
2. ใช้วัสดุที่ทิ้งสูญเปล่าให้เป็นประโยชน์
3. กำจัดของเสียจากอุตสาหกรรมบางอย่าง
4. เพื่อกำจัดของเสียจากการเลี้ยงสัตว์ ซึ่งมลพิษก่อความเดือดร้อนต่อประชาชนในบริเวณนั้น

ถึงแม้จะมีการส่งเสริมมานานพอสมควร แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ทั้งนี้เพราะประชาชนยังไม่เห็นผลประโยชน์ที่จะได้คุ้มค่ากับการลงทุน จึงเป็นเรื่องที่จะต้องมีการค้นคว้า เพื่อให้ลงทุนแล้วคุ้มค่า และสะดวกในการดูแล

เผยแพร่ ชักนำให้ประชาชนนิยมเลื่อมใส จนมีการกำจัดของเสียโดยการใช้ผลิตกาซชีวภาพ ซึ่งปัจจุบันนี้มีความจำเป็นเพราะประชาชนเพิ่มมากขึ้น โรงงานอุตสาหกรรมและเกษตรกรรมก็ต้องขยายมากขึ้น ทำให้เกิดปัญหามลพิษทั้งในน้ำ บนดิน และในอากาศ

บรรดานักวิทยาศาสตร์แต่ละสาขา ก็พยายามค้นคว้าเกี่ยวกับการผลิตกาซชีวภาพในแง่ต่าง ๆ กัน เช่นการออกแบบถังหมักให้ลงทุนน้อย ได้กาซมาก ง่ายต่อการดูแล ทางด้านจุลชีววิทยาก็พยายามศึกษาถึงจุลินทรีย์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการผลิตกาซชีวภาพ เพื่อจะได้นำมาพัฒนาให้ผลิตกาซได้มากโดยลงทุนต่ำ กาซมีเทนเปอร์เซนต์สูง ทางด้านที่เกี่ยวข้องกับประชาชน ก็พยายามชักนำให้ประชาชนผลิตกาซชีวภาพขึ้นใช้

ปัจจุบันมีหน่วยงานที่มาร่วมดำเนินงาน (Bhumiratana et al., 1984)

1. กองสุขาภิบาล กรมอนามัย (Division of Sanitation, Department of Health)

2. กรมส่งเสริมการเกษตร (Department of Agriculture Extension)

3. กรมพัฒนาชุมชน (Department of Community Development)

4. สำนักงานพลังงานแห่งชาติ (The National Energy Administration NEA)

ชีวเคมีและจุลชีววิทยาเกี่ยวกับกาซชีวภาพ

สารอินทรีย์เป็นสารที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น ในที่นี้เป็นสารที่ได้จากพืชและสัตว์ ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ คาร์บอน แต่ธาตุคาร์บอนไม่จำเป็นต้องอยู่ในสารอินทรีย์ เช่น อาจอยู่ในหินปูน ($CaCO_3$) และแคลเซียม-คาร์ไบด์ (CaC_2)

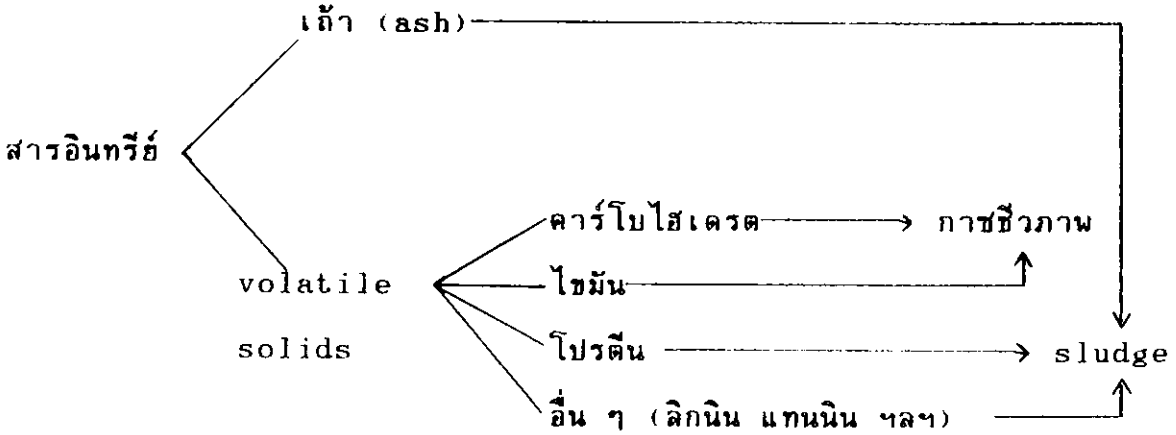
สารประกอบพื้นฐานของสารอินทรีย์ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไลปิด และโปรตีน นอกจากนี้ยังมีพวกที่แตกต่างไป เช่น พวก phenolics เป็นพวกที่มีส่วน

เกี่ยวข้องกับ phenol ได้แก่พวก ลิกนิน แทนนิน และยังมีกลุ่มไคติน เรซิน สารเหล่านี้เป็นพวกที่ยากแก่การย่อยสลายของจุลินทรีย์ สารอินทรีย์เป็นสารที่มีองค์ประกอบซับซ้อน ยากที่จะจัดจำพวก และไม่รู้รายละเอียดเพียงพอ

สารอินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่สุดคือ คาร์โบไฮเดรต ซึ่งได้แก่ เซลลูโลส, กึ่งเซลลูโลส (hemicellulose) แป้ง และน้ำตาล

การหมักสารอินทรีย์ในสภาพไร้ออกซิเจนแล้วให้กาซชีวภาพ ได้มีการค้นคว้าพัฒนาเพื่อใช้วัตถุดิบที่ต้องการกำจัดทิ้งให้เป็นประโยชน์ คือให้ได้กาซมากที่สุดและลงทุนน้อยที่สุด ไม่มีปัญหาในเรื่องมลพิษ และสะดวกต่อการดำเนินการผลิตกาซชีวภาพ ขณะเดียวกันทางด้านจุลชีววิทยา ก็พยายามศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการเปลี่ยนสารอินทรีย์จนได้กาซชีวภาพ ซึ่งกาซที่ให้พลังงานได้แก่มีเทน และพยายามศึกษาถึงความเปลี่ยนแปลงแต่ละขั้นตอนของสารประกอบทางเคมี และปฏิกริยาที่เกิดขึ้น

Maramba (Maramba, 1978) ได้เขียนองค์ประกอบของสารอินทรีย์และวงจรการหมักให้เกิดกาซชีวภาพเป็นแผนผังง่าย ๆ ดังนี้



มีผู้สังเกตว่า กาซชีวภาพผุดขึ้นมาจากสารอินทรีย์ที่ถูกแบคทีเรียย่อยสลาย ได้มีการศึกษากระบวนการละเอียดขึ้น ๆ ว่า จากสารอินทรีย์เปลี่ยนแปลงมาอย่างไร จนได้กาซชีวภาพ ได้มีการแยกและศึกษาว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใด ใช้สารประกอบอะไร สารประกอบที่จุลินทรีย์ใช้ เช่น ในการหมักน้ำตาลจุลินทรีย์ได้แก่ยีสต์ สารที่ใช้ได้แก่น้ำตาล ผลที่ได้คือ เอทธิลแอลกอฮอล์ และ คาร์บอนไดออกไซด์ การ

หมักแอลกอฮอล์นี้ ได้มีการศึกษามาอย่างละเอียดว่าจากน้ำตาล ได้เปลี่ยนเป็นสารชีวเคมีหลายขั้นตอน ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดของยีสต์ ซึ่งเขียนปฏิกริยาเคมีอย่างย่อ ๆ ได้ดังนี้

sugar ——————> ethyl alcohol + CO_2

$C_6H_{12}O_6$ ——————> $2C_2H_5OH + 2CO_2$

จากปฏิกริยาเคมี กลูโคส 100 กรัม จะให้เอธิลแอลกอฮอล์ 51.1 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัม แต่สำหรับกระบวนการเกิดกาซชีวภาพ ผู้ทำการค้นคว้าความรู้เหล่านี้ เป็นไปได้ด้วยความลำบาก เพราะมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่จะให้กาซมีเทน และสารอินทรีย์ที่จะเป็นตัวเริ่มต้นที่แบคทีเรีย จะใช้ผลิตกาซมีเทนก็มีหลายชนิดไม่เหมือนการผลิตเอธิลแอลกอฮอล์ ซึ่งใช้น้ำตาลเท่านั้น

วัตถุดิบ (substrate) ที่แบคทีเรียจะเปลี่ยนเป็นมีเทน เป็นสารประกอบเชิงเดี่ยว (simple compounds) ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. กรดไขมันที่มีคาร์บอน 1 - 6 อะตอม
2. แอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 1 - 5 อะตอม
3. ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และคาร์บอนมอนนอกไซด์

บางกลุ่มเชื่อว่า methanogenic bacteria สามารถเปลี่ยน long chain fatty acids, dicarboxylic acids บางชนิด, acetone, 2,3 - butylene glycerol และ aromatic compounds บางชนิด (เช่น benzoic acid)

ทฤษฎีที่เป็นที่ยอมรับกันในการเกิดมีเทน

ในแง่ความเห็นด้านชีวเคมี กรดอินทรีย์เมื่อเกิดกระบวนการ decarboxylation แล้ว จะให้กาซต่าง ๆ ดังนี้

$HCOOH$ ——————> $CO_2 + H_2$

CH_3COOH ——————> $CO_2 + CH_4$ (methane)

C_2H_5COOH ——————> $CO_2 + C_2H_6$ (ethane)

C_3H_7COOH ——————> $CO_2 + C_3H_8$ (propane)

C_4H_9COOH ——————> $CO_2 + C_4H_{10}$ (butane)

จากการหมักพบเพียงมีเทนอย่างเดียว แสดงถึงชนิดของกรด ถ้ามีกรดอื่นก็จะเปลี่ยนมาเป็นสารตั้งต้นของมีเทน (methane precursors) จาก Van Niel carbon dioxide reduction theory ได้ให้หลักฐานว่าคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนเป็น immediate precursors ของมีเทน คาร์บอนไดออกไซด์ถูก reduced ด้วยไฮโดรเจน ในขบวนการนี้ โดยขั้นแรกคาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจนเกิดขึ้นจากกรด ต่อมามี chemical reduction ของคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยไฮโดรเจนได้มีเทน ดังนั้นขั้นตอนในการเกิดมีเทนจากกรดฟอร์มิก (formic acid) อาจเป็นดังนี้

Step 1 $4HCOOH \text{ ------> } 4CO_2 + 4H_2$

Step 2 $CO_2 + 4H_2 \text{ ---> } CH_4 + 2H_2O$

ปฏิกริยารวม $4\ HCOOH \text{ -------> } CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$

ขั้นตอนในการเกิดมีเทนจากกรดอะซิติก อาจเป็นดังนี้

Step 1 $CH_3COOH + 2H_2O \text{ --------> } 2CO_2 + 4H_2$

Step 2 $CO_2 + 4H_2 \text{ ----------> } CH_4 + 2H_2O$

ปฏิกริยารวม $CH_3COOH \text{ ----------> } CO_2 + CH_4$

จากสารประกอบเชิงเดี่ยวอื่น ๆ อาจจะเกิดมีเทนได้ดังนี้

1. From a primary alcohol

$4CH_3OH \text{ ------> } 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$

$2C_2H_5OH + CO_2 \text{ ------> } CH_4 + 2CH_3COOH$

2. From a secondary alcohol

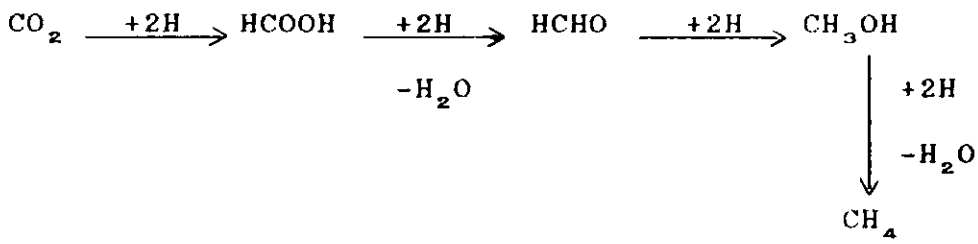
$4CH_3CHOHCH_3 + CO_2 \text{ -----> } CH_4 + 4CH_3COCH_3 + 2H_2O$

3. From a higher fatty acid

$2C_4H_9COOH + CO_2 + 2H_2O \text{ -----> } CH_4 + 2CH_3COOH + 2C_2H_5COOH$

ข้อที่น่าระลึกไว้คือ คาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากปฏิกริยาเหล่านี้ ยังไม่ใช่ปฏิกริยาสุดท้าย จากหลักฐานเกี่ยวกับต้นกำเนิดของมีเทน คาร์บอนไดออกไซด์

จะเข้าสู่กระบวนการต่อไป ซึ่งนักเคมีรู้จักกันดังนี้



กระบวนการเริ่มด้วย reduction ของคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยไฮโดรเจน ได้กรดฟอร์มิก แล้วเปลี่ยนไปเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) ด้วยไฮโดรเจนและน้ำ เปลี่ยนต่อไปเป็นเมธิลแอลกอฮอล์ด้วยไฮโดรเจน แล้วต่อไปเป็นมีเทนด้วยไฮโดรเจนและน้ำ อย่างไรก็ตาม กระบวนการนี้ยังไม่สามารถแสดงให้ดูจริง ๆ ได้

จากสารประกอบเชิงซ้อน (complex compounds) ถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเชิงเดี่ยว แล้วจึงให้กาซชีวภาพ

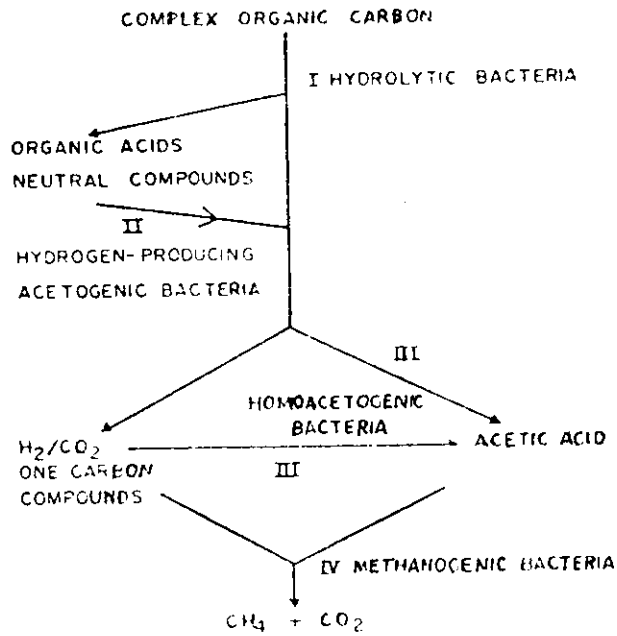
Barker (Barker, 1956) ได้ให้แง่คิดว่า จากสารประกอบเชิงซ้อนถึงมีเทนมีหลายกระบวนการ ไม่ได้เปลี่ยนไปเป็นมีเทนทันที แต่เปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเชิงเดี่ยว แล้ว methane bacteria เปลี่ยนไปเป็นกาซชีวภาพ อาจเขียนสมการได้ดังนี้

$$(CH_2O)_6 \xrightarrow{\text{แบคทีเรีย}} 3CH_3COOH \xrightarrow{\text{แบคทีเรีย}} 3CH_4 + 3CO_2$$

คาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ กาซชีวภาพ

Zeikus (Zeikus, 1979a) ได้สรุปปฏิกริยาต่าง ๆ มีแบคทีเรีย 4 กลุ่ม เข้าไปเกี่ยวข้อง ดังรูปที่ 14 ได้แก่

1. Hydrolytic bacteria
2. Hydrogen producing acetogenic bacteria
3. Homoacetogenic bacteria
4. Methanogenic bacteria



รูปที่ 14 Bacterial groups involved in the complete anaerobic degradation of complex organic carbon.(Zeikus,1979a)

จากแบคทีเรีย 4 กลุ่มนี้ อาจจะจัดได้เป็น 2 พวก

1. Nonmethanogenic bacteria คือแบคทีเรียกลุ่ม 1 - 3 ไว้ด้วยกัน ซึ่งมีทั้งที่เป็น facultative และ strictly anaerobes ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มเหล่านี้

Streptococcaceae

Enterobacteriaceae

Bacteroides, chiefly Bacteroides ruminicola

Clostridium

Bifidobacterium

Desulfovibrio

Nonmethanogenic bacteria เป็นผู้เปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน ซึ่งเป็นวัตถุดิบ เช่น เซลลูโลส แป้ง โปรตีน ไลปิด ฯลฯ ให้เป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ (soluble compounds) ส่วนใหญ่เกิดโดยขบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) จากคาร์โบไฮเดรต เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว

จากไลปิดเป็นกรดไขมัน ที่มีคาร์บอน 1 - 6 อะตอม และกลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งมีคาร์บอน 1 - 5 อะตอม และจากโปรตีนเป็น proteoses, peptones, ฯลฯ ในขบวนการนี้ไม่ต้องการออกซิเจนอิสระ และถ้ามีออกซิเจนอิสระ อาจจะเป็นอันตรายได้

อาจรวมเรียกกลุ่มแบคทีเรียตามวัตถุดิบที่ใช้ เช่น cellulolytic bacteria เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส แล้วอาจจะให้ acetate,ethanol, ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์

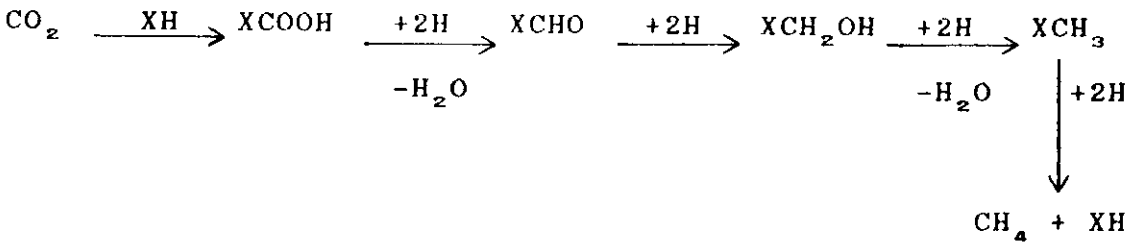
อาจเรียกแบคทีเรียตามผลิตผลที่ได้จากการย่อยสลายได้แก่ acetogenic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เปลี่ยนสารอินทรีย์ เช่น volatile fatty acids ไปเป็น acetates

2. Methanogenic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เปลี่ยนสารต่าง ๆ เช่น acetates กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ ให้เป็นมีเทน แบคทีเรียเหล่านี้ต้องการสภาพไร้ออกซิเจนอย่างแท้จริง แม้แต่สารพวก oxidizing อย่างอ่อน เช่น ไนเตรต ก็ต้องไม่มี

กลไกในการสร้างกาซชีวภาพจากสารประกอบเชิงเดี่ยวยังไม่แจ่มแจ้ง แต่มีหลักฐานว่า

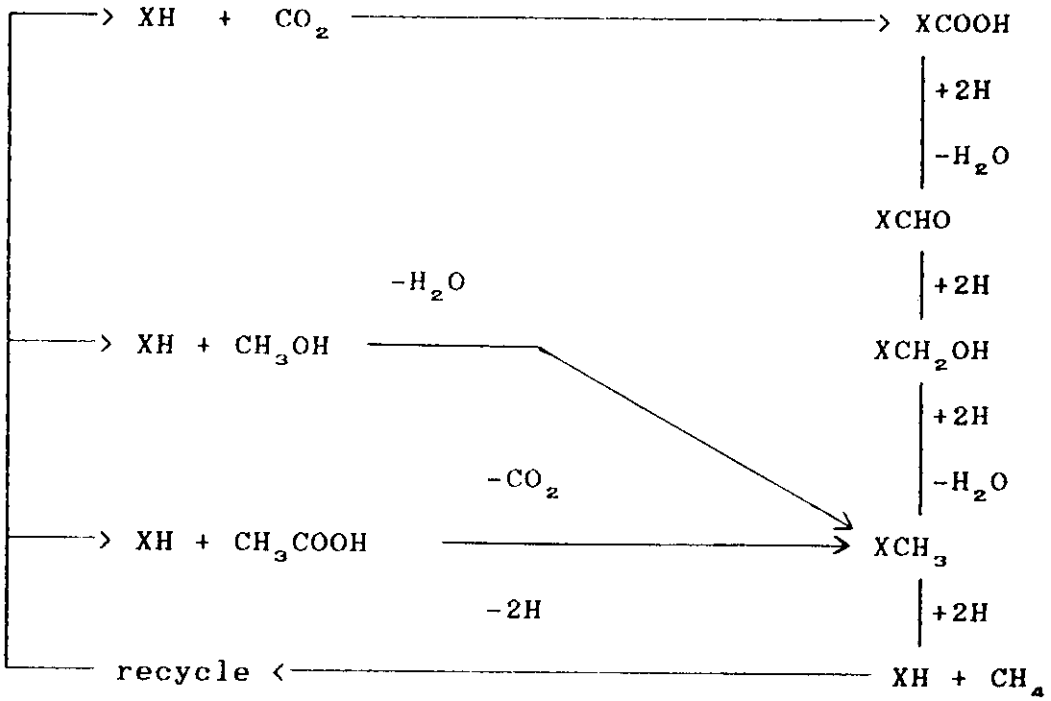
1. วิตามินบี 12 เกี่ยวข้อง เนื่องจากมีวิตามินบี 12 ปรากฏอยู่มากใน sludge

Barker (Barker, 1956) ให้แนวคิดว่า reductive step อาจจะไม่ได้เกิดจากไฮโดรเจน แต่เกิดจาก hydrogen carrier ซึ่งอาจแทนด้วย XH ดังนั้น reductive steps ของคาร์บอนไดออกไซด์ อาจเขียนขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงได้ดังนี้



Hydrogen carrier ถูกสร้างขึ้นแล้วเข้าสู่วงจรหมุนเวียนไปเรื่อย ๆ

การเกิดมีเทนจาก methanol และกรดอะซิติก อาจแสดงการเกี่ยวข้องของ hydrogen carrier (XH) และทฤษฎีที่น่าจะเป็นไปได้ในกลไกของการเกิดมีเทน แต่ในกรณีเหล่านี้ oxidant ไม่ใช่คาร์บอนไดออกไซด์ ถึงแม้ว่า reductant จะเป็นตัวเดียวกันคือ XH โครงร่างปฏิกริยาที่สมบูรณ์ของ Barker จะเป็นดังนี้

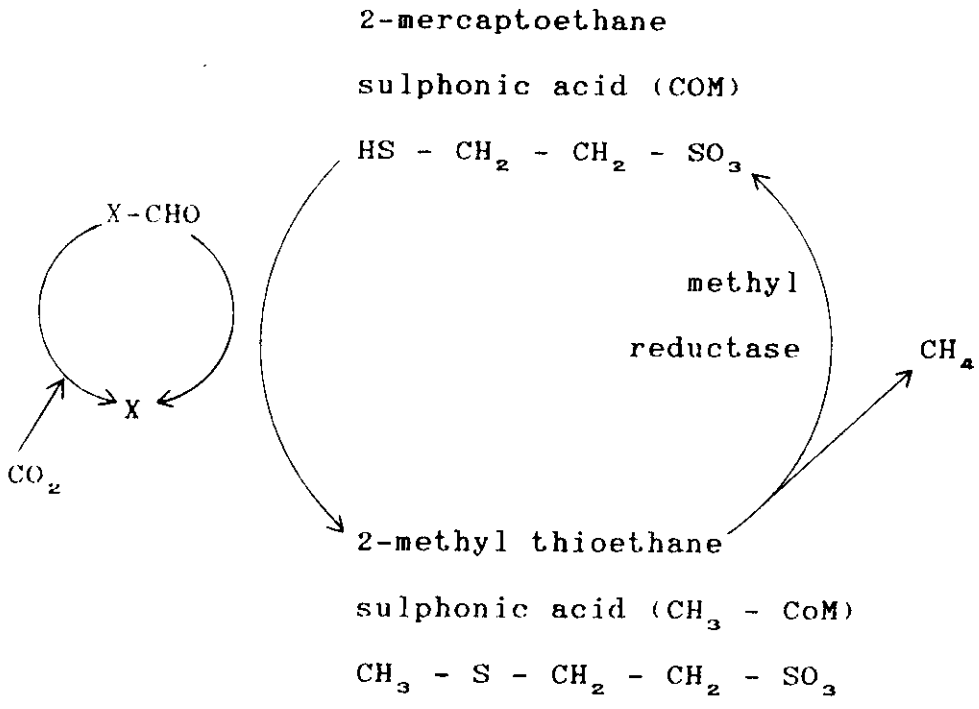


จากสารประกอบเคมีเชิงซ้อน จะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงเดี่ยว และในที่สุดเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ เมทธิลแอลกอฮอล์ กรดอะซิติก จะถูก methanogenic bacteria เปลี่ยนเป็นมีเทน ผ่านขบวนการตามสมมติฐานที่อาศัย

XH จะเชื่อได้จะต้องมีการพบในทุกกรณีเหมือนกัน

Stadtman (Stadtman, 1967) ได้พบว่า XH คือ cobalt-containing compound ซึ่งได้แก่ วิตามินบี 12 ใน sludge จากถังหมักกาชชีวภาพ ได้พบวิตามินบี 12 เป็นปริมาณมาก (Santos, 1983) เป็นการเปิดยุคใหม่ที่มีประโยชน์ในความเชื่อของนักชีววิทยา

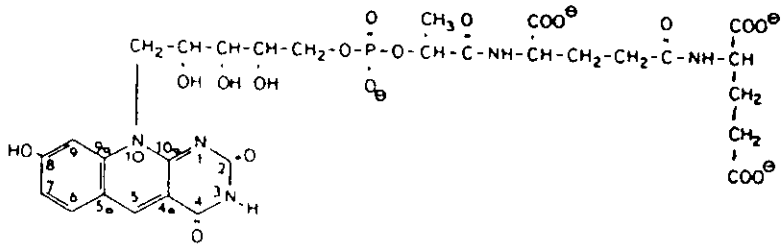
2. Coenzyme M (2-mercaptoethane sulphonic acid) เป็นสารที่ methanogenic bacteria สร้างขึ้นใช้ในการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นมีเทน (Balch et al., 1979) ดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 Activation of CO_2 by CoM and methyl reductase to form methane (Adams, 1981)

3. F_{420} เป็น co-enzyme ที่พบเฉพาะใน methanogens ไม่พบในเซลล์ของสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ สามารถเห็นคุณสมบัติที่ได้ โดยทำ wet mount แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง จะมี excitation 420 nm, emission 470 nm ได้ใช้เป็นเครื่องแสดงว่าเป็น methanogens (Edwards

and McBridge, 1975) ในการสังเคราะห์มีเทนไฮโดรเจนถูก oxidized โดยเชื่อมต่อกับ F_{420} และคาร์บอนไดออกไซด์ไป reduced โดยเชื่อมต่อกับ CoM แล้วได้มีเทน ได้มีการหาสูตร F_{420} ได้ดังรูปที่ 16



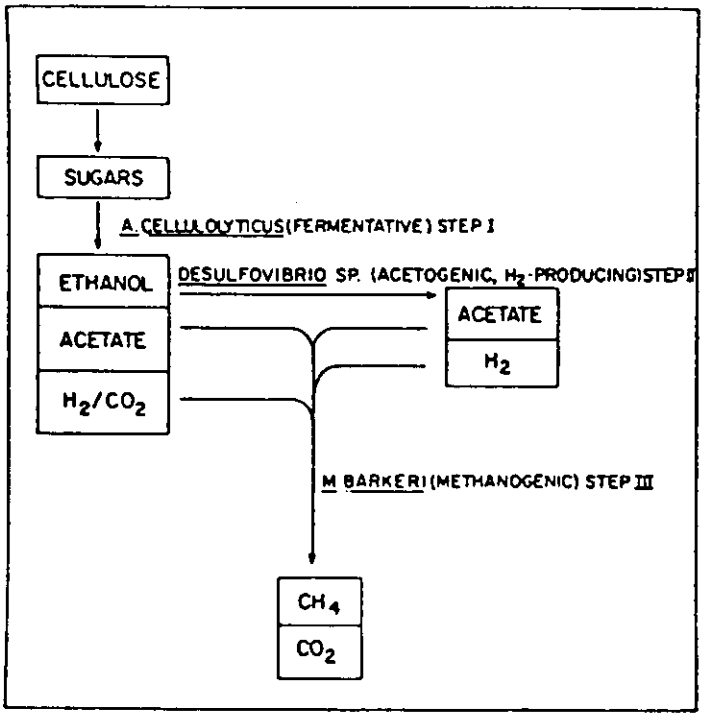
รูปที่ 16 Structure of F_{420} (Eirich et al., 1978)

Cheeseman และคณะ (Cheeseman et al., 1972) ได้อธิบายถึงการที่ออกซิเจนเป็นอันตรายต่อ methanogens อย่างแรง อาจเป็นเพราะเกี่ยวกับ F_{420} oxidation เมื่อถูก oxidized จะทำให้ enzyme แยกตัวออกจาก F_{420} แล้วสลายตัว (labile) enzyme จะเชื่อมต่อกับ F_{420} เมื่อถูก reduced ทำให้คงรูป (stable)

เนื่องจากสารประกอบอินทรีย์มักจะเปลี่ยนเป็นกรด เมื่อมีการหมักแล้ว pH ในถังหมักจะลดลง ถ้าลดลงมากจะยับยั้งการเจริญของ methanogenic bacteria ดังนั้นการเกิดกรดจึงต้องเกิดอย่างช้า ๆ เมื่อกรดถูกเปลี่ยนไปเป็นมีเทน pH จะไม่ลดลงมาก ปกติในถังหมักมีการปรับ pH ให้อยู่ในช่วงที่แบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม คือทั้ง nonmethanogenic และ methanogenic แบคทีเรียเจริญ มีสภาพบัฟเฟอร์ (buffer) อยู่ในอาหารที่หมัก

ขบวนการผลิตกาซชีวภาพ จะต้องมีแบคทีเรีย 2 จำพวกดังกล่าวมาแล้ว การที่จะผลิตกาซชีวภาพทั่วไป โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เพียงเชื้อเดียวเป็นไปไม่ได้ เท่าที่มีผู้ค้นคว้าทดลองกันมา เชื้อผสม (mixed culture) เป็นสิ่งจำเป็น อาจจะใช้เพียง 2 เชื้อ คือพวกละเชื้อ เรียก coculture หรือใช้เพียง 3 เชื้อ เรียก

triculture ยิ่งไปกว่านั้น ถึงแม้จะผลิตกาซจากสารประกอบเชิงเดี่ยว ก็ยังพบว่าต้องการเชื้อต่าง ๆ กัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสารประกอบเชิงเดี่ยวนั้น ๆ Barker (Barker, 1956) พบว่าการหมักที่สมบูรณ์ของสารประกอบเชิงเดี่ยว เช่น valeric acid (C_4H_9COOH) ยังต้องการ methanogenic bacteria อย่างน้อย 3 ชนิด (species) methanogenic bacteria แต่ละชนิด จะเลือกวัตถุดิบเป็นการเฉพาะเจาะจงมาก คงต้องใช้คำบรรยายว่า "extreme substrate specificity" ดังนั้นเชื้อกลุ่มเดียวจึงไม่เหมาะสามที่จะใช้กับวัตถุดิบทุกชนิด



รูปที่ 17 Scheme showing the relationships of the three bacteria effecting the cellulose-to-methane fermentation. (Laube and Martin, 1981)

Laube และ Martin (Laube and Martin, 1981) ได้ทดลองผลิตกาซชีวภาพจากเซลลูโลส โดยใช้เชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ Acetivibrio cellulolyticus, Desulfovibrio sp. และ Methanosarcina barkeri ในการศึกษาการทำงานของเชื้อ สรุปได้ดังรูป 17 พบว่าถ้าใช้ A. cellulolyticus อย่างเดียว จะได้ ethanol, acetate, ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าใช้ A. cellulolyticus กับ M.barkeri จะได้ acetate มากขึ้น และ ethanol น้อยลง เพราะ ethanol เปลี่ยนไปเป็น acetate เมื่อซัลเฟตทำหน้าที่เป็น reducer และมีไฮโดรเจนนิดหน่อยแล้ว จะได้มีเทนเกิดขึ้นเล็กน้อย ถ้าใช้ A. cellulolyticus, M.barkeri และ Desulfovibrio sp. จะได้มีเทนอย่างมากและรวดเร็ว มี ethanol,acetate และไฮโดรเจนน้อยมาก ดังนั้นถ้าจะหมักกาซชีวภาพจากเซลลูโลสให้ได้ผลดี จะต้องมีแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด

Lane (Lane, 1980) ได้สรุปการเปลี่ยนแปลงในถังหมักแบบไร้ออกซิเจน โดยแบคทีเรีย 4 กลุ่ม ตามที่ Zeikus ได้สรุปไว้ในรูปที่ 14 โดยมี nonmethanogenic bacteria 3 ชนิด ทำหน้าที่เปลี่ยนสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งมีอยู่ในของกำจัดทิ้งให้เป็น acetate, กรดอินทรีย์, แอลกอฮอล์, ไฮโดรเจน, คาร์บอนไดออกไซด์ แล้ว methanogenic bacteria 2 ชนิด เปลี่ยนต่อไปเป็นมีเทน ดังตารางที่ 6

Group	Organism	Nutrition	Substrate	Product
Hydrolytic	Clostridium thermocellum	Heterotroph	Cellulose, cellobiose.	H_2/CO_2, ethanol, acetate, lactate.
H_2-producing acetogen	S-isolate	Heterotroph	Pyruvate, ethanol.	H_2/CO_2, ethanol, acetate.
Homoace - togen	Acetobacte-rium woodii	Mixotroph	Fructose, lactate, CO_2/H_2	Acetate
Methanogen	Methanobac - terium ther-moautotro-phicum	Autotroph	H_2/CO_2	CH_4
Methanogen	Methanosar - cina barkeri	Mixotroph	H_2/CO_2, CH_3OH, CH_3NH_2, CH_3COOH	CH_4

ตารางที่ 6 Physiology characteristics of some organisms representative of the 4 trophic groups involved in anaerobic digestion (Lane, 1980)

การจัดจำพวก methanogenic bacteria

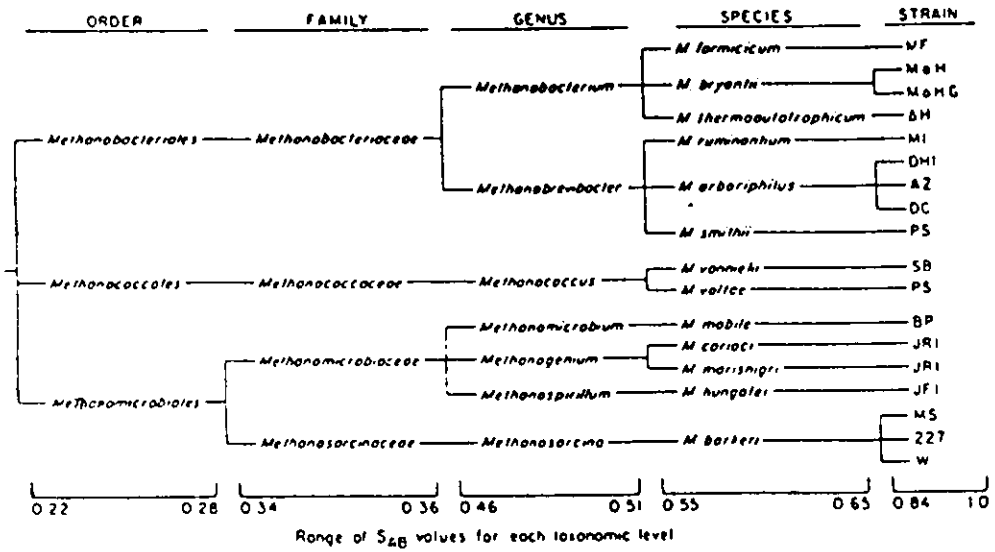
การจัดจำพวก methanogenic bacteria ได้มีวิวัฒนาการมาเรื่อย ๆ ได้มีการจัดแบคทีเรียที่ให้มีเทนอยู่ใน family Methanobacteriaceae ใน Part 13 of the 8 th edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ได้ยึดหลักทาง morphology แบ่งแบคทีเรียที่ได้พบแล้วเป็น 3 สกุล ดังในตารางที่ 7

I	Rod or chain-forming, lancet-shaped coccoids
	Genus 1. Methanobacterium
II	Cocci other than chain-forming lancets
	A. Large cocci in packets
	Genus II. Methanosarcina
	B. Cocci occurring single, in pairs, or in clumps
	Genus III. Methanococcus

ตารางที่ 7 Key to the genera of family Methanobacteriaceae, Barker 1956. (from the 8 th edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1974)

Balch และคณะ (Balch et al., 1979) ได้รวบรวมการจัดจำพวก methanogenic bacteria โดยยึดหลักหลายรูปแบบดังนี้

การจัดจำพวกโดยเปรียบเทียบ 16S r RNA ได้มีการคำนวณหาค่า association coefficient (S_{AB}) แต่ละคู่ของชนิดแบคทีเรียจะมีค่าระหว่าง 0.02 - 1.0 แล้วนำมาจัดจำพวก methanogenic bacteria ได้ดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 New taxonomic treatment for the methanogenic bacteria based on 16S rRNA comparative cataloging. (from Balch et al., 1979)

การจัดจำพวกโดยอาศัย DNA base composition (mol % G+C) ดังตารางที่ 8

Order	Family	Species	mol% G + C[a]	Reference	Substrates for growth and CH_4 production[b]
I	I	*Methanobacterium formicicum*	40.7[c] (42.0)	126	H_2, formate
		Methanobacterium bryantii	32.7[c] (38.0)	131	H_2
		Methanobacterium bryantii strain M.o.H.G.	33.2[c]		H_2
		Methanobacterium thermoautotrophicum	49.7[c] (52.0)	131	H_2
		Methanobrevibacter ruminantium	30.6[c]		H_2, formate
		Methanobrevibacter arboriphilus	27.5	130	H_2
		Methanobrevibacter arboriphilus strain AZ	31.6[c]		H_2
		Methanobrevibacter arboriphilus strain DC	27.7[c]		H_2
		Methanobrevibacter smithii	31.0[c] (32.0)	126	H_2, formate
II	I	*Methanococcus vannielii*	31.1[c]		H_2, formate
		Methanococcus voltae	30.7[c]		H_2, formate
III	I	*Methanomicrobium mobile*	48.8[c]		H_2, formate
		Methanogenium cariaci	51.6	81a	H_2, formate
		Methanogenium marisnigri	61.2	81a	H_2, formate
		Methanospirillum hungatei	45.0	33	H_2, formate
		Methanospirillum hungatei strain GP1	46.5	78	H_2, formate
	II	*Methanosarcina barkeri*	38.8[c] (43.5)	108	H_2, CH_3OH, CH_3NH_2, acetate
		Methanosarcina barkeri strain 227	38.8[c]		H_2, CH_3OH, CH_3NH_2, acetate
		Methanosarcina barkeri strain W	40.5[c]		H_2, CH_3OH, CH_3NH_2, acetate
		Methanosarcina barkeri strain UBS	43.5	109	H_2, CH_3OH, CH_3NH_2, acetate
		Methanosarcina barkeri strain Z	51.0	135	H_2, CH_3OH, CH_3NH_2, acetate

ตารางที่ 8 Summary of DNA base composition (mole % G + C) and substrates that serve as sole electron doners for methanogenesis and growth (Balch et al., 1979)

นอกจากนี้ยังมีการจัดจำพวก ซึ่งอาจจะยึดคุณสมบัติอย่างอื่น ๆ ได้แก่ ส่วนประกอบของผนังเซลล์ ส่วนประกอบของไลปิด ซึ่งจะได้สภาพการจัดจำพวกออก

มาทำนองเดียวกัน Balch และคณะ จึงได้เสนอการจัดจำพวกตามตารางที่ 9

I. Gram-positive to gram-variable rods or lancet-shaped cocci often forming chains and filaments.
Order I. *Methanobacteriales*
Family I. *Methanobacteriaceae*
A. Slender, straight to irregularly crooked long rods often occurring in filaments.
Genus I. *Methanobacterium*
1. Mesophilic.
a. Methane produced from formate.
Methanobacterium formicicum
b. Methane not produced from formate.
Methanobacterium bryantii
2. Thermophilic
Methanobacterium thermoautotrophicum
B. Short rods or lancet-shaped cocci which often occur in pairs or chains.
Genus II. *Methanobrevibacter*
1. Cells form short, nonmotile rods which do not utilize formate.
Methanobrevibacter arboriphilus
2. Chain-forming, lancet-shaped cocci that produce methane from formate and require acetate as a carbon source.
a. Growth requirement for 2-mercaptoethanesulfonic acid and D-α-methyl butyrate.
Methanobrevibacter ruminantium
b. Do not have an obligate growth requirement for 2-mercaptoethanesulfonic acid or D-α-methyl-butyrate.
Methanobrevibacter smithii
II. Gram-negative cells or gram-positive cocci occurring in packets.
A. Gram-negative, regular to slightly irregular cocci often forming pairs.
Order II. *Methanococcales*
Family I. *Methanococcaceae*
Genus I. *Methanococcus*
1. Cells inhibited by addition of 5% NaCl to medium.
Methanococcus vannielii
2. Cells not inhibited by addition of 5% NaCl to medium.
Methanococcus voltae
B. Gram-negative rods or highly irregular cocci occurring singly.
Order III. *Methanomicrobiales*
Family I. *Methanomicrobiaceae*
1. Straight to slightly curved, motile, short rods.
Genus I. *Methanomicrobium*
Methanomicrobium mobile
2. Irregular coccoid cells.
Genus II. *Methanogenium*
a. Cells require acetate.
Methanogenium cariaci
b. Cells do not require acetate.
Methanogenium marisnigri
3. Regularly curved, slender, motile rods, often forming continuous spiral filaments.
Genus III. *Methanospirillum*
Methanospirillum hungatei
C. Gram-positive coccoid cells which usually occur in packets and ferment methanol, methylamine, and acetate.
Family II. *Methanosarcinaceae*
Genus I. *Methanosarcina*
Methanosarcina barkeri

ตารางที่ 9 Determinative key to species of the methanogenic bacteria based on simple phenotypic characters (Batch et al., 1979)

สรุปการจัดจำพวก methanogenic bacteria ได้ดังนี้

Order I, Methanobacteriales

Family I, Methanobacteriaceae

Genus I, Methanobacterium

Methanobacterium bryantii

Genus II, Methanobrevibacter

Methanobrevibacter smithii

Order II, Methanococcales

Family I, Methanococcaceae

Genus I, Methanococcus

Methanococcus voltae

Order III, Methanomicrobiales

Family I, Methanomicrobiaceae

Genus I, Methanomicrobium

Genus II, Methanogenium

Genus III, Methanospirillum

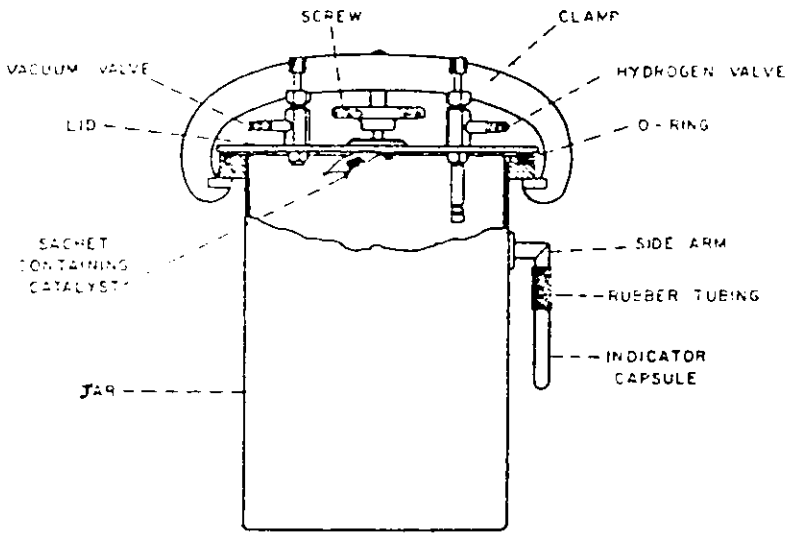
Family II, Methanosarcinaceae

Genus I, Methanosarcina

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพไร้ออกซิเจน

การทำให้เกิดสภาพไร้ออกซิเจน อาจจะทำให้มีบรรยากาศมีสภาพไร้ออกซิเจน หรือต้องทำให้ทั้งบรรยากาศและในอาหาร ให้มีสภาพไร้ออกซิเจน สำหรับพวก strictly anaerobic bacteria ได้มีผู้ใช้วิธีการต่าง ๆ กัน ดังนี้

1. Anaerobic jar เป็นการทำให้บรรยากาศที่อยู่รอบ ๆ อาหารที่เลี้ยง ปราศจากออกซิเจน anaerobic jar มีส่วนประกอบดังรูปที่ 19 วิธีทำให้ภายใน anaerobic jar ปราศจากออกซิเจน ทำได้ดังนี้



รูปที่ 19 B.T.L. anaerobic jar. (Reproduced by courtesy of Messrs Baird and Tatlock(London)Ltd.) (Willis, 1969)

ก. ใช้ palladiumized asbestos เป็นตัวเร่งให้ออกซิเจนรวมกับไฮโดรเจนเป็นน้ำ

ข. ใช้ anaerobic "Gaspak" system เป็น hydrogen-carbon dioxide generator ใส่ซองกระดาษตะกั่วไว้ เวลาจะใช้จิงเติมน้ำจะให้ไฮโดรเจนทำปฏิกริยากับออกซิเจน โดยอาศัยตัวเร่งที่อุณหภูมิปกติ Brewer and Allgerier ประดิษฐ์ขึ้นในปี 1966 จัดจำหน่ายโดย Becton, Dickinson, U.K.Ltd., York House, Empire Way, Wembley, Middlesex. (Cruickshank et al., 1975) วิธีนี้ค่าใช้จ่ายสูงในการซื้อ gas pak

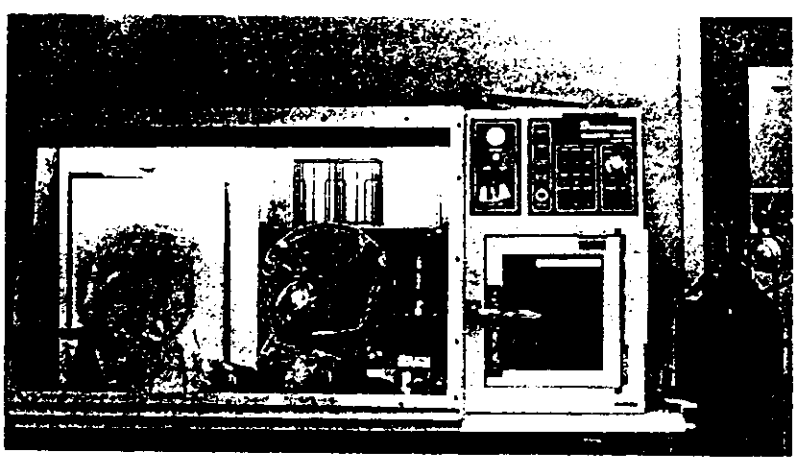
ค. ใช้เครื่องดูดอากาศข้างในออก แล้วเติมกาซที่ไม่มีออกซิเจนที่ต้องการเช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน ไนโตรเจน หรือกาซผสมของกาซเหล่านี้เข้าไปแทนที่ anaerobic jar ที่จะใช้กาซวิธีนี้ต้องมีท่อดูดกาซออกและ

ท่อใส่กาซเข้าไปได้ และมีเครื่องวัดความดันกาซ ดังรูปที่ 19

2. Roll tube method (Hungate, 1969) เป็นวิธีที่ใช้เลี้ยง strictly anaerobic bacteria ใช้กาซที่ต้องการ เช่น ไนโตรเจน ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ ฮีเลียม หรือผสมระหว่างกาซเหล่านี้ เช่น ไฮโดรเจน 80 % คาร์บอนไดออกไซด์ 20 % พ่นลงไปไล่ออกซิเจน ทั้งในอาหารขณะที่ยังเป็นของเหลว และกาซที่อยู่เหนืออาหารในภาชนะ แล้วปิดภาชนะที่ใส่อาหารให้แน่นจนอากาศเข้าไม่ได้ กาซที่ใช้ไล่ออกซิเจนจะต้องเป็นกาซที่ไม่มีออกซิเจนผสมอยู่ ทำได้โดยให้กาซผ่าน copper granule ซึ่งบรรจุอยู่ใน pyrex glass column ที่ทำให้ร้อน 350°C ด้วยไฟฟ้า ทองแดงจะทำปฏิกริยากับออกซิเจน เป็นคอปเปอรออกไซด์ (CuO)

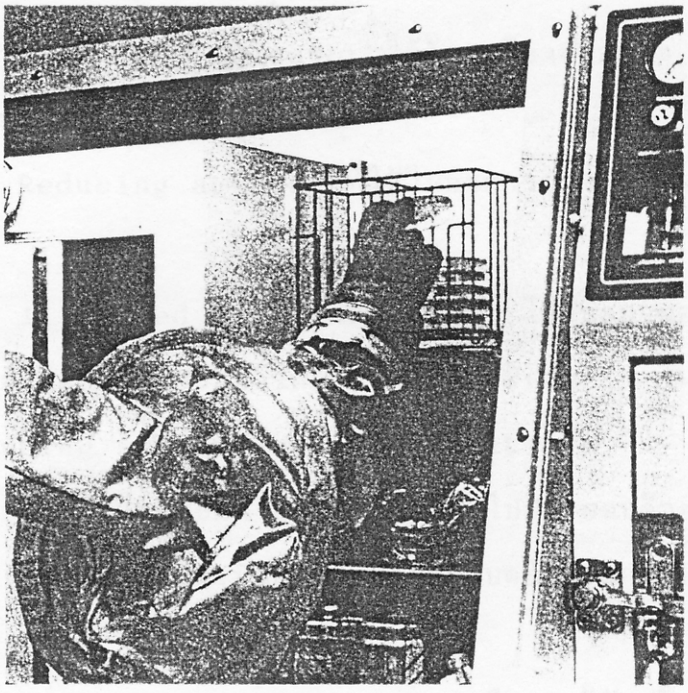
ภาชนะที่ใส่อาหารเป็นแก้วที่อบ ฆ่าจุลินทรีย์ได้ ปกติใช้หลอดแก้วขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร มีฝาเกลียว ซึ่งเจาะช่องตรงกลาง และมีจุกยางทำด้วย butyl rubber ซึ่งมีคุณสมบัติเมื่อใช้เข็มฉีดยาแทงผ่านแล้วชักออก กาซไม่สามารถผ่านได้ ถ้าไม่ใช้ฝาเกลียว อาจใช้ขวดยาฉีดแทนในการเลี้ยงเชื้อ โดยมีจุกยางปิด และรัดด้วยอลูมิเนียมอีกชั้นหนึ่งแบบขวดบรรจุยาฉีด

3. Anaerobic glove box ได้มีการประดิษฐ์ตู้ซึ่งกาซผ่านเข้าออกไม่ได้ เพื่อใช้ในการแยกเชื้อ บ่มเชื้อ และจำแนกแบคทีเรียที่เจริญในสภาพไร้ออกซิเจน ดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 Anaerobic glove box. (Courtesy Suburban Hospital, Behtesda, Md.)

มีการนำของที่จะใช้ผ่านเข้าออกทางช่องเปิดด้านซ้ายมือ มีถุงมือยางติดอยู่ เพื่อสวมมือที่จะยื่นเข้าไปทำงานภายในตู้ ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 Use of gloves for manipulations in glove box.
(Courtesy Suburban Hospital, Bethesda, Md.)

ภายในบรรจุด้วยกาซตามที่ต้องการใช้ วิธีนี้สามารถเลี้ยงแบคทีเรียพวก strictly anaerobes ในจานเพาะเชื้อได้ และขณะถ่ายเชื้อเชื้อจะไม่มีโอกาสสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศเหมือนวิธีอื่น ๆ (Silver, 1980)

ขณะนี้ได้มีการผลิต anaerobic glove bag ประกอบด้วยถุงยางแทนตู้ และมีถุงมือยางเช่นเดียวกับ anaerobic glove box ขึ้นมาใช้ประโยชน์ในด้านนี้ ทำให้ประหยัดกาซที่จะใช้บรรจุ แต่คงสะดวกไม่เท่า anaerobic glove box

<u>อาหารที่ใช้ในการศึกษา strictly anaerobic bacteria</u>

อาหารจะต้องมีการทำให้ปราศจากออกซิเจนและ oxidizing

agent เช่น ไนเตรต ซัลเฟต วิธีทำให้อาหารปราศจากออกซิเจน จะต้องทำขณะที่อาหารยังเหลว ในอาหารปกติจะใส่ resazurin เป็น oxidation-reduction indicator resazurin เมื่อถูก oxidized จะเป็นสีชมพู และจะไม่มีสีเมื่อถูก reduced resazurin นอกจากจะเป็น oxidation-reduction indicator แล้วยังเป็น pH indicator ได้ด้วย คือจะมีสีแดง เมื่อเป็นกรด จะมีสีน้ำเงินเมื่อเป็นด่าง

Reducing agents ที่ใช้ในอาหารต่าง ๆ (Willis, 1969) มีดังนี้

1. Cooked meat particles ใช้ในสภาพอาหารเหลวบรรจุขวดปิดฝาสนิทโดยไม่ต้องอาศัยวิธีทำให้มีสภาพไร้ออกซิเจน ใน cooked meat tissue มี reducing substances เช่น glutatione

2. กลูโคล ปกติในอาหารทั่ว ๆ ไปประกอบด้วยกลูโคสเข้มข้นไม่เกิน 1 % จะไม่เป็นพิษ กลูโคสเป็นสารอาหารให้แบคทีเรียและเป็น reducing agent ด้วย

3. Thioglycollic acid หรืออาจใช้อยู่ในสภาพ sodium thioglycolate ใช้เข้มข้นระหว่าง 0.01 - 0.2 % ถ้าเข้มข้นมากเกินไปจะเป็นพิษ ควรเตรียมใหม่ ๆ ก่อนจะใส่ลงในอาหาร

4. Cysteine ใช้ความเข้มข้นไม่เกิน 0.05 % ถ้าเข้มข้นมากจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทั่วไปใช้ Cysteine hydrochloride

5. โซเดียมซัลไฟด์ (Na_2S) อาหารที่มีโซเดียมซัลไฟด์จะต้องอยู่ภายใต้กาซไฮโดรเจน หรือไนโตรเจน ถ้าอยู่ภายใต้กาซคาร์บอนไดออกไซด์ กาซคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกดูดซับอย่างรวดเร็ว เพราะโซเดียมซัลไฟด์มีสภาพเป็นด่าง ทำให้เหนืออาหารไม่มีกาซจะทำให้อากาศเข้าไปภายในได้ง่าย ถ้า pH ต่ำลงกว่า 6.7 โซเดียมซัลไฟด์จะเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) เมื่อ pH7 ไฮโดรเจนซัลไฟด์จะเกิดปฏิกริยาดังนี้ $H_2S \rightleftharpoons S + 2H^+ + 2e$ ปกติจะใช้โซเดียมซัลไฟด์ เมื่อต้องการเลี้ยง strictly anaerobe (Hungate, 1969)

6. Dithionite ใช้ความเข้มข้นไม่เกิน 1 % เป็น reducing agent.

7. เหล็ก ใช้เป็น reducing agent อาจอยู่ในสภาพชิ้นส่วนอย่างไรก็ได้ เป็นฝอย เป็นชิ้น เป็นตะปู เวลาจะใช้เผาไฟฆ่าเชื้อ แล้วใส่ลงในอาหาร

บัฟเฟอร์ของอาหาร (Hungate, 1969) อาหารทั่วไปใช้ K_2HPO_4 กับ KH_2PO_4 เป็นบัฟเฟอร์ ส่วนพวก anaerobic culture media ทั่วไปใช้ carbon dioxide-bicarbonate เป็นบัฟเฟอร์ ถ้าโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.5 % ในบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์จะมี pH ประมาณ 6.7 สามารถคำนวณหา pH กับสารที่จะใช้ได้ตาม Henderson-Hasselbach equation ดังนี้

$$pH = 6.52 + \log \frac{\text{molar conc. bicarb.}}{\text{molar conc. dissolved } CO_2}$$

โซเดียมไบคาร์บอเนตต้องทำให้ปราศจากจุลินทรีย์ด้วยการกรอง เพราะถ้าใช้วิธีอบด้วยไอน้ำ โซเดียมไบคาร์บอเนตจะเปลี่ยนเป็นโซเดียม - คาร์บอเนต คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ถ้าเกิดคาร์บอนไดออกไซด์มาก ๆ และขวดปิดแน่นจะระเบิด ถ้าเหนืออาหารยังมีคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ จะต้องการระยะเวลาหนึ่ง โซเดียมคาร์บอเนต คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ จะกลับเป็นโซเดียมไบคาร์บอเนตได้ ความดันในหลอดอาหารจะต่ำลง และถ้ามีโซเดียมคาร์บอเนตมากจะทำให้เป็นด่างมาก ซึ่งจะทำให้เกลือฟอสเฟต และเกลือซิลเฟตตกตะกอน

การเจริญของ anaerboic bacteria ในธรรมชาติ เมื่อมีสารอินทรีย์ทับถมอยู่ พวก facultative anaerobic bacteria จะเป็นตัวช่วยทำให้ออกซิเจนหมดไปจากบริเวณนั้น จึงทำให้เกิดสภาพไร้ออกซิเจนเกิดขึ้นในธรรมชาติ

ในธรรมชาติมีสารอินทรีย์ที่ทับถมกันอยู่ มีแบคทีเรียมากมายที่เปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์เหล่านั้นต่าง ๆ กัน แล้วแบคทีเรียที่เจริญได้เมื่ออาหารและสิ่งแวดล้อมเหมาะสม ก็จะเจริญ ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะเตรียมอาหารและสิ่งแวดล้อมที่จะแยกแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติได้หมด อาหารที่ใช้เลี้ยงเพื่อแยกแบคทีเรียที่ปกติประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต เกลือแร่ และวิตามิน ซึ่งอาหารแต่ละกลุ่มมีมากจนหามาผสมให้พอดีกับที่แบคทีเรียนั้น ๆ ต้องการได้ยาก

ดังนั้นอาหารที่จะนำมาแยกเชื้อ จึงมักผสมด้วยสารธรรมชาติ ซึ่งปกติจะมีองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น ยีสต์เอกแทรคต์ (yeast extract) ได้มีการแยกส่วนประกอบได้ ดังตารางที่ 10

	(g/100 g)
Total nitrogen	7.5-10.5
Amino nitrogen	3.4-4.8
Chlorides as NaCl	0.07-1.3
Moisture	30
Phosphates as P_2O_5	3.8
Carbohydrates	8.2
Purine nitrogen	0.27
Fat	trace
Sodium	5.6
Potassium	3.0
Calcium	0.01
Iron	0.005
Magnesium	0.2
Copper	0.005
Zinc	0.005
Manganese	0.0005
Cobalt	0.0005

Range of Values of Vitamin Content of Yeast Extract

	(µg/g)
Thiamine	18-40
Riboflavin	18-150

ตารางที่ 10 (ต่อเนื่อง)

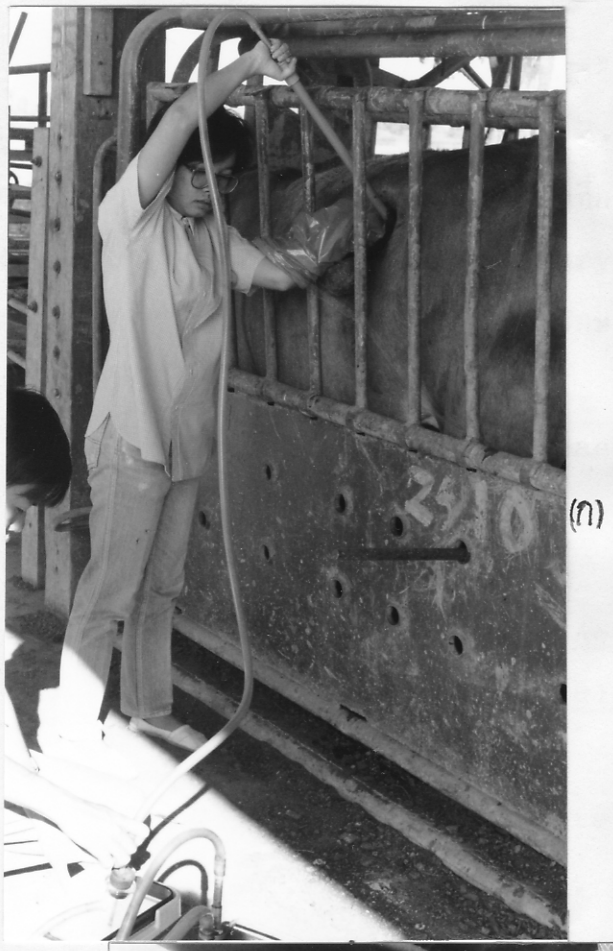
Nicotinic acid	300-1250
Pantothenic acid	20-100
Pyridoxine	25-35
Folic acid	5-10
Inositol	1000-1700
Choline	1000-2000
Biotin	0.5-1.0
p-Aminobenzoic acid	6
Vitamin B_{12}	0.01
Amino-acid Composition (g/100g) of Yeast Extract	
Alanine	3.4
Arginine	2.0
Aspartic acid	4.5
Cystine	0.45
Glutamic acid	6.7
Glycine	2.3
Histidine	1.2
Isoleucine	2.3
Leucine	3.0
Lysine	3.5
Methionine	0.7
Phenylalanine	1.7
Proline	1.7
Serine	2.3
Threonine	2.3

ตารางที่ 10 (ต่อเนื่อง)

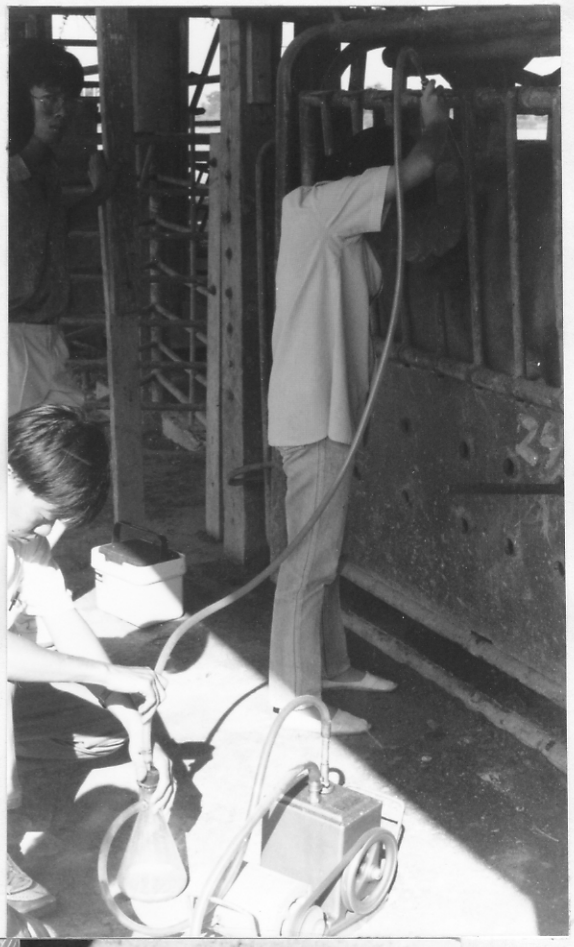
Tryptophan	0.5
Tyrosine	1.6
Valine	2.5

ตารางที่ 10 A general analysis of yeast extract paste (Bridson and Brecker, 1970)

อาหารสำหรับแยก rumen bacteria และ methanogenic bacteria ได้เอาสารซึ่งเป็นที่อยู่ในสภาพปกติได้แก่ rumen fluid และ digester fluid มา centrifuge แล้วเอาส่วนที่ใสไปผสมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียเหล่านั้น digester fluid ได้จากการหมักสารอินทรีย์ในสภาพที่ไร้ออกซิเจนไว้นาน ๆ จะมีของเหลวใส ๆ อยู่ข้างบน ส่วน rumen fluid อาจจะไปคั้นเอาจากอาหารในทางเดินอาหารของสัตว์ เช่น โค กระบือ สุกร ที่ถูกฆ่าใหม่ ๆ การศึกษาเกี่ยวกับการทำงานในทางเดินอาหารสัตว์ของพวกสัตว์ศาสตร์ มีการศึกษาในขณะที่สัตว์ยังมีชีวิตอยู่ และเป็นการศึกษาต่อเนื่อง จึงใช้วิธีเจาะด้านหลังของสัตว์ แล้วเอากระเพาะมาเย็บติดไว้กับหนัง มียางวงกลมติดเป็นช่อง มีฝาปิดเวลาต้องการ rumen fluid ก็เปิดเอาท่อแหย่ลงไป แล้วใช้เครื่องดูด rumen fluid ออกมา เสร็จแล้วปิดไว้ ดังรูปที่ 22 เมื่อได้ rumen fluid แล้ว ยังไม่ได้ใช้เตรียมอาหาร ต้องเก็บด้วยวิธีแช่แข็งไว้



(ก)



(ข)

(ค)

รูปที่ 22 การนำ rumen fluid ออกมาจากวัว ขณะยังมีชีวิต

(ก) ช่องที่เจาะไว้ที่สีข้างด้านหลังวัว

(ข) ขณะปั๊ม rumen fluid

(ค) rumen fluid ที่ได้

ในทางเดินอาหารของสัตว์มีแบคทีเรียหลายชนิดที่เมื่อปนออกมากับมูลสัตว์ และอยู่ในสภาพไร้ออกซิเจน จะเกิดการหมักให้กาซชีวภาพได้เองตามธรรมชาติ แสดงว่ามีแบคทีเรียทั้ง 4 กลุ่มที่กล่าวมาข้างต้น จึงน่าสนใจแบคทีเรียที่มีอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์ทั่ว ๆ ไป Bryant (Bryant, 1959) ได้รวบรวมชนิดและคุณสมบัติของแบคทีเรีย จากการศึกษาของนักจุลชีววิทยามากมายไว้ ซึ่งมีแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ดังนี้

ก. Facultative anaerobes

1. Coliform bacilli

Escherichia coli ซึ่งมีจำนวนมาก

หรืออาจจะพบ Aerobacter aerogenes

A. cloacae

Micrococcus

Enteric bacteria อื่น ๆ เช่น

Pseudomonas, Proteus

2. Bacilli พวก spore forming ได้พบว่ามีปริมาณไม่มากนัก ได้แก่

Bacillus subtilis

B. licheniformis

B. cereus

3. Propionibacterium

4. Lactobacilli ได้แก่

Lactobacillus brevis

L. fermenti

L. buchneri

L. plantarum

L. acidophilus

L. casei

5. Streptococci ได้แก่

Streptococcus bovis มีปริมาณมากและหลาย strain

S. liquefaciens

S. faecalis

อาจจะมี Streptococcus ชนิดอื่น ๆ อีก

ข. Anaerobes

1. Spore forming rods ได้แก่

Clostridium perfringens

C. lochheadii

C. longisporum

C. butyricum

C. sporogenes

C. kluyveri

2. Nonspore forming rods

1) Lactobacilli ได้แก่

Lactobacillus lactis

L. bifidus

2) Ramibacterium

3) Eubacterium

Eubacterium biforme

E. aerofaciens

E. ruminantium

4) Methanobacterium ได้แก่

Methanobacterium formicicum

M. sohngenii

5) Lachnospirae

Lachnospira multiparus

6) Cillobacteria

Cillobacterium cellulosolvens

7) Succinic acid-producing *Bacteroides*

Bacteroides succinogenes

B. amylophilus

B. ruminicola

8) Butyric acid-producing *Bacteroides*

Bacteroides amylogenes

9) Fusobacteria

Fusobacterium fusiforme

F. biacutus

10) *Butyrivibrio*

Butyrivibrio fibrisolvens

11) *Desulfovibrio*

12) *Selenomonas*

Selenomonas ruminantum

S. palpitans

S. sputigena

13) Borrelia

14) *Succinimonas*

Succinimonas amylolytica

3. Cocci

1) Peptostreptococci

Peptostreptococcus intermedius

P. lanceolatus

2) Ruminococci

Ruminococcus flavefaciens

R. albus

3) Veillonellae

Veillonella alcalescens

4. อุปกรณ์และวิธีการ

4.1 อุปกรณ์

ก. อุปกรณ์ศึกษาส่วนประกอบของมูลสุกร

1. ตู้อบอุณหภูมิ 105°C และ desiccator เพื่อหา total solid

2. เตาเผาอุณหภูมิ 500 - 550°C เพื่อหา volatile solid

3. เครื่องมือหาปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน

ข. อุปกรณ์ศึกษาเกี่ยวกับการหมักมูลสุกรเพื่อให้ได้กาซชีวภาพ

1. กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 200 มิลลิลิตร

2. แผ่นพลาสติคที่มีคุณสมบัติบาง เหนียว และอ่อนตัว สำหรับปิดช่องที่เปิดสำหรับเสียบเข็มฉีดยาและยางรัด

3. ไปเปตขนาด 10 มิลลิลิตร ตัดปลายเพื่อให้ปลายกว้างเหมาะสมสำหรับตวงของผสม

4. เชื้อ MP9 ที่เกษรและ Oi (เกษรและ Oi 2527) ได้คัดเลือกจากดินในที่ต่าง ๆ ในอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

5. ถังพลาสติค

6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

ค. อุปกรณ์การแยกแบคทีเรีย

1. หม้อนึ่งความดันไอและตู้อบใช้ในการฆ่าเชื้อ

2. กาซไฮโดรเจน ไนโตรเจน และ copper column พร้อมเครื่องทำอุณหภูมิ copper column ร้อน 350°C เพื่อทำให้กาซไนโตรเจนปราศจากออกซิเจน ใช้สำหรับไล่กาซออกซิเจนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. Mechanical roll tube ใช้ในการกลิ้งหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อและแบคทีเรีย ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเคลือบด้านในของหลอด เพื่อเลี้ยง

เชื้อโดยวิธี Hungate roll tube พร้อมด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 45-50°C

4. หลอดฝาเกลียวชิ่งฝามีช่องตรงกลางพร้อมจุก butyl rubber

5. เครื่องแก้ว เช่น ไปเปต กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 2, 5 มิลลิลิตร พร้อมเข็ม จานเพาะเชื้อ สไลด์

6. กล้องจุลทรรศน์

4.2 วิธีการ

ก. วิธีหาส่วนประกอบของมูลสุกร

1. นำมูลสุกรชั่งแล้วนำเข้าอบในตู้อบอุณหภูมิ 105°C ประมาณ 2 วัน นำเข้า desiccator 10 วัน นำมาชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้เป็น total solid

2. นำมูลสุกรที่แห้งแล้ว ชั่งน้ำหนักแล้วนำเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 550°C ประมาณ 30 นาที เมื่อเย็นแล้วนำมาชั่งจะได้น้ำหนัก total fixed solid (ash) คำนวณหา total volatile solid แล้วหาเปอร์เซนต์ของ total volatile solid หรือเรียก volatile solid

3. นำมูลสุกรแห้งชั่งน้ำหนักแล้วนำไปหาเปอร์เซนต์ของไนโตรเจน (total Kjeldahl nitrogen) ตามวิธีใน Standard methods (Standard method, 1980)

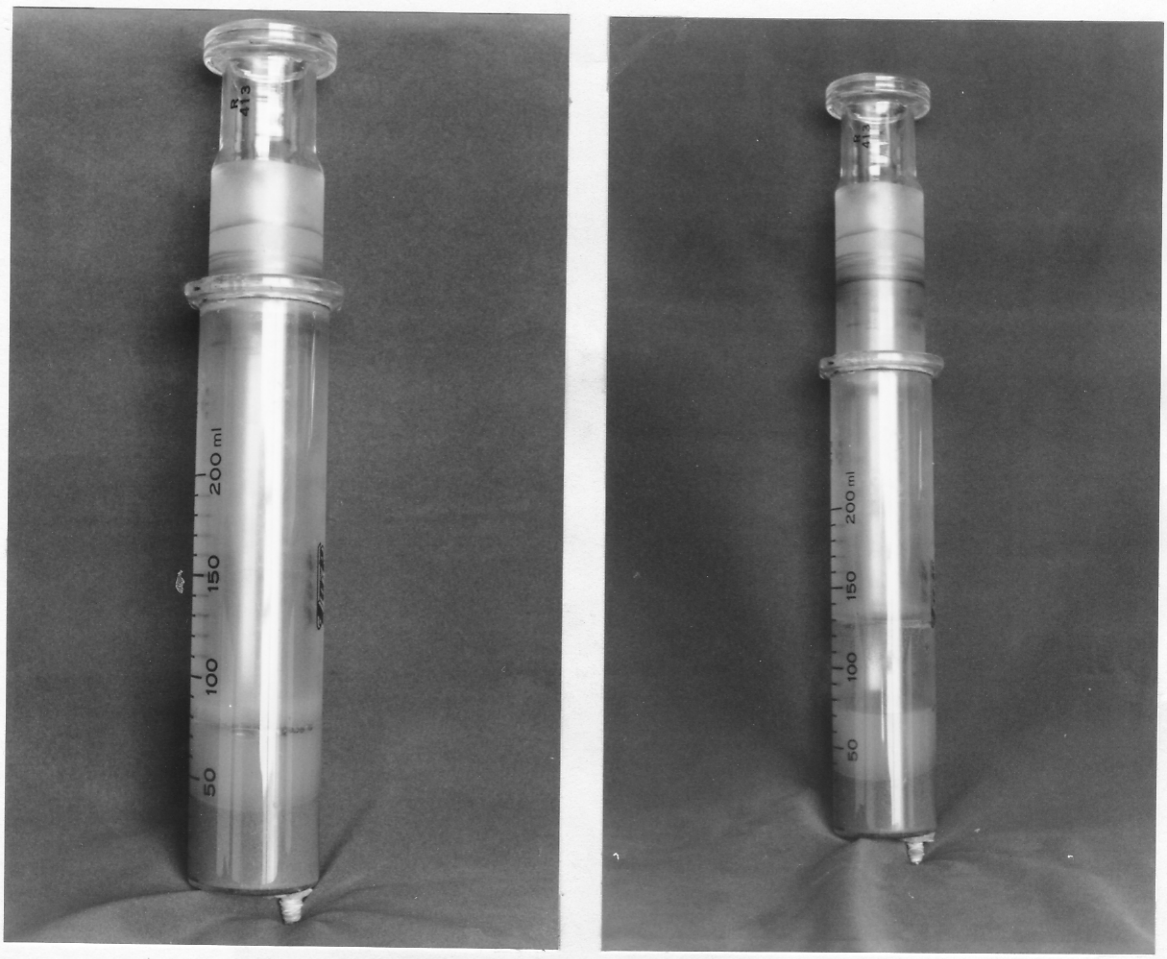
4. นำมูลสุกรแห้งชั่งน้ำหนักแล้วนำไปหาเปอร์เซนต์ของคาร์บอน โดยนำมาย่อยด้วยกรดซัลฟุริค และเมอร์คิวริกซัลเฟต ($HgSO_4$) แล้วนำมาไตเตรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ methyl red เป็น indecator ปรับปริมาตร แล้วนำส่วนที่ใสมาหาปริมาณคาร์บอน โดยใช้ total organic carbon analyzer (Shimadzu, TOC-10B) แล้วเขียนกราฟคำนวณหาเปอร์เซนต์ของคาร์บอน

ข. การหมักมูลสุกรในสภาพต่าง ๆ

หลักการที่จะเริ่มต้นการหมัก โดยวิธี syringe method (เกษร, 2527) วิธีการหมักเป็นแบบ batch culture มีดังนี้

ใส่สารที่ต้องการหมักลงในกระบอกฉีดยาที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้นิ้วมือที่ถือกระบอกปิดช่องที่จะเสียบเข็มฉีดยา ตวงของเหลวด้วยไปเปตปลายกว้าง

ดูดสาร เวลาใส่สารลงในกระบอกฉีดยา พยายามให้สัมผัสกับอากาศน้อยที่สุด ถ้าต้องการผสมน้ำเพิ่ม ก็ใช้น้ำที่ต้มไล่กาซออกโดยต้มให้เดือดประมาณ 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เมื่อใส่ส่วนผสมที่ต้องการครบแล้วเสียบลูกสูบและค่อย ๆ เอียงจนอากาศไปอยู่ทางที่เสียบเข็ม ดันลูกสูบไล่อากาศออก ปิดช่องที่เสียบเข็มด้วยแผ่นพลาสติค แล้วรัดด้วยยางให้แน่นจนน้ำซึมผ่านไม่ได้ ปกติจะใส่ของที่หมักไม่เกิน 70 มิลลิลิตร ในกระบอกฉีดยา 200 มิลลิลิตร เมื่อกาซเกิดขึ้นจะดันลูกสูบให้ถอยหลัง สามารถอ่านปริมาตรกาซที่เกิดขึ้น ดังรูปที่ 23



(ก) (ข)

รูปที่ 23 กระบอกฉีดยา ขณะเริ่มต้นหมัก (ก) ขณะเกิดกาซ (ข)

ถ้าต้องการเก็บกาซไปทดสอบ ทำได้โดยนำปากขวดที่มีน้ำหรือน้ำเกลืออิ่มตัว ไปปิดไว้ตรงปลายที่เสียบเข็ม เครื่องมือทั้งหมดอยู่ในอ่างน้ำ จากนั้นดันลูกสูบไล่กาซออกมาแทนที่น้ำ ถ้าต้องการของเหลวไปทดสอบ ก็ใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มเสียบผ่านช่วงเสียบเข็มดูดของเหลวออกมาใช้ได้ตามต้องการ เครื่องมือที่ใช้หมักนี้จึงทำหน้าที่เป็นทั้งถังหมัก และที่เก็บกาซซึ่งอ่านปริมาตรได้ เก็บบ่มเชื้อโดยวิธีปักลงในถังพลาสติค ใส่น้ำแช่ส่วนล่างไว้แล้วเอาไว้ในตู้บ่มเชื้อ หรือแช่ใน water bath ที่ตั้งอุณหภูมิ 37°C ดังรูปที่ 24

รูปที่ 24 กระบอกฉีดยา ขณะหมักอุณหภูมิ 37°C

ในการทดลองนี้ได้หมักมูลสุกรและเชื้อ ต่าง ๆ กัน โดยใส่ส่วนผสมตามตารางที่ 11

กระบอกฉีดยาเบอร์	มูลสุกรผสมน้ำ 1:1 (มล.)	น้ำต้มไล่กาซแล้ว (มล.)	Starter (มล.)
Y 636	10	50	-
E 550	20	40	-
K 640	40	20	-
K 661	70	-	-
K 677	10	30	20 MP9

ตารางที่ 11 ส่วนผสมในการหมักครั้งที่ 1

หมักครั้งแรก อ่านกาซที่เกิดขึ้นทุกวัน เมื่อมีกาซมากก็ไล่ทิ้ง กาซบางช่วงได้เก็บแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย gas chromatography หมัก 31 วัน แล้วหยุดเริ่มต้นหมักครั้งที่ 2 โดยใส่ส่วนผสมตามตารางที่ 12 หมักถึงวันที่ 16 ของการหมัก เอาของเหลวออก 20 มิลลิลิตร แล้วเติมมูลสุกรผสมน้ำ 1:1 ลงไป 10 มิลลิลิตร และน้ำต้มไล่กาซที่เย็นแล้ว 10 มิลลิลิตร หมักและอ่านกาซที่เกิดขึ้นต่อไป

กระบอกฉีดยาเบอร์	มูลสุกรผสมน้ำ 1:1 (มล.)	น้ำต้มไล่กาซแล้ว (มล.)	Starter (มล.)
K 636	10	30	20 จาก K636 ที่หมักครั้งแรก
K 413	10	30	20 จาก K677 ที่หมักครั้งแรก

ตารางที่ 12 ส่วนผสมในการหมักครั้งที่ 2

ค. <u>การแยกเชื้อแบคทีเรีย</u>

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากการหมักมูลสุกร เมื่อให้กาซชีวภาพแล้ว ได้แยกแบคทีเรียทั้งพวก facultative anaerobes และ strictly anaerobes โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็น aerobic medium สำหรับพวก facultative anaerobes สำหรับพวก strictly anaerobes ใช้ anaerobic medium และ cellulose medium ซึ่งมีส่วนผสมดังตารางที่ 13 และ Tamura standard medium สำหรับ methanogenic medium cellulose ก่อนนำมาผสม ต้อง ball mill ในน้ำจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน

Substances	aerobic medium	anaerobic medium (developed from Hobson 1969)	cellulose medium
Casitone	1 g	1 g	-
Yeast extract	0.25 g	0.25 g	1 g
Mineral 1	15 ml	15 ml	-
Mineral 2	15 ml	15 ml	-
Sodium lactate	1 ml	1 ml	-
Distilled water	60 ml	40 ml	1 litre
Agar	1.5 g	2 g	2 g
Solution A	10 ml	10 ml	-
Rumen fluid	-	20 ml	-
Resazurin (o.1 % aq.)	-	0.1 ml	1 ml
Cellulose	-	-	10 g
Mineral 1:K_2HPO_4	3 g	3 g	7.5 g
Dist.water	1 litre	1 litre	-
Mineral 2:KH_2PO_4	3 g	3 g	3.5 g
$(NH_4)_2SO_4$	6 g	6 g	0.5 g
NaCl	6 g	6 g	1.0 g
$MgSO_4$	0.6 g	0.6 g	0.024 g
$CaCl_2$	0.6 g	0.6 g	0.05 g
Dist.water	1 litre	1 litre	- g
Sol.^{n}A:Cellobiose	0.2 g	0.2 g	-
Glucose	0.2 g	0.2 g	-
Maltose	0.2 g	0.2 g	-

ตารางที่ 13 (ต่อเนื่อง)

Substances	aerobic medium	anaerobic medium (developed from Hobson 1969)	cellulose medium
$NaHCO_3$	-	0.4 g	-
Cysteine HCl	-	0.05 g	0.5 g
Dist.water	10 ml	10 ml	-

ตารางที่ 13 ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้

ส่วนประกอบของ Tamura standard medium มีดังนี้

ปริมาณต่อ 100 มิลลิลิตร KH_2PO_4 0.021 g, K_2HPO_4 0.021 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.021g, NaCl 0.05 g, $MgSO_4.7H_2O$ o.02 g, $CaCl_2.2H_2O$ 0.02 g, yeast extract 0.05g, casitone 0.05g, resazurin 0.1 % aqueous 0.1 ml, trace mineral solution 1 ml, vitamin 1 ml, Na_2CO_3 0.4 g, $Na_2S.9H_2O$ 0.025 g, L-cysteine 0.025 g, formate 0.5 g, acetate 0.35 g, butyrate 0.2 g, propionate 0.2 g

Trace mineral solution เตรียมเป็น stock solution เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0°C ส่วนประกอบต่อลิตร NaCl 1.0 g, $FeSO_4.7H_2O$ 0.1 g, $CoSO_4$ หรือ $CoCl_2$ 0.1 g, $CaCl_2.2H_2O$ 0.1 g, $ZnSO_4$ 0.1 g, $CuSO_4.5H_2O$ 0.01 g, $AlK(SO_4)_2$ 0.01 g, H_3BO_3 0.01 g, $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.0i g, $MgSO_4.7H_2O$ 3 g, $MnSO_4.2H_2O$ 0.5 g, nitriloacetic acid 1.5 g.

Vitamin solution เตรียมเป็น stock solution เก็บแช่แข็งไว้ ส่วนประกอบต่อ 100 มิลลิลิตร thiamine 0.5 mg, riboflavin (B_2) 0.5 mg, nicotinic acid 0.5 mg, DL calcium panthothenate 0.5

mg, vitamin B_{12} (cobamine) 0.01 mg, p aminobenzoic acid 0.5 mg, lipoic acid 0.5 mg, biotin 0.2 mg, folic acid 0.2 mg, pyridoxine HCl(B_6) 1 mg

Diluent สำหรับพวก facultative anaerobes ประกอบด้วย peptone 0.1 g, NaCl 0.85 g ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ส่วน diluent สำหรับพวก strictly anaerobes ใช้ anaerobic medium แต่ไม่ใส่วุ้น (agar)

การเตรียม anaerobic media ใช้หลักของ Hungate roll tube method (Hungate, 1969) สารประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่นึ่งฆ่าเชื้อในหม้อความดัน เพื่อทำให้ปราศจากจุลินทรีย์ บางส่วนเช่น Na_2S, Cysteine HCl, $NaHCO_3$ ทำให้ปราศจากจุลินทรีย์ด้วย การกรองแล้วผสมก่อนที่จะบรรจุในหลอด ขณะบรรจุลงหลอด ต้องมีการไล่ออกซิเจนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และที่ว่างภายในหลอดเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ กาซที่จะใช้พ่นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะต้องเป็นกาซที่ปราศจากออกซิเจน ทำได้โดยให้กาซผ่าน copper column ที่อุณหภูมิ 350°C ทองแดงเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนจะได้ CuO สีน้ำตาลปนดำ

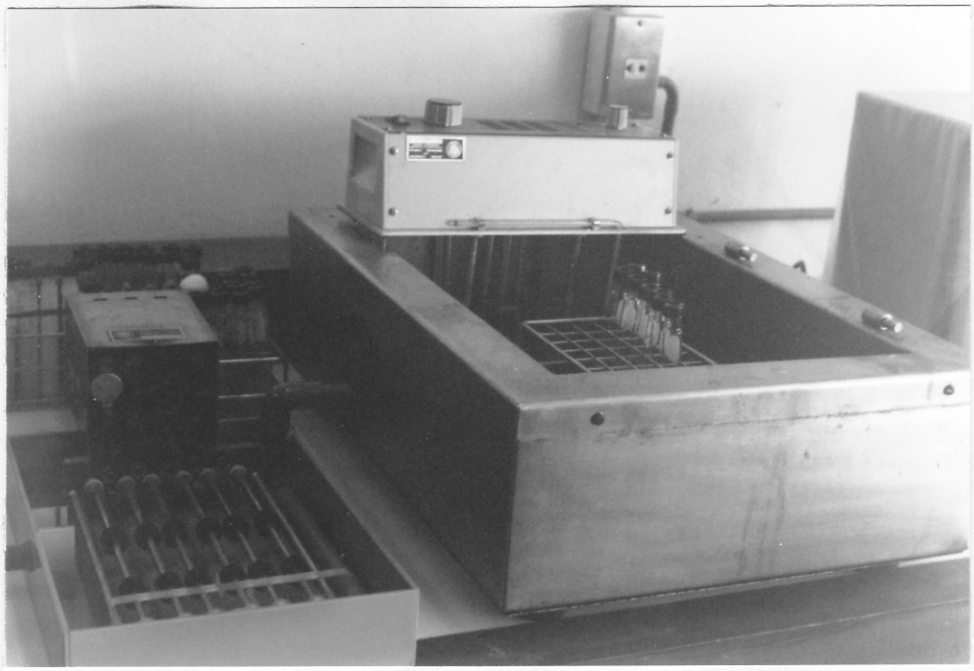
จะทำให้กลับคืนเป็นทองแดงได้โดยผ่านไฮโดรเจนเข้าไปใน copper column ที่อุณหภูมิ 350°C ไฮโดรเจนจะดึงออกซิเจนมารวมเป็นน้ำ (H_2O) ขณะผ่านไฮโดรเจนต้องไม่มีเปลวไฟอยู่ในบริเวณ เพราะจะทำให้ไฮโดรเจนที่ผ่านออกมาติดไฟระเบิดขึ้นได้ อาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำมาวางไว้ใน water bath อุณหภูมิประมาณ 80°C พ่นกาซไนโตรเจนที่ผ่านมาจาก copper column 350°C แล้วตลอดเวลา ผสมบางส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้ปราศจากจุลินทรีย์แล้วโดยการกรองพ่นกาซจนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เป็นสีชมพู ใช้กระบอกฉีดยาพร้อมด้วยเข็มยาวประมาณ 5 นิ้ว ล้างหัวกระบอกฉีดยาด้วยกาซไนโตรเจน จากกาซเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อที่กำลังไล่ออกซิเจน ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดฝาเกลียวขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ที่ปิดด้วยกระดาษตะกั่ว และอบฆ่าจุลินทรีย์แล้ว ขณะที่ไล่อากาศที่อยู่ในหลอดด้วยกาซไนโตรเจน จะต้องพ่นกาซอยู่จนแน่ใจว่าไล่ออกซิเจนออกจนหมด อาจต้องช่วยดูดอากาศออกด้วยกระบอกฉีดยาอีกอันหนึ่ง ขณะที่จะใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ ปิดด้วยจุกยางซึ่งห่อด้วยกระดาษตะกั่วนึ่งฆ่าจุลินทรีย์แล้ว ปิด

ฝาเกลียวให้แน่นจนกาซซึมผ่านไม่ได้ การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อวิธีนี้ เตรียมแต่ละครั้งปริมาณไม่มาก ประมาณ 100 - 300 มิลลิลิตร ถ้าเตรียมครั้งละมาก ๆ ขณะอยู่ใน water bath และพ่นกาซ จะเสียน้ำ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นมากขึ้นเรื่อย ๆ

ได้สุ่มตัวอย่างหลังจากการหมัก 3 ครั้ง คือหลังจากหมัก 3,5,7 วัน นำมาทำให้เจือจางครั้งละ 10 เท่าตามลำดับ และเพาะเชื้อ เพื่อนับจำนวนทั้งสภาพมีอากาศและสภาพไร้ออกซิเจน

aerobic culture เพื่อศึกษาพวก facultative anaerobes เมื่อทำให้เจือจางครั้งละ 10 เท่าตามลำดับ แล้วใช้วิธีเทเพลต (pour plate) เพื่อนับโคโลนี่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C 48 ชั่วโมง นับโคโลนี่และแยกเชื้อลงจานเพาะเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วศึกษาสมบัติเกี่ยวกับรูปร่าง และทางชีวเคมีหรือสรีรวิทยา

Anaerobic culture ทำให้เชื้อจางครั้งละ 10 เท่าตามลำดับ โดยใช้ anaerobic media แต่ไม่ใส่วุ้น โดยใช้กระบอกฉีดยาดูด 0.5 มิลลิลิตร ไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ในหลอดซึ่งหลอมและแช่อยู่ใน water bath อุณหภูมิ 50°C ไว้แล้ว เมื่อผสมแล้วนำไปวางลงใน mechanical roll tube ซึ่งมีน้ำอยู่ภายใน ดังรูปที่ 25 กลิ้งหลอดจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวเคลือบติดอยู่ด้านในของหลอด ทำเช่นเดียวกันทั้งใน anaerobic medium, cellulose medium และ methanogenic medium แล้วนำไปบ่มเชื้ออุณหภูมิ 37°C การเคลื่อนย้ายหลอดต่อไปห้ามเอียงหลอด เพราะอาจมีน้ำอยู่ก้นหลอดบ้างเล็กน้อย ถ้าเอียงหลอดจะทำให้แบคทีเรียที่อยู่ตามผิววุ้นปนกัน



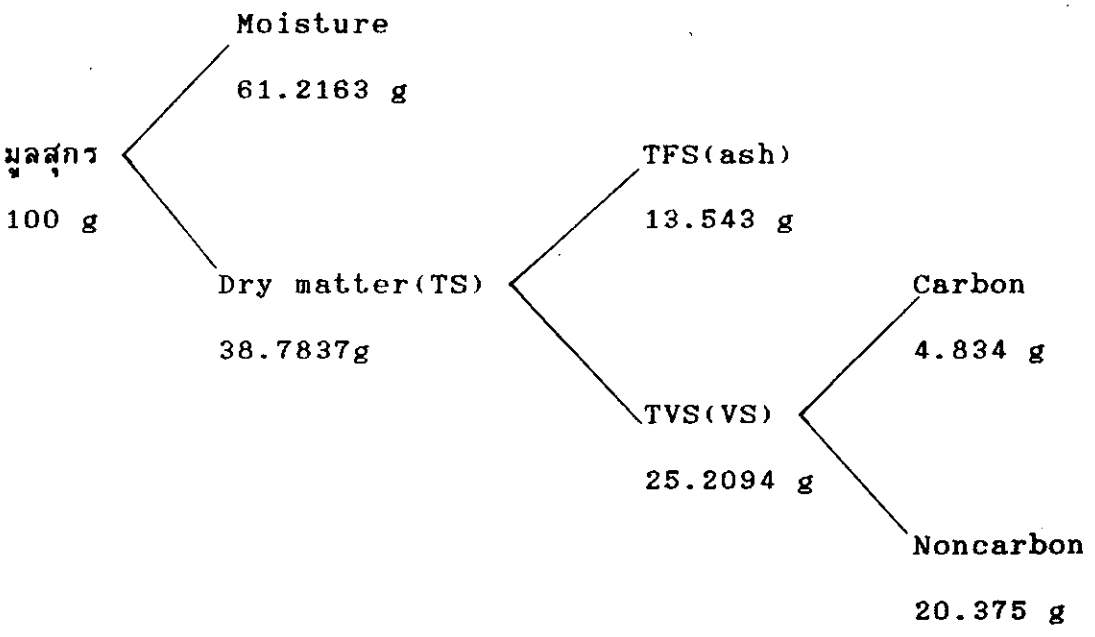
รูปที่ 25 Mechanical roll tube และ water bath

เชื้อใช้เวลาเจริญแตกต่างกันมาก จึงตรวจดูโคโลนี่ทุกวันประมาณ 5 วัน นำไปแยกเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ขณะเปิดหลอดเพื่อถ่ายเชื้อ ต้องพ่นกาซที่ปราศจากออกซิเจนตลอดเวลา ดังรูปที่ 26 ได้ศึกษารูปร่างโดยย้อมสีแบบแกรม ยังไม่ได้ศึกษาสมบัติทางชีวเคมี เพราะยังไม่ได้เชื้อบริสุทธิ์

รูปที่ 26 การถ่ายเชื้อพวก strictly anaerobes

5. ผลการทดลอง

ก. สมบัติของมูลสุกร



หรือ 1 Total solid (TS) 38.7837 %

2 Total volatile solid or volatile solid (VS) 65 %

3 Carbon 12.464 % of dry matter (TS)

4 Nitrogen 1.008 % of dry matter (TS)

5 C/N = 12.365

ข. ผลการทดลองเกี่ยวกับการหมักกาซชีวภาพ

มูลสุกรเมื่อนำมาหมักจะได้กาซในแต่ละวัน และผลการแยกกาซบางวันด้วย gas chromatogrophy ดังต่อไปนี้

การหมักมูลสุกรปริมาณต่าง ๆ กัน ได้กาซชีวภาพประกอบด้วยมีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ ดังตารางที่ 14

กระบอกฉีดยาเบอร์	เก็บกาซหลังจากหมัก(วัน)	% CH_4	% CO_2
Y 636	21	75.67	24.33
E 550	26	57.13	42.87
K 661	17	30.98	69.02
	21	26.48	73.52

ตารางที่ 14 ส่วนประกอบของกาซชีวภาพที่ได้จากการหมักมูลสุกรปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณกาซชีวภาพที่ได้แต่ละวัน ดังตารางที่ 15 ซึ่งนำมาเขียนกราฟ ดังรูปที่ 27

กระบอกฉีดยาเบอร์	วันที่หมัก																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Y 636	1	4	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	3	7	7	10	8
E 550	0	0	1	1	1	1	1	5	0	4	0	0	2	1	2	0	7
K 640	0	7	8	10	0	14	3	3	5	0	10	3	7	5	15	20	5
K 661	0	15	15	10	12	3	0	20	4	6	0	4	9	7	4	6	20

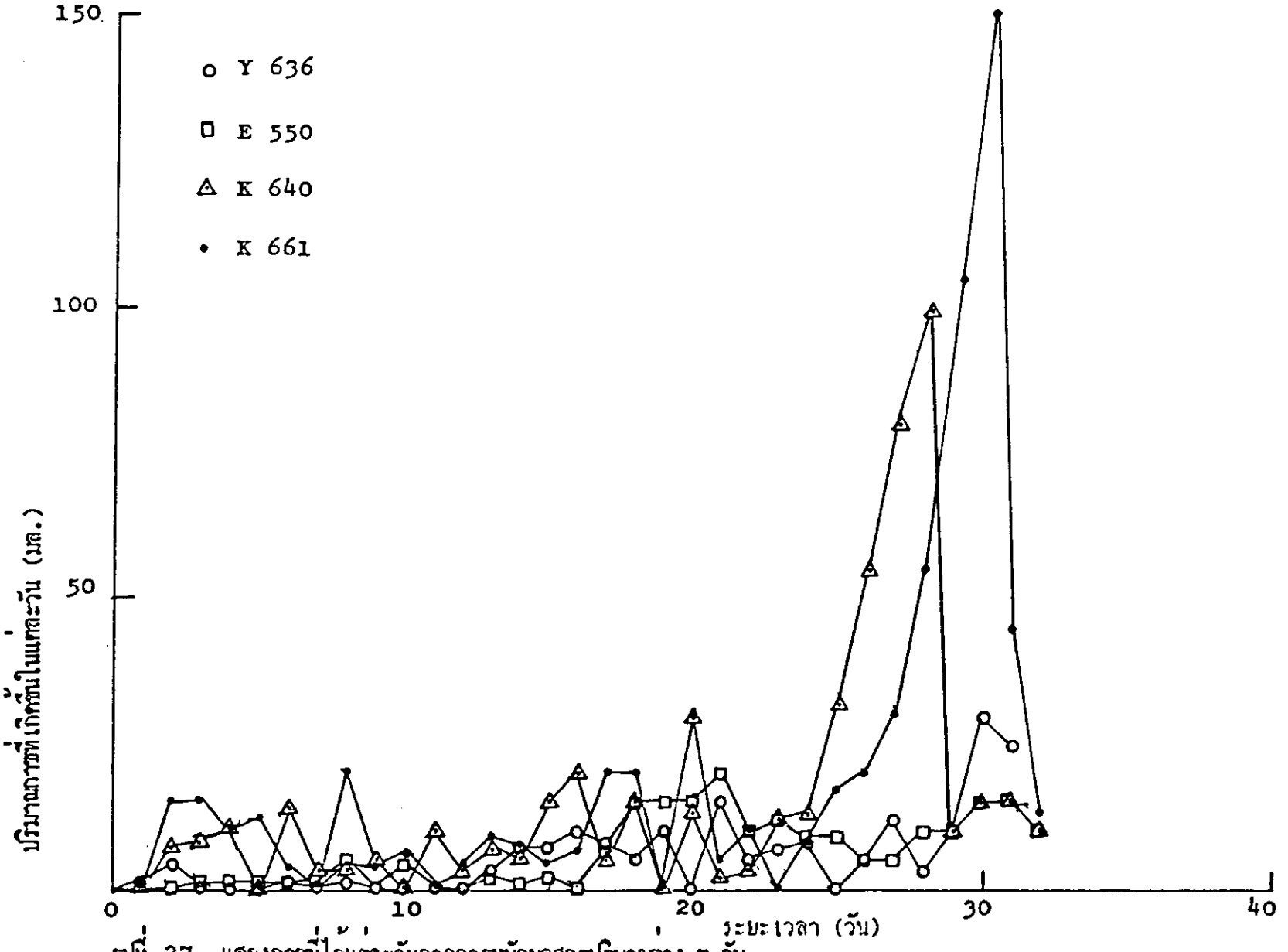
ตารางที่ 15 (ต่อเนื่อง)

กระบอกฉีดยาเบอร์	วันที่หมัก															
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	กาซรวม
Y 636	5	10	0	15	5	7	8	0	5	12	3	10	30	25	หยุด	180
E 550	15	15	15	20	10	12	9	9	5	5	10	10	15	15	10	191
K 640	15	0	13	2	3	12	13	32	55	80	100	10	15	15	10	480
K 661	20	0	30	5	10	0	8	17	20	30	55	105	150	45	13	626

ตารางที่ 15 ปริมาตรกาซ (มล.) ที่ได้จากการหมักมูลสุกรปริมาณต่าง ๆ กัน

แสดงว่าในมูลสุกรเองมีแบคทีเรียหลายชนิด สามารถเปลี่ยนสารต่าง ๆ ในมูลสุกรต่อเนื่องกันไปจนได้กาซมีเทนได้ แต่ methanogenic bacteria อาจจะมีปริมาณน้อย จึงได้กาซมีเทนเปอร์เซนต์ต่ำ กาซที่ได้จากการหมักมูลสุกรปริมาณต่าง ๆ กัน จะให้กาซใกล้เคียงกันในระยะต้น ๆ ถึงระยะ 20 วันของการหมักมูลสัตว์ที่เข้มข้นมากจะให้กาซมาก

เมื่อใส่เชื้อผสม MP9 เป็น starter ลงไปหมักกับมูลสุกร จะให้กาซแตกต่างกับมูลสุกรอย่างเดียว ดังตารางที่ 16 ซึ่งเขียนกราฟได้ดังรูปที่ 28

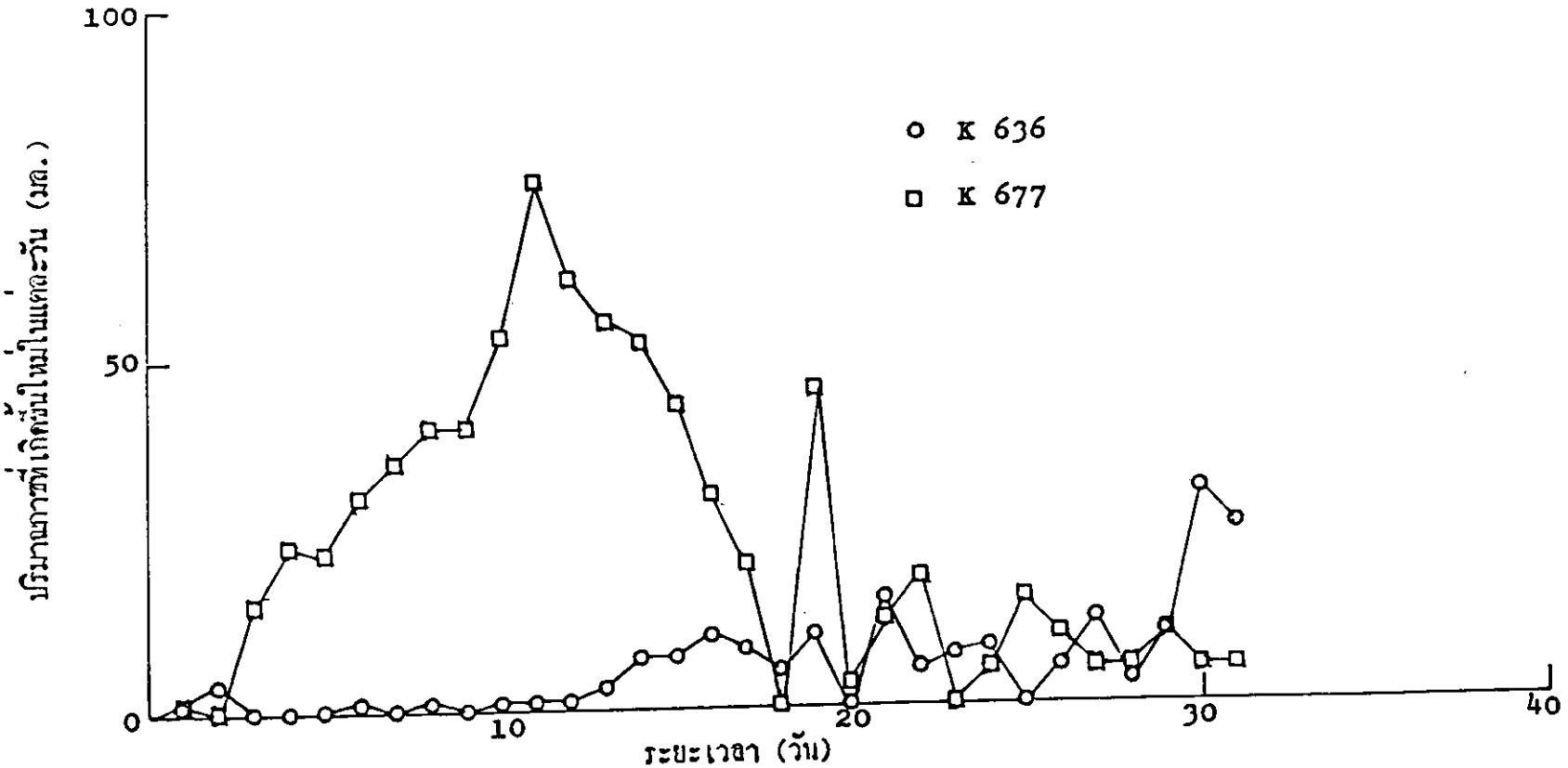


รูปที่ 27 แสดงการที่ได้แต่ละวันจากการหมักมูลสุกรปริมาณต่าง ๆ กัน

กระบอกฉีดยา เบอร์	วันที่หมัก																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
K 636	1	4	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	3	7	7	10	8
K 677	1	0	15	23	22	30	35	40	40	53	75	61	55	52	43	30	20

กระบอกฉีดยา เบอร์	วันที่หมัก															
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	กาซรวม
K 636	5	10	0	15	5	7	8	0	5	12	3	10	30	25	หยุด	180
K 677	0	45	3	12	18	0	5	15	10	5	5	10	5	5	หยุด	733

ตารางที่ 16 ปริมาตรกาซ (มล.) ที่ได้จากการหมักมูลสุกรที่ใส่และไม่ใส่ starter



รูปที่ 28 เปรียบเทียบกาซที่ได้จากการหมักมูลสุกรที่ใส่กับไม่ใส่ starter

กาซที่ได้ประกอบด้วยมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์ ดังตารางที่ 17

กระบอกฉีดยาเบอร์	เก็บกาซหลังจากหมัก(วัน)	% CH_4	% CO_2
K 636	21	75.67	24.33
K 677	10	77.02	22.98
	13	86.71	13.29

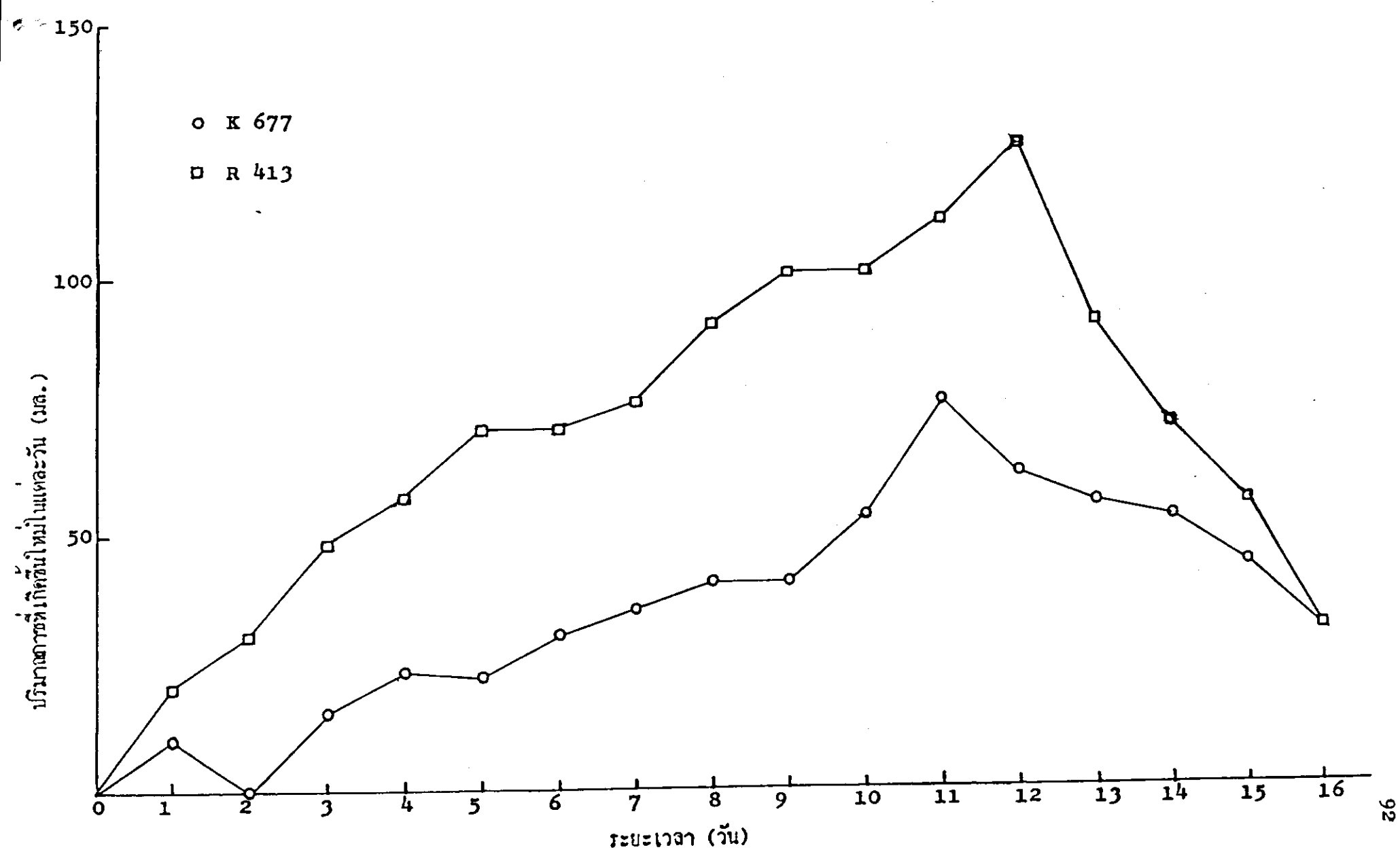
ตารางที่ 17 ส่วนประกอบของกาซชีวภาพจากมูลสุกรที่ใส่เชื้อ และไม่ได้ใส่เชื้อผสม MP9

จากผลที่ได้แสดงว่า ในการหมักที่ใส่ starter จะให้กาซเร็วปริมาณมาก และได้กาซชีวภาพที่มีเทนเปอร์เซนต์สูงกว่า

นำผลของการหมักมูลสุกร โดยใช้เชื้อ MP9 มาผสมในการหมักครั้งที่ 1 แล้วนำมาเป็น starter ในการหมักมูลสุกรครั้งที่ 2 ได้กาซแต่ละวัน ดังตารางที่ 18

กระบอกฉีดยาเบอร์	วันที่หมัก																ก๊าซรวม
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
K 677	1	0	15	23	22	30	35	40	40	53	75	61	55	52	43	30	575
R 413	20	30	48	57	70	70	75	90	100	100	110	125	90	70	55	30	1140

ตารางที่ 18 ปริมาตรก๊าซ (มล.) ที่ได้จากการใช้ starter เชื้อผสม MP9 และเชื้อผสม MP9 ที่ acclimatized แล้ว



รูปที่ 29 ผลของการ acclimatized เชื้อที่นำมาใช้เป็น starter

จะเห็นข้อแตกต่างได้ชัด โดยดูจากกราฟรูปที่ 29 กาซชีวภาพที่ได้ประกอบด้วยมีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ ดังตารางที่ 19

กระบอกฉีดยาเบอร์	เก็บกาซหลังจากหมัก(วัน)	% CH_4	% CO_2
K 677	10	77.02	22.98
	13	86.71	13.29
R 413	2	86.397	13.603
	4	73.63	26.37

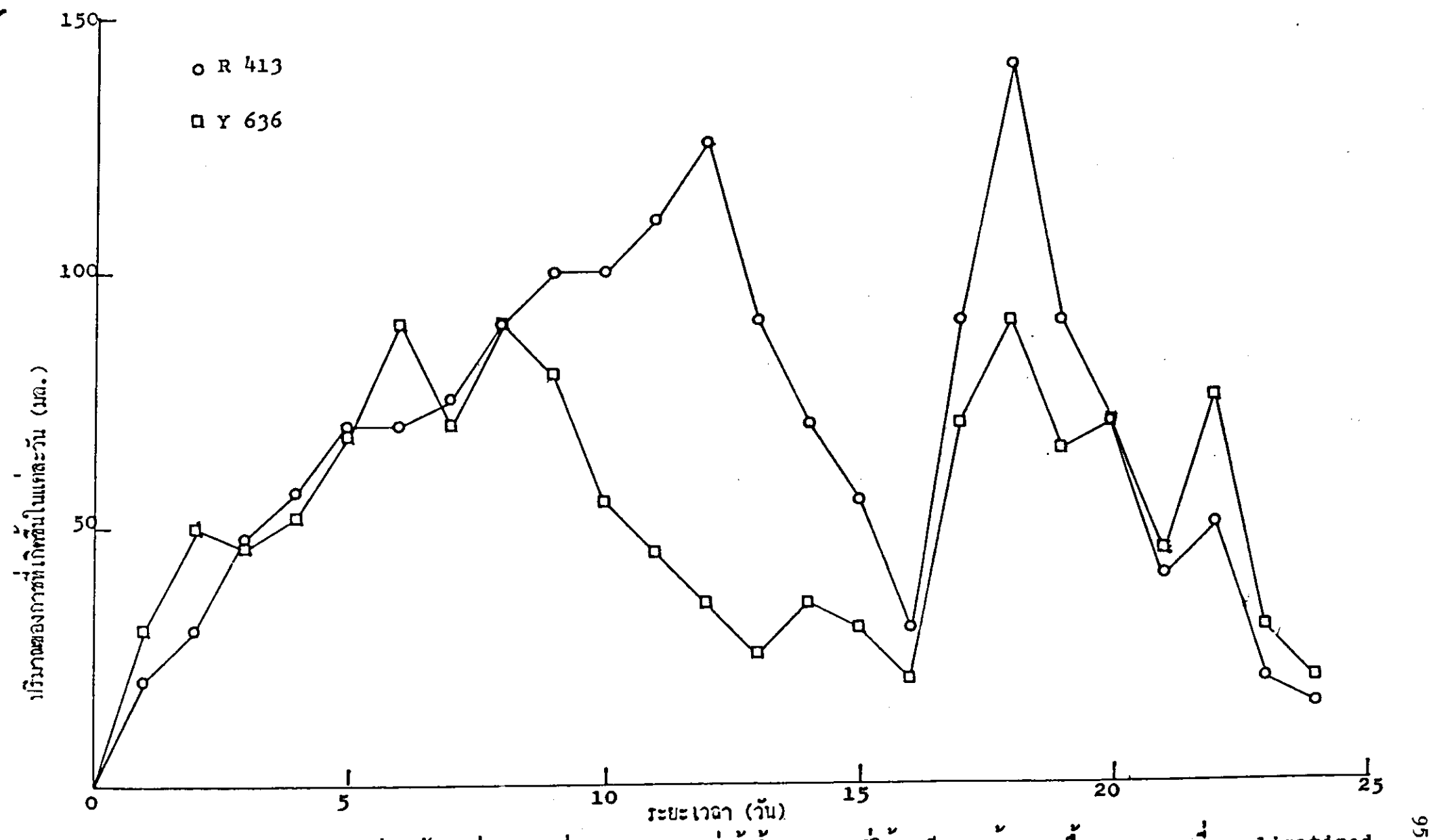
ตารางที่ 19 ส่วนประกอบของกาซชีวภาพจากมูลสุกรที่ใส่เชื้อผสม MP9 และเชื้อผสม MP9 ที่ acclimatized แล้ว

จะเห็นว่าการหมักครั้งแรกแบคทีเรียต้องใช้เวลาในการปรับตัวเพื่อใช้มูลสุกรเป็นวัตถุดิบ การหมักครั้งที่ 2 แบคทีเรียได้ผ่าน acclimatized จากการหมักครั้งแรก ทำให้ไม่ต้องใช้เวลาในการปรับตัว จึงให้กาซได้เร็วกว่า

ผลจากการใช้มูลสุกรที่หมักให้กาซชีวภาพแล้ว กับเชื้อ MP9 ที่ acclimatized ในมูลสุกรแล้วเป็น starter และมีการเติมมูลสุกรหลังจากหมัก 16 วัน ได้กาซแต่ละวันดังตารางที่ 20 และแสดงเป็นกราฟรูปที่ 30 กาซชีวภาพที่ได้ ประกอบด้วยมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์ ดังตารางที่ 21

กระบอกฉีดยา เบอร์	วันที่หมัก																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
R 413	20	30	48	57	70	70	75	90	100	100	110	125	90	70	55	30	90	140	90	70	40	50	20	15
Y 636 (หมักครั้งที่ 2)	30	50	46	52	68	90	70	90	80	55	45	35	25	35	30	20	70	90	65	70	45	75	30	20

ตารางที่ 20 ปริมาตรกาซ (มล.) ที่ได้จากการใช้มูลสุกรที่ให้กาซชีวภาพแล้ว และเชื้อผสม MP9 ที่ acclimatized ในมูลสุกรแล้วเป็น starter และกาซจากการเติมมูลสุกรหลังจากหมัก 16 วัน



รูปที่ 30 เปรียบเทียบปริมาตรกาซที่เกิดขึ้นในแต่ละวันระหว่างการหมักมูลสุกรที่ใช้เชื้อจากมูลสุกรที่ให้กาซชีวภาพแล้ว และเชื้อผสม MP9 ที่ acclimatized แล้วเป็น starter และเติมมูลสุกร 10 ml ในวันที่ 16 ของการหมัก

กระบอกฉีดยาเบอร์	เก็บกาซหลังจากหมัก(วัน)	% CH_4	% CO_2
R 413	2	86.397	13.603
Y 636(หมักครั้งที่ 2)	2	68.298	31.702

ตารางที่ 21 ส่วนประกอบของกาซชีวภาพจากการหมักมูลสุกรที่ใช้เชื้อจากมูลสุกรที่กาซชีวภาพแล้ว และเชื้อผสม MP9 ที่ acclimatized แล้วเป็น starter

ค. <u>การแยกแบคทีเรีย</u>

จาก anaerobic culture การนับจำนวนไม่แน่นอน ตามที่ควรจะเป็น ทั้งนี้เพราะมีออกซิเจนเข้าผสม ซึ่งสังเกตจากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีชมพู ขณะทำ dilution และ inoculate บางหลอดทำให้เกิด oxygen shock มีผลทำให้แบคทีเรียที่ sensitive ต่อออกซิเจนตายได้ แบคทีเรียที่ได้พบมี cellulolytic bacteria และแบคทีเรียอื่น ๆ ดังรูปที่ 29 แบคทีเรียที่เจริญได้จะมีทั้ง facultative anaerobes และ strictly anaerobes เมื่อศึกษารูปร่างจากการย้อมสีแบบแกรม น่าจะเป็นพวก <u>Bacillus</u>, <u>Bacteroides</u>, <u>Lactobacillus</u>, <u>Streptococcus</u>, Enterobacteriaceae และอื่น ๆ ซึ่งเชื้อที่ได้มักจะมี streptococci ผสมอยู่ ทำให้เชื้อที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ จึงยังไม่มีการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

จาก aerobic culture ซึ่งจะได้แบคทีเรียพวก facultative anaerobes ผลการศึกษาในการแยกแบคทีเรียหลังจากการหมัก 3 วัน 5 วัน 7 วัน มีดังนี้

แบคทีเรีย	3 วัน เซลล์/มล.	5 วัน เซลล์/มล.	7 วัน เซลล์/มล.
แบคทีเรียทั้งหมด	169 x 10^3	83 x 10^3	38 x 10^3
Gram + , cocci	60 x 10^3	24 x 10^3	9 x 10^3
Gram + , bacilli	49 x 10^3	40 x 10^3	13 x 10^3
Long slender rod	29 x 10^3	21 x 10^3	6 x 10^3
Big rod, sporeforming	20 x 10^3	19 x 10^3	7 x 10^3
Gram - , bacilli	60 x 10^3	19 x 10^3	17 x 10^3
Escherichia coli	8 x 10^3	8 x 10^3	17 x 10^3

ตารางที่ 22 Facultative anaerobes ที่พบในการหมักกาซชีวภาพจากมูลสุกร

จากการศึกษาคุณสมบัติทาง morphology และ biochemistry ของแบคทีเรียที่พบ พอจะจำแนก (identify) ได้ดังนี้

1. Gram positive cocci ได้แก่ Streptococcus น่าจะเป็นชนิด (species) ต่อไปนี้

S. uberis, S. lactis, S. cremoris

2. Gram positive, long slender rod, non-sporeforming น่าจะเป็น Lactobacillus

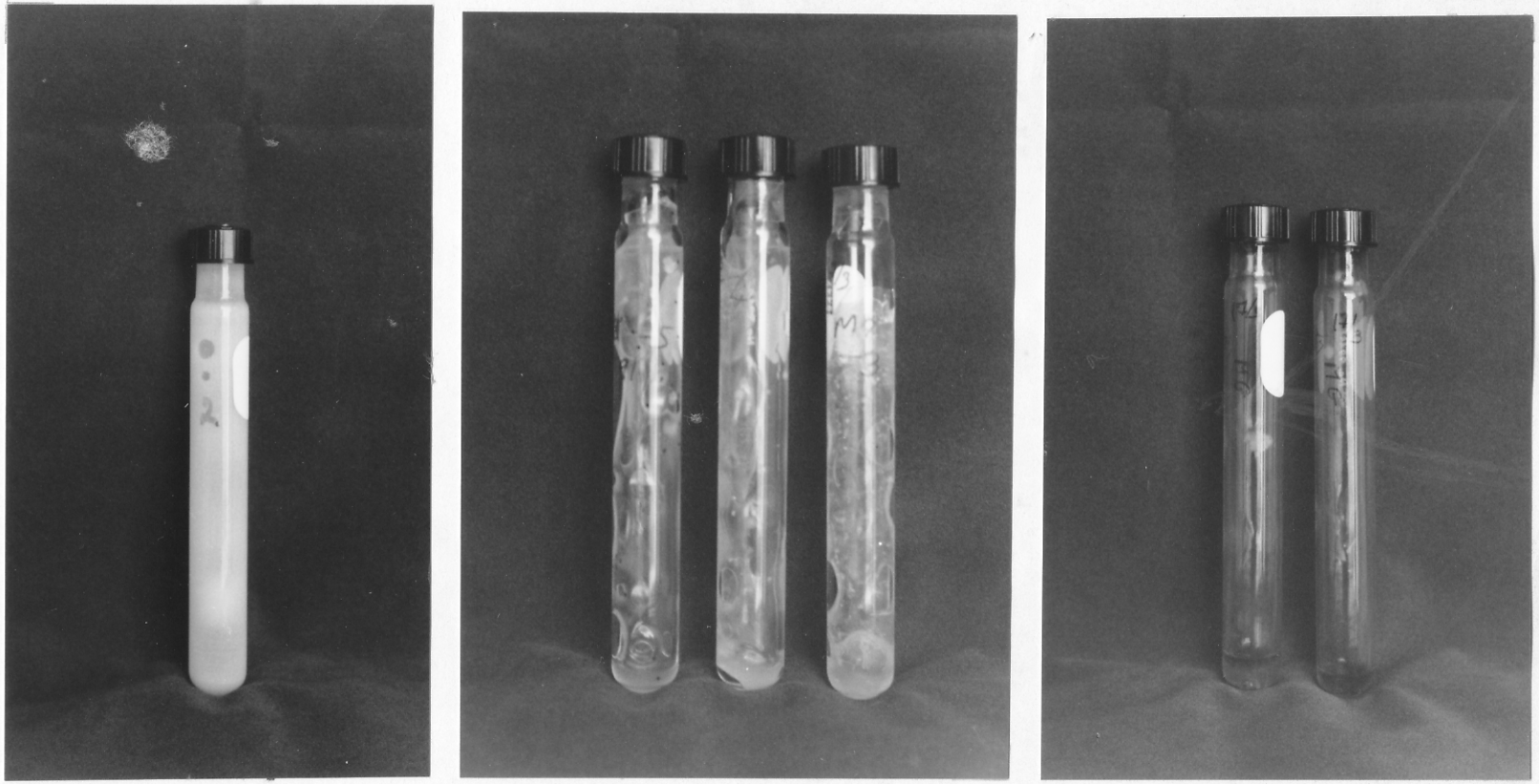
3. Gram positive, sporeforming, big rod ได้แก่ Bacillus น่าจะเป็นชนิดต่อไปนี้

B. licheniformis, B. cereus, B. circulans

B. coagulans

4. Gram negative, non-sporeforming rod ได้แก่ Esherichia coli นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดน่าจะเป็น Enterobacter, Citrobacter, Erwinia

การจำแนกแบคทีเรียเหล่านี้ ได้ยึดหลักเกณฑ์ของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition 1974 และ Cowan & Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd edition, 1974.



(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 31 การเจริญของแบคทีเรียใน cellulose medium (ก) anaerobic medium (ข) methanogenic medium (ค)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ส่วนประกอบของมูลสุกรแตกต่างกันไปตามอาหารที่ใช้เลี้ยงสุกร แบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็น starter พอจะหาได้จากธรรมชาติ ได้แก่จากมูลสัตว์และดินตามแหล่งที่มีการทับถมของสารอินทรีย์ที่อากาศเข้าถึงได้น้อย starter จะทำให้การหมักใช้เวลาน้อย และให้กาซชีวภาพที่มีมีเทนสูง starter ควรจะ acclimatized เพื่อให้แบคทีเรียมีการปรับตัวให้เหมาะสมกับวัตถุดิบ มูลสัตว์เข้มข้นมาก จะให้กาซมากแต่ใช้เวลาในการหมักยาวนาน

แบคทีเรียที่พบในการหมักกาซชีวภาพมีทั้ง facultative anaerobes และ strictly anaerobes ในการแยกเชื้อนี้ พบเพียงแบคทีเรียบางจำพวก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอาหารและสภาวะที่แยกแบคทีเรีย

การแยกเชื้อแบคทีเรียเป็นเรื่องยุ่งยาก ต้องพร้อมทั้งอุปกรณ์ วัสดุ และกำลังคน แต่ในแง่ของจุลชีววิทยา ก็ยังมีสิ่งที่น่าศึกษาอีกมาก เช่น มีแบคทีเรียอะไรบ้าง เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตกาซชีวภาพอย่างไร เมื่อหมักกาซชีวภาพแล้ว sludge ที่ออกมายังมีแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค และไข่พยาธิมีชีวิตอยู่ ทำให้เป็นปัญหาในการแพร่เชื้อต่อไปหรือไม่