

ผลของการดำเนินระบบ TPAD ต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในการหมักร่วมระหว่าง
สลัดจ์บ่อเกรอะกับของเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง



กุลธิดา เฉลิมแสน

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2563

ผลของการดำเนินระบบ TPAD ต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในการหมักร่วมระหว่าง
สลัดจ์บ่อเกรอะกับของเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง



กุลธิดา เฉลิมแสน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม

สำนักบริหารและพัฒนาระบบสารสนเทศ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ผลของการดำเนินระบบ TPAD ต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในการหมักร่วม
ระหว่างสัลดัจจ์บ่อเกราะกับของเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง

กุลธิดา เฉลิมแสน

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(อาจารย์ ดร.มุกฉลินทร์ ผลจันทร์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรีกาญจนา คล้ายเรือง)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(อาจารย์ ดร.มุกฉลินทร์ ผลจันทร์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)

รองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน

อธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	ผลของการดำเนินระบบ TPAD ต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในการหมักร่วมระหว่างสลัดจ์บ่อเกรอะกับของเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง
ชื่อผู้เขียน	นางสาวกุลธิดา เฉลิมแสน
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร.มูจลินทร์ ผลจันทร์

บทคัดย่อ

การผลิตแก๊สชีวภาพเป็นกระบวนการทางชีวภาพที่ต้องอาศัยจุลินทรีย์หลายกลุ่มในการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน การควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์จึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ระบบสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบจึงเป็นหนึ่งในวิธีที่จะทำให้ทราบถึงกลุ่มจุลินทรีย์ชนิดเด่นและใช้เป็นแนวทางในการกำหนดสภาวะของระบบที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบผลิตแก๊สชีวภาพจากการหมักร่วมระหว่างสลัดจ์บ่อเกรอะกับของเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้งด้วยระบบ Temperature Phased Anaerobic Digestion (TPAD) ซึ่งการทดลองประกอบด้วยชุดควบคุมซึ่งจะใช้สลัดจ์บ่อเกรอะเป็นวัตถุดิบเดี่ยวเป็น (TPAD 1) และชุดการทดลองซึ่งประกอบไปด้วยการหมักร่วมระหว่างสลัดจ์บ่อเกรอะกับน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง (TPAD 2) และสลัดจ์บ่อเกรอะกับเปลือกลำไย (TPAD 3) โดยในระหว่างการทดลองได้ตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ (ค่าพีเอช กรดไขมันระเหย สภาพต่าง ค่าซีโอดี ปริมาณของแข็งทั้งหมด และของแข็งระเหย) ควบคู่กับการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction - Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) ผลของการทดลองพบว่าที่ถังอุณหภูมิต่ำของระบบ TPAD 3 สามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้ดีที่สุดเท่ากับ $11,397.13 \pm 3,106.23$ ml/day ที่อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ 4.6/5.0 kg VS/L/day และมีปริมาณแก๊สมีเทนเท่ากับ 48.75% ส่วนถังอุณหภูมิต่ำปานกลางมีปริมาณแก๊สชีวภาพเกิดขึ้นเท่ากับ $2,637.62 \pm 1,108.33$ ml/day และมีแก๊สมีเทนเท่ากับ 56% แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์มีกิจกรรมการย่อยสลายทางชีวภาพที่อุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าอุณหภูมิต่ำปานกลาง และพบว่าที่อุณหภูมิต่ำมีการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของค่าซีโอดีและค่าของแข็งได้สูงด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ให้สูงขึ้นทำให้ระบบมีการผลิตแก๊สชีวภาพลดลง ผลการศึกษาในส่วนของการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์พบว่าอุณหภูมิต่ำและอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ใน

ระบบ โดยกลุ่มประชากรอาร์เคียและแบคทีเรียมีจำนวนแถบดีเอ็นเอในโพลีอะคลีลาไมด์เจลที่ถึง
อุณหภูมิปานกลางมากกว่าถึงอุณหภูมิสูง และยังพบว่ากลุ่มประชากรแบคทีเรียมีความหลากหลาย
มากกว่าอาร์เคียในทุกอุณหภูมิ อย่างไรก็ตามการเดินระบบที่อุณหภูมิสูงพบว่ามีประสิทธิภาพการย่อย
สลายสารอินทรีย์ได้ดีถึงแม้จะพบว่ามีหลากหลายของจุลินทรีย์น้อยกว่า ผลการเปรียบเทียบ
ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่สนใจจาก DGGE gel กับฐานข้อมูล NCBI BLAST พบว่า
มี *Methanothermobacter* และ *Methanobacterium* เป็นกลุ่มแบคทีเรียสร้างมีเทนชนิดเด่นที่
พบทุกถังปฏิกรณ์ อย่างไรก็ตามจะพบ *Methanosarcina* เด่นในระบบ TPAD 2 เท่านั้น โดยความ
แตกต่างของกลุ่มประชากรอาร์เคียนี้อาจมีผลมาจากการใช้วัตถุดิบและสภาวะในการเดินระบบที่
ต่างกัน (อุณหภูมิ และอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์) ทั้งนี้จะเห็นว่าการดำเนินระบบด้วยอุณหภูมิสูง
ได้มีความเสถียรมากกว่าอุณหภูมิปานกลางทั้งในแง่ของความหลากหลายของจุลินทรีย์และการผลิต
แก๊สชีวภาพ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการผลิตแก๊สชีวภาพจากการหมักร่วมระหว่างสลัดจ์บ่อเกรอะ
กับเปลือกกล้วยด้วยระบบหมักแก๊สชีวภาพแบบเฟสอุณหภูมิสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแก๊ส
ชีวภาพและพบว่าจุลินทรีย์มีบทบาทต่อประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพซึ่งมีความแตกต่างตาม
วัตถุดิบที่ใช้และสภาวะในการเดินระบบ ดังนั้นการเลือกใช้วัตถุดิบและการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมจึง
เป็นแนวทางในการพัฒนาระบบผลิตแก๊สชีวภาพให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

คำสำคัญ : สลัดจ์บ่อเกรอะ กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ เทคนิค PCR-DGGE ระบบหมักชีวภาพแบบเฟส
อุณหภูมิ อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์

Title	EFFECT OF OPERATING CONDITIONS OF TPAD ON MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURES IN ANAEROBIC CO-DIGESTION OF SEPTAGE AND DRIED LONGAN PROCESSING WASTE
Author	Miss Koontida Chalermnan
Degree	Master of Science in Environmental Technology
Advisory Committee Chairperson	Dr. Mujalin Pholchan

ABSTRACT

Biogas production is a bioprocess that requires a number of different microbial groups for the degradation of organic compounds to biogas under the anaerobic condition. In order to optimize the biogas process, it is important to have a controlling of the conditions suitable for microbial growth. Thus, the study of microbial diversity is one of approaches to understand the abundance species and how the process can be operated under suitable conditions for harbouring microbial community. The purpose of this work was to study the microbial communities in the Temperature Phased Anaerobic Digestion (TPAD) system co-digested between septage and longan processing waste. In this work, digestion of septage as a sole substrate was a control treatment (TPAD 1), while others were co-digestion of septage and longan dried processing wastewater (TPAD 2) and co-digestion of septage and longan peel waste (TPAD 3). During the experiment, biodegradation efficiency (pH, volatile fatty acid, alkalinity, COD, total solid and volatile solid) were determined couple with studies of a microbial community using Polymerase chain reaction – Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). The results of the experiment showed that the thermophilic digester of TPAD 3 provided the highest biogas production accounting for $11,397.13 \pm 3,106.23$ ml/day at an organic loading rate of 4.6/5.0 kg VS/L/day and methane content of 48.75%, whereas the mesophilic digester produced $2,637.62 \pm 1,108.33$ ml/day and 56% of biogas and methane content, respectively. These revealed higher microbial biological activity was found

from thermophilic digesters. It was also found that higher biodegradation in terms of COD and solids was achieved in the thermophilic digester. However, an increase in organic loading rates also caused a reduction of biogas and methane production rates. The result obtained from PCR-DGGE showed that the pattern of the microbial population varied in response to changes in temperature and organic loading rate. Moreover, the DGGE patterns of both bacterial and archaeal communities in mesophilic digesters appeared to have more bands than the thermophilic digesters. Also, bacterial communities were more diverse than archaeal communities at both temperatures. However, the systems with lower diversity in the thermophilic reactors had higher biodegradation efficiency. The result of the sequence analysis indicated that *Methanothermobacter* and *Methanobacterium* were the dominances in both thermo-and mesophilic digesters. However only *Methanosarcina* has been found from TPAD 2. Differences in these observations could be explained by different feedstock and conditions (e.g. temperatures, OLRs). This suggested that the thermophilic process was more stable than the mesophilic process in terms of microbial diversity and biogas production. The study thus suggests that the biogas production process from septage and longan peel can be optimized through temperature phased anaerobic digester and microorganisms were the main players in biogas production and varied with different types of feedstocks and operating conditions. Consideration of substrate choices and optimization of operating conditions were the important key success for enhancing the system performance.

Keywords : Septage Microbial community PCR-DGGE technique Temperature
phased anaerobic digestion Organic loading rate

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. มุจลินทร์ ผลจันทร์ และกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรีกาญจนา คล้ายเรือง ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน พร้อมทั้งให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดระหว่างดำเนินการวิจัย อีกทั้งยังสละเวลาอันมีค่าในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนคอยให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปฎิรูป ผลจันทร์ ที่ให้ความกรุณาให้เก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิจัย ตลอดจนสถานที่และถึงปฏิกรณ์สำหรับการทดลอง จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ได้มอบทุนสนับสนุนค่าใช้จ่ายรายเดือน และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้มอบทุนการศึกษานับสนุนค่าธรรมเนียมในการศึกษาแก่ข้าพเจ้าให้มีความตั้งใจในการทำวิจัยมาตลอด

ขอกราบขอบพระคุณวิสาหกิจชุมชนกลุ่มแม่บ้านริมร่อง จังหวัดลำพูน ที่เอื้อตัวอย่างน้ำเสียในการทดลอง ตลอดจน คุณพิริววิทย์ เปาชัย ผู้จัดการฝ่ายซ่อมบำรุง ที่ให้การข้อมูลและให้คำปรึกษาจนเสร็จสิ้นการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณ ห้องปฏิบัติการสาขาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและหน่วยบริการวิชาการ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และคุณเรือนแก้ว ประพฤติ นักวิทยาศาสตร์ สถาบัน IQS มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่ออำนาจ เฉลิมแสน และคุณแม่บุญสี เฉลิมแสน พร้อมทั้งครอบครัวของข้าพเจ้า ที่ได้มอบโอกาสที่ดีในการศึกษาครั้งนี้ รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และนักวิทยาศาสตร์ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ สาขาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

ประโยชน์ และความดี อันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณแม่ผู้ให้กำเนิด และเลี้ยงดู ตลอดจนครูอาจารย์ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

กุลธิดา เฉลิมแสน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
อักษรย่อ.....	ท
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ที่มาและความสำคัญ.....	1
2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร.....	4
1. สลัดจ์บ่อเกรอะ (Septage).....	4
2. การแปรรูปลำไยอบแห้งสีทอง.....	10
3. วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส.....	13
4. กระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพด้วยระบบที่ไม่ใช้ออกซิเจน.....	15
5. ถังปฏิกรณ์ผลิตแก๊สชีวภาพแบบสองเฟส (Two-phase anaerobic digester).....	25
6. การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์.....	27
7. การศึกษาแบคทีเรียในระบบผลิตแก๊สชีวภาพด้วยเทคนิค PCR-DGGE.....	29
8. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	35
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	40

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ	41
2. การศึกษาคุณสมบัติสัจข้อเท็จจริงและของเสียจากการแปรรูปลำไย.....	42
3. การติดตั้งและดำเนินระบบหมักร่วม	44
4. การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ.....	46
5. การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบหมักจากถังปฏิกรณ์ TPAD	47
บทที่ 4 ผลและการอภิปรายผลการวิจัย	51
1. คุณสมบัติของสัจข้อเท็จจริง.....	51
2. คุณสมบัติของน้ำเสียและเปลือกลำไยการแปรรูปลำไยอบแห้ง	53
2.1 ผลของการศึกษาลักษณะของน้ำเสียจากการผลิตลำไยอบแห้ง.....	53
2.2 ผลของการศึกษาลักษณะของเปลือกลำไย	55
3. ประสิทธิภาพของระบบ TPAD	57
3.1 การผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทน.....	57
3.2 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชตลอดการทดลอง.....	62
3.3 การเปลี่ยนแปลงกรดไขมันระเหยและสภาพต่างตลอดการทดลอง.....	65
4. ประสิทธิภาพการกำจัดของเสียอินทรีย์ด้วยระบบ TPAD	71
4.1 ค่าซีโอดีและประสิทธิภาพการกำจัด.....	71
4.2 ค่าของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยและประสิทธิภาพการกำจัด.....	74
5. การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบหมักร่วม	79
5.1 การเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของกลุ่มประชากรแบคทีเรียตามสภาวะการดำเนินระบบที่แตกต่างกัน.....	80
5.2 การเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของกลุ่มประชากรอาร์เคียตามสภาวะการดำเนินระบบที่แตกต่างกัน.....	94
จากการเปรียบเทียบความหลากหลายของประชากรอาร์เคียในระบบผลิตแก๊สชีวภาพ ทั้ง.....	107
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	112

บรรณานุกรม.....	114
ภาคผนวก.....	129
ประวัติผู้วิจัย.....	133



สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ลักษณะโดยทั่วไปของสไลด์จ๋บ่อเกรอะ.....	6
ตาราง 2 แหล่งที่มาและลักษณะโดยทั่วไปของสไลด์จ๋บ่อเกรอะ	7
ตาราง 3 คุณสมบัติทางเคมีของเปลือกผลไม้	12
ตาราง 4 องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกผลไม้ (% โดยน้ำหนักแห้ง).....	13
ตาราง 5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของแบคทีเรียในชั้นตอนไฮโดรไลซิสและผลิตภัณฑ์	16
ตาราง 6 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนของสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	24
ตาราง 7 ไพโรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียสร้างกรดและแบคทีเรียสร้างมีเทนด้วยเทคนิค PCR-DGGE	31
ตาราง 8 วิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของน้ำเสียและเปลือกกล้วย	43
ตาราง 9 ชุดการทดลองหมักร่วมของสไลด์จ๋บ่อเกรอะกับของเสียการแปรรูปลำไยอบแห้ง	46
ตาราง 10 วิธีการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของระบบด้วยวิธีทางกายภาพและเคมี	46
ตาราง 11 แสดงชุดไพโรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	48
ตาราง 12 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	48
ตาราง 13 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ	49
ตาราง 14 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการเตรียม 10% acrylamide.....	50
ตาราง 15 สารเคมีที่ใช้เตรียม Acrylamide gel.....	50
ตาราง 16 คุณลักษณะเบื้องต้นของสไลด์จ๋บ่อเกรอะ	52
ตาราง 17 ลักษณะของน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง.....	55
ตาราง 18 ลักษณะของเปลือกกล้วยจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง	56
ตาราง 19 ปริมาณแก๊สมีเทนที่เกิดขึ้นในระบบ TPAD ทั้งสามชุดการทดลอง	62
ตาราง 20 ปริมาณค่าเฉลี่ยของซีไอดีในน้ำเข้าและน้ำออกระบบตลอดการทดลอง.....	72

ตาราง 21 ปริมาณค่าเฉลี่ยของของแข็งทั้งหมดในน้ำเข้าและน้ำออกระบบตลอดการทดลอง.....	75
ตาราง 22 ปริมาณค่าเฉลี่ยของของแข็งระเหยง่ายในน้ำเข้าและน้ำออกระบบตลอดการทดลอง	75
ตาราง 23 ค่า Shannon index (H') ของแบคทีเรียจากระบบ TPAD 1.....	92
ตาราง 24 ค่า Shannon index (H') ของแบคทีเรียจากระบบ TPAD 2.....	93
ตาราง 25 ค่า Shannon index (H') ของแบคทีเรียจากระบบ TPAD 3.....	93
ตาราง 26 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสแถบดีเอ็นเอจาก DGGE gel ของระบบ TPAD 1 กับฐานข้อมูล NCBI BLAST.....	97
ตาราง 27 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสแถบดีเอ็นเอจาก DGGE gel ของระบบ TPAD 2 กับฐานข้อมูล NCBI BLAST.....	102
ตาราง 28 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสแถบดีเอ็นเอจาก DGGE gel ของระบบ TPAD 3 กับฐานข้อมูล NCBI BLAST.....	106
ตาราง 29 ค่า Shannon index (H') ของอาร์เคียจากระบบ TPAD 1.....	110
ตาราง 30 ค่า Shannon index (H') ของอาร์เคียจากระบบ TPAD 2.....	111
ตาราง 31 ค่า Shannon index (H') ของอาร์เคียจากระบบ TPAD 3.....	111



สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 โครงสร้างโดยรวมของศูนย์บริการและพัฒนาคุณภาพสิ่งแวดล้อมเทศบาลนครนนทบุรี	9
ภาพ 2 สถิติพื้นที่การเพาะปลูกต้นลำไย ปริมาณผลผลิตสดและผลผลิตการอบแห้งปี 2552-2560..	10
ภาพ 3 ขั้นตอนการผลิตลำไยอบแห้งสีทอง.....	11
ภาพ 4 สูตรโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสในเซลล์พืช	14
ภาพ 5 กระบวนการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสของแบคทีเรีย	14
ภาพ 6 กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไม่ใช้ออกภาค	18
ภาพ 7 ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรีย	22
ภาพ 8 ค่าความเป็นกรดต่างต่อกิจกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม methanogen	22
ภาพ 9 ถังหมักแบบสองเฟส (Two-phase anaerobic digester).....	26
ภาพ 10 ปฏิกริยาของการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	30
ภาพ 11 ตัวอย่างการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบน polyacrylamide gel	32
ภาพ 12 ลักษณะการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอบน Polyacrylamide gel.....	33
ภาพ 13 แผนภาพขั้นตอนการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE.....	34
ภาพ 14 ขั้นตอนในการทดลองเพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบหมัก	40
ภาพ 15 รูปแบบของถังปฏิกรณ์แบบ Temperature-Phased Anaerobic Digester	45
ภาพ 16 ปริมาณแก๊สชีวภาพในแต่ละวันของระบบ TPAD 1 ที่อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ต่างๆ	61
ภาพ 17 ปริมาณแก๊สชีวภาพในแต่ละวันของระบบ TPAD 2 ที่อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ต่างๆ	61
ภาพ 18 ปริมาณแก๊สชีวภาพในแต่ละวันของระบบ TPAD 3 ที่อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ต่างๆ	61
ภาพ 19 ค่าพีเอชในระบบหมักร่วมของระบบ TPAD 1 โดยแยกตาม OLR ที่ใช้	64
ภาพ 20 ค่าพีเอชในระบบหมักร่วมของระบบ TPAD 2 โดยแยกตาม OLR ที่ใช้	64
ภาพ 21 ค่าพีเอชในระบบหมักร่วมของระบบ TPAD 3 โดยแยกตาม OLR ที่ใช้	64

ภาพ 22	กรดไขมันระเหยในระบบ TPAD 1 โดยแยกตาม OLR ที่ใช้.....	66
ภาพ 23	กรดไขมันระเหยในระบบ TPAD 2 โดยแยกตาม OLR ที่ใช้.....	66
ภาพ 24	กรดไขมันระเหยในระบบ TPAD 3 โดยแยกตาม OLR ที่ใช้.....	66
ภาพ 25	สภาพต่างในระบบ TPAD 1 โดยแยกตาม OLR ที่ใช้.....	68
ภาพ 26	สภาพต่างในระบบ TPAD 2 โดยแยกตาม OLR ที่ใช้.....	68
ภาพ 27	สภาพต่างในระบบ TPAD 3 โดยแยกตาม OLR ที่ใช้.....	68
ภาพ 28	กรดไขมันระเหยต่อสภาพต่างในระบบ TPAD 1.....	70
ภาพ 29	กรดไขมันระเหยต่อสภาพต่างในระบบ TPAD 2.....	70
ภาพ 30	กรดไขมันระเหยต่อสภาพต่างในระบบ TPAD 3.....	70
ภาพ 31	ประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีไอดีโดยแยกตามอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้	73
ภาพ 32	ประสิทธิภาพการกำจัดของแข็งทั้งหมดโดยแยกตามอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้.....	77
ภาพ 33	ประสิทธิภาพการกำจัดของแข็งระเหยง่ายโดยแยกตามอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้	78
ภาพ 34	การเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรของแบคทีเรียในระบบ TPAD 1	81
ภาพ 35	ค่าความชุกชุมสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 1	82
ภาพ 36	UPGMA dendrogram ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 1.....	83
ภาพ 37	ผลการติดตามกลุ่มประชากรของแบคทีเรียในระบบ TPAD 2	85
ภาพ 38	ค่าความชุกชุมสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 2	85
ภาพ 39	UPGMA dendrogram ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 2.....	86
ภาพ 40	ผลการติดตามกลุ่มประชากรของแบคทีเรียในระบบ TPAD 3.....	88
ภาพ 41	ค่าความชุกชุมสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 3	88
ภาพ 42	UPGMA dendrogram ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 3	89
ภาพ 43	ผลการติดตามกลุ่มประชากรของอาร์เคียในระบบ TPAD 1.....	96
ภาพ 44	ค่าความชุกชุมสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 1	96
ภาพ 45	UPGMA dendrogram ของกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 1.....	98

ภาพ 46 ผลการติดตามกลุ่มประชากรของอาร์เคียในระบบ TPAD 2..... 101

ภาพ 47 ค่าความชุกชุมสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 2 101

ภาพ 48 UPGMA dendrogram ของกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 2..... 103

ภาพ 49 ผลการติดตามกลุ่มประชากรของอาร์เคียในระบบ TPAD 3..... 105

ภาพ 50 ค่าความชุกชุมสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 3 105

ภาพ 51 UPGMA dendrogram ของกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 3..... 108



อักษรย่อ

A	Adenine	ไนโตรจีนัสเบสชนิดอะดีนีน
Alk	Alkalinity	ค่าสภาพต่าง
BOD	Biochemical Oxygen Demand	ปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อย สลายสารอินทรีย์
C	Cytosine	ไนโตรจีนัสเบสชนิดไซโทซีน
COD	Chemical Oxygen Demand	ปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการย่อย สลายสารอินทรีย์
DGGE	Temperature gradient gel electrophoresis	เทคนิคศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสในดีเอ็นเอ
DNA	Deoxyribonucleic acid	สารพันธุกรรม
EtBr	Ethidium bromide	สีย้อมกรดนิวคลีอิก
F	Forward primer	ไพรเมอร์ส่วนหน้า
G	Guanine	ไนโตรจีนัสเบสชนิดกัวนีน
HRT	Hydraulic Retention Time	ระยะเวลาที่กักเก็บน้ำเสีย
LPG	Liquefied Petroleum Gas	ก๊าซปิโตรเลียมเหลว
NCBI	National Center for Biotechnology Information	ฐานข้อมูลจำแนกลำดับเบสออนไลน์
OC	Organic Carbon	อินทรีย์คาร์บอน
OLR	Organic Loading Rate	อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์
PCR	Polymerase chain reaction	ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน
R	Reverse primer	ไพรเมอร์ส่วนหลัง
rRNA	ribosomal RNA	องค์ประกอบสำคัญของไรโบโซม
SS	Suspended solid	ปริมาณของแข็งแขวนลอย
T	Thymine	ไนโตรจีนัสเบสชนิดไทมีน
TAE	Tris-acetate-Ethylene diamine tetra-acetic acid	สารละลายบัฟเฟอร์
TKN	Total Kjeldahl Nitrogen	ปริมาณรวมทั้งหมดของไนโตรเจนอินทรีย์และ แอมโมเนีย-ไนโตรเจนที่อยู่ในโปรตีน

TPAD	Temperature-phase anaerobic digester	ถังหมักแบบเฟสอุณหภูมิต่ำ
TS	Total solid	ปริมาณของแข็งทั้งหมด
VS	Volatile solid	ปริมาณของแข็งระเหย
VSS	Volatile suspended solid	ปริมาณของแข็งแขวนลอยระเหย



บทที่ 1

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญ

การพัฒนาพลังงานสะอาดที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เป็นหนึ่งในยุทธศาสตร์ชาติ 20 ปี ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 12 และแผนพัฒนาพลังงานทดแทน 15 ปี โดยกระทรวงพลังงาน ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการใช้พลังงาน เพื่อเป็นแนวทางในการสร้างพลังงานทดแทน และลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน โดยนโยบายการสร้างพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ ได้กำหนดไว้เบื้องต้นว่าต้องสามารถผลิตไฟฟ้ารวมสะสมถึงปี 2565 จำนวน 5,604 เมกะวัตต์ (กระทรวงพลังงาน, 2554) ดังนั้นจึงมีการเสนอให้มีการพัฒนาพลังงานทดแทนในรูปของพลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังงานน้ำ พลังงาน ชีวมวล และแก๊สชีวภาพ ทั้งนี้การสร้างพลังงานทดแทนในรูปของแก๊สชีวภาพมีความสำคัญเนื่องจากสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงเพื่อผลิตพลังงานความร้อน หรือใช้เป็นเชื้อเพลิงในการผลิตพลังงานกล/ไฟฟ้า อันเป็นการลดการใช้พลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิลที่กำลังจะหมดไป

ปัจจุบันการผลิตแก๊สชีวภาพนิยมใช้วัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรและของเสียจากฟาร์มสัตว์เลี้ยงมาหมักในรูปของวัตถุดิบเดี่ยว (solo substrate) เป็นการพัฒนาพลังงานเพื่อใช้แล้วยังเป็นการกำจัดของเสียที่จุดกำเนิดในแง่ของการลดปริมาณขยะอินทรีย์ ซึ่งสไลด์จ์บ่อเกรอะอุดมไปด้วยสารอินทรีย์และธาตุอาหารอยู่เป็นจำนวนมากโดยเฉพาะไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ทั้งนี้ระบบการจัดการของเสียชุมชนในประเทศไทยที่มีการใช้บ่อเกรอะในการบำบัดน้ำเสียเมื่อใช้ไประยะหนึ่งจะเกิดการสะสมจนไม่สามารถทำงานต่อไปได้ จึงต้องมีการสูบหรือดูดไปบำบัดยังสถานที่กำจัดสไลด์จ์บ่อเกรอะ ซึ่งสถานที่รองรับเพื่อบำบัดสไลด์จ์บ่อเกรอะจะต้องกระทำตามหลักสุขาภิบาลเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อโรคสู่สิ่งแวดล้อมรวมถึงผู้ปฏิบัติงาน (กระทรวงสาธารณสุข, 2558) ในขณะเดียวกันยังพบว่ามีการลักลอบนำสไลด์จ์บ่อเกรอะไปทิ้งตามที่สาธารณะ เช่น คลอง ป่าไม้ หรือมีการนำไปเททิ้งเพื่อใช้เป็นปุ๋ยให้พืชไร่ทั้งที่ยังไม่มีการบำบัด ซึ่งจากการกระทำดังกล่าวจะทำให้สถานที่นั้นเกิดกลิ่นเหม็นเป็นที่น่ารังเกียจ รวมถึงเกิดการสะสมอยู่ในดิน น้ำ และอากาศ และยังเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของแมลงวันและเชื้อโรคต่างๆ ซึ่งสามารถแพร่เข้าสู่มนุษย์ได้ ทั้งนี้การใช้สไลด์จ์บ่อเกรอะเป็นวัตถุดิบในการผลิตแก๊สชีวภาพจึงเป็นทางเลือกที่ดีเพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการปนเปื้อนของสารอินทรีย์จากสไลด์จ์บ่อเกรอะ รวมถึงเป็นการลดต้นทุนให้น้อยลงเพื่อให้เกิดความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจมากยิ่งขึ้นและยังได้ปุ๋ยที่มีประโยชน์ทางการเกษตรอีกด้วย

นอกจากนี้การย่อยสลายร่วมโดยการใช้ของเสียอินทรีย์ประเภทอื่น (Co-digestion) ยังเป็นแนวทางหนึ่งซึ่งจะทำให้ระบบสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากเป็นการ

ทดแทนปริมาณสารอาหารและสารอินทรีย์ให้มีปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพของ จุลินทรีย์ในระบบ ทั้งนี้การใช้เปลือกกล้วยและน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้งเป็นวัตถุดิบหลัก ร่วมกับสไลด์จ๋บ่เกรอะนับว่าเป็นแนวทางในการเสริมปริมาณสารอินทรีย์ให้มีค่าที่เหมาะสมต่อการ ผลิตแก๊สชีวภาพได้ โดยที่เปลือกกล้วยเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งอุดม ไปด้วยสารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของคาร์โบไฮเดรตจะเป็นการเสริมปริมาณสารอินทรีย์ให้กับสไลด์จ๋บ่ เกรอะที่มีไนโตรเจนสูงและทำให้ระบบได้มีปริมาณสารอินทรีย์และสารอาหารที่เหมาะสม ในขณะที่ น้ำเสียนั้นจัดว่าเป็นของเสียที่มีปริมาณน้ำตาลที่มาจากผลไม้ ซึ่งจะส่งเสริมให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีและ ผลิตแก๊สชีวภาพได้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้สไลด์จ๋บ่เกรอะผลิตแก๊สชีวภาพจะมีจุลินทรีย์ก่อโรค ประเภทโคลิฟอร์มและและฟีคัลโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในจำนวนมากจึงได้มีการเลือกใช้ถังปฏิกรณ์แบบ เฟสอุดมหมู่ (TPAD) ที่มีการดำเนินระบบด้วยการใช้ถังปฏิกรณ์แบบ 2 ถังโดยถังแรกจะถูกควบคุม อุณหภูมิไว้ในช่วงอุณหภูมิสูงและถังที่สองอยู่ในช่วงอุณหภูมี่ปานกลาง ด้วยเหตุนี้จะทำให้จุลินทรีย์ก่อ โรคประเภทโคลิฟอร์มและฟีคัลโคลิฟอร์มถูกทำลายในถังอุณหภูมิสูงซึ่งเป็นการลดปริมาณเชื้อก่อโรค ให้ลดลงได้

ทั้งนี้การผลิตแก๊สชีวภาพจะอาศัยจุลินทรีย์หลายชนิดที่ช่วยทำหน้าที่ในการย่อยสลาย สารอินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่แตกต่าง กันและยังมีปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันอีกด้วย เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น อย่างไรก็ตามการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมจะอาศัยการ ทำงานร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลาย ในสภาพแวดล้อมหนึ่งจุลินทรีย์บางชนิดจะ สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์บางประเภทไม่สามารถย่อยสลายได้ให้เป็นสารตั้งต้นที่ จุลินทรีย์ในกลุ่มที่สองสามารถนำไปใช้ได้ทำให้เกิดการหมุนเวียนสารเคมีเพื่อใช้ในกระบวนการ เจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ส่งผลให้ระบบมีการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (นุกูลและคณะ, 2550) จะเห็นว่าจุลินทรีย์มีความสำคัญต่อการย่อยสลายทางชีวภาพเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีความเข้าใจในกลไกการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ซึ่งในอดีตการศึกษาความ หลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียได้เริ่มต้นจากการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture based methods) ซึ่งวิธีนี้จำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อได้เจริญบน อาหารในระยะเวลาหนึ่งก่อนที่จะมีการสังเกตเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อได้ ทั้งนี้วิธีดั้งเดิมสามารถเกิด ข้อผิดพลาดในการตรวจสอบได้ง่ายเนื่องจากเชื้อบางชนิดมีลักษณะใกล้เคียงกัน (Amann et al., 1995) อีกทั้งยังมีข้อจำกัดในเรื่องของเวลา รวมถึงจุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหาร เลี้ยงเชื้อได้หรือบางชนิดสามารถเพาะเลี้ยงได้แต่ต้องใช้เวลานาน ทำให้ไม่สามารถศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ ทุกชนิดในสิ่งแวดล้อมที่มีความหลากหลายได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคด้านชีวโมเลกุล เพื่อใช้ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียและระบบผลิตแก๊สชีวภาพ รวมถึงสิ่งแวดล้อม

อื่นๆ เพื่อใช้เป็นหนึ่งในโลกสำหรับอธิบายประสิทธิภาพและการทำงานของระบบบำบัดทางชีวภาพ นอกเหนือจากการใช้วิธีการตรวจสอบประสิทธิภาพทางเคมี

ดังนั้นเพื่อให้เกิดการพัฒนาด้านพลังงานทางเลือกให้มีประสิทธิภาพและสอดคล้องกับการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรตลอดจนความต้องการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากสลัดจ์บ่อเกรอะ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการผลิตแก๊สชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของระบบการผลิตแก๊สชีวภาพจากการหมักร่วมระหว่างสลัดจ์บ่อเกรอะกับของเสียจากกระบวนการแปรรูปลำไยอบแห้ง โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบด้วยการใช้เทคนิค PCR-DGGE เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมระบบหมักร่วมให้มีประสิทธิภาพ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะเป็นต้นแบบของการพัฒนาประสิทธิภาพของระบบการผลิตแก๊สชีวภาพจากการหมักร่วมระหว่างสลัดจ์บ่อเกรอะกับน้ำเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารและการเกษตรสำหรับประเทศไทยได้

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษาผลของปัจจัยในการดำเนินระบบ TPAD ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในการหมักร่วมระหว่างสลัดจ์บ่อเกรอะกับของเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง
- 2.2 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์และประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากการหมักร่วมระหว่างสลัดจ์บ่อเกรอะกับของเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 ได้มีแนวทางในการจัดการสลัดจ์บ่อเกรอะอย่างถูกต้องตามหลักสุขาภิบาล
- 3.2 ทราบปัจจัยการดำเนินระบบที่มีผลต่อการผลิตก๊าซชีวภาพจากการหมักร่วม
- 3.3 ทราบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการผลิตก๊าซชีวภาพจากการหมักร่วม ทำให้สามารถควบคุมและติดตามเพื่อให้ระบบบำบัดมีประสิทธิภาพมากขึ้น

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

การศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในระบบหมักร่วมระหว่างตะกอนจากบ่อเกรอะกับน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการแปรรูปลำไย เพื่อให้ประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพสูงสุด จำเป็นต้องมีความเข้าใจถึงบ่อเกรอะและสลัดจ์บ่อเกรอะในด้านลักษณะทั่วไป กระบวนการเกิดตะกอนจากบ่อเกรอะ วิธีการบำบัดโดยทั่วไปและการใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ควบคู่กับการศึกษา ลักษณะของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปลำไย รวมทั้งการศึกษาระบวนการเกิดแก๊สชีวภาพ ซึ่งจะต้องทำความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์และปัจจัยที่ทำให้เกิดแก๊สชีวภาพ รวมถึงระบบต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตแก๊สชีวภาพ นอกจากนี้ยังต้องมีการศึกษาการประยุกต์ใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลในการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่ได้กล่าวมาข้างต้น เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้

1. สลัดจ์บ่อเกรอะ (Septage)

สลัดจ์บ่อเกรอะ หรือ Septage เป็นตะกอนที่มาจากบ่อเกรอะ (Septage Tank) หรือส้วมรูปแบบต่างๆ อาจมาจากอาคารบ้านเรือน ร้านอาหาร หรืออุตสาหกรรม มีลักษณะที่เป็นของเหลวและของแข็ง ซึ่งบ่อเกรอะมีลักษณะเป็นบ่อปิดและไม่มีการเติมอากาศ สภาวะภายในบ่อจึงเป็นสภาวะไร้อากาศ (Anaerobic) ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากสิ่งปฏิกูลที่มาจากคน หรือใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากครัวเรือนและน้ำเสียอื่นๆ ได้ โดยส่วนใหญ่ น้ำเสียที่ไหลเข้าบ่อเกรอะจะเป็นอุจจาระหรือสารอินทรีย์ที่ย่อยง่าย จุลินทรีย์ที่อยู่ในบ่อเกรอะจะย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เหลือกลายเป็นก๊าซกับน้ำ และได้กากตะกอน (Septage) ในสภาวะไร้อากาศ ทั้งนี้กากตะกอนที่ได้มีปริมาณที่น้อยจึงทำให้บ่อไม่เต็มได้ง่าย จึงมีการสูบเพื่อนำไปกำจัดเป็นครั้งคราว

2.1 ลักษณะของสลัดจ์บ่อเกรอะ

ลักษณะของสลัดจ์บ่อเกรอะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และความสามารถในการสูบสิ่งปฏิกูล ประสิทธิภาพของบ่อเกรอะ เวลาเก็บกัก การซึมของน้ำใต้ดิน และสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ ทำให้ลักษณะโดยทั่วไปของสลัดจ์บ่อเกรอะจะมีสีดำและมีกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ นอกจากนี้ยังพบสารพิษปะปนอยู่ด้วย รวมถึงเส้นผม ไขมัน กรวด และเศษซาก ในขณะที่เดียวลักษณะของสลัดจ์บ่อเกรอะมีความแตกต่างกันออกไปตามสภาพแวดล้อมในแหล่งกำเนิด เช่น จำนวนประชากร ปริมาณน้ำที่ใช้ ความถี่ในการสูบตะกอนออก และลักษณะการใช้งานอื่นๆ เช่น การล้างจาน การซักผ้า เป็นต้น รวมถึงกิจกรรมต่างๆ ที่สามารถส่งผลให้สลัดจ์บ่อเกรอะมีลักษณะที่แตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ (U.S. EPA, 1994)

นอกจากนี้ยังพบว่าสลัดจ์บ่อเกรอะมีปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคมมากกว่าน้ำทิ้งจากบ้านเรือนถึง 6-80 เท่า (Metcalf et al., 1979) ซึ่งสลัดจ์บ่อเกรอะมีปริมาณของแข็งและไขมันสูงที่มาจาก การขับถ่ายของมนุษย์จึงมักพบจุลินทรีย์ก่อโรคเสมอ นอกจากจุลินทรีย์แล้วยังพบไวรัสหรือปรสิตและโปรโตซัวอีกด้วย โดยเชื้อก่อโรคและปรสิตเหล่านี้มักพบอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลือดอุ่น โดยอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารทำให้เวลาขับถ่ายออกมาจึงปนเปื้อนออกมาพร้อมกับอุจจาระและปนเปื้อนไปสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งลักษณะของสลัดจ์บ่อเกรอะได้แสดงดังตาราง 1

2.2 แหล่งที่มาและลักษณะทั่วไปของสลัดจ์บ่อเกรอะ

การจัดการและการกำจัดสลัดจ์บ่อเกรอะขึ้นอยู่กับลักษณะและปริมาณของเสียที่เกิดขึ้น รวมถึงแหล่งที่มาทำให้มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ตามจะต้องมีการออกแบบระบบบำบัด และวิธีการจัดการอย่างถูกวิธี เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการบำบัดอย่างสูงสุด ซึ่งแหล่งที่มาของการเกิดสลัดจ์บ่อเกรอะได้แสดงดังตาราง 2



ตาราง 1 ลักษณะโดยทั่วไปของสลัดจ์บำบัด

พารามิเตอร์	U.S. EPA (1994)	Koottatep et al. (2005)	กรมควบคุมมลพิษ (2545)
pH	1.5-12.6	6.7-8.1	6.7-8.0
BOD (mg/l)	440-78,600	630-5,550	600-5,500
COD (mg/l)	1,500-703,000	1,108-76,075	1,200-76,000
TS (mg/l)	1,132-130,475	2,202-67,200	2,200-67,200
TVS (mg/l)	353-71,402	848-52,362	-
TSS (mg/l)	310-93,378	-	1,000-44,000
VSS (mg/l)	95-51,500	840-34,667	-
Total nitrogen (mg/l)	-	-	-
TKN (mg/l)	66-1,060	226-4,880	300-5,000
NH ₃ -N (mg/l)	3-116	60-1,200	120-1,200
Total phosphorus (mg/l)	20-760	-	692-1,482
Alkalinity (mg/l)	522-4190	-	-
Grease (mg/l)	208-23,368	-	-
Total coliform (CFU/100 ml)	10 ⁷ -10 ⁹	-	-
Fecal coliform (CFU/100 ml)	10 ⁶ -10 ⁸	-	-
Helminths eggs	-	0-14 no./g of sample	-

ตาราง 2 แหล่งที่มาและลักษณะโดยทั่วไปของสลัดจ์บ่อเกรอะ

แหล่งที่มา	ความถี่ในการสุบออก	ลักษณะ
บ่อเกรอะ	2-6 ปี (แตกต่างกันแล้วแต่พื้นที่)	มีความเข้มข้นของค่าบีโอดีสูง มีของแข็ง สารอาหาร มีปริมาณสารพิษไม่แน่นอน (เช่น โลหะ) และมีกลิ่นเหม็น เชื้อโรค ไขมันและน้ำมัน และ สารอินทรีย์ (ดิน ทราาย)
ส้วมซึม	2-10 ปี	มีความเข้มข้นของค่าบีโอดีสูง มีของแข็ง สารอาหาร มีปริมาณสารพิษไม่แน่นอน มีกลิ่นเหม็น เชื้อโรค ไขมันและน้ำมัน บางครั้งอาจมีทรายใน ปริมาณมาก
ส้วมเคลื่อนที่	1 สัปดาห์-1 เดือน	และสารอินทรีย์ มีความเข้มข้นของบีโอดีไม่แน่นอน มีของแข็ง สารอินทรีย์ กลิ่นเหม็น เชื้อโรค และสารเคมีบางชนิด
ถังเติมอากาศ	หลายเดือน-1 ปี	มีความเข้มข้นของบีโอดีไม่แน่นอนและมีความเข้มข้นของของแข็งสูง รวมถึงสารอินทรีย์มี กลิ่นเหม็นและเชื้อโรค
ถังเก็บตะกอน หรือบ่อเกรอะที่ ไม่มี Drain Field	หลายวัน-หลายสัปดาห์	มีความเข้มข้นของบีโอดีไม่แน่นอน ประกอบด้วยสารอินทรีย์ ของแข็ง และเชื้อโรค มีกลิ่นเหม็น รวมถึงของแข็งมีลักษณะคล้ายของแข็งที่ยังไม่ผ่านการบำบัด
หลุมแห้ง	2-6 ปี	ความเข้มข้นของบีโอดีไม่แน่นอน ประกอบด้วยของแข็งและสารอินทรีย์ มีกลิ่นเหม็น

ที่มา: U.S. EPA (1994)

2.3 การจัดการสลัดจ์บ่อเกรอะ

ลักษณะทางเคมีและชีวภาพของสลัดจ์บ่อเกรอะประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นสูง รวมถึงจุลชีพที่ปะปนอยู่หลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย ไวรัส และปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ ซึ่งวิธีที่ใช้ในการจัดการสลัดจ์บ่อเกรอะเป็นกระบวนการบำบัดสลัดจ์บ่อเกรอะก่อนที่จะนำไปทิ้งหรือนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ด้านการเกษตร ทั้งนี้ข้อมูลจาก (U.S. EPA, 1999) ได้แบ่งวิธีการกำจัดและบำบัดสลัดจ์บ่อเกรอะขึ้นพื้นฐานออกเป็น 3 แบบ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.3.1 การบำบัดด้วยดิน (Land application) เป็นการนำสลัดจ์บ่อเกรอะใส่ลงในดิน โดยเป็นสถานที่ในการบำบัดสลัดจ์บ่อเกรอะโดยเฉพาะหรือมีการส่งเสริมจากรัฐบาล เป็นการปรับเสถียรภาพเพื่อลดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ รวมถึงจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายใช้พลังงานน้อยและเป็น การทดแทนสารประกอบอินทรีย์และธาตุอาหารกลับสู่ดิน แต่ต้องมีการพักที่ดินในช่วงฤดูหนาวหรือช่วงที่ดินอืดตัวและใช้พื้นที่ในการดำเนินการในจำนวนมาก สามารถทำได้ 3 วิธี คือ การปล่อยลงผิวดิน (Surface Application) การปล่อยลงใต้ผิวดิน (Subsurface Application) และการฝังกลบ (Burial)

2.3.2 การบำบัดในโรงบำบัดน้ำเสีย (Wastewater Treatment Plant) เป็นการจัดการตะกอนสำหรับการบำบัดร่วมกันระหว่างบำบัดน้ำเสีย หรือตะกอนจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับความจุของโรงงานและประเภทของกระบวนการที่ใช้ ข้อดีคือโรงบำบัดน้ำเสียส่วนใหญ่สามารถกำจัดสลัดจ์บ่อเกรอะได้และเป็นศูนย์รวมในการบำบัดของเสีย แต่ต้องมีการจัดการและกำจัดของเสียที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีวิธีการต่างๆ เช่น การปล่อยลงท่อน้ำทิ้ง (Upstream Sewer Manhole) การปล่อยเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียหลัก (Plant Headwork) การนำเข้าสู่กระบวนการจัดการตะกอน (Sludge Handling Process) และการปล่อยสู่แหล่งน้ำร่วมกับการจัดการตะกอน เป็นต้น

2.3.3 การบำบัดในโรงบำบัดสลัดจ์บ่อเกรอะโดยเฉพาะ (Independent Septage Treatment Plant) การบำบัดด้วยวิธีนี้ใช้ในการบำบัดสลัดจ์บ่อเกรอะเท่านั้น ของเสียที่ได้จากการบำบัดต้องทิ้ง มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานและบำรุงรักษาสูง และต้องมีความเชี่ยวชาญในการดำเนินการสูง ซึ่งมีวิธีต่างๆ เช่น บ่อปรับเสถียรภาพ (Stabilization Lagoons) ระบบออกซิเดชันคลอรีน (Chlorine Oxidation) ระบบบำบัดทางชีวภาพและเคมี (Biological and Chemical Treatment) การปรับสภาพและปรับเสถียร (Conditioning and Stabilization) ทำปุ๋ยหมัก (Composting) ระบบบึงประดิษฐ์ (Constructed Wetland) การย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic Digestion) และการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic Digestion) เป็นต้น

จากการสำรวจวิธีการกำจัดและบำบัดสลัดจ์บ่อเกรอะในประเทศไทยปี 2557 พบว่ามีองค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น (อปท.) จำนวน 1,965 แห่งจาก 45 จังหวัด ที่มีสถานที่บำบัดและกำจัดสลัดจ์บ่อเกรอะ 125 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 6.39 เท่านั้น และยังพบว่ามีเพียง 17 แห่ง หรือร้อยละ 13.6 ที่สถานที่บำบัดและกำจัดสลัดจ์บ่อเกรอะมีการระบุวิธีการบำบัดและกำจัด นอกจากนี้ยังพบการลักลอบทิ้งสลัดจ์บ่อเกรอะในหลายพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นการลักลอบทิ้งในที่สาธารณะ พื้นที่สวนหรือในลำคลองคิดเป็นร้อยละ 18.71 ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของประชาชนได้ (สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม, 2558)

ทั้งนี้สลัดจ์บ่อเกรอะประกอบไปด้วยสิ่งสกปรกและเชื้อโรคปะปนอยู่ในจำนวนมาก การจัดการที่ถูกต้องตามหลักสุขาภิบาลจึงมีความจำเป็นในการบำบัดและกำจัดสลัดจ์บ่อเกรอะ เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคระบบทางเดินอาหารและพยาธิ โดยการบำบัดที่ถูกต้องตามหลักสุขาภิบาลมีอยู่หลายวิธีตามราคาในการลงทุน ประสิทธิภาพในการบำบัด และผลพลอยได้ สำหรับการบำบัดโดยวิธีการย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศ (Anaerobic Digestion) โดยการอาศัยจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศช่วยย่อยสลายสลัดจ์บ่อเกรอะ นับว่าเป็นวิธีการบำบัดที่ดีวิธีหนึ่ง เนื่องจากเป็นการบำบัดที่ให้ประสิทธิภาพสูง และยังได้แก๊สชีวภาพซึ่งเป็นแหล่งพลังงานทดแทนคุณภาพสูง รวมถึงได้ผลผลิตเป็นปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณค่าในการเป็นธาตุอาหารให้แก่พืชที่ดีด้วย เช่น โครงการปุ๋ยชีวภาพตามแนวทางพระราชดำริ เทศบาลนครนนทบุรี (ภาพ 1) ซึ่งได้มีการดำเนินงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 และมีการจัดการกับสิ่งปฏิกูลอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการและยังสามารถผลิตปุ๋ยอินทรีย์เพื่อใช้ในการเกษตร โดยจะมีถึงปฏิกรณ์ย่อยสลายสลัดจ์บ่อเกรอะภายในเวลา 28 วัน และจึงมีการปล่อยสลัดจ์บ่อเกรอะเข้าสู่ลานทรายกรอง เป็นเวลา 7-14 วัน เพื่อให้ตะกอนที่ผ่านการย่อยสลายแล้วแห้งจึงจะสามารถนำไปเป็นปุ๋ยได้ ส่วนที่เป็นน้ำจะไหลไปยังบ่อเก็บน้ำเสียซึ่งจะนำไปบำบัดก่อน จึงจะนำไปใช้ประโยชน์เป็นปุ๋ยสำหรับรดน้ำต้นไม้ได้ (สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม, 2558)

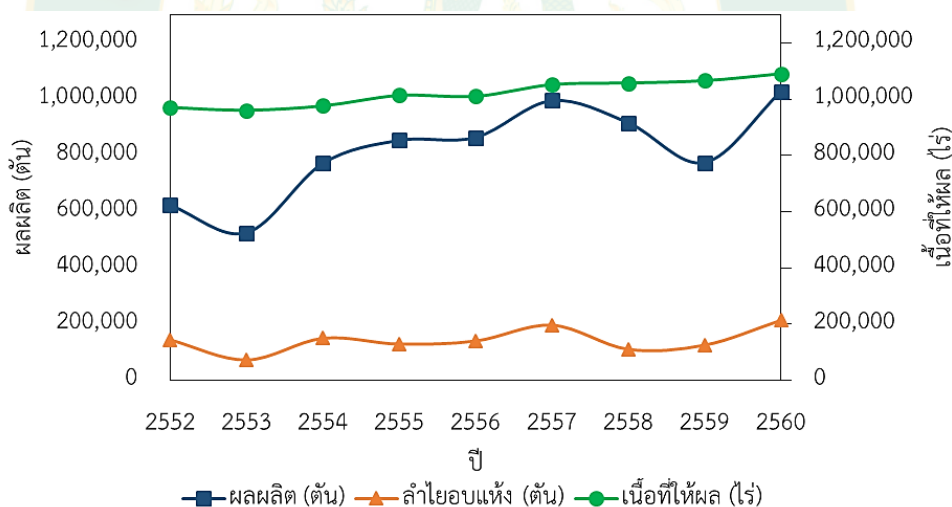


- 1 อาคารสำนักงาน
- 2 บ่อเก็บน้ำ
- 3 ถังหมักย่อยสลาย
- 4 ลานทรายกรอง
- 5 อาคารเก็บเครื่องจักร
- 6 อาคารโรงเก็บปุ๋ย
- 7 อาคารเก็บอุปกรณ์
- 8 ลานจอกกรถ

ภาพ 1 โครงสร้างโดยรวมของศูนย์บริการและพัฒนาคุณภาพสิ่งแวดล้อมเทศบาลนครนนทบุรี
ที่มา : สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม (2558)

2. การแปรรูปลำไยอบแห้งสีทอง

ลำไยเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีอย่างแพร่หลายทั่วประเทศ โดยเฉพาะพื้นที่ภาคเหนือ อย่างจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และเชียงราย เป็นจังหวัดที่มีการผลิตลำไยกว่าร้อยละ 70 ของผลผลิตลำไยทั้งหมด (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) และจากข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตรพบว่าในปี 2560 มีพื้นที่การปลูกลำไยทั้งหมด 2,262,877 ไร่ ให้ผลผลิต 1,090,605 ตัน โดยในภาคเหนือมีการเพาะปลูกลำไยถึง 1,704,030 ไร่ และให้ผลผลิต 619,231 ตัน ทั้งนี้จากสถิติของผลผลิตลำไยในภาคเหนือได้แสดงดังภาพ 5 จะเห็นว่าผลผลิตลำไยได้มีปริมาณมากขึ้นจากปี 2559 และมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี ทั้งนี้ผลผลิตลำไยในฤดูของภาคเหนือจะออกสู่ตลาดตั้งแต่กลางเดือนกรกฎาคม และจะออกมากที่สุดพร้อม ๆ กันช่วงเดือนสิงหาคม (ประชาชาติธุรกิจออนไลน์, 2560) ซึ่งปริมาณผลผลิตลำไยสดจำนวนมากออกสู่ตลาดในได้เพียงระยะสั้นในช่วงฤดูกาลเท่านั้นและไม่สามารถเก็บรักษาผลผลิตได้ในระยะเวลานาน ทำให้ราคาการรับซื้อผลสดลดลง ดังนั้นการนำผลผลิตลำไยมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ลำไยอบแห้งสีทองจึงช่วยในการเก็บรักษาผลผลิตลำไยให้มีอายุยาวนานขึ้นและเป็นแนวทางในการรักษาระดับราคาผลผลิตไม่ให้ตกต่ำ รวมถึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับลำไยไปด้วย

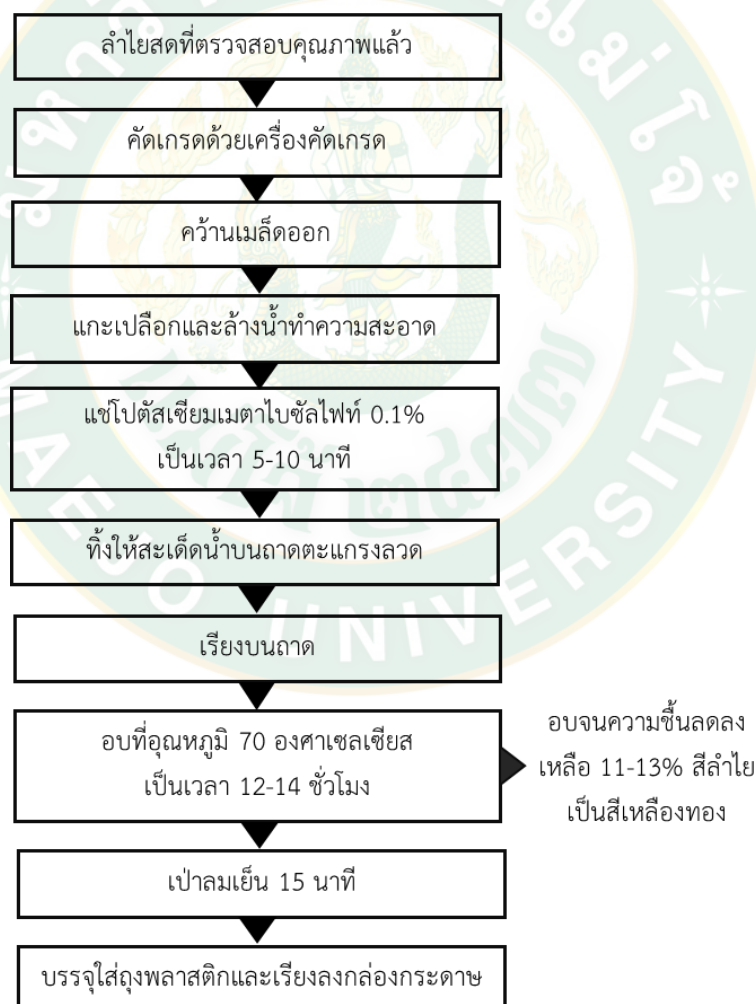


ภาพ 2 สถิติพื้นที่การเพาะปลูกต้นลำไย ปริมาณผลผลิตสดและผลผลิตการอบแห้งปี 2552-2560
ที่มา: สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร (2561)

ปัจจุบันการส่งออกลำไยสดไปต่างประเทศเฉลี่ยอยู่ที่ 67% ของผลผลิตลำไยทั้งหมด (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) ปริมาณลำไยสดที่เหลือจากการส่งออกจะถูกนำมาบริโภคภายในประเทศโดยการบริโภคสดและนำมาแปรรูป ซึ่งการแปรรูปสามารถนำไปแปรรูปเป็นลำไยกระป๋อง ลำไยแช่แข็ง และลำไยอบแห้ง ทั้งนี้ลำไยอบแห้งสามารถแปรรูปเป็นลำไยอบแห้งทั้งเปลือก ลำไยอบแห้งธรรมดา และลำไยอบแห้งสีทอง

3.1 ขั้นตอนการแปรรูปลำไยอบแห้ง

โดยทั่วไปการแปรรูปลำไยมีกระบวนการผลิตอยู่ 2 แบบ คือ อบแห้งทั้งเปลือกแต่การอบแห้งแบบนี้จะทำให้เนื้อของลำไยมีสีดำคล้ำและไม่ได้คุณภาพ ส่วนอีกแบบคือจะมีการแกะเปลือกและคว้านเมล็ดออกก่อนที่จะนำไปอบแห้ง และในระหว่างกระบวนการผลิตจะมีการแช่สารละลายโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (Potassium metabisulfite) เพื่อป้องกันการเปลี่ยนสีของเนื้อลำไย ทั้งนี้กระบวนการอบแห้งเริ่มจากการนำผลลำไยสดที่ตรวจสอบคุณภาพแล้ว มาทำการคัดเกรดโดยเครื่องคัดเกรดก่อน จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนการอบที่อุณหภูมิ 60-70 °C จนเนื้อลำไยมีความชื้นต่ำกว่า 18% ซึ่งผลลำไยสด 1 กิโลกรัมจะได้ลำไยแปรรูป 100 กรัมโดยน้ำหนัก (หทัยรัตน์, 2556) โดยขั้นตอนการแปรรูปได้แสดงดังภาพ 6



ภาพ 3 ขั้นตอนการผลิตลำไยอบแห้งสีทอง
ที่มา: สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร (2561)

3.2 ของเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้งสีทอง

กระบวนการแปรรูปลำไยอบแห้งสีทองจะมีเปลือกลำไยและน้ำเสียเป็นของเสียที่เกิดจากการแปรรูปอย่างเห็นได้ชัด ในปัจจุบันยังไม่มีแนวทางในการจัดการของเสียที่เกิดขึ้นอย่างมีมาตรฐาน เนื่องจากผู้ประกอบการที่แปรรูปลำไยอบแห้งส่วนใหญ่ดำเนินการด้วยวิสาหกิจชุมชนซึ่งยังขาดความรู้ในการกำจัดของเสียที่เกิดขึ้น จากข้อมูลของ (มติชนออนไลน์, 2560) พบว่าภาคเหนือมีความต้องการแปรรูปลำไยอบแห้งสีทองประมาณ 17,696 ตัน คิดเป็น 4.70% ของผลผลิตในภาคเหนือ และจากการศึกษาของ (ัญญาลักษณ์, 2560) ยังพบว่าน้ำหนักของเปลือกลำไยคิดเป็น 20% ของน้ำหนักสด ทั้งนี้หากมีการแปรรูปในปริมาณตามความต้องการจะพบว่าการแปรรูปจะมีเปลือกลำไยเหลือทิ้งถึง 3,539 ตัน และเมื่อคิดจากปริมาณผลสดจะพบว่าการแปรรูปมีปริมาณเปลือกลำไยเหลือทิ้งประมาณ 123,846 ตัน

นอกจากนี้การแปรรูปลำไยอบแห้งสีทองจะใช้น้ำในการแปรรูป 1 ลิตร ต่อเนื้อลำไยสด 10-15 กิโลกรัม (แช่ลำไยได้ 3 รอบ) โดยน้ำเสียที่เกิดขึ้นจะถูกเก็บไว้ถึงพักน้ำเสียสำเร็จรูปจากนั้นจะมีรถสูบน้ำเสียมานำน้ำเสียไปบำบัดที่ระบบบำบัดของจังหวัดลำพูนต่อไป ซึ่งลักษณะของของเสียที่เหลือทิ้งจากการแปรรูปจัดเป็นการแปรรูปผลไม้อย่างหนึ่งประกอบไปด้วยของแข็งรวมถึงสารประกอบคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่แสดงดังตาราง 3 ดังนี้

ตาราง 3 คุณสมบัติทางเคมีของเปลือกผลไม้

ชนิด	พารามิเตอร์ (mg/kg หรือ ตามที่ระบุ)					แหล่งที่มา
	TS	VS	COD	C/N	MC (%)	
ลำไย	327,554	317,733	416,603	-	67.20	ัญญาลักษณ์ (2560)
ลิ้นจี่	222,967	211,518	266,640	-	77.70	
มะละกอ	98,840	83,230	165.11	20.41	97.26	Dahunsi et al. (2017)
ส้ม	26,400	86,600	30,080	23.7	-	Anjum, Muzammil et al. (2017)
สับปะรด	12.31%	93.79%	-	42.3	-	Viswanath et al. (1992)
กล้วย	10.68%	86.65%	-	39	-	Bardiya et al. (1996)
ขนุน	6%	83%	78,836	-	-	Vijayaraghavan et al. (2006)
ว่านหางจระเข้	12.49%	8.33%	38,241	34.52	-	Huang, Xinlei et al. (2016)
เงาะ	-	88.1	-	23.1	-	Odedina et al. (2017)

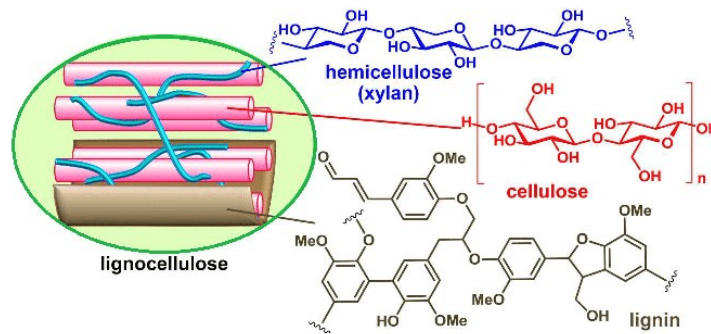
3. วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลสเป็นชีวมวลอินทรีย์พบมากในผนังเซลล์พืชประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งจะเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากไม้และเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชังข้าวโพด ชานอ้อย แกลบ และฟางข้าว และอาจมาจากขยะจากบ้านเรือน การแปรรูปอาหาร รวมถึงมูลของสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยทั่วไปองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสจะมีสัดส่วนของ เซลลูโลสอยู่ประมาณ 30-50% เฮมิเซลลูโลส 15-35% และลิกนิน 5-30% และบางประเภทอาจมีแร่ธาตุอนินทรีย์หรือถ้าอยู่ประมาณ 0.5-8% ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของชีวมวล (Li and Khanal, 2016) ซึ่งเปลือกของผลไม้แต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสที่แตกต่างกันดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกผลไม้ (% โดยน้ำหนักแห้ง)

ชีวมวล	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	แหล่งอ้างอิง
เปลือกส้ม	11.93	14.46	2.17	Orozco et al. (2014)
เปลือกกล้วย	11.45	25.52	9.82	Orozco et al. (2014)
เปลือกมะม่วง	9.19	14.51	4.25	Orozco et al. (2014)
เปลือกทุเรียน	38.05	18.51	2.36	Wanlapa et al. (2015)
เปลือกกระท้อน	15.13	17.98	4.50	Wanlapa et al. (2015)
เปลือกลำไย	45.51	2.09	18.66	Wanlapa et al. (2015)
เปลือกลองกอง	26.09	11.31	4.67	Wanlapa et al. (2015)

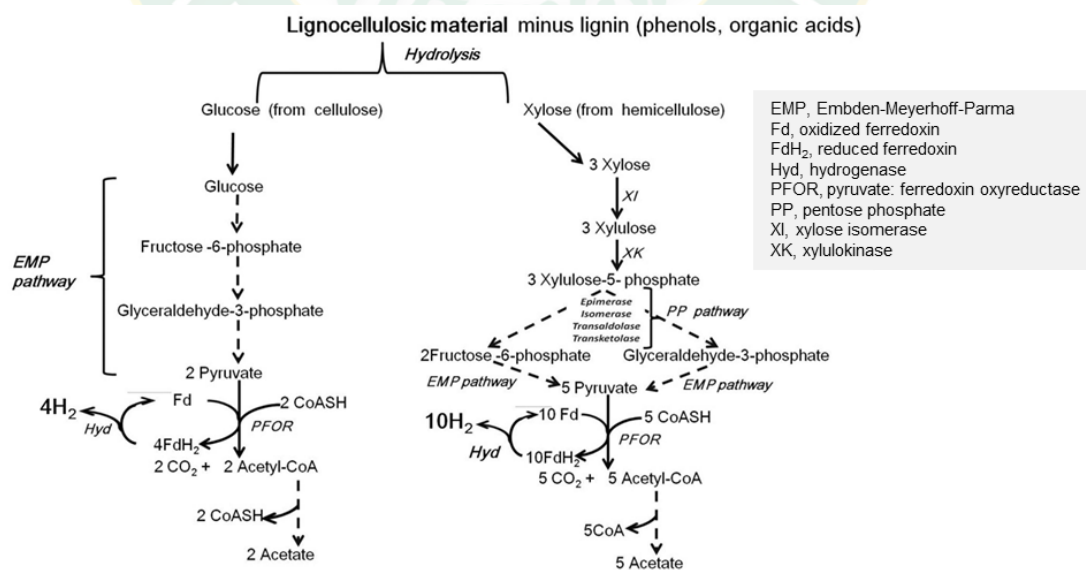
เซลลูโลสเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ที่เกิดจากน้ำตาล D-glucose ต่อกันเป็นสายยาว เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดบีตา (β -1,4 – glycosidic bonds) ทำให้ผนังเซลล์พืชมีความแข็งแรงสามารถป้องกันการแตกของเซลล์ ซึ่งเอนไซม์อะไมเลสจะไม่สามารถย่อยได้ ส่วนเฮมิเซลลูโลสพบอยู่ที่ของผนังเซลล์พืช เป็นสายพอลิเมอร์ที่เกิดจาก D-Xylose ซึ่งมีแขนงข้างเป็นน้ำตาลอะราบินอสหรือน้ำตาลชนิดอื่นมีสายที่สั้นกว่าเซลลูโลส ในขณะที่ลิกนินเป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์อโรมาติกที่ไม่มีรูปผลึกจะเกาะกันอยู่ในชั้นระหว่างเส้นใยทำหน้าที่ยึดเกาะเส้นใยเข้าด้วยกัน โดยมี phenylpropane เป็นโครงสร้างพื้นฐาน ซึ่งลิกนินไม่สามารถย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจนแต่จะสามารถย่อยสลายได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนด้วยเชื้อรากลุ่ม white rot fungi และ moulds (Betts, 2012) โดยโครงสร้างของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้แสดงในภาพ 4



ภาพ 4 สูตรโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสในเซลล์พืช

ที่มา : Kuthi et al. (2016)

การพัฒนาเทคโนโลยีด้านพลังงานต่างๆ ได้มีการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ประเภทลิกโนเซลลูโลสที่หลากหลาย เช่น ไบโอเอทานอล ไบโอไฮโดรเจน และแก๊สชีวภาพ ทั้งนี้ในการนำชีวมวลที่มีองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสสูงในการผลิตแก๊สชีวภาพด้วยองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสมีความซับซ้อนทำให้เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพได้ยากและเกิดขึ้นได้ช้า โดยกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพของจุลินทรีย์จะย่อยสลายเซลลูโลสที่พันธะ β -1,4 – glycosidic bonds ด้วยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูเลส (Cellulitic bacteria) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสส่วนเฮมิเซลลูโลสจะย่อยสลายด้วยแบคทีเรียได้น้ำตาลไซโลส (ภาพ 5) หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นอะซิเตทซึ่งเป็นสับสเตรทที่แบคทีเรียสร้างมีเทนนำไปใช้ผลิตแก๊สชีวภาพซึ่งมีแก๊สมีเทนเป็นองค์ประกอบหลัก



ภาพ 5 กระบวนการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสของแบคทีเรีย

ที่มา : Reginatto and Antônio (2015)

ทั้งนี้กระบวนการผลิตจะต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) เบื้องต้นก่อนที่จะนำไปผลิตแก๊สชีวภาพเพื่อลดปริมาณลิกนินซึ่งเป็นส่วนที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยวิธีที่นิยมใช้ในการปรับสภาพ ได้แก่

- การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical pretreatment) เป็นการทำให้เซลลูโลสแตกออกมาและลดขนาดของวัตถุดิบเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ได้มากขึ้น เช่น การบด การไพล์โรลชีส และการใช้ความร้อน เป็นต้น
- การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (Chemical pretreatment) เป็นการใช้สารเคมีที่เป็นกรดหรือเบสในการทำปฏิกิริยากับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส เพื่อเพิ่มปริมาณการละลายของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกมาได้มากขึ้น
- การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี-ฟิสิกส์ (Physic-Chemical pretreatment) จะเป็นการปรับสภาพโดยใช้กระบวนการทางกายภาพร่วมกับวิธีทางเคมีภายใต้ความดันสูง ซึ่งประสิทธิภาพการปรับสภาพจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายเบสและความร้อนที่เพิ่มขึ้น โดยสารละลายที่นิยมใช้คือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological pretreatment) เป็นการใช้จุลินทรีย์ในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลีสเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้มีโครงสร้างเป็นโซ่ตรง

4. กระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพด้วยระบบที่ไม่ใช้ออกซิเจน

แก๊สชีวภาพ (Biogas) คือ แก๊สที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ซึ่งสามารถเกิดขึ้นเองได้ตามธรรมชาติด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจน องค์ประกอบของแก๊สชีวภาพประกอบไปด้วย มีเทน (CH_4) ประมาณ 50-70 % (V/V) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ประมาณ 20-50 % (V/V) เป็นหลัก นอกจากนี้ยังมีแก๊สไฮโดรเจน (H_2) ออกซิเจน (O_2) ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) และไนโตรเจน (N_2) ด้วยคุณสมบัติของมีเทน สามารถให้พลังงานความร้อนใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงได้ โดยทั่วไปแก๊สชีวภาพ 1 ลูกบาศก์เมตรมีค่าความร้อน 21.5 MJ หรือเท่ากับค่าความร้อนของแก๊สเหลว (Liquefied Petroleum Gas : LPG) 0.46 กก. หรือไฟฟ้า 1.2 kWh และถ่าน 1.6 กก. (Noyola et al., 2006) ด้วยคุณสมบัตินี้จึงมีการพัฒนาระบบการผลิตแก๊สชีวภาพขึ้นมาในระดับ scale ใหญ่ขึ้นเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน โดยมีการใช้สารอินทรีย์ที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมแปรรูปอาหารและการเกษตร ของเสียจากกระบวนการทางเกษตรต่างๆ รวมถึงกากตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งเป็นการบำบัดและใช้ประโยชน์จากของเสียให้คุ้มค่ามากที่สุด เพื่อลดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ผลพลอยได้จากการย่อยสลาย คือ กากตะกอนที่มีสารอาหารคงเหลืออยู่ในสารอินทรีย์ซึ่งอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมสามารถใช้เป็นสารอาหารให้แก่พืชได้

4.1 กระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ

การผลิตแก๊สชีวภาพ เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้อากาศ ซึ่งมี 4 ขั้นตอน ได้แก่ ไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) แอซิโดเจเนซิส (Acidogenesis) แอซิโตเจเนซิส (Acetogenesis) และการสร้างมีเทน (Methanogenesis) ซึ่งจะอาศัยจุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์ให้เป็นแก๊สชีวภาพที่ประกอบด้วยก๊าซมีเทน (CH_4) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึ่งกระบวนการทางเคมีในการเกิดแก๊สชีวภาพประกอบด้วย 4 ขั้นตอนตามลำดับ (ภาพ 7) ดังนี้

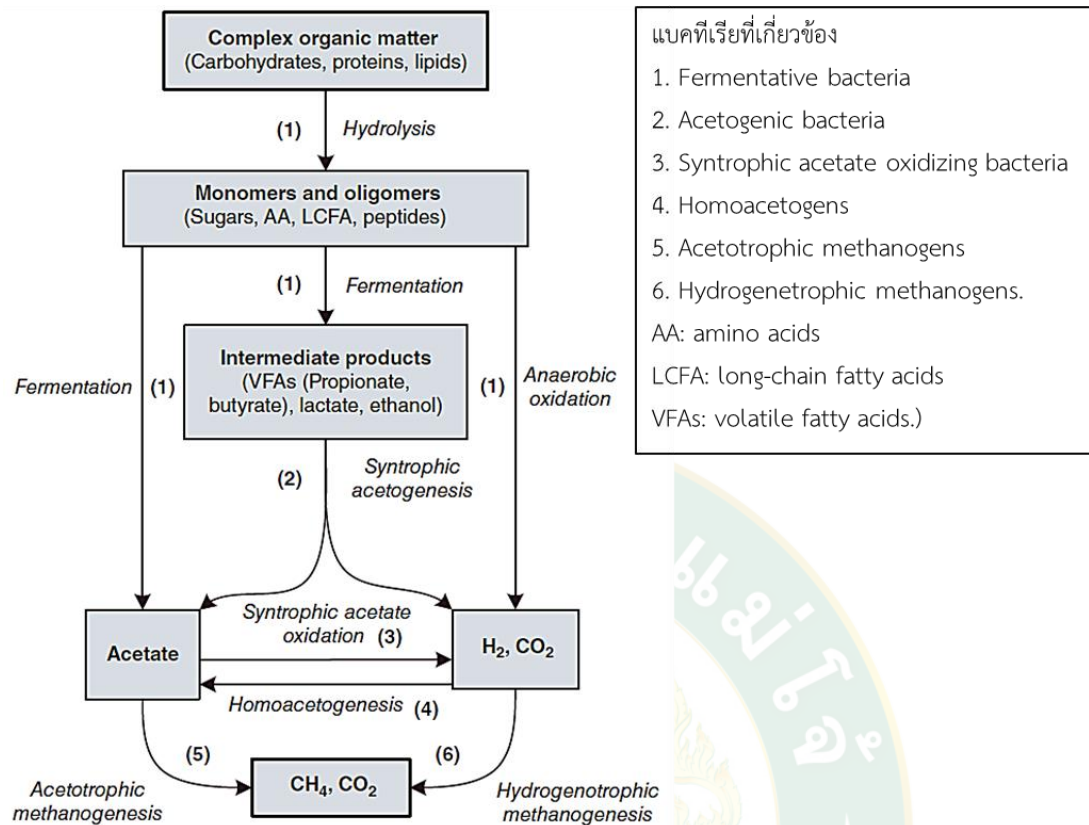
4.1.1 Hydrolysis เป็นปฏิกิริยาที่เปลี่ยนสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ให้กลายเป็นสารอินทรีย์โมเลกุลเล็ก เช่น น้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโน กรดไขมัน และกลีเซอรอล ทำให้ง่ายต่อการลำเลียงเข้าสู่เซลล์ โดยมีแบคทีเรียกลุ่มไฮโดรไลติกปล่อย เอนไซม์ที่มีอยู่นอกเซลล์มาเร่งปฏิกิริยาการแตกตัวของโมเลกุล รวมถึงเอนไซม์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ เซลลูเลส (Cellulases) อะไมเลส (Amylases) โปรตีเอส (Proteases) (ตาราง 4) ซึ่งเกิดจากกระบวนการหมักของแบคทีเรีย

ตาราง 5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของแบคทีเรียในขั้นตอนไฮโดรไลซิสและผลิตภัณฑ์

Enzymes	Substrates	Breakdown products
Proteinase	Proteins	Amino acids
Cellulase	Cellulose	Cellobiose and glucose
Hemicellulase	Hemicellulose	Sugars, such as glucose, xylose, mannose and arabinose
Amylase	Starch	Glucose
Lipase	Fats	Fatty acids and glycerol
Pectinase	Pectin	Sugars, such as galactose, arabinose Polygalacturonic acid

ที่มา: Adekunle and Okolie (2015)

4.1.2 Acidogenesis เป็นการทำงานของแบคทีเรียอีกกลุ่มที่จะย่อยสลายโมเลกุลที่มาจากขั้นตอนไฮโดรไลซิสให้เป็นกรดอินทรีย์ น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยกระบวนการหมักซึ่งสารที่ได้ในกระบวนการนี้จะเป็นสารตัวกลางที่จะถูกย่อยสลายในขั้นตอนถัดไป (intermediate degradation product) ได้แก่ กรดไพรูวิก กรดบิวทริก และสารตั้งต้นโดยตรงของมีเทน ได้แก่ กรดอะซิติก และแก๊สไฮโดรเจนจากการปล่อยไฮโดรเจนออกของไพรูเวท โดยปริมาณไฮโดรเจนไอออนเป็นตัวกำหนดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา (Adekunle and Okolie, 2015) แบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง



ภาพ 6 กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไม่ใช้ออกาศ
 ที่มา: Li and Khanal (2016)

4.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแก๊สชีวภาพ

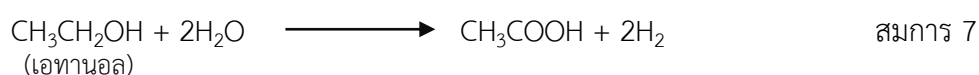
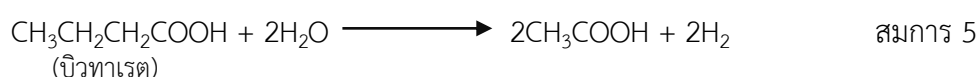
กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน เป็นการอาศัยจุลินทรีย์ที่ใช้สารอื่นเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายแทนออกซิเจน เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ จุลินทรีย์ที่ไม่สร้างมีเทน (non-methanogenic bacteria) และจุลินทรีย์ชนิดสร้างมีเทน (methanogenic bacteria) (Leigh, 1983) โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างมีเทนจะทำการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง เพื่อให้จุลินทรีย์สร้างมีเทนนำไปใช้ได้ เช่น กรดอะซิติก ก๊าซไฮโดรเจน เป็นต้น

4.2.1 กลุ่มจุลินทรีย์ชนิดไม่สร้างมีเทน (non-methanogenic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอน hydrolysis, acidogenesis และ acetogenesis สามารถเจริญได้ใน pH ช่วง 4.0-6.5 โดยมีทั้งพวกที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะไร้ออกซิเจนเท่านั้นหรือในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน มีอัตราการเจริญที่รวดเร็ว สามารถเพิ่มจำนวนได้ 2 เท่าภายในเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ fermentative bacteria และ acetogenic bacteria ซึ่งแบคทีเรีย

Fermentative bacteria มีหน้าที่ในขั้นตอน hydrolysis และ acidogenesis ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococcus*, *Enterobacteriu*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus* และ *Flavobacterium* (Ali Shah et al., 2014) เมื่อดำเนินระบบในสภาวะที่อุณหภูมิสูง (thermophilic temperature) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยมีช่วงอุณหภูมิ 55-60 °C ส่วนปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือสารตั้งต้น (substrate) และความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจน (hydrogen partial pressure) โดยในสภาวะที่มีความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนต่ำ (low hydrogen partial pressure) แบคทีเรียจะผลิตอะซิเตท ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา แต่ในสภาวะที่มีความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนสูง (high hydrogen partial pressure) แบคทีเรียจะผลิตสารพวกโพรพิโอเนท แลคเตทบิวทิเรท และเอทานอล (Adekunle and Okolie, 2015)

แบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในขั้นตอน Acetogenesis คือ Acetogenic bacteria ในกระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนจะมีการผลิตกรดอินทรีย์จากแบคทีเรียสร้างกรดซึ่งบางชนิดจะมีขนาดโมเลกุลใหญ่ซึ่งแบคทีเรียชนิดสร้างมีเทนใช้ไม่ได้ จึงต้องมีแบคทีเรียอีกกลุ่มที่สามารถนำสารเหล่านั้นมาเปลี่ยนให้เป็กรดอะซิติก ก๊าซไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งแบคทีเรียสร้างมีเทนจะสามารถดูดซึมเข้าไปใช้ในเซลล์ได้ โดยสามารถแบ่งแบคทีเรียในขั้นตอนนี้ได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือแบคทีเรียสร้างอะซิเตทและไฮโดรเจน (Hydrogen producing acetogenic bacteria) และแบคทีเรียผลิตอะซิเตทอย่างเดียว (Homoacetogenic bacteria) (Gerardi, 2003)

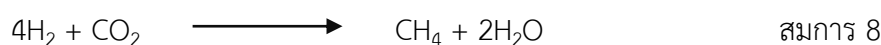
แบคทีเรียที่สร้างอะซิเตทและไฮโดรเจน (Hydrogen producing acetogenic bacteria) จะสามารถย่อยสลายกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีคาร์บอนมากกว่า 2 อะตอม และเอทานอลจากขั้นตอนอะซิโดเจเนซิส (Acidogenesis) ให้เป็นอะซิเตท ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Acetobacterium carbinolium*, *Clostridium thermoaceticum*, *Acetobacterium woodii*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetoanaerobicum naterae* และ *Eubacterium limosum* (Schuchmann and Müller, 2016) โดยปฏิกิริยาการเกิดอะซิเตท แสดงดังสมการ 4-7



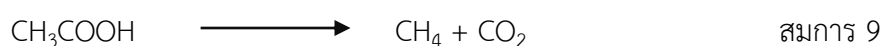
สำหรับแบคทีเรียชนิดที่สามารถผลิตอะซิเตทอย่างเดี่ยว (Homoacetogenic bacteria) จะผลิตอะซิเตทจากสารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอม เช่น ฟอร์เมท ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในขณะที่เดียวกันแบคทีเรียชนิดนี้จะสามารถผลิตทั้งอะซิเตทและบิวทิเรท โดยเมื่อใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนหลายอะตอม เช่น น้ำตาลกลูโคส แลคเตท และไพรูเวทจะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาทั้งอะซิเตทและบิวทิเรท (Saady, 2013) แบคทีเรียที่ทำงานในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Acetobacterium*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* และ *Sporomusa* (Guo et al., 2006)

4.2.2 กลุ่มจุลินทรีย์ชนิดสร้างมีเทน (methanogenic bacteria or methanogen) จุลินทรีย์กลุ่มนี้มีหน้าที่ในขั้นตอน Methanogenesis โดยจะเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน (strictly anaerobic bacteria) สามารถเจริญได้ดีที่ pH ในช่วง 6.8-7.2 มีอัตราการเจริญช้ากว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่อุณหภูมิ 35°C โดยจะมีช่วง Generation time ตั้งแต่ 3 วันไปจนถึง 50 วัน ที่อุณหภูมิ 10°C (Bitton, 2005) และจะใช้สารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน เช่น อะซิเตท หรือสารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอมเท่านั้น เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจน ฟอร์เมท เมทิลลามีน และเมทานอล เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนเป็น methylCoM (CH₃-S-CoM) และจะเปลี่ยนเป็น CH₄ โดยเอนไซม์ methylCoM reductase (Ritchie et al., 1997) โดยทั่วไปสามารถแบ่ง Methanogenic Bacteria ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ Hydrogenotrophic methanogens และ Acetotrophic methanogens โดยอาศัยหลักการใช้สารอาหารที่แตกต่างกัน (Bitton, 2005)

1) Hydrogenotrophic methanogens เป็นแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทนจากก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะได้คาร์บอนมาจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และได้พลังงานจำนวนมากมาจากก๊าซไฮโดรเจนโดยพบว่ามากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ของก๊าซมีเทนในระบบเกิดขึ้นโดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ดังสมการ 8



2) Acetotrophic methanogens เป็นแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทนจากหมู่เมทิลในโมเลกุลอะซิเตทเท่านั้น ดังสมการ 9 โดยพบว่าก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นมากกว่า 70% มาจากการใช้อะซิเตทของแบคทีเรีย

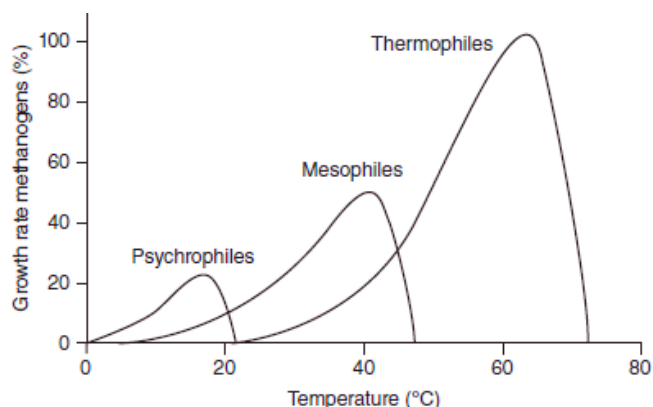


โดยทั่วไปแบคทีเรียในกลุ่มนี้ประกอบด้วย *Methanosarcina* (Smith and Mah, 1978), *Methanotrinx* (Huser et al., 1982) และ *Methanosaeta* (Ritchie et al., 1997) ซึ่งทั้ง 3 กลุ่มจัดเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในการผลิตแก๊สชีวภาพ (Bitton, 2005) และยังพบว่าที่สภาวะ thermophilic (55°C) ในการย่อยสลายร่วมระหว่างขยะชีวภาพ (bio waste) กับสลัดจ์ระบบบำบัดน้ำเสีย (sewage sludge) ซึ่งพบว่ามี *Methanothermobacter* และ *Methanosarcina* เป็นแบคทีเรียชนิด acetotrophic methanogen ชนิดเด่นที่พบอยู่ในถังปฏิกรณ์ (Yu et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีการใช้กากอ้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตแก๊สชีวภาพโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบสองอุณหภูมิที่มีถังปฏิกรณ์ mesophilic (40 °C) และ thermophilic (55 °C) พบว่ามีประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีไอดีสูงสุดถึง 94% และพบว่ามี *Methanothermobacter*, *Coprothermobacter* และ *Thermacetogenium* เป็นแบคทีเรียชนิดเด่นในถังปฏิกรณ์อุณหภูมิสูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสร้างมีเทนที่พบในระบบจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบภายในวัตถุดิบที่ใช้ เช่น การใช้กากอ้อยในการผลิตแก๊สชีวภาพจะพบว่ามีกรดอะซิติกเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียชนิด Acetotrophic methanogens (Oosterkamp et al., 2016)

4.3 ปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมที่ส่งผลการทำงานของแบคทีเรียสร้างมีเทน

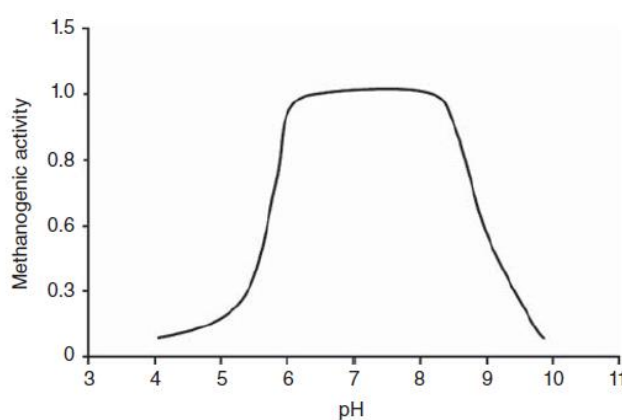
การผลิตแก๊สชีวภาพให้มีประสิทธิภาพทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณจำเป็นต้องควบคุมสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในระบบ โดยจุลินทรีย์ในระบบจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ แบคทีเรียที่ไม่สร้างมีเทนและพวกที่สร้างมีเทน เพื่อให้ระบบทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพการควบคุมระบบจะต้องทำให้จุลินทรีย์นี้อยู่ในสภาวะสมดุลกัน โดยมีรายละเอียดดังนี้

4.3.1 อุณหภูมิ การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ โดยทั่วไปจะมีการใช้ช่วงอุณหภูมิปานกลางที่ 35-38°C (mesophilic) และช่วงอุณหภูมิสูง 48-60°C (thermophilic) รวมไปถึงใช้ช่วงอุณหภูมิต่ำที่ 5-15°C (psychrophilic) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตได้และประสิทธิภาพของระบบ ซึ่งจากภาพ 8 จะเห็นว่าที่อุณหภูมิต่ำแบคทีเรียมีอัตราการเจริญเพียง 20% และเพิ่มขึ้นที่ช่วงอุณหภูมิปานกลางเป็น 55-60% ในขณะที่มีอัตราการเจริญสูงสุดที่ช่วงอุณหภูมิสูงเป็น 80-100% (Lettinga et al., 2001) นอกจากนี้ Kafle และ Kim ได้ทำการหมักของเสียจากเปลือกแอปเปิ้ลร่วมกับมูลสุกรพบว่าระบบมีการผลิตแก๊สชีวภาพที่อุณหภูมิ 55°C มากกว่า 36.5°C (Kafle and Kim, 2013) ซึ่งตามปกติแล้วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการย่อยสลายจะเกิดได้เร็วขึ้นทำให้อัตราการเจริญเพิ่มขึ้นด้วย แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินกว่าที่เซลล์ทำงานได้ ส่วนต่างๆ ของเซลล์จะถูกทำลายจนไม่สามารถกลับคืนสภาพได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียชนิดนั้นๆ ด้วย ซึ่งจะเห็นได้จาก Tian และ คณะ ที่พบว่าแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในขั้นตอน hydrolysis, acidogenesis และ acetogenesis จะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 55°C ในขณะที่แบคทีเรียประเภท Acetotrophic methanogens ได้เข้ามามีบทบาทแทน (Tian et al., 2018)



ภาพ 7 ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรีย
ที่มา : Li and Khanal (2016)

4.3.2 ค่าพีเอช (pH) แบคทีเรียกลุ่ม methanogens มีความอ่อนไหวต่อค่าพีเอชมากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นในระบบ ทำให้สามารถแบ่งช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในระบบออกเป็น 2 ช่วงคือ ช่วง 5.5-6.5 เป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม acidogens และที่ช่วง 7.8-8.2 จะเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม methanogens ในขณะที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อระบบผลิตแก๊สชีวภาพจะอยู่ที่ 6.8-7.4 จากภาพ 9 จะเห็นว่าแบคทีเรียกลุ่ม methanogen สามารถเจริญได้ดีในช่วง pH เป็นกลาง แต่จะลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้นเป็น 8 ซึ่งจะทำให้ NH_3 เปลี่ยนรูปเป็น NH_4^+ โดย NH_4^+ จะเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรีย (Dague, 1991) นอกจากนี้ค่าพีเอช อาจลดลงได้เมื่อปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายหรือปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น ซึ่งแนวทางการแก้ปัญหาคือการลดอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ (OLR) หรือเพิ่มสารเคมีอัลคาไลน์เพื่อปรับ pH ให้สูงขึ้น (Li and Khanal, 2016)



ภาพ 8 ค่าความเป็นกรดต่างต่อกิจกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม methanogen
ที่มา: Li and Khanal (2016)

4.3.3 กรดอินทรีย์ระเหย (volatile fatty acid, VFA) กรดอินทรีย์ระเหยง่ายเกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียพวกสร้างกรดซึ่งกรดที่เกิดขึ้นจะถูกแบคทีเรียพวกสร้างก๊าซมีเทนนำไปใช้เป็นสารอาหารและแหล่งพลังงาน ในการดำเนินระบบปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยจะมีส่วนสำคัญต่อค่าพีเอช ของระบบ คือ เมื่อมีปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยสูงขึ้น pH จะต่ำลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากระบบมีแบคทีเรียสร้างมีเทนน้อยเกินไปหรือแสดงว่าแบคทีเรียสร้างกรดผลิตกรดอินทรีย์ระเหยง่ายได้เร็วเกินไป โดยปกติกรดอินทรีย์ระเหยง่ายในถังบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่ทำงานได้ดี ควรมีค่าประมาณ 50-500 mg (CH_3COOH) / l ได้มีการรายงานของ Pullammanappallil และคณะ ที่พบว่าอัตราของการเปลี่ยนกรดโพรพิโอนิกไปเป็นกรดอะซิติก จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสมดุลของระบบโดยที่ถ้ามีกรดโพรพิโอนิก เหลืออยู่ในถังเป็นปริมาณมากอัตราการเกิดก๊าซก็จะลดลงทำให้ระบบล้มเหลวได้ (Pullammanappallil et al., 2001)

4.3.4 อัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ (Organic Loading Rate, OLR) แสดงถึงปริมาณของสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้าสู่เครื่องปฏิกรณ์ต่อหน่วยขึ้นอยู่กัค่าของแข็งของวัตถุดิบ ทั้งนี้อัตราการบรรทุกสารอินทรีย์มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ในระบบ ซึ่งความเข้มข้นของแบคทีเรียและปริมาณสารอินทรีย์ต้องมีค่าที่เหมาะสมกันในเวลาหนึ่งจึงจะทำให้การย่อยสลายมีประสิทธิภาพ (Paudel et al., 2017) สำหรับสารอินทรีย์ที่มีค่า TS น้อยกว่า 1-2% เช่น น้ำเสียชุมชนและน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอัตราการบรรทุกสารอินทรีย์จะแสดงค่าด้วยค่า COD หรือ $\text{kg COD/m}^3\text{d}$ สำหรับระบบหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนแบบเร็ว (High Rate Anaerobic Digestion) เช่น UASB, anaerobic filter, และ expanded/fluidized bed reactors เป็นระบบที่ใช้หมักของเสียที่เป็นของเหลวจะใช้ OLR 10–40 $\text{kg COD/m}^3\text{d}$ และอาจเพิ่มขึ้นเป็น 100 $\text{kg COD/m}^3\text{d}$ ในระบบ fluidized bed reactors ในขณะที่สารอินทรีย์ที่มีค่าของแข็งสูง เช่น ของเสียทางการเกษตรมูลจากฟาร์มสัตว์ เศษอาหาร และสลัดจ์บ่อเกรอะ เป็นต้น อัตราการบรรทุกสารอินทรีย์จะแสดงด้วยค่าของแข็งระเหยง่ายเป็น $\text{kg VS/m}^3\text{d}$ ทั้งนี้เมื่ออัตราการบรรทุกสารอินทรีย์สูงแสดงให้เห็นว่าวัตถุดิบสามารถย่อยสลายไปได้ต่อปริมาตรของเครื่องปฏิกรณ์นั้นๆ (Li and Khanal, 2016)

4.3.5 ความเป็นด่าง (Alkalinity) สภาพต่างแสดงถึงกำลังบัฟเฟอร์ของระบบซึ่งจะรักษาระบบให้มีพีเอชค่อนข้างคงที่และทนต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันระเหยได้ โดยทั่วไปกระบวนการไม่ใช้ออกซิเจนควรมีสภาพต่างประมาณ 1,500–2,000 mg/l สำหรับย่อยสลัดจ์หรือน้ำเสียเข้มข้นปริมาณสภาพต่างที่พอเพียงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของซีโอดีที่ย่อยสลายได้ นอกจากจะดูสภาพต่างแล้วยังต้องพิจารณาอัตราส่วนของกรดไขมันระเหยในรูปกรดอะซิติกต่อสภาพต่างด้วย (VFA (CH_3COOH) : alkalinity) ถ้าอัตราส่วนของกรดไขมันระเหยต่อสภาพต่างน้อยกว่า 0.4 ถือได้ว่าระบบยังทำงานได้ดี แต่ถ้าอัตราส่วนกรดไขมันระเหยต่อสภาพต่างสูงกว่า 0.8 แล้วแสดงว่าระบบมีบัฟเฟอร์ต่ำ (พลกฤษณ์, 2557)

4.3.6 สารอาหาร (nutrient) สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ สารอาหารหลัก (macronutrient) ได้แก่ คาร์บอน (C) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) กำมะถัน (S) และสารอาหารรอง (micronutrient) ซึ่งเป็นสารอาหารที่แบคทีเรียต้องการในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ เช่น แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) สังกะสี (Zn) และแมงกานีส (Mn) (Li and Khanal, 2016) ทั้งนี้การเสริมสารอาหารสามารถคำนวณได้จากสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารชีวมวลโดยสมมติว่าสูตรของเซลล์จุลินทรีย์เป็นสูตรของ $C_5H_7O_2N$ (Speece, 1964) สำหรับระบบที่มีอัตราภาระบรรทุกสูง (0.8–1.2 kgCOD/(kgVSS d)) ระบบควรมีค่า COD:N:P 350:7:1 ส่วนในระบบที่มีอัตราภาระบรรทุกต่ำ (<0.5 kgCOD/(kgVSS d)) ระบบควรมีค่า COD:N:P 1,000:7:1 (Henze and Harremoës, 1983)

นอกจากนี้สารอินทรีย์ที่มีค่าของแข็งสูง เช่น ชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง เศษอาหาร มูลสัตว์ และอื่นๆ สารอาหารที่จำเป็นจะแสดงในค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) ซึ่งอัตราส่วนของ C/N ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 20–30 (Li and Khanal, 2016) ซึ่งค่า C/N ของสารอินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันดังแสดงในตาราง 6

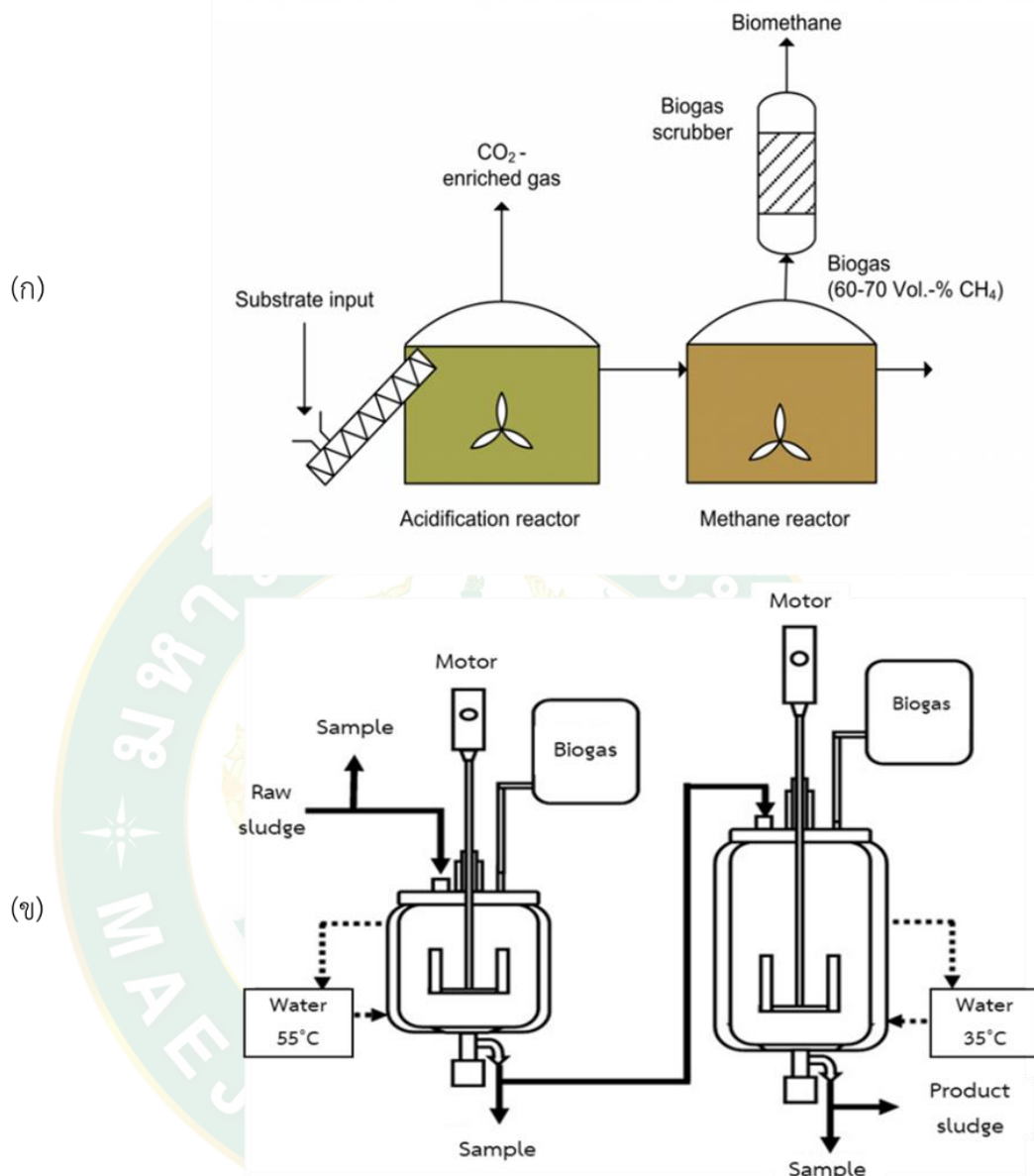
ตาราง 6 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนของสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ

วัตถุดิบ	C/N ratios	แหล่งอ้างอิง
เปลือกมะละกอ	20.41	Dahunsi et al. (2017)
เปลือกส้ม	23.7	Anjum, M. et al. (2017)
เปลือกสับปะรด	42.3	Viswanath et al. (1992)
เปลือกกล้วย	39	Bardiya et al. (1996)
ว่านหางจระเข้	34.52	Huang, X. et al. (2016)
เปลือกเงาะ	32.1	Odedina et al. (2017)
เศษอาหาร	16.89	Haider et al. (2015)
มูลวัว	22.2	Wang et al. (2014)
มูลไก่	9.6	Wang et al. (2014)
มูลวัว	7.4	Zhou et al. (2016)

5. ถังปฏิกรณ์ผลิตแก๊สชีวภาพแบบสองเฟส (Two-phase anaerobic digester)

เป็นระบบที่มีการแยกถังหมักออกเป็น 2 ส่วนหรือ 2 ถัง ตามลักษณะการทำงานของแบคทีเรียแบบไม่ใช้ออกซิเจน โดยในแต่ละถังปฏิกรณ์จะควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมกับแบคทีเรียแต่ละชนิด จึงทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดของเสียของแบคทีเรียแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยส่วนใหญ่สามารถแบ่งออกเป็น 2 ระบบ ได้แก่ ถังหมักแบบเฟสกรด (Acid-phase anaerobic digestion) และถังหมักแบบเฟสอุณหภูมิ (Temperature-phase anaerobic digestion, TPAD) ทั้งสองระบบมีวัตถุประสงค์เพื่อเปลี่ยนของเสียไปเป็นก๊าซชีวภาพ โดยถังหมักแบบเฟสกรดสร้างขึ้นตามหลักการที่แบคทีเรียในกลุ่มสร้างกรดมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าแบคทีเรียในกลุ่มสร้างมีเทน จึงมีการออกแบบให้ถังปฏิกรณ์แรกเป็นถังที่เหมาะสมสำหรับการสร้างกรดของแบคทีเรียชนิดสร้างกรดและถังปฏิกรณ์ที่สองจะออกแบบให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียชนิดสร้างมีเทน ทำให้รูปแบบของถังปฏิกรณ์แบบเฟสกรดถังแรกจะมีขนาดเล็กกว่าถังปฏิกรณ์ที่สองซึ่งเป็นถังปฏิกรณ์ที่แบคทีเรียสร้างมีเทน (Li and Khanal, 2016) ดังแสดงในภาพ 9ก

สำหรับถังปฏิกรณ์แบบ TPAD ได้รับการพัฒนาโดย (Han et al., 1997) จะประกอบด้วยถังปฏิกรณ์สองถังต่อกันเช่นเดียวกับระบบเฟสกรด โดยถังแรกจะควบคุมให้อุณหภูมิอยู่ในช่วงเทอร์โมฟิลิก (Thermophilic temperature) ถังที่สองถูกควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงมีโซฟิลิก (Mesophilic temperature) โดยถังปฏิกรณ์แบบเฟสอุณหภูมิสูงจะมีระยะเวลาเก็บกักที่สั้นกว่าถังปฏิกรณ์แบบเฟสอุณหภูมิปานกลาง (Riau et al., 2010) ซึ่งเป็นการควบคุมเชื้อโรคต่างๆ และเป็นการสร้างอาหารเพื่อป้อนเข้าสู่ถังที่สอง ดังแสดงในภาพ 9ข ทั้งนี้ช่วง thermophilic ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายในขั้นตอน hydrolysis และ acidogenesis มักเป็นขั้นตอนกำหนดอัตราเร็ว (rate-limiting steps) ของ biometanation ในขณะที่ช่วง mesophilic จะช่วยให้ขั้นตอน acetogenesis และ methanogenesis มีความเสถียรมากขึ้นเนื่องจาก mesophilic methanogens มีความต้านทานต่อสารพิษหรือสารยับยั้ง (Borowski, 2015) เมื่อเปรียบเทียบกับถังปฏิกรณ์ย่อยสลายแบบขั้นตอนเดียว (single-stage) พบว่า TPAD มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายของแข็งระเหยง่ายและสามารถกำจัดแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดได้ดีกว่าและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพได้ดี รวมไปถึงยังมีประสิทธิภาพการกำจัด SCOD และมีระยะเวลาเก็บกักน้ำ (HRT) ที่สั้นกว่าการย่อยสลายแบบขั้นตอนเดียว (Akgul et al., 2017)



ภาพ 9 ถังหมักแบบสองเฟส (Two-phase anaerobic digester)

(ก); ถังหมักแบบเฟสกรด (Acid-phase anaerobic digestion), (ข); ถังหมักแบบเฟสอุณหภูมิ
(Temperature-phase anaerobic digester)

ที่มา: Riau et al. (2010)

6. การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์

การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียสามารถทำได้ด้วยโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture based methods) และไม่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture independent methods) (Ghiasian et al., 2017) ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อได้เจริญบนอาหารในระยะเวลาหนึ่งก่อนที่จะมีการสังเกตเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อได้ ทั้งนี้อาจเกิดข้อผิดพลาดในการตรวจสอบได้ง่ายเนื่องจากเชื้อบางชนิดมีลักษณะใกล้เคียงกัน ทั้งยังมีข้อจำกัดในเรื่องของเวลารวมถึงจุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้หรือบางชนิดสามารถเพาะเลี้ยงได้แต่ต้องใช้เวลาานซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้เพียง 1% เท่านั้น หรืออาจสามารถเพาะเลี้ยงได้สูงสุด 15% หากเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม (Amann et al., 1995) ทำให้ไม่สามารถศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคด้านชีวโมเลกุลเพื่อใช้ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียและระบบผลิตแก๊สชีวภาพ รวมถึงสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหนึ่งในกลไกสำหรับอธิบายประสิทธิภาพการทำงานของการผลิตแก๊สชีวภาพและระบบบำบัดน้ำเสีย นอกเหนือจากการใช้วิธีการตรวจสอบทางเคมี เช่น ค่าซีไอดีและบีไอดี เป็นต้น

โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลเป็นการศึกษาในส่วนของยีน Ribosomal RNA ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมาตรวจสอบและจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้ถึงระดับยีน (Gene) เป็นการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้โดยไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำให้ง่ายต่อการศึกษาและสามารถตรวจเชื้อจุลินทรีย์ได้ทุกชนิด ทั้งนี้ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคดังกล่าวนี้อย่างกว้างขวาง เช่น Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) เป็นเทคนิคที่ใช้การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ร่วมกับเทคนิค DGGE ซึ่งใช้วิธีทางอิเล็กโทรโฟรีซิสศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดเบสเท่ากัน โดยการแยกดีเอ็นเอภายใน denaturing gradient gel ที่มีระดับความเข้มข้นจากต่ำไปสูง (Muyzer et al., 1993) เทคนิค Clone library ประกอบด้วยยีนที่โคลนมาจากสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดต้องอาศัย Gene cloning ซึ่งเป็นวิธีการที่จะทำให้สามารถเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (วิชัยและคณะ, 2552) เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) จะใช้ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งเอนไซม์จะมีตำแหน่งจดจำนิวคลีโอไทด์ 4-6 คู่เบส ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ (Bernatzky, 1989) และ Fluorescent in situ Hybridization (FISH) เป็นการใช้ตัวตรวจจับ (probe) ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ไปจับกับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนโครโมโซม เพื่อศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม และยังสามารถตรวจสอบถึงความผิดปกติบนโครโมโซมได้ด้วย (Sekiguchi et al., 1999) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวสามารถตรวจสอบ

ความหลากหลายของกลุ่มชุมชนจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กันในระบบนิเวศ รวมถึงสามารถนำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิตวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เพื่อศึกษาการสืบทอดทางพันธุกรรมได้ ทั้งนี้เทคนิคที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างในลำดับเบสของอาร์เอ็นเอหรือดีเอ็นเอโดยจะจัดแบ่งความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ออกมาเป็นกลุ่มตามความแตกต่าง (Profile หรือ Pattern) ซึ่งอาจเรียกว่าเป็นเทคนิคการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) (วศิตลา, 2553) ทำให้สามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมต่างๆได้ รวมถึงสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย โดยยีนอาร์เอ็นเอไรโบโซม (Ribosomal RNA; rRNA) เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับโมเลกุลไรโบโซมมีอยู่ในแบคทีเรียทุกชนิดเป็นเหมือนยีนลายเซ็น (signature gene) จะมีความแตกต่างในแบคทีเรียแต่ละชนิด และจะมีบางช่วงของสายไพรเมอร์ (primer) ของยีน rRNA เหมือนกัน ในแบคทีเรียทุกชนิด ช่วงที่เหมือนและแตกต่างกันของลำดับเบสนี้สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียได้ (Chen et al., 2010)

rRNA ในเซลล์โปรคาริโอตประกอบด้วยโมเลกุล rRNA 3 ชนิด ได้แก่ 23S rRNA 16S rRNA และ 5S rRNA โดยทั่วไปนิยมใช้ยีน 16S rRNA เนื่องจากมีขนาดที่เหมาะสม (ประมาณ 1500 คู่เบส) ในขณะที่ยีน 23S rRNA มีขนาดที่ยาวเกินไป (ประมาณ 2900 คู่เบส) ซึ่งจะให้ข้อมูลที่สมบูรณ์แต่มีความยากต่อการวิเคราะห์ที่สูงและอาจเกิดการผิดพลาดได้ง่าย ส่วนยีน 5S rRNA มีขนาดที่สั้นเกินไปเพียง 120 คู่เบส ทำให้ข้อมูลที่ได้มีความเชื่อมั่นต่ำจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาศึกษา จะเห็นได้ว่ายีน 16S rRNA มีขนาดที่เหมาะสมและเพียงพอที่จะใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียได้ (Janda and Abbott, 2007)

จะเห็นว่าแบคทีเรียทุกชนิดประกอบด้วยยีนในการสังเคราะห์ไรโบโซม และมีหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งโปรตีนที่ได้จากการสังเคราะห์จะสร้างเป็นแบบเดิม ทำให้แต่ละช่วงวิวัฒนาการมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก นอกจากนี้ยังมีบริเวณอนุรักษ์และบริเวณที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของจุลินทรีย์จึงทำให้ลำดับเบสของยีนของ rRNA สามารถนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้

7. การศึกษาแบคทีเรียในระบบผลิตแก๊สชีวภาพด้วยเทคนิค PCR-DGGE

โดยเทคนิค PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนขงยีน 16S rRNA โดยการใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมของแต่ละชนิดของแบคทีเรีย (ตาราง 7) ด้วยเทคนิค PCR และขั้นตอนต่อมาเป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการเสถียรภาพของดีเอ็นเอสายคู่ด้วยเทคนิค DGGE จะทำให้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสยาวเท่ากันแต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันสามารถแยกได้ด้วยเทคนิคนี้ ดังนั้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR จะวิ่งบนเจลในระยะทางที่ไม่เท่ากัน (Ercolini, 2004)

7.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

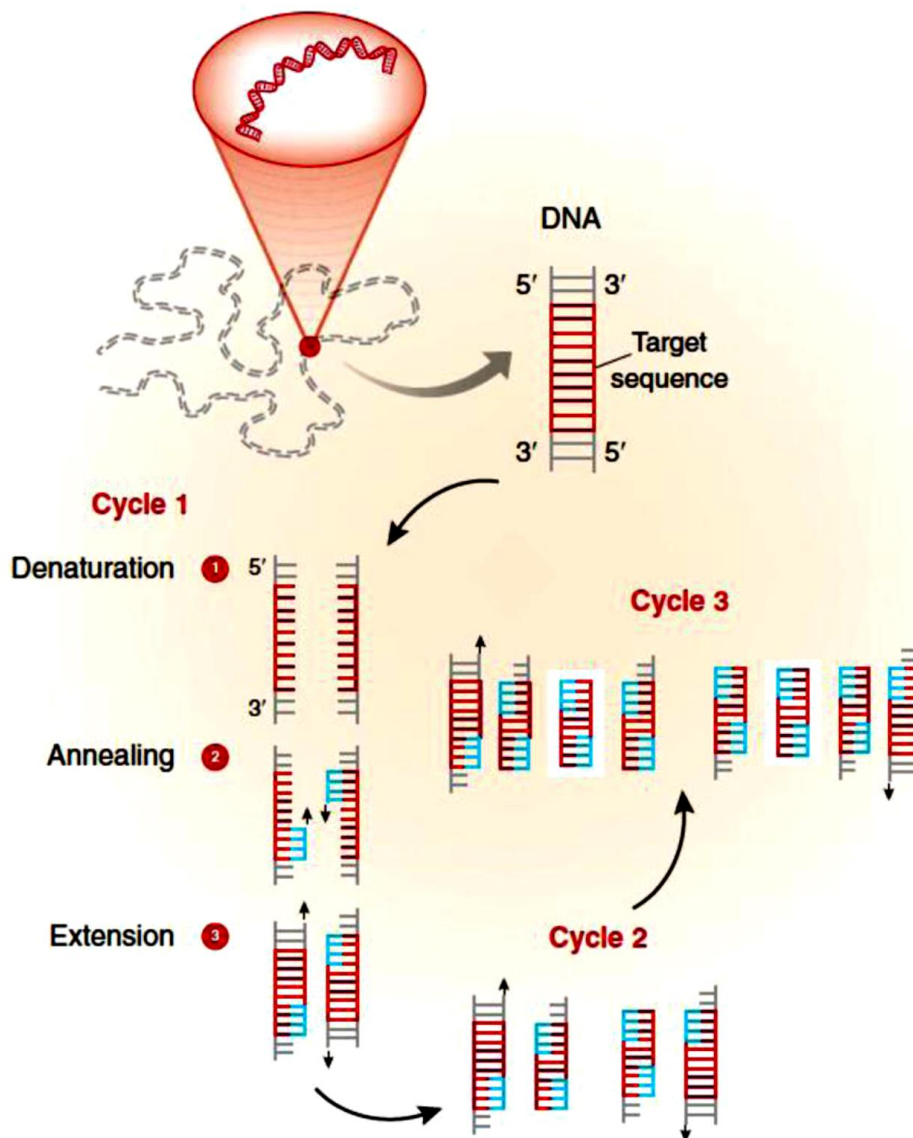
เป็นเทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอภายในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่จากดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ในปริมาณมากและยังได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เหมือนสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ทุกประการ ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงและมีความสำคัญมากในการทำงานวิจัยทางด้านชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) และการสร้าง DNA probe เป็นต้น (อาภรทิพย์, 2556) โดยในปฏิกิริยาประกอบไปด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) บัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (PCR Buffer) นิวคลีโอไทด์ (deoxynucleotides) ไพรเมอร์ (Primers) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ซึ่งทำหน้าที่เป็น co-factor ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase และเอนไซม์ DNA Polymerase ชนิดทนความร้อน (Taq DNA polymerase) เมื่อผสมส่วนประกอบต่างๆแล้วจะนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องเทอร์มอลไซเคิลเลอร์ (thermocycler หรือ PCR machine) โดยมีขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

1) Denaturing step เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ (สภาพ Native DNA) ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆ จนกลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 90-95 °C

2) Annealing step เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ และใส่ไพรเมอร์ลงไปในปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดการเกาะแบบเข้าคู่กันของเบส (Complementary base pair) ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Template DNA) โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 37-60 °C

3) Extension step เป็นขั้นตอนการใส่ DNA polymerase ลงไปในระบบเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่หรือเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอให้มากขึ้นโดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 72-75 °C

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ ให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นแม่แบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และเมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบ จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวนมากดังแสดงในภาพ 10 นอกจากนี้ยังสามารถนำ PCR product มาทำการตรวจสอบด้วยการแยกด้วยไฟฟ้าโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) ซึ่งระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้



ภาพ 10 ปฏิกิริยาของการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

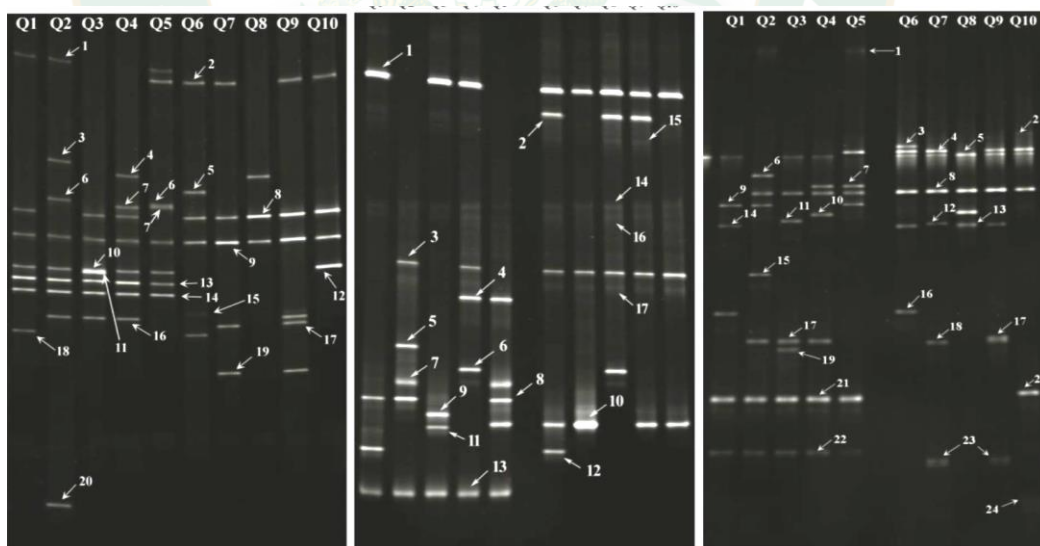
ที่มา : Garibyan and Avashia (2013)

ตาราง 7 เพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่เรียสร้างมีเทนด้วยเทคนิค PCR-DGGE

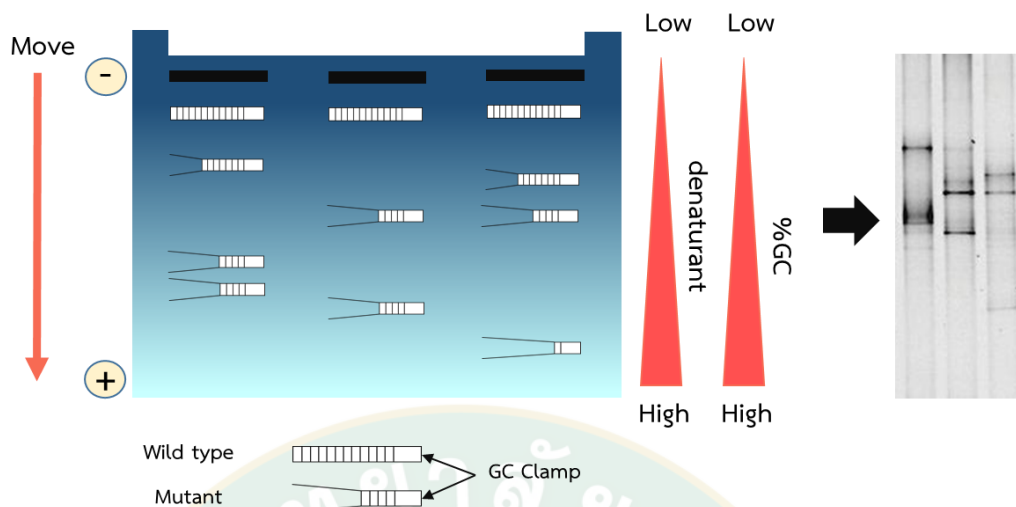
Primer (5'-3')	Sample	Target	Reference
mcrA-F (GGTGGTGMGGATTACACARTAYGCWACAGC)	biowaste and Sewage sludge	methanogen	Yu et al. (2014)
mcrA-R (TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT)	sewage sludge	bacteria	Pervin et al. (2013)
27F (TTTGATCCTGGCTCAG)	food wastewater	bacteria	Jang et al. (2015)
1492R (GGTTACCTTGACGACTT)	food wastewater	archaeal	Jang et al. (2015)
Bac27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)	sewage sludge	archaeal	Kim et al. (2015)
Bac541R (ACWTTACCGGGCTGCTGG)	sewage sludge	archaeal	Kim et al. (2015)
Arc344F (CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA)	sewage sludge	archaeal	Kim et al. (2015)
Arc927R (CCCCCAATTCCTTTAAGTTTC)	sewage sludge	archaeal	Kim et al. (2015)
ARC787F (ATTAGATACCCSBGTTAGTCC)	sewage sludge	archaeal	Kim et al. (2015)
1059R (GCCATGCACCCWCCTCT)	sewage sludge	archaeal	Kim et al. (2015)
357F (CCTACGGGAGGCAGCAG)	sewage sludge	archaeal	Kim et al. (2015)
517R (ATTACCGCG-GCTGCTGG)	sewage sludge	archaeal	Kim et al. (2015)
A109F (ACKGCTCAGTAACACGT)	sewage sludge	archaeal	Kim et al. (2015)
A912R (GTGCTCCCCCGCCAATTCCTTTA)	sewage sludge	archaeal	Kim et al. (2015)
ARC344F (ACGGGGYGCAGCAGCGCGGA)	sewage sludge	archaeal	Kim et al. (2015)
519R (GWATTACCGGGKGGCTG)	sewage sludge	archaeal	Kim et al. (2015)

7.2 หลักการตรวจสอบความหลากหลายของแบคทีเรียด้วยเทคนิค DGGE

เทคนิค DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ได้เข้ามามีบทบาทในการวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในเชิงเปรียบเทียบโครงสร้างและรูปแบบของความหลากหลายของกลุ่มจุลินทรีย์โดย DGGE เป็นเทคนิคที่อาศัยสารเคมีที่สามารถทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกออกเป็นสายเดี่ยวได้ (denaturants) ซึ่งความเข้มข้นของ denaturants ที่ใช้จะขึ้นอยู่กับลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 16S rRNA โดยพันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมต่อกันระหว่างคู่เบส G และ C (พันธะสาม) จะมีความเสถียรมากกว่าพันธะที่เชื่อมกันของคู่เบส A และ T (พันธะสอง) ทำให้คู่เบส A และ T เสียสภาพได้ง่ายกว่าเมื่อมีสารเคมีเข้ามาทำลายพันธะ (Abed and Grötzschel, 2005) ทั้งนี้ DGGE gel (polyacrylamide gel) สารที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพโดยทั่วไปนิยมใช้ formamide และ urea ซึ่งจะมีความเข้มข้นแตกต่างกันจากความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง เมื่อมีการใช้เทคนิค electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าค่าหนึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอที่มีจำนวนคู่เบสเท่ากันแต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันสามารถแยกได้โดยเทคนิคนี้ และยังทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอหลายแถบบน polyacrylamide gel ภายในตัวอย่างเดียวกัน (ภาพ 11) ซึ่งมีกลไกการแยกสายดีเอ็นเอได้แสดงดังภาพ 12



ภาพ 11 ตัวอย่างการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบน polyacrylamide gel
ที่มา : Lv et al. (2017)



ภาพ 12 ลักษณะการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอบน Polyacrylamide gel

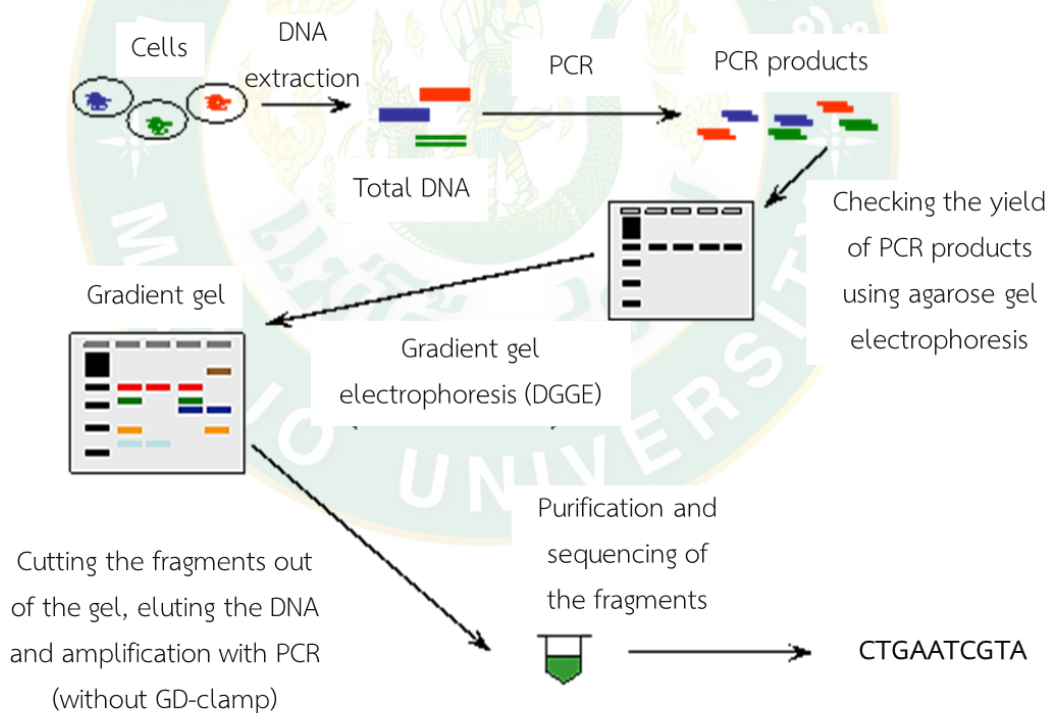
จากหลักการข้างต้นจะเห็นว่าเทคนิค PCR-DGGE สามารถนำมาศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียได้ โดยจะเริ่มต้นจากการนำตัวอย่างมาทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ที่ตำแหน่ง 16S rRNA ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับกลุ่มแบคทีเรียโดย forward primer จะมีการเติมส่วนของ GC-clamp ที่บริเวณปลาย 3' เพื่อให้มีการแยกสายดีเอ็นเอได้ไม่สมบูรณ์ (Myers and Evans, 1985) จากนั้นจึงนำตัวอย่างมาตรวจสอบความหลากหลายของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DGGE บน Polyacrylamide gel และนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดังภาพ 13 ซึ่งได้มีการประยุกต์ใช้ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมหลายแหล่ง เช่น การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในน้ำ ดิน พืช และสัตว์ รวมถึงใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เป็นต้น

ข้อดีของ DGGE

- ใช้ศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ได้อย่างกว้างขวางโดยไม่ต้องมีการเพาะเลี้ยงเชื้อและคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Giraffa and Neviani, 2001)
- สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ชนิดเด่นที่อยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกันได้อย่างรวดเร็ว (Sanz and Köchling, 2007)
- สามารถศึกษาอาการบาดเจ็บหรือพฤติกรรมของจุลินทรีย์ได้ เช่น ในระยะ viable but non-cultivable (VNA) state (Giraffa and Neviani, 2001)

ข้อเสียของ DGGE

- อาจเกิดความผิดพลาดจากเทคนิค PCR เช่น เกิดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์ที่ตายแล้ว (Giraffa and Neviani, 2001)
- ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แยกได้จาก DGGE มีขนาดสั้นประมาณ 200-600 คู่เบส ทำให้ยากต่อการนำไปสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ (phylogenetic) และไม่สามารถนำไปออกแบบเป็นไพรเมอร์ในการทดลองครั้งต่อไปได้ (Sanz and Köchling, 2007)
- เมื่อมีการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์รวมกันอยู่ อาจเกิด heteroduplex ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยสายดีเอ็นเอของจุลินทรีย์สายหนึ่งจะไปจับกับสายดีเอ็นเอของจุลินทรีย์อีกสายพันธุ์หนึ่ง (Aquilanti et al., 2007)
- ไม่สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความยาวมากกว่า 500 คู่เบส (Giraffa and Neviani, 2001)



ภาพ 13 แผนภาพขั้นตอนการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE

ที่มา: Kaksonen (2006)

8. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาของกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูงรวมถึงการใช้ประโยชน์จากสลัดจ์บ่อเกรอะเพื่อการผลิตแก๊สชีวภาพ โดยการศึกษานิยมใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อติดตามและตรวจสอบกลุ่มชุมชนของแบคทีเรียที่มีผลต่อประสิทธิภาพต่อการบำบัดน้ำเสียและการผลิตแก๊สชีวภาพในระบบซึ่งได้มีการใช้เทคนิคที่หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เทคนิค PCR-DGGE ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาถึงประสิทธิภาพของถังปฏิกรณ์ไร้อากาศแบบ Temperature-phase anaerobic digestion โดยในที่นี้จะแสดงถึงงานวิจัยที่สำคัญที่มีบทบาทในการกำหนดขอบเขตของการดำเนินงานวิจัยในข้อเสนอโครงการนี้ ดังนี้

นริรัตน์ (2552) ศึกษาประสิทธิภาพของระบบบำบัดสิ่งปฏิกูลในการกำจัดจุลินทรีย์และปรสิตรด้วยการใช้บ่อหมักกรางร่วมกับบ่อฝักตบขวาและระบบบึงประดิษฐ์เป็นระยะเวลา 6 เดือนตลอดการเดินระบบ ซึ่งได้ทำการทดลองจุลินทรีย์ดัชนี คือ แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliforms) ฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal coliforms) และโคลิฟาจ (Coliphages) ทำการศึกษาด้วยวิธี MPN และการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Double Agar Layer method โดยใช้ *E.coli* เปนโฮสต์ รวมถึงตรวจหาไข่พยาธิ ผลการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์ม และโคลิฟาจเฉลี่ยที่ 2.79 3.59 logMPN และ 4.40 logCFU ตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังพบว่าค่าพีเอช ค่าการนำไฟฟ้า และปริมาณของแข็งละลายไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดจุลินทรีย์ในระบบ นอกจากนี้ยังพบพยาธิในตะกอนจากการบำบัดสิ่งปฏิกูลอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ ไข่พยาธิตัวตืด ไข่พยาธิปากขอ และไข่พยาธิใบไม้ตับ และพบตัวอ่อน 2 ชนิด ได้แก่ ตัวอ่อนพยาธิไส้ไม้ และตัวอ่อนพยาธิปากขอ

ศุภัญญะและคณะ (2557) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพจากสิ่งปฏิกูลในระดับห้องปฏิบัติการโดยทดลองในขวดเซิร์มขนาด 120 ml ใช้ตะกอนจุลินทรีย์จากระบบ UASB ของโรงงานแป่งมันสำปะหลังที่มีค่า MLVSS 2 g/l และเติมสิ่งปฏิกูลที่ค่าซีไอดีเท่ากับ 1000 2000 4000 และ 6000 mg/l ดำเนินระบบที่ 37°C เป็นเวลา 60 วัน ซึ่งผลการทดลองพบว่าที่ค่าซีไอดีเข้าเท่ากับ 6000 mg/l เมื่อดำเนินระบบเป็นระยะเวลา 45 วัน สามารถกำจัดค่าซีไอดีได้สูงสุดเท่ากับ 65.05±0.8% และพบว่าปริมาณแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามความเข้มข้นของค่าซีไอดีและระยะเวลาที่ใช้ นอกจากนี้ยังตรวจพบพยาธิและไข่พยาธิที่ระยะเวลา 5-30 วัน ได้แก่ พยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrin*) พยาธิตัวตืด (*Teania spp.*) และพยาธิไส้เดือน (*Ascaris lumbricoides*) ในขณะที่ระยะเวลา 35-60 วัน ไม่มีการตรวจพบพยาธิและไข่พยาธิ หลังจากนั้นนำสภาวะที่ได้ไปใช้จริงในระบบ Covered Lagoon แบบไร้อากาศปริมาตร 8 m³ ที่ระยะเวลา 45 วัน ทำการเติมสิ่งปฏิกูลทุกวันวันละ 88 l ที่ความเข้มข้นของค่าซีไอดีเท่ากับ 6,000 mg/l โดยทำการทดลองแบบกะ (Batch) พบว่ามีประสิทธิภาพกำจัดค่าซีไอดีเท่ากับ 53.17±0.70% เกิดแก๊สชีวภาพ 2.15±1.10 m³ และปริมาณแก๊สมีเทนสูงถึง 67.17±1.3% ส่วนตะกอนพบว่า

ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม $1.71 \pm 0.03\%$ $0.62 \pm 0.04\%$ และ $0.65 \pm 0.02\%$ ตามลำดับ และยังตรวจพบพยาธิและไข่พยาธิที่ระยะเวลา 5-25 วัน โดยตรวจพบ *Entamoeba coli*, *Opisthorchis viverrini* *Teania* spp. และ *Ascaris lumbricoides* ในขณะที่ระยะเวลา 30-45 วัน ไม่มีการตรวจพบพยาธิและไข่พยาธิ

Lin and Chou (1998) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของระบบบำบัดสลัดจ์บ่อเกรอะแบบใช้อากาศภายในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ถังปฏิกรณ์ขนาด 8 ลิตร เติมน้ำที่อุณหภูมิห้องที่เวลาเก็บกักตะกอน (SRT) 30 20 15 10 และ 5.3 วัน ทำการเติมสลัดจ์บ่อเกรอะเข้าระบบวันละครั้ง พบว่าสามารถบำบัดสลัดจ์บ่อเกรอะได้ตลอดเวลาเก็บกักตะกอน แต่ที่เวลาเก็บกักตะกอน 10 วัน ที่ภาระบรรทุกอินทรีย์ (organic loading) $464 \text{ gCOD/m}^3\text{d}$ หรือที่ของแข็งระเหยเท่ากับ $1.462 \text{ kg/m}^3\text{d}$ มีประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีโอดี 80.4% และของแข็งระเหยลดลง 30% ซึ่งภายใต้สภาวะนี้สามารถกำจัดค่าซีโอดี แอมโมเนีย และฟอสฟอรัสทั้งหมดได้เท่ากับ 373, 26.1 และ $0.7 \text{ g/m}^3\text{d}$ ตามลำดับ

Lin et al. (2000) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนของระบบ UASB ด้วยการหมักร่วมระหว่างน้ำชะขยะและสลัดจ์บ่อเกรอะ ซึ่งมีการดำเนินระบบที่ $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ โดยทำการผสมน้ำชะขยะกับสลัดจ์บ่อเกรอะในอัตราส่วนของค่าซีโอดีที่ 3:1 2:1 และ 1:1 และอัตราส่วนของสารอินทรีย์มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการทดลอง พบว่าที่อัตราส่วนของค่าซีโอดีเท่ากับ 1:1 เวลาเก็บกักน้ำ 15 วัน และเวลาเก็บกักตะกอน $6.73 \text{ kgCOD/m}^3\text{d}$ มีประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีโอดีทั้งหมด (TCOD) ค่าซีโอดีแขวนลอย (SCOD) ของแข็งทั้งหมด (TS) ของแข็งระเหยได้ (VS) กรดไขมันระเหยทั้งหมด (TVFA) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (TP) แอมโมเนียไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) คาร์โบไฮเดรตและโปรตีน เท่ากับ 42.2%, 58.1%, 45.3%, 68.2%, 73.4%, 44.3%, 47.8%, 53.7% และ 44.4% ตามลำดับ

Sung and Santha (2003) ศึกษาประสิทธิภาพของระบบ Temperature-Phased Anaerobic Digestion (TPAD) ในการหมักมูลวัวที่มีของแข็งสูง โดยเดินระบบที่เวลาเก็บกักเป็นเวลา 14 วัน ที่ค่าของแข็งของมูลวัวในช่วง 3.46-14.54% ผลการทดลองพบว่าภายหลัง 14 วัน ระบบสามารถกำจัดของแข็งระเหยได้สูงสุดที่ 42.6% เมื่อปรับค่าโหลดสารอินทรีย์ที่ $5.82 \text{ gVS/m}^3\text{d}$ ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมในการดำเนินระบบ พบว่าที่ถังปฏิกรณ์แบบอุณหภูมิสูงผลิตแก๊สชีวภาพได้เกือบ 60% ซึ่งสอดคล้องกับการกำจัดของแข็งระเหยภายในถังปฏิกรณ์ นอกจากนี้สลัดจ์ที่ระบายออกจากระบบทุกสภาวะที่ทำการทดลองมีปริมาณเชื้อโรคไม่เกินค่าที่กำหนดโดย U.S.EPA สำหรับ Class A Biosolids

Yen-Phi et al. (2010) ศึกษาแบคทีเรียก่อโรคในสลัดจ์บ่อเกรอะจากประเทศเวียดนามโดยใช้สลัดจ์บ่อเกรอะจำนวน 20 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ความลึก 10 เซนติเมตรจำนวน 2 ตัวอย่าง (untreated septage) ส่วนอีก 18 ตัวอย่างถูกเก็บที่ช่วงตรงกลางของสลัดจ์บ่อเกรอะใน

บ่อเกรอะจากนั้นนำตัวอย่างมาตรวจสอบจำนวนเชื้อโรคและแบคทีเรียบ่งชี้ ผลการทดลองพบว่ามี *Escherichia coli* และ *Enterococcus* spp. อยู่ในทุกตัวอย่าง รวมถึงยังพบเฟจอยู่ 80% ของตัวอย่าง ในขณะที่พบ *Salmonella* spp. ในสลัดจ์บ่อเกรอะที่ไม่ผ่านการบำบัดอยู่ 70% และสลัดจ์บ่อเกรอะ 60% ซึ่งความเข้มข้นของเฟจและแบคทีเรียที่พบในสลัดจ์บ่อเกรอะที่เก็บไว้ในบ่อเกรอะมีค่าสูงเกินที่คาดไว้ นอกจากนี้ในสลัดจ์บ่อเกรอะที่ไม่ผ่านการบำบัดยังพบพยาธิอยู่ 95% โดยเฉลี่ยที่ 450 ova/l และตรวจพบในสลัดจ์บ่อเกรอะทุกตัวอย่างโดยเฉลี่ย 16,000 ova/l และพบหนอนพยาธิ 12 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีหนอนพยาธิอยู่ในตัวอย่างสลัดจ์บ่อเกรอะมากกว่าตัวอย่างอุจจาระ และพบว่าหนอนพยาธิมีความถี่ของสายพันธุ์ที่ 10%- 50% โดยจะพบ *Ascaris lumbricoides* เป็นส่วนใหญ่

Papadopoulos et al. (2011) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดแบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์มในสลัดจ์บ่อเกรอะด้วยระบบบ่อกักเก็บที่ปกคลุมด้วยแหแบบเต็มรูปแบบ ระบบประกอบด้วยบ่อสามชุด โดยปริมาณการเติมสลัดจ์ในฤดูหนาวอยู่ที่ 36 m³/d และฤดูร้อน 60 m³/d ส่งผลให้มีเวลาเก็บกับน้ำทั้งหมดเป็น 88 และ 58 วัน ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม แหที่เจริญเติบโตได้ดีในฤดูร้อนและยังคงเจริญต่อไปในฤดูหนาว ซึ่งในระหว่างการทดลองไม่มีการเก็บแหขึ้นมาจากบ่อทำให้การตรวจสอบประสิทธิภาพการบำบัดจึงได้มีการเก็บเกี่ยวพืชตัวอย่าง โดยได้มีการตรวจวัดอุณหภูมิ ค่าพีเอช คลอโรฟิลล์ *Escherichia coli* และ *Enterococci* การเจริญของแหทำให้ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์จาก 924 เป็น 13 µg/l ทำให้เกิดสภาวะเป็นกลางและไม่เป็นพิษในบ่อ ผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์การสลายตัวของเชื้อ *E. coli* และมีแนวโน้มลดลงตามระบบการบำบัด นอกจากนี้ยังพบว่า *Enterococci* ถูกกำจัดได้น้อยกว่า *E. coli* ทั้งนี้จากการศึกษาคุณภาพน้ำที่พบ *E. coli* เท่ากับ 489 และ 1377 cfu/100 ml ในช่วงฤดูร้อนและฤดูหนาวตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ย 99.995±1.46% และ 99.33±3.03% ส่วนปริมาณ *Enterococci* เท่ากับ 88.91±23.1% ในฤดูร้อนและ 94.43±24.45% ในฤดูหนาว โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1058 และ 1404 cfu/100 ml ตามลำดับ

Zuo et al. (2013) ได้ศึกษาผลของการใช้อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์และผลของไหลเวียนไดนามิกส์ต่อขั้นตอน acidogenesis และ methanogenesis โดยถึงหมักไร้อากาศแบบสองเฟสของการหมักเศษผัก โดยทำการทดลองที่ระดับ OLRs ต่างๆ เท่ากับ 1.3, 1.7, 2.1 และ 2.6 gVS/m³d ผลจากการทดลองพบว่าเมื่อ OLR เพิ่มขึ้นจะทำให้กรดไขมันระเหยทั้งหมดที่ถึงปฏิกรณ์ acidogenic ได้เพิ่มขึ้นประมาณ 8500 mg/l และค่าพีเอช ได้ลดลงจาก 6.4 เป็น 5.2 ในขณะที่ปริมาณแก๊สชีวภาพต่อวันและปริมาณแก๊สมีเทนในถังปฏิกรณ์ methanogenic ได้เพิ่มขึ้นจาก 1.2 เป็น 4.4 l/d และ 27.4% เป็น 60.5% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการยับยั้งปฏิกิริยา hydrolysis ในถังปฏิกรณ์ acidogenic เมื่อใช้ OLR ต่ำกว่า 2.6 gVS/m³d แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่ม

สารอินทรีย์เข้าสู่ระบบมากเกินไป (overloading) ซึ่งการหมุนเวียนน้ำทิ้งจะช่วยลดการยับยั้งกรดอินทรีย์ระเหยง่ายและช่วยปรับปรุงการผลิตแก๊สชีวภาพในถังปฏิกรณ์ acidogenic เนื่องจากเป็นผลของการเจือจางและการปรับค่าพีเอช โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ OLR สูงๆ

Yu et al. (2014) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพจากการหมักร่วมระหว่างขยะชีวภาพ (Bio-waste) และกากตะกอนจากน้ำเสีย (Sewage Sludge) และได้ศึกษาโครงสร้างทางชุมชนของแบคทีเรียกลุ่มสร้างมีเทน (methanogenic archaeal) ในเครื่องปฏิกริยาการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนภายใต้อุณหภูมิปานกลาง (35-37 °C) และอุณหภูมิสูง (55-57 °C) และมีการเพิ่มอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ (OLR) ตั้งแต่ 1-10 kgVS/m³d พบว่าที่ OLR ถึงปฏิกรณ์อุณหภูมิสูงมีการผลิตแก๊สชีวภาพสูงสุดและจากการตรวจสอบความหลากหลายของแบคทีเรียพบว่าไม่มีแบคทีเรียสร้างมีเทนกลุ่ม *Methanobacteriales* และ *Methanosarcinales* เป็นแบคทีเรียชนิดเด่นในถังปฏิกรณ์อุณหภูมิทั้งสองเฟส นอกจากนี้ยังพบถึงปฏิกรณ์อุณหภูมิสูงยังพบ *Methanothermobacter* เป็นแบคทีเรียที่โดดเด่นร่วมอีกด้วย

Lv et al. (2016) ศึกษาผลของอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างถังปฏิกรณ์อุณหภูมิสูงและถังปฏิกรณ์อุณหภูมิต่ำของระบบ Temperature-Phased Anaerobic Digestion (TPAD) ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพและกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่อยู่ในระบบ โดยการหมักมูลวัวในเวลาเก็บกัก (HRT) 15 วัน พบว่าเมื่อเติมมูลวัวทิ้งเหลือเข้าไป 10% ของของแข็งทั้งหมดทั้งสองระบบมีประสิทธิภาพการกำจัดของแข็งระเหยได้ใกล้เคียงกันเท่ากับ 36-38% และถังปฏิกรณ์อุณหภูมิสูงสามารถผลิตมีเทนในระหว่างเวลาเก็บกัก 5 และ 7.5 วัน เท่ากับ 0.21-0.22 V/gVS fed อย่างไรก็ตามยังพบว่าที่เวลาเก็บกัก 5 วันสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้ดีกว่าที่เวลาเก็บกัก 7.5 วัน (6.3 และ 4.7 V/m³d) ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพอุณหภูมิต่ำมีการผลิตแก๊สชีวภาพอย่างสม่ำเสมอประมาณ 1.0 V/m³d และจากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้วยเทคนิค qPCR-DGGE พบว่า *Methanosarcina* และ *Methanosaeta* เป็นแบคทีเรียผลิตแก๊สมีเทนที่สำคัญที่สุดในถังปฏิกรณ์อุณหภูมิสูงและถังปฏิกรณ์อุณหภูมิต่ำตามลำดับ ซึ่งการศึกษาด้วยเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลจะช่วยให้เข้าใจถึงถึงกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพที่เป็นปัจจัยสำคัญในการย่อยสลายที่ไม่ใช้ออกซิเจนภายในถังปฏิกรณ์ทั้งสองระบบของ TPAD

Odedina et al. (2017) ได้ทำการผลิตแก๊สชีวภาพจากเปลือกกล้วยและได้เปรียบเทียบศักยภาพการย่อยสลายให้ก๊าซมีเทนระหว่างเปลือกกล้วยสด เปลือกกล้วยสับ เปลือกกับเมล็ดลำไยสับ และเปลือกกับเมล็ดเงาะสับตามวิธีของ Buswell และ Mueller โดยทำการหมักเปลือกกล้วยโดยใช้กระบวนการหมักแบบขั้นตอนเดียวดำเนินการอุณหภูมิที่ 35 °C ควบคุมค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่ 0.41, 0.83, และ 0.62 กก./ม³-วัน และอีกระบบใช้กระบวนการหมักแบบสองขั้นตอน ถังปฏิกรณ์แรกดำเนินการอุณหภูมิที่ 55 °C ส่วนถังที่สองดำเนินการที่ 35 °C ควบคุมอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์

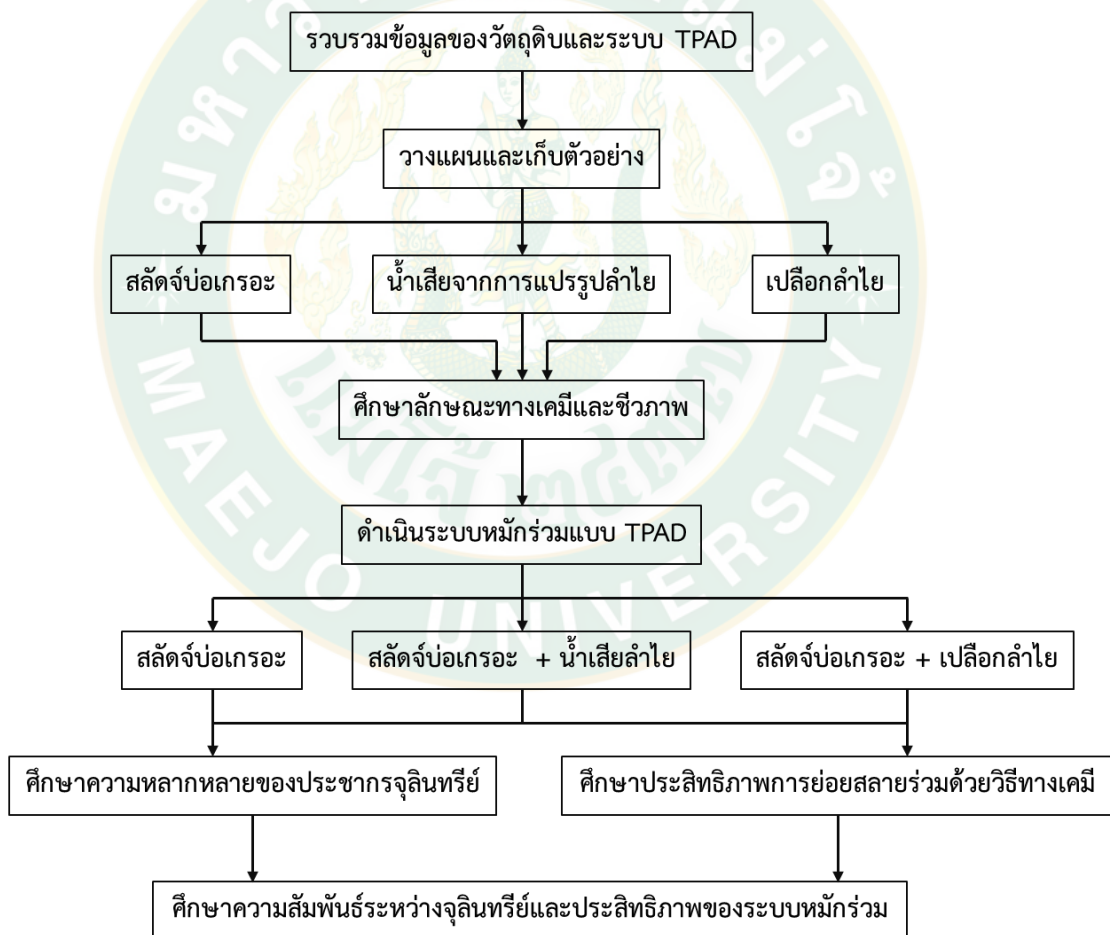
2.07, 4.14 และ 3.11 กก./ม³-วัน โดยทั้งหมดได้ค่าของแข็งที่แตกต่างกันเท่ากับ 1%TS, 2%TS และ 1.5%TS ซึ่งผลการทดลองพบว่าระบบสามารถแก๊สมีเทนจากการทดลองศักยภาพการย่อยสลายให้ก๊าซมีเทนของเปลือกกล้วยบด เปลือกกล้วยสับ เปลือกกับเมล็ดลำไยสับ และเปลือกกับเมล็ดเงาะสับได้เท่ากับ 330.6, 268.3, 234.6 and 193.2 มล.มีเทน/ก.ของแข็งระเหย ตามลำดับ ในส่วนของการหมักเปลือกกล้วยโดยใช้กระบวนการหมักแบบขั้นตอนเดียวที่ระยะเวลาพักเก็บน้ำเสีย 20 วันพบว่าเมื่อใช้ค่าของแข็งทั้งหมด 1.5% ทำให้ระบบผลิตแก๊สชีวภาพได้ดีแต่ระบบได้ล้มเหลวเมื่อใช้ของแข็งที่ 2% และยังพบว่าการใช้กระบวนการหมักแบบสองขั้นตอนดีกว่ากระบวนการหมักแบบขั้นตอนเดียว อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพที่ดีที่สุดของการย่อยแบบสองขั้นตอนคือช่วงที่ใช้ค่าของแข็งเท่ากับ 2% โดยสามารถกำจัดค่าของแข็งระเหยไปได้ 68.5% และให้พลังงาน 2510.9 กิโลจูล/กก. ของแข็งระเหย

Dooms et al. (2018) ได้ศึกษาการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีปริมาณของแข็งสูง ด้วยการใช้อัดหมักแบบสองเฟสชนิดเฟสอุณหภูมิหรือ TPAD ภายในห้องปฏิบัติการ โดยดำเนินระบบในขั้นตอน hyperthermophilic hydrolysis เป็นเวลา 4 วัน ตามด้วยขั้นตอน methanogenesis เป็นเวลา 15 วัน ทั้งนี้ถึงปฏิกรณ์ TPAD ประกอบด้วยถังปฏิกรณ์ 4 หรือ 5 ถัง โดยไม่มีการหมุนเวียน ซึ่งแบ่งออกเป็นถังปฏิกรณ์ hydrolysis จำนวน 2 ถัง (ถังละ 2 วัน) และถังปฏิกรณ์ methanogenesis จะมี 2-3 ถัง (ใช้ HRT ที่ 5+10 หรือ 3×5 วัน) จากนั้นถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ชุด จะมีการใช้อุณหภูมิที่ต่างกันเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของระบบ โดยใช้ 65–37 °C และ 65–55 °C ในถังปฏิกรณ์ของปฏิกรณ์ hydrolysis และ methanogenesis ตามลำดับ ผลจากการทดลองพบว่าระบบมีการผลิตแก๊สมีเทนทั้งหมดเท่ากับ 235±3 mlCH₄STP g/VS ทั้งนี้จากถังปฏิกรณ์ที่ 4 และ 5 สามารถตรวจสอบได้ว่าในสองวันแรกของปฏิกรณ์ hydrolysis ทำให้ hydrolysis yield และ acidification yield สูงขึ้นเป็น 22% และ 13% ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าในสองวันหลัง (2% และ 2% ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนเจนสามารถนำกรดไขมันระเหยไปใช้และผลิตมีเทนที่อุณหภูมิ 55 °C มากกว่า 37 °C และยังพบว่าที่ถังปฏิกรณ์ที่ 4 และ 5 เมื่อมีการลด HRT ลงไป 5 วันทำให้มีการสูญเสียการผลิตแก๊สมีเทนลงเล็กน้อย (11%) อย่างไรก็ตามการใช้ HRT เป็นเวลา 2 วัน และ 10 ที่ปฏิกรณ์ hydrolytic และ methanogenic ตามลำดับ พบว่าระบบสามารถผลิตแก๊สมีเทนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การทดลองเพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพในระบบหมักร่วมของถังปฏิกรณ์แบบ TPAD จำเป็นต้องมีการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของวัตถุดิบ ได้แก่ สลัดจ์บ่อเกรอะ เปลือกลำไย และน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง ซึ่งจะมีการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพด้วยวิธีมาตรฐาน จากนั้นจะได้ศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบควบคู่ไปกับผลของประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์และการผลิตแก๊สชีวภาพจากการหมักด้วยระบบ TPAD โดยมีแผนการศึกษาตามภาพ 14 ดังนี้



ภาพ 14 ขั้นตอนในการทดลองเพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบหมัก

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

- อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับทำปฏิกิริยาในห้องปฏิบัติการทางอนุชีววิทยา
- อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับทำปฏิกิริยาในห้องปฏิบัติการทางเคมี

เครื่องมือ

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ยี่ห้อ Sturdy Industrial
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance) ยี่ห้อ Precisa
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precision Balance) ยี่ห้อ Mettler toledo
- เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ OAKTON
- ตู้ดูดควันไอสารเคมี (Fume Hood) ยี่ห้อ GTech
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) ยี่ห้อ Hettich zentrifugen
- เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle Furnace) ยี่ห้อ CARBOLITE
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ BINDER
- ตู้บ่ม (Incubator) ยี่ห้อ BINDER
- เครื่องทำความเย็น 4 °C (Chiller) ยี่ห้อ SHARP
- เครื่องทำความเย็น -20 °C (Chiller) ยี่ห้อ SANYO
- เครื่องย่อยสาร (Digestion apparatus) เครื่องกำจัดไอกรด (Scrubber) และเครื่องกลั่นสาร (Kjeldhal Distillation Unit) ยี่ห้อ BUSHI
- เครื่องล้างความถี่สูง (Sonicator) ยี่ห้อ CREST
- ไมโครเวฟ (Microwave) ยี่ห้อ SHARP
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet) ยี่ห้อ BIOCYT
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cyclers) ยี่ห้อ Bio-Rad
- ชุดวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ (Bio-Rad)
- เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) ยี่ห้อ Bio-Rad
- เครื่องถ่ายภาพเจลและวิเคราะห์เจล (Gel documentation system) ยี่ห้อ UVP
- เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop) ยี่ห้อ Thermo scientific

2. การศึกษาคุณสมบัติสัลดัจบ่อเกรอะและของเสียจากการแปรรูปลำไย

2.1 การเก็บตัวอย่างวัตถุดิบ

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาในการหมักร่วมประกอบด้วยสัลดัจบ่อเกรอะ (Septage; ST) น้ำเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง (Dried Longan Processing Wastewater; DLW) และเปลือกลำไย (Longan peel; LP) โดยการเก็บตัวอย่างสัลดัจบ่อเกรอะทำได้โดยเลือกสัลดัจบ่อเกรอะที่มีเวลาเก็บกักอย่างน้อย 1 ปีขึ้นไป จากระบบบริการสุขส้วมที่ให้บริการในเขตชุมชนในพื้นที่ต่างๆ ภายในอำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ ในส่วนของตัวอย่างน้ำเสียและเปลือกลำไยจะทำการเก็บตัวอย่างจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชนและบ้านเรือนที่มีการผลิตลำไยอบแห้งภายในจังหวัดลำพูน โดยจะทำการเก็บตัวอย่างในช่วงที่มีการผลิตลำไยอบแห้งตามฤดูกาลในช่วงเดือนมิถุนายน-สิงหาคม ซึ่งตัวอย่างสัลดัจบ่อเกรอะและน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยที่จะนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีจะถูกเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 98% และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อรอนำมาวิเคราะห์พารามิเตอร์ภายในห้องปฏิบัติการสิ่งแวดล้อมต่อไป นอกจากนี้ได้มีการศึกษาลักษณะทางชีวภาพของสัลดัจบ่อเกรอะ ซึ่งจะทำการเก็บไว้ในขวดแก้วเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำมาวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการทันที

2.2 การศึกษาคุณสมบัติของสัลดัจบ่อเกรอะ

การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของสัลดัจบ่อเกรอะเพื่อให้ได้ข้อมูลในเชิงคุณภาพ ทำได้โดยการนำตัวอย่างสัลดัจบ่อเกรอะที่เก็บมาแล้วจากระบบบริการสุขส้วมมาทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี ทั้งนี้สัลดัจบ่อเกรอะเป็นของเสียที่มาจากการย่อยสลายของสิ่งปฏิกูลที่สกปรกจึงต้องมีการศึกษาลักษณะทางชีวภาพเพื่อให้ทราบถึงจำนวนของจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นพาหะนำเชื้อโรคอีกด้วย ซึ่งจะทำการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ตามวิธีมาตรฐาน ดังแสดงในตาราง 8

2.3 การศึกษาคุณสมบัติของของเสียจากกระบวนการแปรรูปลำไย

ของเสียจากกระบวนการแปรรูปลำไยอบแห้งที่ใช้ในการผลิตแก๊สชีวภาพได้นำมาจากวิสาหกิจชุมชนกลุ่มแม่บ้านริมร่องที่ได้ประกอบกิจการผลิตลำไยอบแห้งทำให้มีของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตอยู่เป็นจำนวนมาก ทั้งในรูปของน้ำเสียและเปลือกของลำไย ซึ่งการศึกษาคูณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียและเปลือกลำไยดังตาราง 8 ดังนี้

ตาราง 8 วิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของน้ำเสียและเปลือกลำไย

พารามิเตอร์	ตัวอย่างที่วิเคราะห์			หน่วย	วิธีการวิเคราะห์
	ST	DLW	LP		
ค่าพีเอช (pH)	√	√	-	-	Electronic pH meter
ของแข็งทั้งหมด (TS)	√	√	√	mg/l	AWWA APHA 2540 B
ของแข็งระเหยง่าย (VS)	√	√	√	mg/l	AWWA APHA 2540 E
ของแข็งแขวนลอย (SS)	√	√	-	mg/l	AWWA APHA 2540 D
ของแข็งแขวนลอยระเหย (VSS)	√	√	-	mg/l	AWWA APHA 2540 E
ค่าซีโอดี (COD)	√	√	-	mg/l	AWWA APHA 5220 C
ค่าบีโอดี (BOD)	√	√	-	mg/l	AWWA APHA 5210 B
อินทรีย์คาร์บอน (OC)	√	√	√	%	Walkley and Black (1934)
ค่าทีเคเอ็น (TKN)	√	√	√	mg/l	AWWA APHA 4500-Norg B
ไนเตรทไนโตรเจน (NO ₃ ⁻ -N)	√	√	-	mg/l	Cadmium reduction (R6000™ UV VIS Spectrophotometer)
แอมโมเนียไนโตรเจน (NH ₃ -N)	√	√	-	mg/l	Nessler method (DR6000™ UV VIS Spectrophotometer)
ออโธฟอสเฟต (Ortho-P)	√	√	-	mg/l	Ascorbic acid (DR6000™ UV VIS Spectrophotometer)
ความชื้น (Moisture content)	√	-	√	%	AOAC, 2000
Total coliform bacteria	√	-	-	MPN/ 100ml	APHA, AWWA and WEF (1998)
Fecal coliform bacteria	√	-	-	MPN/ 100ml	APHA, AWWA and WEF (1998)

หมายเหตุ: ST ; สลัดจ์บ่อเกรอะ (Septage), DLW; น้ำเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้งสีทอง (Dried Longan Processing Wastewater), LP; เปลือกลำไย (Longan Peel)

3. การติดตั้งและดำเนินระบบหมักร่วม

3.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

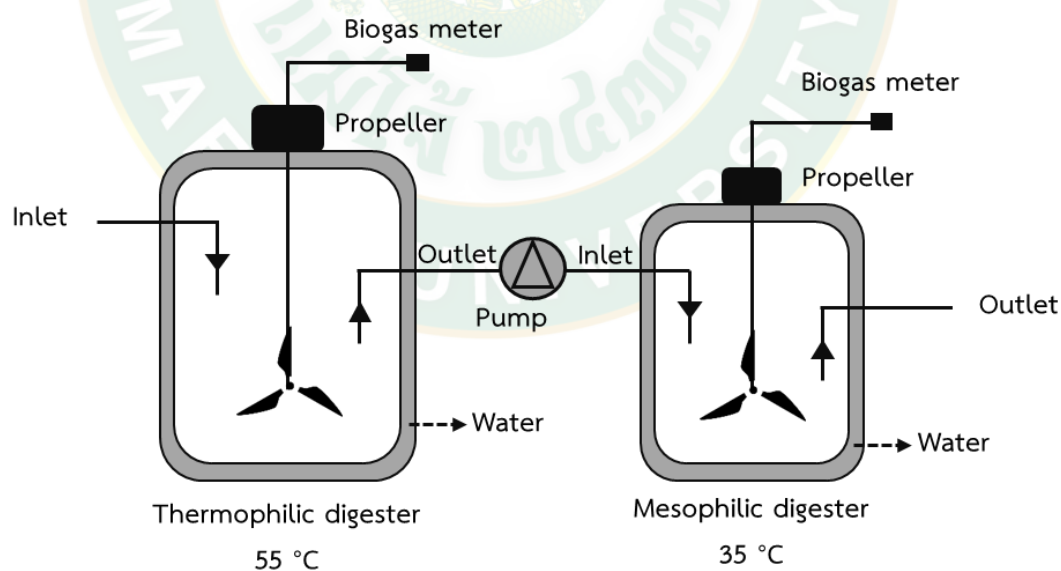
การผลิตแก๊สชีวภาพได้มีการปรับสภาพของเชื้อตั้งต้นที่จะใช้ก่อนที่จะนำมาดำเนินระบบ โดยเชื้อตั้งต้นได้นำมาจากถังย่อยสลัดจ์ส่วนเกินของกระบวนการแอกติเวตเตดสลัดจ์ของระบบบำบัดน้ำเสียมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทำการบรรจุใส่ถังขนาด 3, 6, 9 และ 18 ล. จากนั้นแยกแต่ละส่วนเก็บไว้ที่ตู้อบอุณหภูมิ 55 °C และห้องควบคุมอุณหภูมิ 35 °C ทำการป้อนสลัดจ์บ่อเกรอะและของเสียผสม (สลัดจ์บ่อเกรอะกับน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง และสลัดจ์บ่อเกรอะกับเปลือกลำไย) โดยใช้ค่าอัตราภาระบรรทุกระหว่างอินทรีย์ 1 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน สำหรับสลัดจ์บ่อเกรอะและสลัดจ์บ่อเกรอะกับเปลือกลำไยและ 0.5 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน สำหรับสลัดจ์บ่อเกรอะกับน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง ซึ่งเป็นการเลี้ยงเชื้อในอุณหภูมิช่วง Thermophilic และ Mesophilic เพื่อจุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้คุ้นเคยกับของเสียที่จะใช้ในการเริ่มเดินระบบหมักร่วม

3.2 การเริ่มต้นระบบ TPAD

สำหรับการศึกษานี้จะมีการดำเนินระบบแบบต่อเนื่องด้วยถังปฏิกรณ์ Temperature-Phased Anaerobic Digester (TPAD) ที่มีการใช้วัสดุติดแตกต่างกัน 3 ประเภท โดยระบบแรกจะเป็นชุดควบคุมที่เป็นการหมักโดยใช้สลัดจ์บ่อเกรอะเป็นสารอาหารเดี่ยว (TPAD 1) ระบบที่ 2 จะเป็นการหมักร่วมของสลัดจ์บ่อเกรอะกับน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง (TPAD 2) และระบบที่ 3 จะเป็นการหมักร่วมระหว่างสลัดจ์บ่อเกรอะกับเปลือกลำไย (TPAD 3) ซึ่งจะมีการดำเนินระบบโดย ัญญาลักษณ์ ชุ่มใจ และ Nanja Hummelink (Nanya, 2017; ัญญาลักษณ์, 2560) ถึงปฏิกรณ์จะประกอบด้วยถังย่อยสลายสองชั้นตอนจำนวน 2 ถังต่อเข้าด้วยกันแบบอนุกรม โดยถังที่ 1 จะทำการเดินระบบช่วงอุณหภูมิสูง (Thermophilic) ที่อุณหภูมิ 55 °C ส่วนถังที่ 2 เดินระบบช่วงอุณหภูมิต่ำปานกลาง (Mesophilic) ที่อุณหภูมิ 35 °C โดยถึงปฏิกรณ์ของระบบ TPAD 1 และ TPAD 2 จะมีขนาด 30 ล. และ 10 ล. และระบบ TPAD 3 มีขนาด 60 ล. และ 20 ล. สำหรับถังอุณหภูมิสูงและปานกลางตามลำดับ (ภาพ 15) โดยจะทำการเติมเชื้อตั้งต้นที่ผ่านการปรับสภาพแล้วลงในถังปฏิกรณ์ปริมาตร 30% ของปริมาตรที่ใช้ จากนั้นทำการเติมสลัดจ์บ่อเกรอะจนได้ปริมาตรที่ใช้งาน โดยเริ่มต้นระบบที่อัตราภาระบรรทุกระหว่างอินทรีย์เท่ากับ 1.0 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน (ยกเว้นถัง Thermophilic ที่เติมสลัดจ์บ่อเกรอะกับน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยใช้ค่า 0.5 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน เพื่อให้จุลินทรีย์ปรับตัวเข้ากับส่วนผสมที่มีน้ำเสียลำไยซึ่งมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักได้ง่ายขึ้น)

3.3 การดำเนินระบบหมักระบบ TPAD

การเดินระบบได้ทำการเติมวัตถุดิบเข้าระบบวันละสองครั้ง (ในช่วงเวลาประมาณ 09.00 น. และ 17.00 น.) ซึ่งก่อนการเติมวัตถุดิบเข้าระบบจะทำการปิดใบพัดกวนผสมเป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อป้องกันการหลุดออกของเชื้อ และทำการดึงของเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วออกจากระบบก่อนเติมของเสียเข้าระบบ ส่วน TPAD 3 จะดึงของเสียที่ผ่านการบำบัดในขณะที่มีใบพัดกวนอยู่เพื่อไม่ให้มีการสะสมตัวของของแข็งแขวนลอยในถังปฏิกรณ์ก่อนเติมของเสียเข้าระบบในปริมาณเท่ากับที่ดึงออก หลังจากนั้นทำการเพิ่มค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ตามค่าที่แสดงในตารางที่ 9 เมื่อระบบเริ่มผลิตก๊าซชีวภาพอย่างสม่ำเสมอจึงเริ่มทำการเพิ่มค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ในแต่ละถังปฏิกรณ์ และในระหว่างการหมักได้เติมของเสียเข้าระบบโดยปรับใช้อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ต่างกันและมีการควบคุมค่าซีไอดีต่อทีเคเอ็นของระบบสลัดจ์บ่อเกรอะร่วมกับน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้งให้เท่ากับ 100: 5 และควบคุมค่าของแข็งทั้งหมดของระบบสลัดจ์บ่อเกรอะร่วมกับเลือกลำไยให้เท่ากับ 10% ตลอดช่วงเวลาในการทดลอง โดยจะทำการเพิ่มค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ในการเดินระบบจนระบบล้มเหลว พิจารณาจากค่าปริมาณก๊าซมีเทนจำเพาะมีค่าลดลงมากกว่า 20% หรือระบบมีการสะสมตัวของปริมาณกรดไขมันระเหยจนทำให้มีอัตราส่วนของกรดไขมันระเหยต่อสภาพต่างสูงขึ้นมากกว่า 0.8 หรือมีค่าพีเอชน้อยกว่า 6.2



ภาพ 15 รูปแบบของถังปฏิกรณ์แบบ Temperature-Phased Anaerobic Digester

ตาราง 9 ชุดการทดลองหมักร่วมของสลัดจ์บ่อเกรอะกับของเสียการแปรรูปลำไยอบแห้ง

การทดลอง	วัตถุดิบ	อัตราภาวะบรรทุksารอินทรีย์
		(OLR 1 และ 2) (กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน) ^a
TPAD 1	สลัดจ์บ่อเกรอะ (ชุดควบคุม)	3.5/4.6 และ 5.8/3.4
TPAD 2 ^c	สลัดจ์บ่อเกรอะกับน้ำเสียจาก การแปรรูปลำไยอบแห้ง	3.8/4.5 ^b และ 3.2/2.7 ^b
TPAD 3	สลัดจ์บ่อเกรอะกับเปลือกลำไย	4.6/5.0 และ 6.8/7.0

หมายเหตุ ^a ค่าอัตราภาวะบรรทุksารอินทรีย์ที่ใช้แสดงในรูปค่าของถัง Thermophilic / ค่าของถัง Mesophilic; ^b เตินระบบที่อัตราส่วนซีโอดี : ทีเคเอ็นเท่ากับ 100:2.5 เนื่องจากสลัดจ์บ่อเกรอะชุดใหม่ที่ใช้ไม่สามารถปรับค่าซีโอดี : ทีเคเอ็น เป็น 100:5 ได้; ^c เตินระบบเพื่อทดสอบความสามารถในการฟื้นตัวของระบบเนื่องจากไม่สามารถปรับอัตราภาวะบรรทุksารอินทรีย์ให้สูงขึ้นได้

4. การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพทางกายภาพและเคมีของระบบหมักแบบ TPAD เป็นไปตามวิธีการมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำและน้ำเสียดังแสดงในตาราง 10 ดังนี้

ตาราง 10 วิธีการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของระบบด้วยวิธีทางกายภาพและเคมี

พารามิเตอร์	หน่วย	วิธีการวิเคราะห์	ความถี่
ปริมาณแก๊สต่อวัน	ml/day	Biogas Collection	ทุกวัน
องค์ประกอบของแก๊สชีวภาพ	%	Biogas Checks	ทุกวัน
ค่าพีเอช		pH meter	ทุกวัน
ของแข็งทั้งหมด (TS)	mg/l	AWWA APHA 2540 B	ทุก 3 วัน
ของแข็งระเหยง่าย (VS)	mg/l	AWWA APHA 2540 E	ทุก 3 วัน
ค่าซีโอดี (COD)	mg/l	AWWA APHA 5220 C	ทุก 3 วัน
กรดไขมันระเหย (VFA)	mg/l	Titration Method	ทุก 3 วัน
ค่าสภาพด่าง (Alkalinity)	mg/l	Titration Method	ทุก 3 วัน

5. การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบหมักจากถังปฏิกรณ์ TPAD

การศึกษาความสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบหมักร่วมที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายและการผลิตแก๊สชีวภาพด้วยเทคนิค PCR-DGGE ได้เริ่มจากการเก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์จากระบบ TPAD 1-3 จากนั้นนำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับตัวอย่าง ต่อด้วยศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยการแยกสายของดีเอ็นเอที่ความแตกต่างกันของปริมาณเบส G และ C ด้วยเทคนิค DGGE ซึ่งแถบดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ที่สนใจจะถูกนำไปวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ โดยมีขั้นตอนการดำเนินงาน ดังนี้

5.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์จากระบบหมักร่วมระหว่างสัปดาห์บ่อเกรอะกับของเสียจากการแปรรูปลำไยด้วยระบบ TPAD ในระดับห้องปฏิบัติการที่อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ต่างๆ โดยจะทำการเก็บตัวอย่างในขณะที่ถังปฏิกรณ์มีการกวนผสมสมบูรณ์จำนวน 20 มล. แล้วการตรึงเชื้อในเอทานอลเข้มข้น 70% ในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อเอทานอล 1 : 1 ทุกๆ 3 วัน สำหรับถังปฏิกรณ์ระบบ TPAD 1 และ TPAD 2 และจะเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 วันจากถังปฏิกรณ์ระบบ TPAD 3 และเก็บตัวอย่างทั้งในส่วนของถังปฏิกรณ์อุณหภูมิต่ำและอุณหภูมิสูงทั้ง 3 ชุดการทดลอง จากนั้นนำมาเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อรอนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ต่อไป

5.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ด้วย PCR-DGGE

ในการศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์หมักร่วมในระดับห้องปฏิบัติการโดยการวิเคราะห์ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR-DGGE มี 4 ขั้นตอนดังนี้

5.2.1) การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) นำตัวอย่างจากถังปฏิกรณ์หมักร่วมมาสกัดดีเอ็นเอด้วยการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Nucleospin[®] soil (Bio-Rad) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop 2000C Spectrophotometer (Thermo scientific) และตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel Electrophoresis โดยใช้ Agarose เข้มข้น 1% ใน 1X TAE buffer จากนั้นนำเจลที่เตรียมไว้แล้ววางลงบนบล็อกรันเจลที่เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยไฟฟ้า แล้วจะทำการผสมดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจำนวน 2 ไมโครลิตร เข้ากับ 6X loading dye จำนวน 1 ไมโครลิตร แล้วใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอลงในช่องใส่ตัวอย่างของ Agarose gel โดยเทียบกับ GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder ทำการเดินระบบอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล GelMax Imager (UVP)

5.2.2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ Quick Taq ซึ่งไพรเมอร์เข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้จะมีการแยกทาร์เก็ตโดยอาร์เคีย คือ Arc344F และ Univ522R ส่วนแบคทีเรียใช้ 341F และ Univ518R (ตาราง 11) ที่เจือจางจนได้ความเข้มข้น 10 พิโคโมล/ไมโครลิตร ทั้งนี้ไพรเมอร์ Arc344F และ 341F จะมีการเติมส่วนของ GC-clamp ที่บริเวณปลาย 5' จำนวน 41 คู่เบส ซึ่งในหนึ่งหลอดของปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย Quick Taq จำนวน 25 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ที่เจือจางอย่างละ 1 ไมโครลิตร น้ำปราศจากนิวคลีเอส (Nuclease-Free Water) 22 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร รวมปฏิกิริยามีปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังตาราง 12 และทำการผสมสารละลายให้เข้ากันและนำไปทำปฏิกิริยาโดยเครื่อง T100 Thermal cycle (Bio-Rad) และกำหนดโปรแกรมการทำงานแสดงในตาราง 13 ภายหลังจากการทำพีซีอาร์ทำการเก็บตัวอย่างพีซีอาร์ไว้ที่ -20 เพื่อนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในขั้นต่อไป

ตาราง 11 แสดงชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	กลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมาย	แหล่งอ้างอิง
Arc344F*	ACG GGY GCA GCA GGC GCGA	อาร์เคีย	Lv et al. (2016)
Univ522R	ATT ACC GCG GCK GCTG	อาร์เคีย	Lv et al. (2016)
341F*	CC TAC GGG AGG CAG CAG	แบคทีเรีย	Yu et al. (2008)
Univ518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	แบคทีเรีย	Yu et al. (2008)

* เติม GC-clamp (CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGCC) ที่ปลาย 5'

ตาราง 12 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารละลาย	ปริมาตร (µl)
Quick Taq	25
Reverse primer	1
Forward primer with GC-clamp	1
DNA template	1
Nucleases-free water (Steriled)	22
Total	50

ตาราง 13 ปฏิกริยาพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

กลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมาย	ปฏิกริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
อาร์เคีย (Hogg and Lehane, 1999)	Initial denaturation	95	4.5
	Denature	95	1
	Annealing	55	1
	Extension	72	1
	Final extension	72	5
	Hold	15	
แบคทีเรีย (Muyzer et al., 1993)	Initial denaturation	95	5
	Denature	94	0.5
	Annealing	54	1
	Extension	72	1
	Denature	95	1
	Annealing	54	1
	Extension	72	1
	Final extension	72	5
	Hold	15	

ลดลง 1 °C ทุก 0.5 นาที

5.2.3) การวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค DGGE โดยใช้ชุดอุปกรณ์ของ DCode™ system (Bio-Rad) ทำการเตรียม 10% acrylamide ที่มีความเข้มข้นของสารที่ทำให้ดีเอ็นเอแยกสาย (denaturant) 20-70% สำหรับอาร์เคียและ 30-60% สำหรับแบคทีเรีย โดยทำการผสมสารเคมีดังแสดงในตาราง 14 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วและผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการเตรียม acrylamide gel โดยใช้ 40% bis-acrylamide 15 มล. แล้วผสมสารเคมีซึ่งแสดงในตาราง 15 ภายหลังจากการเติม TEMED จะต้องบรรจุลงในอุปกรณ์การเตรียมเจลของชุด DCode™ system ทันทีและตั้งทิ้งไว้ 6-12 ชั่วโมงหรือข้ามคืนเพื่อให้เจลแข็งตัว จากนั้นนำมาต่อเข้ากับชุดการทดลองที่มี 1X TAE buffer เติมตัวอย่าง PCR Product ที่มีอัตราส่วนของตัวอย่างต่อสีย้อมเป็น 11 : 4 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วเริ่มเดินเครื่องกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 200 V เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr) เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที และนำมาตรวจดูภายใต้ UV transilluminator Genesnap program (SynGene, UK) บันทึกภาพและทำการวิเคราะห์ข้อมูล

ตาราง 14 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการเตรียม 10% acrylamide

กลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมาย	สารเคมี	% Denaturant	
อาร์เคีย		20%	70%
	Urea	16.8 g	58.8 g
	50X TAE buffer	4.0 ml	4.0 ml
	Formamide	16.0 ml	56.0 ml
	40% bis Acrylamide	50.0 ml	50.0 ml
	ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	200 ml	200 ml
แบคทีเรีย		30%	60%
	Urea	25.2 g	50.4 g
	50X TAE buffer	4.0 ml	4.0 ml
	Formamide	24.0 ml	48.0 ml
	40% bis Acrylamide	50.0 ml	50.0 ml
	ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	200 ml	200 ml

ตาราง 15 สารเคมีที่ใช้เตรียม Acrylamide gel

สารเคมี	% Denaturant	
	Low	High
Dcode dye solution	150 µl	-
10% acrylamide (ตาราง 13)	15 ml	15 ml
Ammonium persulfate (APS)	150 µl	150 µl
N, N, N', N'- tetramethyl ethylene diamine (TEMED)	15 µl	15 µl

5.2.4) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากโปรไฟล์ดีจีจีอี จากการวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิคดีจีจีอีจะได้แถบดีเอ็นเอที่สนใจ ทำการตัดชิ้นส่วนบน Polyacrylamide gel บริเวณดีเอ็นเอที่สนใจ เติมน้ำปราศจากนิวคลีโอไซด์ 20 ไมโครลิตร แล้วเก็บรักษาไว้ที่ 4 °C จนดีเอ็นเอละลายออกมาในเจลมากที่สุด แล้วนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ทั้งนี้ forward primer จะไม่มีการเติม GC-clamp และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทดลองสำเร็จรูป RBC BIOSCIENCE แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ส่งวิเคราะห์นำผลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) ด้วยการใช้โปรแกรม BLAST ที่ทำหน้าที่ในการค้นหาความเหมือนหรือความแตกต่างของ sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

บทที่ 4

ผลและการอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้จะได้ศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบหมักแบบ TPAD ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดของเสียและการผลิตก๊าซชีวภาพจากการหมักแบบสารอาหารเดี่ยวและการหมักร่วมระหว่างสลัดจ์บ่อเกรอะกับของเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง ได้แก่เปลือกลำไยและน้ำเสีย ซึ่งระบบ TPAD จะประกอบด้วยถังปฏิกรณ์สองถังต่อแบบอนุกรมที่ใช้อุณหภูมิในการดำเนินระบบแตกต่างกัน สำหรับถังแรกจะดำเนินระบบที่อุณหภูมิ 55 °C และถังที่ 2 จะควบคุมอุณหภูมิของระบบที่ 35 °C โดยผู้วิจัยได้ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบด้วยเทคนิค PCR-DGGE ซึ่งผลและวิจารณ์ผลการทดลองได้แสดงรายละเอียด ดังต่อไปนี้

1. คุณสมบัติของสลัดจ์บ่อเกรอะ

จากการศึกษาลักษณะเบื้องต้นทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของสลัดจ์บ่อเกรอะในช่วงเดือนกรกฎาคม-เดือนตุลาคม ผลการศึกษา (ตาราง 16) พบว่าสลัดจ์บ่อเกรอะมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6.55-7.78 ซึ่งอยู่ในช่วงที่เป็นกลาง มีปริมาณสารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของค่าซีโอดีและบีโอดีเฉลี่ยอยู่ที่ $1,606.14 \pm 981.76$ และ $11,601.28 \pm 9,128.75$ mg/L ตามลำดับจะเห็นได้ว่าสลัดจ์บ่อเกรอะมีค่าอัตราส่วนค่าบีโอดีต่อซีโอดีอยู่ในช่วง 0.03-1.02 และมีค่าเฉลี่ยแล้วเท่ากับ 0.32 ± 0.42 เป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพง่าย อย่างไรก็ตามค่าบีโอดีต่อซีโอดีที่น้อยกว่า 0.3 จะแสดงถึงน้ำเสียนั้นมีลักษณะที่ย่อยสลายทางชีวภาพได้ยากซึ่งอาจมีสารปนเปื้อนที่ย่อยสลายยากหรือเป็นมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ (Badawy and Ali, 2006; Manyuchi et al., 2018) โดยอาจเป็นไปได้ว่าสลัดจ์บ่อเกรอะจากบ้านเรือนมีการปนเปื้อนสารอนินทรีย์ที่มาจากกิจกรรมของครัวเรือนผ่านการเททิ้งลงชักโครกหรือส้วม เช่น น้ำยาล้างห้องน้ำ สารซักล้าง ทำให้สลัดจ์บ่อเกรอะมีการปนเปื้อนสารอนินทรีย์ นอกจากนี้จากข้อมูลในตารางยังพบว่าสลัดจ์บ่อเกรอะมีปริมาณฟอสเฟส (PO_4^{3-}) สูงโดยฟอสเฟสเป็นส่วนประกอบหนึ่งของผงซักฟอกและสารทำความสะอาดต่างๆ จากครัวเรือนและสามารถเปลี่ยนรูปเป็นออร์โธฟอสเฟตซึ่งเป็นโพลีฟอสเฟตที่เป็นสารอนินทรีย์ที่มีโครงสร้างทางเคมีค่อนข้างซับซ้อน (Etnier et al., 2005) ในส่วนของค่าทีเคเอ็นที่แสดงถึงผลรวมของแอมโมเนียและไนโตรเจนอินทรีย์นั้นพบอยู่ในช่วง 182-656 mg/L ซึ่งพบว่าแอมโมเนียมีปริมาณ 191-209 mg/L โดยสารอินทรีย์ที่เป็นไนโตรเจนอินทรีย์จะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียด้วยกระบวนการ ammonification ในสถานะที่ไม่ใช้ออกซิเจนและใช้ออกซิเจน

ตาราง 16 คุณลักษณะเบื้องต้นของสลัดจ์บ่อเกรอะ

พารามิเตอร์	หน่วย	ค่าน้อยสุด-มากที่สุด	ค่าเฉลี่ย
pH		6.55-7.78	6.98±0.40
TS	mg/l	1,435-14,645	7376.67±6,704.18
VS	mg/l	780-9,755	4,698.33±4,594.51
SS	mg/l	120-327	237.50±102.41
VSS	mg/l	46-290	194.50±121.04
BOD	mg/l	664-3,656	1,606.14±981.76
COD	mg/l	2,284-22,800	11,601.28±9,128.75
TKN	mg/l	182-656	419.30±335.60
NH ₃	mg/l	191-209	200±12.73
PO ₄ ³⁻	mg/l	83-448	257±166.98
Total coliform bacteria	MPN/100 ml	2,100-110,000	33,355.56±43,876.82
Fecal coliform bacteria	MPN/100 ml	1,100-21,000	8,644.44±8,289.17

เมื่อพิจารณาถึงอัตราส่วนซีโอดี : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ จะพบว่าค่าที่เหมาะสมควรอยู่ที่ 100: 2: 0.3 และ 100: 0.7: 0.1 สำหรับระบบที่มีอัตราการไหลลด ของเสียสูง (0.8-1.2 กก. ซีโอดี/กก. ของแข็งแขวนลอยระเหย - วัน) และต่ำ (<0.5 กก. ซีโอดี/กก. ของแข็งแขวนลอยระเหย - วัน) ตามลำดับ (Henze and Harremoës, 1983) สำหรับสลัดจ์บ่อ เกรอะมีอัตราส่วนซีโอดี : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัสเฉลี่ยอยู่ที่ 100: 3: 2 โดยพบว่ายังมีค่ามากกว่า อัตราส่วนขั้นต่ำที่ใช้ในระบบการหมักที่มีไหลลดของสารอินทรีย์สูงโดยมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มาก เกินพอต่อการผลิตแก๊สชีวภาพซึ่งอาจมีผลทำให้เมื่อนำมาผลิตแก๊สชีวภาพอาจทำให้ได้ปริมาณแก๊ส ชีวภาพน้อยเนื่องจากจุลินทรีย์นำสารอาหารไปใช้เพื่อสร้างเป็นเซลล์ใหม่ในปริมาณมาก ซึ่งคุณสมบัติ นี้ทำให้สามารถประยุกต์ใช้สลัดจ์บ่อเกรอะสำหรับการหมักร่วมกับวัตถุดิบอื่นที่มีองค์ประกอบของ คาร์บอนสูงแต่มีปริมาณสารอาหารต่ำเพื่อปรับอัตราส่วนของซีโอดี : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัสให้อยู่ ในช่วงที่เหมาะสมได้ ซึ่งนับว่าเป็นอีกหนึ่งวิธีที่จะพัฒนาประสิทธิภาพของการผลิตแก๊สชีวภาพจากเศษ วัสดุทางการเกษตรให้สูงขึ้นได้

ในส่วนของแบคทีเรียก่อโรคที่ตรวจพบในสลัดจ์บ่อเกรอะพบว่ามีปริมาณสูงมากโดยจะพบ แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดอยู่ที่ 33,355.56±43,876.82 MPN/100 ml และพบฟีคัลโคลิฟอร์ม เท่ากับ 8,644.44±8,289.17 MPN/100 ml ซึ่งเป็นค่าที่เกินมาตรฐานในแหล่งน้ำทิ้งจากกิจกรรมบาง ประเภทและสามารถใช้เป็นประโยชน์เพื่อการเกษตร (คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2537)

ดังนั้นการนำสลัดจ๋บ่อเกรอะมาใช้ประโยชน์ไม่ว่าจะเป็นการใช้ผลิตแก๊สชีวภาพหรือการปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมควรจะต้องคำนึงถึงแบคทีเรียกลุ่มนี้และมีการตรวจวิเคราะห์น้ำทิ้งเพื่อให้ปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานก่อนที่จะปล่อยออกสู่ธรรมชาติ ซึ่งโดยปกติจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 44.5 ± 0.2 °C (Schuettpelez, 1969) มีรายงานว่ากรมหมักสลัดจ๋บ่อเกรอะโดยใช้ถัง Thermophilic ที่ดำเนินระบบด้วยอุณหภูมิสูงพบว่าสามารถที่จะลดปริมาณของจุลินทรีย์ประเภทนี้ได้ (Song et al., 2004) ดังนั้นการใช้ระบบนี้จึงมีข้อดีนอกเหนือจากการผลิตก๊าซชีวภาพเพียงอย่างเดียว

นอกจากนี้ผลจากตาราง 15 พบว่าคุณสมบัติของสลัดจ๋บ่อเกรอะมีค่าไม่คงที่ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของสลัดจ๋บ่อเกรอะตามช่วงฤดูกาล ซึ่งอาจมีส่วนเกี่ยวข้องทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ในสลัดจ๋บ่อเกรอะมีค่าไม่คงที่ ซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณสารอินทรีย์ที่เข้าระบบ โดยผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Halalshah et al. (2010) ที่ได้ศึกษาผลของฤดูกาลที่มีต่อลักษณะของสลัดจ๋บ่อเกรอะโดยได้เปรียบเทียบลักษณะของสลัดจ๋บ่อเกรอะในฤดูร้อนและฤดูหนาว ผลการทดลองพบว่าค่าซีโอดีทั้งหมดในฤดูร้อนมีค่ามากกว่าฤดูหนาวถึง 2.16 เท่า โดยมีค่าเฉลี่ย 6,425 และ 2,969 mg/l สำหรับฤดูร้อนและฤดูหนาวตามลำดับ นอกจากนี้ในช่วงฤดูฝนจะมีน้ำไหลลงบ่อเกรอะทำให้เกิดการเจือจางสารอินทรีย์ในสลัดจ๋บ่อเกรอะด้วย

2. คุณสมบัติของน้ำเสียและเปลือกลำไยการแปรรูปลำไยอบแห้ง

2.1 ผลของการศึกษาลักษณะของน้ำเสียจากการผลิตลำไยอบแห้ง

ในส่วนของการวิเคราะห์คุณสมบัติของของเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง (ตาราง 17) ผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างน้ำเสียมาวิเคราะห์ในช่วงที่มีผลผลิตลำไยออกมามากที่สุดตั้งแต่เดือนมิถุนายน-สิงหาคม 2560 ซึ่งการวิเคราะห์คุณลักษณะเบื้องต้นของน้ำเสียพบว่ามีค่าพีเอชค่อนข้างเป็นกรดอยู่ในช่วง 4.22-5.53 จึงเป็นไปได้ว่าน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้ประกอบไปด้วยน้ำตาลหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลฟรุคโตส รวมถึงสารอินทรีย์อื่นที่มาจากกระบวนการผลิต เมื่อผ่านการย่อยสลายของจุลินทรีย์จะให้เกิดกรดอินทรีย์สะสมในน้ำเสียทำให้ค่าพีเอชลดลง (El-Kamah et al., 2010) และยังพบอีกว่าอัตราส่วนของค่าบีโอดีต่อซีโอดีของน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้มีค่าเท่ากับ 0.61 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำเสียดังกล่าวสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่าย ซึ่งในงานวิจัยนี้อัตราส่วนค่าบีโอดีต่อซีโอดีของน้ำเสียจากการผลิตลำไยอบแห้งโดยเฉลี่ยแล้วมีค่าเท่ากับ 0.57 ± 0.27 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยข้างต้น จากการวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ในรูปของค่าบีโอดีและค่าซีโอดีพบว่าน้ำเสียมีค่าซีโอดีสูงกว่าค่าบีโอดีอยู่ในช่วง 985.07-9,029.85 mg/l และ 1,294-18,000 mg/l ตามลำดับ และมีการเปลี่ยนแปลงตลอดช่วงเวลาการทดลองตามอัตราการผลิตของโรงงานซึ่งผลจาก

การศึกษาพบว่าน้ำเสียจะมีปริมาณสารอินทรีย์น้อยที่สุดในเดือนมิถุนายนซึ่งเป็นเดือนที่มีการผลิตลำไยอบแห้งน้อยกว่าเดือนอื่นและจะพบว่าค่าซีโอดีและบีโอดีมีค่าเพิ่มขึ้นในเดือนกรกฎาคมและเดือนสิงหาคมซึ่งเป็นช่วงที่มีการผลิตลำไยอบแห้งมากที่สุด (วิสาหกิจชุมชนกลุ่มแม่บ้านริมร่อง, 2560)

การทดลองยังพบว่าค่าของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยมีค่าตั้งแต่ 2,500-8,258 mg/l และ 2,015-4,148 mg/l ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณของแข็งทั้งหมดในน้ำเสียนี้น้อยกว่า 1% (จาก 10,000 mg/l เท่ากับ 1%) ซึ่งจากการพิจารณาการแปรรูปลำไยอบแห้งพบว่าจะมีการใช้น้ำในส่วนของกระบวนการล้างและแช่น้ำลำไยรวมถึงการทำความสะดวกอัดพื้นที่ ซึ่งมีการเจือปนของปริมาณของแข็งน้อย ในขณะที่มีค่าของแข็งแขวนลอยและค่าของแข็งแขวนลอยระเหยได้อยู่ในช่วง 297-531 mg/l และ 292-496 mg/l ตามลำดับ โดยค่าของแข็งแขวนลอยส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ ซึ่งมีปริมาณที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ El-Kanah และคณะ (2010) ที่พบว่าค่าของแข็งแขวนลอยและของแข็งแขวนลอยระเหยได้อยู่ในช่วง 323 ± 349 mg/l และ 183 ± 152.4 mg/l (El-Kamah et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าซีโอดีต่อของแข็งแขวนลอยระเหยได้เท่ากับ 1.11 กก. ซีโอดี/กก. ของแข็งแขวนลอยระเหย โดยค่าดังกล่าวแสดงถึงปริมาณสารอินทรีย์เริ่มต้นต่อปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น ซึ่งหากมีค่ามากจะหมายถึงปริมาณอาหารของจุลินทรีย์ที่มีมากกว่าจุลินทรีย์อยู่มากจะส่งผลให้ระบบมีช่วงการเริ่มระบบที่มากขึ้น อย่างไรก็ตามสำหรับงานวิจัยนี้หากเปรียบเทียบปริมาณสารอินทรีย์ที่เป็นอาหารเริ่มต้นต่อปริมาณจุลินทรีย์ที่อยู่ในรูปของของแข็งแขวนลอยระเหยได้จะมีค่าเท่ากับ 32.40 ± 72.60 กก. ซีโอดี/กก. ของแข็งแขวนลอยระเหย - วัน ซึ่งสามารถอนุมานได้ว่าน้ำเสียมีปริมาณจุลินทรีย์น้อยกว่าอาหารอยู่มาก อาจมีการใช้เวลาระยะหนึ่งเพื่อให้จุลินทรีย์สามารถเจริญให้มีปริมาณที่สูงขึ้น

นอกจากนี้ น้ำเสียจากการผลิตลำไยอบแห้งมีค่าที่เคเอ็นอยู่ในช่วง 26-54 มก. ทีเคเอ็น/ล. ในขณะที่แอมโมเนียมีอยู่ในช่วง 2-54 mg/l ซึ่งทั้งสองค่าจะมีความเข้มข้นไม่คงที่ตามการเปลี่ยนแปลงของกำลังการผลิตในแต่ละเดือน โดยจะมีค่าสูงตามอัตราการผลิตสูงในเดือนกรกฎาคมจึงทำให้มีการใช้น้ำเป็นปริมาณมากและทำให้มีสารอินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำมากเช่นกัน จากการพิจารณาคุณสมบัติเบื้องต้นของน้ำเสียจะพบว่าอัตราส่วนซีโอดี : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัสเฉลี่ยอยู่ที่ 100: 0.6: 0.1 ซึ่งจะเห็นว่าน้ำเสียจากการผลิตลำไยมีค่าไนโตรเจนน้อยมากหากจะต้งนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตแก๊สชีวภาพอาจจะต้องมีการเติมไนโตรเจนหรือการหมักร่วมกับของเสียอินทรีย์ชนิดอื่นที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงเพื่อให้มีปริมาณสารอินทรีย์และสารอาหารอย่างสมดุลที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ

ตาราง 17 ลักษณะของน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง

พารามิเตอร์	หน่วย	ค่าน้อยสุด-มากที่สุด	ค่าเฉลี่ย
pH		4.53-5.22	4.88±0.49
TS	mg/l	2,500-8,258	5,795±3,417
VS	mg/l	2,015-4,148	3,178±1,775
SS	mg/l	297-531	380±124.39
VSS	mg/l	292-496	362.33±112.46
BOD	mg/l	985.07-9,029.85	3,910.45±2,930.76
COD	mg/l	1,294-18,000	11,732±8,131.68
TKN	mg/l	26-54	40.6±19.80
NH ₃	mg/l	2-54	28±36.76
PO ₄ ³⁻	mg/l	5.6-106	27.24±44.48

2.2 ผลของการศึกษาลักษณะของเปลือกลำไย

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติเบื้องต้นของเปลือกลำไยโดยคำนวณเทียบกับน้ำหนักแห้ง (ตาราง 17) พบว่ามีปริมาณความชื้นในช่วง 53.44-71.75% ซึ่งเหมาะสมต่อการบำบัดทางชีวภาพโดย McKendry (2002) ได้รายงานว่าคุณค่าความชื้นที่เหมาะสมกับกระบวนการทางชีวภาพจะต้องมีค่ามากกว่า 50% จึงจะทำให้วัสดุสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่าย ส่วนปริมาณของแข็งทั้งหมดมีค่าในช่วง 28.25-46.56% คิดเป็น 569,139-603,440 มก./กก. ซึ่งมีค่าสูงมาก ทั้งนี้การศึกษาของ Xu et al. (2014) พบว่าการเพิ่มปริมาณของแข็งทั้งหมดในระบบหมักร่วมจะทำให้ระบบสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้ดีขึ้นตามปริมาณของแข็งทั้งหมดและจะมีการผลิตแก๊สชีวภาพลดลงเมื่อมีการใช้ของแข็งทั้งหมดสูงเกินไปโดยค่าที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 15-20% ซึ่งในการทดลองอาจต้องมีการเพิ่มปริมาณน้ำเพื่อให้ค่าของแข็งลดลงอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าเปลือกลำไยมีของแข็งระเหยง่ายอยู่ในช่วง 377,600-412,620 มก./กก. ในขณะที่เดียวกันมีปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของค่าที่เคเอ็นอยู่ในช่วง 1,050-1,470 มก./กก. และมีปริมาณคาร์บอนอินทรีย์อยู่ในช่วง 68.92-94.14%

ผลการวิเคราะห์จากตาราง 17 ยังพบอีกว่าเปลือกลำไยที่ใช้ในการทดลองมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) คิดเป็น 54 ± 10 ซึ่งมีช่วงค่าที่ค่อนข้างสูง โดยผลค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ หทัยรัตน์ (2556) ที่ได้ใช้เปลือกลำไยเป็นวัตถุดิบหมักในการผลิตแก๊สชีวภาพพบว่าเปลือกลำไยมีค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 41.4 ± 6.4 ซึ่งค่าอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพควรอยู่ในช่วง 20-30 ดังนั้นการใช้เปลือกลำไยเพื่อผลิตแก๊สชีวภาพให้มีประสิทธิภาพสูงควรจะมีการปรับสัดส่วนปริมาณไนโตรเจนให้เหมาะสม ดังนั้นการหมักร่วมกับวัตถุดิบอื่นที่จะสามารถเพิ่มปริมาณไนโตรเจนให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมได้จึงเป็นวิธีการที่น่าสนใจ นอกจากนี้เปลือกลำไยยังเป็นพืชซึ่งจะมีลิกนินเป็นองค์ประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลสในเปลือกผลไม้ โดยปริมาณลิกนินที่พบในวัตถุดิบที่เป็นพืชจะทำให้แก๊สชีวภาพเกิดได้น้อยลงเนื่องจากลิกนินเป็นสารประกอบประเภทอะโรมาติกที่พบในส่วนผนังเซลล์พืชและเป็นส่วนป้องกันเซลลูโลสไม่ให้ถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ (Pawongrat, 2015) ดังนั้นการนำเปลือกลำไยมาผลิตแก๊สชีวภาพน่าจะต้องการปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้นก่อนที่จะนำไปใช้ โดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการปั่นเพื่อลดขนาดของเปลือกลำไยในการปรับสภาพเบื้องต้นซึ่งจะช่วยให้ดำเนินระบบได้ง่ายมากขึ้น

ตาราง 18 ลักษณะของเปลือกลำไยจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง

พารามิเตอร์	หน่วย	ค่าน้อยสุด-มากที่สุด	ค่าเฉลี่ย
Moisture content	%	53.44-71.75	59.41 ± 8.33
TSC	%	28.25-46.56	40.59 ± 8.33
TS	mg/kg	569,139-603,440	$586290 \pm 24,253.76$
VS	mg/kg	377,600-412,620	$395,110 \pm 24,763.88$
TKN	mg/kg	147-210	178.50 ± 44.55
Nitrogen content	%	1.47-2.10	1.79 ± 2.45
Organic carbon	%	68.92-94.14	84.23 ± 12.06
C/N	%	46.88-60.97	54 ± 10

จากการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของเปลือกลำไย น้ำเสีย และสลัดจ์บ่อเกรอะ จะพบว่าปริมาณสารอินทรีย์และของแข็งที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะปริมาณสารอินทรีย์และสารอาหาร โดยสลัดจ์บ่อเกรอะเป็นของเสียที่ถูกย่อยสลายภายในบ่อเกรอะภายใต้สภาวะไร้อากาศเนื่องจากมีระยะเวลาเก็บกักนาน แต่อัตราส่วนของซีโอดี : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัสที่คำนวณได้พบว่ามีความสารอาหารในช่วงค่าที่มากเกินไปจึงสามารถนำสลัดจ์บ่อเกรอะมาช่วยในการปรับสภาพของเสียชนิดอื่นที่มี

ปริมาณสารอินทรีย์สูงแต่มีสารอาหารต่ำเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของระบบ จากผลการวิเคราะห์ที่ได้พบว่าน้ำเสียจากกระบวนการอบแห้งลำไยมีปริมาณไนโตรเจนน้อยและแอมโมเนียค่อนข้างต่ำอีกทั้งยังมีค่าพีเอชต่ำทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนรูปจากไนโตรเจนอินทรีย์เป็นแอมโมเนียเกิดขึ้นได้ยาก จึงทำให้มีอัตราส่วนซีโอดี : ไนโตรเจนน้อยกว่าค่าที่เหมาะสมอยู่มาก ดังนั้นการนำน้ำเสียมาหมักร่วมกับสลัดจ์บ่อเกรอะจึงเป็นวิธีการปรับปรุงสัดส่วนสารอาหารของน้ำเสียให้มีค่าสูงขึ้นและเหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพมากขึ้นซึ่งน่าจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของระบบที่ดีขึ้นด้วย สำหรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของเปลือกลำไยพบว่ามีค่าสูงแสดงให้เห็นว่าเปลือกลำไยนั้นมีปริมาณสารอินทรีย์ที่มากกว่าสารอาหารอยู่มาก ซึ่งการปรับสัดส่วนของสารอาหารของเปลือกลำไยให้เหมาะสมน่าจะดีต่อประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพที่สูงขึ้น ดังนั้นการหมักร่วมกับสลัดจ์บ่อเกรอะกับเปลือกลำไยน่าจะช่วยให้มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมมากขึ้น

3. ประสิทธิภาพของระบบ TPAD

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพรวมถึงประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในระบบ TPAD โดยจะเน้นที่ประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดีและของแข็งในระบบ โดยการทดลองประกอบด้วยการใช้สลัดจ์บ่อเกรอะเป็นวัตถุดิบเดี่ยวซึ่งจะใช้เป็นชุดควบคุม (TPAD 1) และการทดลองที่มีการใช้วัตถุดิบอื่นเป็นวัสดุหมักร่วม ได้แก่ ชุดการทดลองที่มีการใช้สลัดจ์บ่อเกรอะร่วมกับน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง (TPAD 2) และชุดการทดลองที่มีการใช้สลัดจ์บ่อเกรอะร่วมกับเปลือกลำไย (TPAD 3) ซึ่งแต่ละชุดการทดลองได้มีการเติมของเสียเข้าระบบแบบต่อเนื่อง (continuous) และมีการดำเนินระบบโดยเพิ่มอัตราการบำบัดทุกสารอินทรีย์จนได้ค่าที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับวัตถุดิบแต่ละประเภทซึ่งในระหว่างการทดลองได้มีการวิเคราะห์ค่าซีโอดีและของแข็งทั้งหมด รวมถึงปริมาณแก๊สชีวภาพซึ่งมีผลการวิเคราะห์ ดังนี้

3.1 การผลิตแก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทน

จากการทดลองได้ศึกษาปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตขึ้นในแต่ละระบบรวมถึงปริมาณแก๊สมีเทนที่เป็นองค์ประกอบหลักของแก๊สชีวภาพด้วย โดยภาพ 16-18 แสดงถึงปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตได้จากทุกระบบ โดยผลการศึกษาพบว่าทุกระบบมีแนวโน้มการผลิตแก๊สชีวภาพคล้ายกันซึ่งการผลิตแก๊สชีวภาพจะมีค่าไม่คงที่ตามระยะเวลาการดำเนินระบบและมีค่าแตกต่างกันระหว่างถังปฏิกรณ์ 2 ถึง โดยถังอุณหภูมิสูงจะผลิตแก๊สชีวภาพได้มากกว่าถังอุณหภูมี่ปานกลาง ในส่วนของปริมาณแก๊สมีเทนที่เกิดขึ้น (ตาราง 18) พบว่าโดยรวมแล้วถังอุณหภูมี่ปานกลางจะมีแนวโน้มในการผลิตแก๊สมีเทนสูงขึ้น โดยเฉพาะการทดลอง TPAD 3 อย่างไรก็ตามการทดลอง TPAD 1 และ 2 ที่ถังอุณหภูมี่ปานกลางยังมี

ปริมาณแก๊สมีเทนที่น้อยกว่าถึงอุณหภูมิสูงซึ่งอาจเป็นผลมาจากปริมาณสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้าระบบของทั้ง 2 ระบบนี้มีปริมาณน้อยกว่าระบบ TPAD 3 อยู่มาก นอกจากนี้การเปรียบเทียบผลของการค่าอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ที่ต่างกันในการดำเนินระบบยังพบว่ามึผลต่อการผลิตแก๊สมีเทนอีกด้วย โดยผลการดำเนินระบบได้แสดงรายละเอียดดังต่อไปนี้

สำหรับระบบ TPAD 1 (ภาพ 16) ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ใช้สลัดจ์บ่อเกรอะเป็นวัตถุดิบเดี่ยวในการหมัก พบว่าถึงอุณหภูมิสูงสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้มากกว่าถึงปานกลางโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $1,561.52 \pm 1,279.02$ มล./วัน และ 27.09 ± 21.21 มล./วัน ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับปริมาณแก๊สมีเทนที่ผลิตได้โดยพบว่าถึงอุณหภูมิสูงสามารถผลิตแก๊สได้มากกว่าโดยมีค่าเท่ากับ 53.59% ในขณะที่ถึงอุณหภูมิปานกลางสามารถผลิตแก๊สมีเทนได้เพียง 30.80% เช่นเดียวกับผลที่ได้จากระบบ TPAD 2 (ภาพ 17) ซึ่งเป็นระบบหมักร่วมระหว่างสลัดจ์บ่อเกรอะกับน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้ง โดยพบว่าถึงอุณหภูมิสูงสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้มากกว่าถึงปานกลางโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $4,522.68 \pm 5,583.79$ มล./วัน และ 6.18 ± 9.12 มล./วัน ตามลำดับ จะเห็นว่าถึงอุณหภูมิสูงเป็นถึงปฏิกรณ์หลักในการผลิตแก๊สชีวภาพในขณะที่ถึงอุณหภูมิปานกลางมีการผลิตแก๊สชีวภาพน้อยมากโดยในระบบ TPAD 2 จะพบว่าการผลิตแก๊สมีเทนที่ถึงอุณหภูมิสูงเท่านั้นโดยมีค่าเท่ากับ 55.20% อย่างไรก็ตามสำหรับระบบ TPAD 3 ที่เป็นการหมักร่วมระหว่างสลัดจ์บ่อเกรอะกับเปลือกลำไย (ภาพ 18) พบว่าถึงแม้ว่าถึงอุณหภูมิสูงจะสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้มากกว่าถึงอุณหภูมิปานกลางโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $11,397.13 \pm 3,106.23$ มล./วัน และ $2,637.62 \pm 1,108.33$ มล./วัน ตามลำดับ แต่กลับพบว่าถึงอุณหภูมิปานกลางสามารถผลิตแก๊สได้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับถึงอุณหภูมิปานกลางของ TPAD 1 และ TPAD 2 รวมถึงมีปริมาณแก๊สมีเทนที่ถึงอุณหภูมิปานกลางมากกว่าถึงอุณหภูมิสูงโดยมีค่า 52.02% และ 46.59% ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามเมื่อได้พิจารณาปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตจากระบบหมักร่วมทั้งสามการทดลองจะพบว่าระบบ TPAD 3 มีการผลิตแก๊สชีวภาพมากที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปลือกลำไยมีศักยภาพสูงในการผลิตแก๊สชีวภาพเนื่องจากมีปริมาณสารอินทรีย์มากที่สุด (จากการเปรียบเทียบกับค่าซีโอดีที่เข้าระบบของทั้งสามการทดลอง) จึงทำให้เกิดการย่อยสลายเป็นแก๊สชีวภาพได้มากที่สุด ถึงแม้ว่าระบบ TPAD 3 จะใช้เปลือกลำไยซึ่งมีส่วนประกอบที่ยากต่อการย่อยสลาย แต่ในการทดลองได้มีการปรับสภาพเปลือกลำไยด้วยการปั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ จึงทำให้กระบวนการย่อยสลายเกิดได้ง่ายยิ่งขึ้น ซึ่งงานวิจัยของ Saksong et al. (2019) ได้ทำการปรับสภาพทะเลาะปาล์มในการผลิตแก๊สชีวภาพโดยได้ทำให้เป็นชิ้นเล็กๆ น้อยกว่า 0.5 เซนติเมตร พบว่าสามารถผลิตแก๊สมีเทนที่เป็นส่วนหนึ่งของแก๊สชีวภาพได้ 60.9 ลบ.ม.-มีเทน/ตัน สำหรับการที่ระบบ TPAD 1 ผลิตแก๊สชีวภาพได้น้อยที่สุดคาดว่ามิสาเหตุมาจากสลัดจ์บ่อเกรอะที่ใช้ในการทดลองถูกเก็บในบ่อเป็นระยะเวลาพอสมควรทำให้สารอินทรีย์ส่วนหนึ่งถูกย่อยสลายในบ่อเกรอะ เมื่อนำมาใช้ผลิตแก๊สชีวภาพจึงเหลือสารอินทรีย์ที่ย่อย

สลายง่ายอยู่น้อย โดยสังเกตได้จากค่าบีโอดีต่อซีโอดีที่ยังน้อยกว่า 0.3 แสดงให้เห็นว่าสลัดจ์บ่อเกรอะยังมีส่วนที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ยาก อาจกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์จะใช้สารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ง่ายเปลี่ยนเป็นแก๊สชีวภาพได้น้อยกว่าระบบอื่น ส่วนระบบ TPAD 2 ที่มีการใช้น้ำเสียเข้ามาเป็นวัตถุดิบร่วมในการหมักกับสลัดจ์บ่อเกรอะพบว่ามีปริมาณแก๊สเกิดขึ้นได้น้อยกว่า TPAD 3 แต่มากกว่า TPAD 1 นั้น คาดว่าเป็นเพราะในน้ำเสียนั้นมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักทำให้ระบบย่อยสลายสารอินทรีย์เปลี่ยนเป็นแก๊สชีวภาพไปได้อย่างรวดเร็วในช่วงแรก (ถังแรก) หลังจากนั้นเมื่อสารอินทรีย์ได้ลดลงทำให้มีปริมาณแก๊สชีวภาพลดลงด้วยเช่นกัน

เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ จะเห็นว่าถังอุณหภูมิปานกลางได้มีบทบาทมากขึ้นในขั้นตอนการผลิตแก๊สมีเทน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิที่ใช้ดำเนินระบบพบว่าถังอุณหภูมิปานกลางของการทดลองทุกระบบมีการผลิตแก๊สชีวภาพน้อยกว่าอุณหภูมิสูง แต่ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากที่อุณหภูมิสูงจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสย่อยสลายทางชีวภาพไปเป็นแก๊สชีวภาพได้เร็วกว่าที่ถังอุณหภูมิปานกลาง (Song et al., 2004) ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Lv et al. (2013) ที่พบว่าการผลิตแก๊สชีวภาพจากมูลวัวด้วยระบบ TPAD ที่ถังอุณหภูมิสูงมีการผลิตแก๊สชีวภาพได้มากกว่าอุณหภูมิปานกลางเท่ากับ 5.63 ± 0.10 ลิตร/วัน และ 0.89 ± 0.02 ลิตร/วัน ตามลำดับ นอกจากนี้บทบาทของแต่ละถังในการย่อยสลายทางชีวภาพยังมีความแตกต่างกัน โดยที่ถังอุณหภูมิสูงสามารถเกิดปฏิกิริยา Hydrolysis และปฏิกิริยา Acidogenesis ได้สูงในขณะที่ถังอุณหภูมิปานกลางที่รับของเสียที่ผ่านการย่อยสลายจากถังอุณหภูมิสูงจะเกิดปฏิกิริยา syntrophic acetogenesis และ methanogenesis (Lv et al., 2013) ประกอบกับส่วนใหญ่อุณหภูมิปานกลางเป็นช่วงที่พบแบคทีเรียสร้างมีเทนได้มากกว่าที่อุณหภูมิสูง (Levén et al., 2007; Pycke et al., 2011) จึงทำให้ถังอุณหภูมิปานกลางมีการผลิตแก๊สมีเทนได้ในปริมาณสูง เมื่อเทียบกับปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นในแต่ละถังปฏิกรณ์ นอกจากนี้ประสิทธิภาพการผลิตแก๊สที่ลดลงอาจจะมีผลจากการใช้วัตถุดิบที่มีปริมาณสารอินทรีย์น้อยในการหมักโดยเฉพาะระบบ TPAD 1 และ 2 ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพในถังอุณหภูมิปานกลางลดลงเนื่องจากสารอินทรีย์ถูกย่อยสลายไปในถังแรกจนไม่เพียงพอต่อปฏิกิริยาในถังปฏิกรณ์ที่สอง ทั้งนี้อาจรวมถึงสารอาหารบางชนิดมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการผลิตแก๊สชีวภาพในถังปฏิกรณ์ที่สองด้วย (García-Peña et al., 2011)

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่าการใช้อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้าถังอุณหภูมิสูงและอุณหภูมิปานกลางที่ต่างกันทำให้ระบบมีความสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้แตกต่างกันด้วยดังแสดงในภาพ 16-18 จะเห็นได้ว่าการปรับใช้ OLR 2 ที่เพิ่มขึ้นของระบบ TPAD 1 และ 3 และการปรับค่า OLR 2 ให้ลดลงของระบบ TPAD 2 พบว่ามีผลทำให้ระบบผลิตแก๊สชีวภาพได้น้อยลงในระหว่างการเดินระบบด้วย อย่างไรก็ตามการปรับใช้ OLR 2 ที่ลดลงของระบบ TPAD 2 จาก 3.8/4.5 เป็น 3.2/2.7 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน ยังเป็นการทดสอบการฟื้นตัวของระบบเมื่อใช้โหลดที่ลดลง ซึ่ง

พบว่าระบบไม่สามารถเดินระบบต่อไปได้เนื่องด้วยสล็อตจ็อบเกอร์อะชุดใหม่ที่ใช้ในช่วงดังกล่าวมีปริมาณของแข็งระเหยต่ำทำให้ไม่สามารถผสมของเสียให้มีอัตราส่วนซีโอดี : ทีเคเอ็นเท่ากับ 100 : 5 จึงได้ปรับให้ได้มีค่าเท่ากับ 100 : 2.5 ซึ่งมีการเพิ่มปริมาณน้ำเสียใน OLR 2 นี้มากกว่าที่ OLR 1 ด้วยเหตุนี้ อาจทำให้ระบบ TPAD 2 ในช่วงนี้มีปริมาณไนโตรเจนที่น้อยเกินไป ซึ่งถูกจุลินทรีย์นำไปใช้เพื่อผลิตเป็นเซลล์ใหม่แทนที่จะนำมาผลิตแก๊สชีวภาพ จึงอาจทำให้ในช่วงนี้มีปริมาณแก๊สชีวภาพน้อยมากบางวันไม่มีปริมาณแก๊สชีวภาพเกิดขึ้นเลย ซึ่งสอดคล้องกับ Boonsawang et al. (2014) ได้ระบุว่าการผลิตแก๊สชีวภาพจากน้ำเสียจากการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยใช้ซีโอดี : ไนโตรเจน จาก 100: 0.6 เป็น 100 : 0.1 ที่สูงขึ้นไม่มีผลให้แก๊สชีวภาพและแก๊สมีเทนสูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไนโตรเจนได้มีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพเป็นอย่างมาก

จากการปรับใช้ OLR 2 ที่สูงขึ้นของระบบ TPAD 1 และ 3 จะเห็นว่าระบบได้มีการผลิตแก๊สชีวภาพลดลง อย่างไรก็ตามระบบ TPAD 3 ยังคงสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้เล็กน้อยถึงแม้จะดำเนินระบบที่ OLR 2 สูงขึ้นแต่ยังพบว่าแก๊สชีวภาพเกิดขึ้นได้น้อยกว่าการใช้ OLR 1 ที่ต่ำกว่า ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์มีผลต่อการทำให้ความเข้มข้นของกรดอะซิติกและกรดบิวทิริกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและก่อให้เกิดการสะสมในระบบมากเกินไปทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ส่งผลให้ก๊าซชีวภาพและมีเทนของระบบลดลง ซึ่งการเพิ่มปริมาณสารอินทรีย์เข้าระบบเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของวัตถุดิบให้สูงขึ้นจะช่วยปรับปรุงการผลิตก๊าซชีวภาพและมีเทนได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณสารอินทรีย์มากเกินไป (overloading) จะทำให้ระบบมีปริมาณสารอินทรีย์ในระบบมากเกินไปและจะมีผลต่อการยับยั้งการผลิตก๊าซชีวภาพ (Sun et al., 2017) ซึ่งจากงานวิจัยของ Sun et al. (2017) พบว่าระบบผลิตแก๊สชีวภาพจากสาหร่ายมีปริมาณแก๊สชีวภาพลดลงเมื่อมีการเพิ่มอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์จาก 4.12 เป็น 6.85 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน จากผลการทดลองสามารถกล่าวได้ว่าการเดินระบบที่ค่าอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ที่สูงขึ้นทำให้ระบบเกิดความล้มเหลวได้

ตาราง 19 ปริมาณแก๊สมีเทนที่เกิดขึ้นในระบบ TPAD ทั้งสามชุดการทดลอง

การทดลอง	อัตราภาวะบรรทุกระบบอินทรีย์ (กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน)	ปริมาณแก๊สมีเทน (%)	
		ถึงอุณหภูมิสูง	ถึงอุณหภูมิปานกลาง
TPAD 1	OLR 1 = 3.5/4.6	41.6	30.8
TPAD 1	OLR 2 = 5.8/3.4	65.5	ND
TPAD 2	OLR 1 = 3.8/4.5	55.2	ND
TPAD 2	OLR 2 = 3.2/2.7	ND	ND
TPAD 3	OLR 1 = 4.6/5.0	48.7	56.0
TPAD 3	OLR 2 = 6.8/7.0	44.4	48.0

ND: No data คือ ตรวจไม่พบเนื่องจากมีปริมาณแก๊สชีวภาพน้อยมาก

3.2 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชตลอดการทดลอง

จากการทดลองได้มีการศึกษาค่าพีเอชที่เข้าและออกระบบ (ภาพ 19-21) โดยพบว่าระบบ TPAD 1 ที่ใช้สไลด์จ้อเกรอะเป็นวัตถุดิบเดี่ยวมีค่าเฉลี่ยของค่าพีเอชที่เข้าระบบเท่ากับ 8.0 ± 0.5 ส่วนที่ระบบ TPAD 2 ที่ใช้สไลด์จ้อเกรอะหมักร่วมกับน้ำเสียจากการแปรรูปลำไยมีค่าพีเอชเฉลี่ยอยู่ที่ 7.2 ± 0.8 ในขณะที่น้ำเสียนี้อาศัยค่าพีเอชเท่ากับ 4.8 ± 0.4 ส่วนระบบ TPAD 3 ที่ใช้สไลด์จ้อเกรอะหมักร่วมกับเปลือกลำไยมีค่าพีเอชเฉลี่ยเท่ากับ 6.5 ± 0.2 ซึ่งจะเห็นว่าทั้งสามระบบมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพที่ควรมีค่ามากกว่า 6.2 และไม่ควรถูกเกิน 8.5 (Li and Khanal, 2016)

ในขณะเดียวกันเมื่อวัดค่าพีเอชของของเสียที่อยู่ในระบบตลอดช่วงการทดลอง (ภาพ 19-21) จะเห็นว่าตลอดช่วงการทดลองค่าพีเอชของระบบหมักร่วมทั้งสามระบบมีค่าค่อนข้างเป็นกลาง (ใกล้เคียง 7) โดยระบบ TPAD 1 มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 7.6 ± 0.1 และ 7.7 ± 0.1 สำหรับถึงอุณหภูมิสูงและปานกลางตามลำดับ ส่วนที่ระบบ TPAD 2 มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 7.1 ± 0.1 และ 7.22 ± 0.1 สำหรับถึงอุณหภูมิสูงและปานกลางตามลำดับ และระบบ TPAD 3 ได้มีค่าพีเอชในช่วงเดินระบบอยู่ในช่วง 7.1 ± 0.4 และ 7.1 ± 0.2 ที่ถึงอุณหภูมิสูงและปานกลางตามลำดับ

อย่างไรก็ตามเมื่อเดินระบบไปได้ระยะหนึ่งพบว่าค่าพีเอชได้เริ่มลดลงจนเข้าสู่ช่วงที่เป็นกรด ดังแสดงในภาพ 19-21 โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเดินระบบด้วยการปรับเปลี่ยนค่าใน OLR 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการปรับค่าอัตราภาวะบรรทุกระบบอินทรีย์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในระบบโดยที่ระบบ TPAD 1 (ภาพ 19) จะมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชคล้ายกับระบบ TPAD 2 (ภาพ 20) ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อมีการไปใช้ OLR 2 ระบบได้มีค่าพีเอชลดลงจากอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามค่าพีเอชยังอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสร้างมีเทนทำให้หลังจากนั้นค่าพีเอชของระบบได้เริ่ม

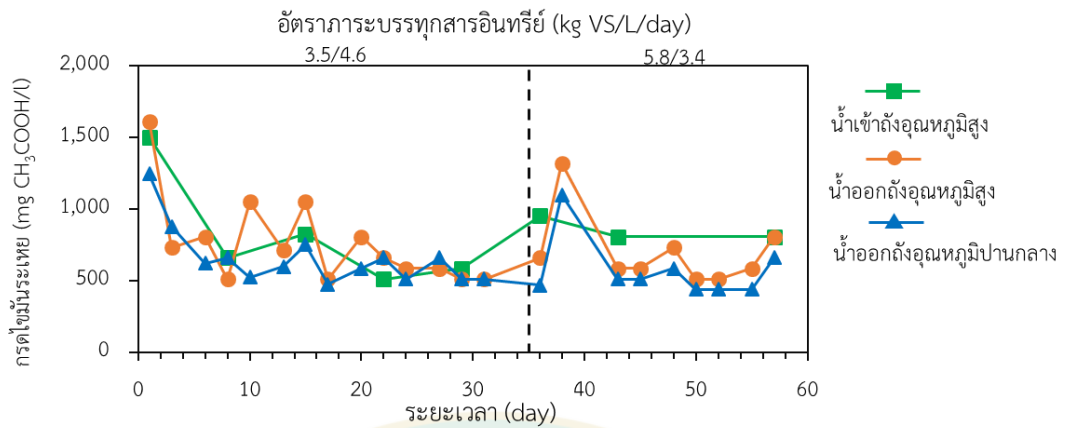
เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของลักษณะสัณฐาน บ่อเกราะที่ใช้ โดยในการทดลองได้มีเก็บรักษาไว้ในถังพักสัณฐานที่มีการกวนผสมก่อนที่จะนำมาใช้ และเมื่อเวลาผ่านไปตามระยะเวลาการทดลอง สารอินทรีย์รวมทั้งสารอาหารในสัณฐานบ่อเกราะถูกย่อยสลายและมีค่าลดลง โดยเฉพาะคาร์บอนและไนโตรเจนจึงทำให้ค่าพีเอชของระบบได้เพิ่มขึ้นและ นอกจากนี้ยังมีการสะสมของแอมโมเนีย ซึ่งความเข้มข้นของแอมโมเนียที่สูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสร้างมีเทน จึงทำให้แก๊สชีวภาพลดลง (Ceron-Vivas et al., 2019) อย่างไรก็ตามเมื่อดำเนินระบบไปได้ระยะหนึ่งที่ OLR 2 ของระบบ TPAD 2 จะพบว่าค่าพีเอชได้มีแนวโน้มลดลง โดยคาดว่าอาจเกิดจากการเจริญของแบคทีเรียสร้างกรดทำให้มีค่าลดลง

ในส่วนของระบบ TPAD 3 (ภาพ 21) ซึ่งเป็นการใช้สัณฐานบ่อเกราะร่วมกับเปลือกกล้วยพบว่า ในช่วงแรกระบบได้มีค่าพีเอชที่อยู่ในช่วงที่เป็นกลาง เนื่องจากเปลือกกล้วยเป็นสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ยากทำให้ช่วงแรกค่าพีเอชยังไม่เปลี่ยนแปลงไปมากนัก อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่ม OLR 2 ให้สูงขึ้นเป็น 6.8/7.0 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน พบว่าค่าพีเอชลดลงอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่สูงเกินไป ทำให้ระบบไม่สามารถทำงานต่อไปได้ เนื่องจากมีกรดไขมันระเหยสะสมในระบบมากเกินไป ค่าที่เหมาะสมและค่าพีเอชได้ลดลงต่ำสุดถึง 5.13 และ 6.20 สำหรับถังอุณหภูมิสูงและปานกลางตามลำดับ การลดลงของค่าพีเอชทำให้เกิดการเสียสมดุลของแบคทีเรียสร้างกรดและสร้างมีเทน จากการพิจารณาค่าพีเอชที่มีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพจะเห็นว่าค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ ทำให้ค่าพีเอชลดลงในระบบผลิตแก๊สชีวภาพทั้งสามระบบ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแก๊สชีวภาพที่ลดลงเมื่อมีการปรับเปลี่ยนค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ซึ่งการลดลงของค่าพีเอชจะมีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพโดยที่แบคทีเรียสร้างกรดจะผลิตกรดอะซิติก, ก๊าซไฮโดรเจน, คาร์บอนไดออกไซด์และ กรดไขมันระเหยง่ายอื่น ๆ เช่น กรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทิริกโดยที่ไอออนของไฮโดรเจนทำให้ค่าความเป็นกรดสูงส่งผลให้ค่าพีเอชต่ำลงจึงทำให้มีการสะสมของกรดไขมันระเหยสูงขึ้น ซึ่งถ้ามีปริมาณกรดสะสมมากเกินไปจะทำให้เกิดความเป็นพิษสำหรับแบคทีเรียสร้างมีเทนและส่งผลให้มีปริมาณแก๊สชีวภาพลดลง (Elbeshbishy and Nakhla, 2012)

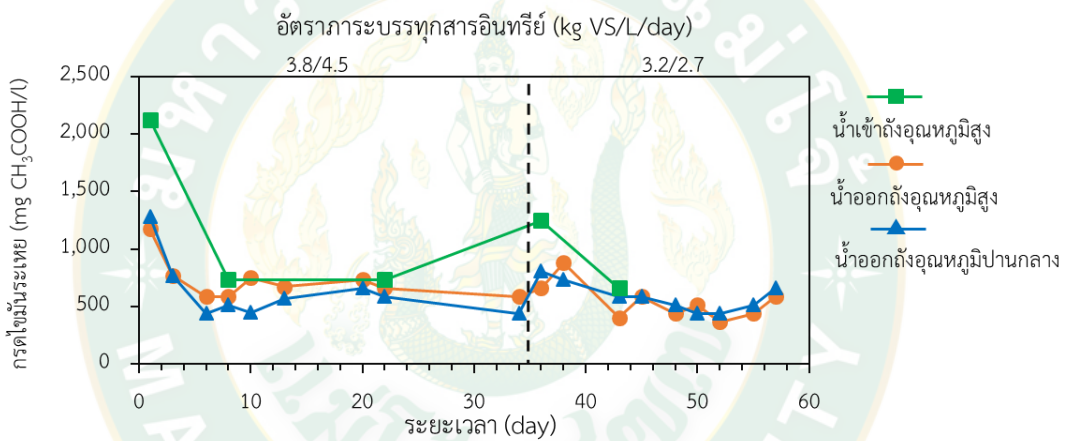
3.3 การเปลี่ยนแปลงกรดไขมันระเหยและสภาพต่างตลอดการทดลอง

กรดไขมันระเหยและสภาพต่างเป็นลักษณะสมบัติทางเคมีที่สำคัญซึ่งเป็นผลมาจากแบคทีเรียสร้างกรดที่จะใช้สารอินทรีย์ในระบบเพื่อสร้างกรดไขมันระเหย (VFA) ขึ้นมา ทั้งนี้จะมีไบคาร์บอเนตเกิดขึ้นเป็นค่าสภาพต่าง (Alkalinity) เพื่อเป็นบัฟเฟอร์ในการรักษาค่าพีเอชให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย (Bitton, 2005) โดยกรดไขมันระเหยที่เหมาะสมควรมีค่าอยู่ในช่วง 50-500 มก. อะซิเตท/ล. และจะมีความเป็นพิษเมื่อมีค่ามากกว่า 2,000 มก.อะซิเตท/ล. อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของกรดไขมันระเหยต่อสภาพต่าง (VFA/ALK) ที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพควรมีค่าน้อยกว่า 0.4 และหากมีค่ามากกว่า 0.8 แสดงว่าระบบมีบัฟเฟอร์ต่ำเกินไปอาจทำให้ค่าพีเอชของระบบลดลงจากการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันระเหย ในขณะที่ค่าสภาพต่างควรอยู่ในช่วง 2,000-3,000 มก. แคลเซียมคาร์บอเนต/ล. (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2553) โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียสร้างกรดจะผลิตกรดไขมันระเหยได้ดีกว่า ทำให้เกิดการสะสมตัวของกรดไขมันระเหยจนทำให้ค่าพีเอชลดลงและเกิดความล้มเหลวของระบบในที่สุด ทั้งนี้จะต้องมีการควบคุมระบบที่ดีเพื่อให้ระบบมีค่าพีเอชที่เหมาะสมของการเจริญแบคทีเรียสร้างกรดและแบคทีเรียสร้างมีเทน (Tchobanoglous et al., 2003)

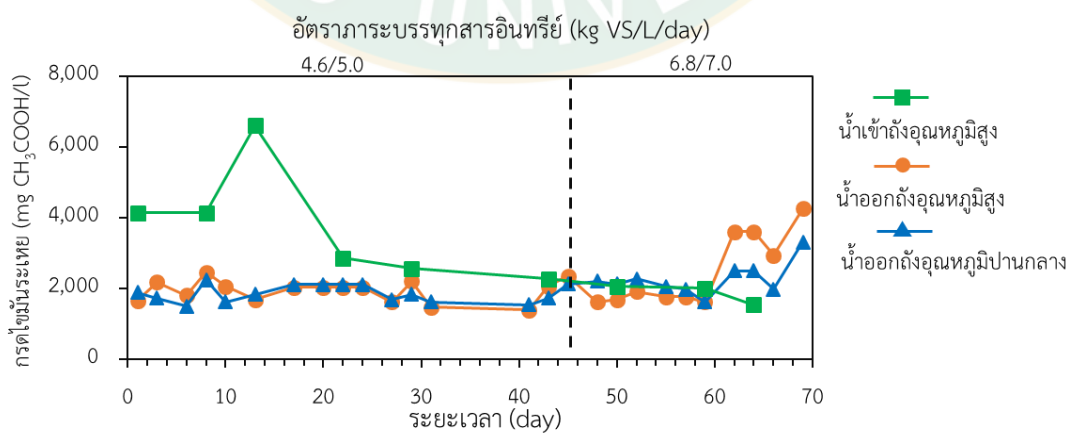
ในระหว่างการทดลองยังได้วิเคราะห์กรดไขมันระเหยและสภาพต่างที่ป้อนเข้า โดยพบว่ากรดไขมันระเหยที่ป้อนเข้าระบบมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเดินระบบโดยกรดไขมันระเหยที่ใช้ของระบบ TPAD 1, 2 และ 3 ได้มีค่าอยู่ในช่วง 832.25 ± 306.86 , $1,100.40 \pm 620.05$ และ $3,127.78 \pm 1,587.22$ มก.อะซิเตท/ล. ตามลำดับระบบ (ภาพ 22-24) ในส่วนของสภาพต่างที่เข้าระบบ พบว่าอยู่ในช่วง $2,057.57 \pm 426.57$, $1,331.20 \pm 552.05$ และ $1,637.25 \pm 688.76$ มก. แคลเซียมคาร์บอเนต/ล. ของระบบ TPAD 1, 2 และ 3 ตามลำดับ (ภาพ 25-27) และเมื่อพิจารณาค่ากรดไขมันระเหยต่อสภาพต่างที่เข้าระบบจะพบว่าที่ระบบ TPAD 1 มีค่าน้อยกว่า 0.4 ซึ่งแสดงว่าสลัดจ์บ่อเกรอะมีความสามารถในการรักษาสมดุลค่าพีเอชให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในช่วงเริ่มต้นระบบได้ ในขณะที่ระบบ TPAD 2 และ 3 มีค่าที่มากกว่า 0.8 (ภาพ 28-30) แสดงให้เห็นว่าในถังที่ใช้ น้ำเสียและเปลือกกล้วยอาจมีสภาพการทำงานของระบบที่ทำให้ระบบรักษาความสมดุลของค่าพีเอชไม่ได้เนื่องจากการสะสมกรดไขมันระเหยทำให้มีค่ากรดไขมันระเหยมากกว่าสภาพต่างไปมาก (Ciotola et al., 2014) อย่างไรก็ตามในระหว่างการเดินระบบพบว่าระบบได้มีการปรับสภาพให้กรดไขมันระเหยลดลงทำให้ระบบยังสามารถดำเนินต่อไปได้



ภาพ 22 กรดไขมันระเหยในระบบ TPAD 1 โดยแยกตาม OLR ที่ใช้



ภาพ 23 กรดไขมันระเหยในระบบ TPAD 2 โดยแยกตาม OLR ที่ใช้



ภาพ 24 กรดไขมันระเหยในระบบ TPAD 3 โดยแยกตาม OLR ที่ใช้

จากผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยของน้ำออกแต่ละระบบตลอดการทดลองพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงตามน้ำเข้าโดยจะลดลงตามระยะเวลาการทดลองเช่นเดียวกับน้ำเข้า ซึ่งระบบ TPAD 1 ได้แสดงในภาพ 22 จะเห็นว่ามีการไขมันระเหยที่อยู่ในระบบตลอดการทดลองอยู่ในช่วง 738.00 ± 281.89 และ 624.91 ± 204.85 มก.อะซิเตท/ล.จากถึงปฏิกรณ์อุณหภูมิสูงและปานกลางตามลำดับ ส่วนกรดไขมันระเหยในระบบ TPAD 2 (ภาพ 23) พบว่าในระหว่างการเดินระบบตลอดการทดลองกรดไขมันระเหยมีค่าอยู่ในช่วง 633.50 ± 191.44 และ 610.94 ± 204.55 มก.อะซิเตท/ล.จากถึงปฏิกรณ์อุณหภูมิสูงและปานกลางตามลำดับและในระบบ TPAD 3 (ภาพ 24) จะพบว่ามีกรดไขมันระเหยตลอดการทดลองมากกว่าทุกระบบโดยมีค่าเท่ากับ $2,143.77 \pm 706.70$ และ $2,009.62 \pm 382.26$ มก.อะซิเตท/ล.จากถึงปฏิกรณ์อุณหภูมิสูงและปานกลางตามลำดับ

นอกจากนี้ผลของสภาพต่างของน้ำออกของทุกระบบตลอดการทดลองได้แสดงในภาพ 25-27 โดยพบว่าระบบ TPAD 1 (ภาพ 25) มีค่าสภาพต่างตลอดการทดลองเท่ากับ $2,032.22 \pm 486.02$ และ $1,955.96 \pm 418.88$ มก. แคลเซียมคาร์บอเนต/ล.จากถึงปฏิกรณ์อุณหภูมิสูงและปานกลางตามลำดับ ส่วนระบบ TPAD 2 (ภาพ 26) พบว่าน้ำออกของถึงอุณหภูมิสูงและปานกลางมีค่าสภาพต่างตลอดการทดลองเท่ากับ $1,403.28 \pm 261.02$ และ $1,473.44 \pm 294.09$ มก. แคลเซียมคาร์บอเนต/ล.ตามลำดับ และค่าสภาพต่างของระบบ TPAD 3 ตลอดการทดลอง (ภาพ 27) พบว่ามีค่าเท่ากับ $3,633.88 \pm 861.74$ และ $4,229.23 \pm 724.83$ มก. แคลเซียมคาร์บอเนต/ล.จากถึงปฏิกรณ์อุณหภูมิสูงและปานกลางตามลำดับ

จากผลการทดลองจะพบว่ากรดไขมันระเหยง่ายตลอดช่วงการทดลองของทุกระบบทุกการทดลองมีค่ามากกว่า 500 มก.อะซิเตท/ล. อย่างไรก็ตามกรดไขมันระเหยในระบบ TPAD 1 และ 2 พบว่ามีค่าไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพแต่จะพบว่าระบบ TPAD 3 มีค่ากรดไขมันระเหยที่สูงมาก ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการใช้เปลือกลำไยมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักร่วมทำให้ระบบนี้มีสารอินทรีย์มากกว่าระบบอื่น โดยเฉพาะค่าซีโอดีที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เมื่อเกิดการย่อยสลายจึงมีปริมาณกรดอินทรีย์ในระบบมากกว่าระบบอื่น ทั้งนี้ในระบบมีสภาพต่างสูงพอที่สามารถต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากกรดไขมันระเหยได้จึงไม่ส่งผลให้ค่าพีเอชในระบบลดลงและทำให้กรดไขมันระเหยอยู่ในรูปที่แตกตัว (Dissociated forms) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์น้อยกว่าในรูปที่ไม่แตกตัว (Undissociated forms) ระบบจึงยังสามารถดำเนินต่อไปได้ ถึงแม้ว่าจะมีการไขมันระเหยมากกว่าค่าที่เหมาะสม (หทัยรัตน์, 2556)

เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วน ของกรดไขมันระเหยและสภาพต่างที่พบในระบบตลอดการ ทดลองพบว่าที่ถึงอุณหภูมิสูงของระบบ TPAD 1, 2 และ 3 (ภาพ 28-30) จะมีค่ากรดไขมันระเหยต่อ สภาพต่างเฉลี่ยอยู่ที่ 0.37 ± 0.09 , 0.45 ± 0.09 และ 0.64 ± 0.34 ตามลำดับ ส่วนที่ถึงอุณหภูมิต่ำ กลางพบว่าระบบ TPAD 1, 2 และ 3 ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.32 ± 0.08 , 0.41 ± 0.09 และ 0.50 ± 0.16 ตามลำดับ จะเห็นว่าค่ากรดไขมันระเหยต่อสภาพต่างทั้งสามระบบมีค่าอยู่ในช่วงที่ยังเหมาะสมต่อการ ผลิตแก๊สชีวภาพที่ควรมีค่าอย่างน้อยกว่า 0.4 แต่ไม่เกิน 0.8 ถึงแม้จะมีค่ากรดไขมันระเหยต่อสภาพต่าง ที่เกิน 0.4 โดยเฉพาะ TPAD 3 แสดงให้เห็นว่าในระบบเริ่มมีการผลิตหรือสะสมกรดไขมันระเหยง่าย มากขึ้นและยังพบว่าสภาพต่างได้มีค่าลดลงในช่วงท้ายของการทดลองเช่นกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการ ปรับเปลี่ยนอัตราภาะบรรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้ดำเนินระบบ

สำหรับการปรับอัตราภาะบรรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้ในการดำเนินระบบไปใช้ OLR 2 เมื่อ ระบบมีการผลิตแก๊สชีวภาพลดลงหรือระบบได้มีการสะสมกรดไขมันระเหยมากขึ้น โดยผลการปรับใช้ OLR 2 ของระบบ TPAD 1 จะพบว่า การปรับใช้ OLR ที่เพิ่มขึ้นจาก 3.5/4.6 ไปใช้ 5.8/3.4 กก. ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน และการปรับไปใช้ OLR 3.8/4.5 ไปใช้ 3.2/2.7 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.- วัน ของระบบ TPAD 2 ยังคงทำให้ระบบได้ดำเนินต่อไปได้ อย่างไรก็ตามการปรับไปใช้ OLR 2 ของ ระบบ TPAD 1 และ 2 พบว่าปริมาณสภาพต่างมีแนวโน้มที่ลดลงอาจเป็นผลมาจากแอมโมเนียไบ คาร์บอนเนตที่ผลิตออกมาระหว่างการเดินระบบซึ่งใช้เป็บบัฟเฟอร์เพื่อลดความเป็นกรดของระบบได้ เริ่มลดลงเนื่องจากถูกนำไปใช้สะเทินกรดไขมันระเหย ในขณะที่เดียวกันกรดไขมันระเหยยังมีค่าไม่ เปลี่ยนแปลงไปมากนัก แต่จะพบว่า การลดลงของสภาพต่างนี้ได้ส่งผลให้ค่ากรดไขมันระเหยต่อสภาพ ต่างได้มีแนวโน้มสูงขึ้นในช่วงท้ายของการทดลอง OLR 2 ซึ่งสอดคล้องกับค่าพีเอชและปริมาณแก๊ส ชิวภาพที่ลดลง ส่วนผลของการปรับใช้ OLR 2 ที่เพิ่มขึ้น (6.8/7.0 กก.ของแข็งระเหย/ลิตร-วัน) ของ ระบบ TPAD 3 พบว่ามีค่ากรดไขมันระเหยต่อสภาพต่างที่มากกว่า 0.4 และบางช่วงมีค่ามากกว่า 1.70 แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของสารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปอัตราภาะบรรทุกสารอินทรีย์ ทำให้ค่า สภาพต่างของระบบลดลงและมีการสะสมตัวของกรดไขมันระเหยอย่างเห็นได้ชัด ทำให้เกิดการเสีย สมดุลระหว่างแบคทีเรียสร้างกรดและแบคทีเรียสร้างมีเทน และส่งผลให้ค่าพีเอชในช่วงนี้ลดลงไปและ ปริมาณแก๊สชีวภาพได้ลดลงไปด้วยเช่นกัน

4. ประสิทธิภาพการกำจัดของเสียอินทรีย์ด้วยระบบ TPAD

จากการทดลองได้มีการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดของเสียอินทรีย์ที่เข้าและออกระบบที่อยู่ในรูปของค่าซีโอดี ค่าของแข็งทั้งหมดและค่าของแข็งระเหยเพื่อนำมาวิเคราะห์ถึงประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์ผลทางสถิติแบบ One Way ANOVA และบ่งชี้ความแตกต่างด้วยวิธีของ Duncan โดยมีผลการทดลองดังต่อไปนี้

4.1 ค่าซีโอดีและประสิทธิภาพการกำจัด

จากการวิเคราะห์ค่าซีโอดีที่ป้อนเข้าระบบดังแสดงในตาราง 19 จะเห็นว่าค่าซีโอดีของเสียที่เข้าทุกระบบของแต่ละอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ค่าไม่คงที่โดยจะพบว่า OLR 1 มีค่าซีโอดีเข้าระบบ TPAD 1, 2 และ 3 เท่ากับ $11,859.00 \pm 9,147.47$ mg/l $8,947.50 \pm 3,185.52$ mg/l และ $38,802.36 \pm 23,995.09$ mg/l ตามลำดับ ในส่วนของการปรับไปใช้ค่า OLR 2 จะพบว่ามีค่าเท่ากับ $6,082.67 \pm 6,796.66$ mg/l $7,429.25 \pm 3,600.68$ mg/l และ $31,410.50 \pm 10,092.54$ mg/l จากระบบ TPAD 1, 2 และ 3 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์จะพบว่าค่าซีโอดีที่เดิมเข้าระบบที่ OLR 2 มีปริมาณน้อยกว่าค่าซีโอดีที่เดิมเข้าระบบของการใช้ OLR 1 อาจเป็นผลมาจากในระหว่างการทดลองได้ใช้สลัดจ์บ่อเกรอะจากแหล่งเดียวและได้มีการเก็บกักสลัดจ์บ่อเกรอะไว้ในถังพักสลัดจ์ที่มีการกวนผสมก่อนที่จะนำมาใช้เสมออาจทำให้ค่าซีโอดีของสลัดจ์บ่อเกรอะมีค่าลดลง

จากผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีโอดีของทั้ง 3 ระบบ (ภาพ 31) พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีโอดีจะส่งผลให้ถึงการผลิตแก๊สชีวภาพ เนื่องจากค่าซีโอดีจะแสดงถึงปริมาณสารอินทรีย์ที่อยู่ในระบบที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะใช้สารอินทรีย์เปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันระเหยง่ายและเปลี่ยนเป็นอะซิเตตรทที่แบคทีเรียสร้างมีเทนนำไปใช้แล้วเปลี่ยนเป็นแก๊สชีวภาพในที่สุด ซึ่งในภาพรวมพบว่าการกำจัดค่าซีโอดีทั้งหมดของทั้งสองถังปฏิกรณ์จะมีค่าไม่คงที่ โดยที่ระบบ TPAD 1 (ภาพ 31ก) มีการกำจัดค่าซีโอดีเฉลี่ยที่ถังอุณหภูมิต่ำในช่วง $56.60 \pm 28.48\%$ ส่วนอุณหภูมิปานกลางมีค่าอยู่ที่ $32.85 \pm 25.64\%$ ซึ่งมีแนวโน้มเดียวกับระบบ TPAD 2 (ภาพ 31ข) ที่มีประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีโอดีในถังอุณหภูมิต่ำและปานกลางอยู่ที่ $63.85 \pm 15.02\%$ และ $47.13 \pm 19.83\%$ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าระบบ TPAD 3 (ภาพ 31ค) มีการกำจัดค่าซีโอดีได้ไม่คงที่และมีการกำจัดได้น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ TPAD 1 และ 2 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $27.63 \pm 19.02\%$ และ $18.92 \pm 12.92\%$ สำหรับถังอุณหภูมิต่ำและปานกลางตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีโอดีของแต่ละถังอุณหภูมิต่ำจะพบว่าที่อุณหภูมิสูงของระบบ TPAD 1 และ 2 มีประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีโอดีได้ดีกว่าที่อุณหภูมิปานกลางอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งมีความสอดคล้องกับปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นโดยจะพบว่ามีปริมาณแก๊สชีวภาพจากถังอุณหภูมิต่ำมากกว่าถังอุณหภูมิต่ำปานกลาง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการป้อนของเสียเข้าถังอุณหภูมิต่ำเป็นถังแรกที่มีการเดินระบบที่อุณหภูมิสูงถึง 55°C จะมีปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเข้ามาช่วยเร่งปฏิกิริยาให้

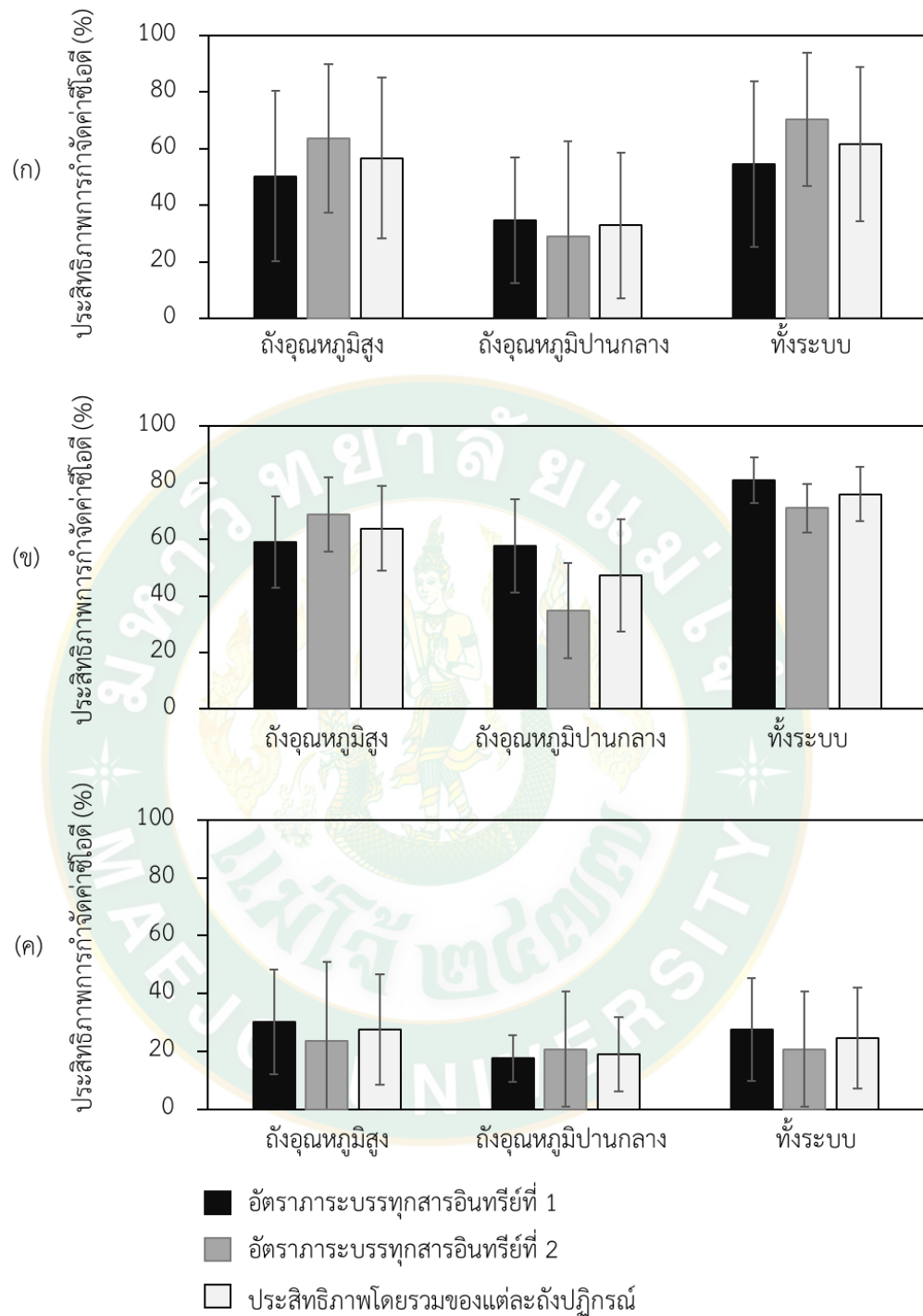
เกิดขึ้นได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิปานกลางที่ได้ดำเนินระบบที่ 35 °C ทำให้มีการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีกว่า (Arras et al., 2019) เป็นที่น่าสังเกตอีกว่าประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีโอดีโดยรวมของระบบ TPAD 1 และ 2 จะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของถังอุณหภูมิสูงโดยจะพบว่าประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีโอดีโดยรวมของระบบและถังอุณหภูมิสูงมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) ในขณะที่เดียวกันจะพบอีกว่าประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีโอดีของระบบ TPAD 3 ของทั้งสองถังอุณหภูมิได้มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้ดำเนินระบบจะพบว่าเมื่อปรับไปใช้ค่า OLR 2 จะพบว่าที่ถังอุณหภูมิสูงระบบได้มีการกำจัดค่าซีโอดีได้เพิ่มขึ้น ในขณะที่ถังอุณหภูมิปานกลางระบบได้มีการกำจัดค่าซีโอดีลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพสัณฐานที่เข้าระบบ โดยจะพบว่าค่าซีโอดีที่ออกระบบมีค่าลดลงตามค่าซีโอดีที่เข้าระบบเนื่องจากในระหว่างการทดลองได้ใช้สัณฐานที่ออกจากระบบแล้วเก็บไว้ในถังพักที่มีการกวนผสมอยู่เสมอจึงทำให้มีค่าซีโอดีลดลงตามระยะเวลาการทดลอง ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดลดลงไปด้วยและยังสอดคล้องกับปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นในช่วงการปรับใช้ OLR 2 ได้ลดลงเช่นกัน

ตาราง 20 ปริมาณค่าเฉลี่ยของซีโอดีในน้ำเข้าและน้ำออกระบบตลอดการทดลอง

การทดลอง	อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ (กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน)	น้ำเข้า (mg/l)	น้ำออก (mg/l)	
			ถังอุณหภูมิสูง	ถังอุณหภูมิปานกลาง
TPAD 1	OLR 1 = 3.5/4.6	11,859.0±9,147.4	7,425.0±6,630.1	5,235.8±5,189.8
TPAD 1	OLR 2 = 5.8/3.4	6,082.6±6,796.6	3,394.2±2,541.6	2,329.4±765.7
TPAD 2	OLR 1 = 3.8/4.5	8,947.5±3,185.5	3,780.2±1,653.0	3,284.7±3,533.3
TPAD 2	OLR 2 = 3.2/2.7	7,429.2±3,600.6	2,906.9±1,626.8	3,083.9±1,769.7
TPAD 3	OLR 1 = 4.6/5.0	38,802.3±23,995.0	46,670.4±8,339.6	51,791.6±8,872.8
TPAD 3	OLR 2 = 6.8/7.0	31,410.5±10,092.5	26,917.3±8,600.2	20,253.3±1,584.2

หมายเหตุ อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์หมายถึงปริมาณสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้าสู่ระบบในแต่ละครั้ง คิดเทียบจากอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่จะป้อนเข้าถังแรกต่ออัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้าถังที่สอง



ภาพ 31 ประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีไอดีโดยแยกตามอัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้ โดยที่ ก; ชุดการทดลอง TPAD 1, ข; ชุดการทดลอง TPAD 2, ค; ชุดการทดลอง TPAD 3

4.2 ค่าของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยและประสิทธิภาพการกำจัด

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยมีค่าไม่คงที่เช่นเดียวกับค่าซีโอดี ทั้งนี้ค่าของแข็งทั้งหมดในน้ำเข้าที่ป้อนเข้าระบบของทุกอัตรากระบวนการบรทุกสารอินทรีย์ได้แสดงในตาราง 20 โดยระบบ TPAD 1 ที่ใช้สลัดจ์บ่อเกรอะเป็นวัตถุดิบเดียวในการหมักมีค่าของแข็งทั้งหมดเท่ากับ $12,176.67 \pm 9,651.50$ และ $7,995.00 \pm 5,701.17$ mg/l ที่ OLR 1 และ 2 (3.5/4.6 และ 5.8/3.4 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน) ตามลำดับ ส่วนระบบ TPAD 2 ที่ใช้น้ำเสียจากการผลิตลำไยอบแห้งเป็นวัตถุดิบร่วมมีค่าของแข็งทั้งหมดเท่ากับ $18,373.33 \pm 18,995.62$ และ $6,582.50 \pm 3,871.40$ mg/l ที่ OLR 1 และ 2 (3.8/4.5 และ 3.2/2.7 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน) ตามลำดับ สำหรับระบบ TPAD 3 เป็นระบบที่ใช้เปลือกลำไยเป็นวัตถุดิบร่วมทำให้มีปริมาณของแข็งทั้งหมดมากที่สุด โดยที่การใช้ OLR 1 และ 2 (4.6/5.0 และ 6.8/7.0 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน) มีค่าของแข็งทั้งหมดเท่ากับ $85,788.83 \pm 9,637.20$ และ $93,148.25 \pm 9,080.21$ mg/l ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาค่าของแข็งระเหยที่เข้าระบบ (ตาราง 21) พบว่าระบบ TPAD 1 มีของแข็งระเหยง่ายเข้าระบบอยู่ในช่วง $7,735.00 \pm 6,979.25$ mg/l และ $4,705.00 \pm 3,667.37$ mg/l ที่ OLR 1 และ 2 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน ตามลำดับ ในขณะที่ระบบ TPAD 2 มีค่าของแข็งระเหยที่เข้าระบบสูงขึ้นโดยมีค่าเท่ากับ $11,740.00 \pm 12,589.76$ mg/l และ $4,895.00 \pm 2,998.27$ mg/l ที่ OLR 1 และ 2 ตามลำดับ ในขณะที่ระบบ TPAD 3 มีปริมาณของแข็งระเหยง่ายเข้าระบบสูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ในช่วง $76,016.00 \pm 10,477.47$ mg/l และ $83,647.00 \pm 7,691.85$ mg/l ที่การใช้ OLR 1 และ 2 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน ตามลำดับ จะเห็นว่าเมื่อปรับระบบเป็น OLR 2 ของระบบ TPAD 1 และ 2 มีค่าของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยเข้าระบบน้อยกว่าการใช้ OLR 1 อยู่มาก ซึ่งเป็นผลมาจากใช้สลัดจ์บ่อเกรอะที่มีปริมาณของแข็งน้อยจึงทำให้มีค่าของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยที่เข้าระบบน้อยลงไปด้วย และยังพบว่าระบบ TPAD 3 มีค่าของแข็งเข้าระบบมากกว่าระบบอื่นอยู่มากอาจเนื่องมาจากการใช้เปลือกลำไยซึ่งเป็นของแข็งและเป็นสารอินทรีย์ที่เป็นประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์พืชทำให้ค่าของแข็งที่ได้วิเคราะห์ได้มีปริมาณสูง

ตาราง 21 ปริมาณค่าเฉลี่ยของของแข็งทั้งหมดในน้ำเข้าและน้ำออกระบบตลอดการทดลอง

การทดลอง	อัตราภาระบรทุกสารอินทรีย์ (กก.ของแข็งระเหย/ ลบ.ม.-วัน)	น้ำเข้า (mg/L)	น้ำออก (mg/L)	
			ถึงอุณหภูมิสูง	ถึงอุณหภูมิปานกลาง
TPAD 1	OLR 1 = 3.5/4.6	12,176.6±9,651.5	13,157.6±12,231.7	8,723.7±8,341.6
TPAD 1	OLR 2 = 5.8/3.4	7,995.0±5,701.1	5,572.0±6,573.8	4,370.0±5,167.3
TPAD 2	OLR 1 = 3.8/4.5	18,373.3±18,995.6	11,200.5±13,375.0	6,412.0±7,355.2
TPAD 2	OLR 2 = 3.2/2.7	6,582.5±3,871.4	3,732.0±2,166.9	3,653.0±1,467.8
TPAD 3	OLR 1 = 4.6/5.0	85,788.8±9,637.2	56,214.6±10,921.4	59,273.3±8,195.3
TPAD 3	OLR 2 = 6.8/7.0	93,148.2±9,080.2	48,676.1±21,951.8	46,524.6±5,848.5

หมายเหตุ อัตราภาระบรทุกสารอินทรีย์หมายถึงปริมาณสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้าสู่ระบบในแต่ละครั้ง คิดเทียบจากอัตราภาระบรทุกสารอินทรีย์ที่จะป้อนเข้าถังแรกต่ออัตราภาระบรทุกสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้าถังที่สอง

ตาราง 22 ปริมาณค่าเฉลี่ยของของแข็งระเหยง่ายในน้ำเข้าและน้ำออกระบบตลอดการทดลอง

การทดลอง	อัตราภาระบรทุกสารอินทรีย์ (กก.ของแข็งระเหย/ ลบ.ม.-วัน)	น้ำเข้า (mg/L)	น้ำออก (mg/L)	
			ถึงอุณหภูมิสูง	ถึงอุณหภูมิกึ่งปานกลาง
TPAD 1	OLR 1 = 3.5/4.6	7,735.0±6,979.2	8,450.8±8,585.6	5,822.7±6,460.7
TPAD 1	OLR 2 = 5.8/3.4	4,705.0±3,667.3	3,411.0±4,119.6	2,559.0±3,251.0
TPAD 2	OLR 1 = 3.8/4.5	11,740.0±12,589.7	6,315.2±8,337.9	4,458.7±6,028.1
TPAD 2	OLR 2 = 3.2/2.7	4,895.0±2,998.2	2,324.0±1,569.5	2,170.0±808.1
TPAD 3	OLR 1 = 4.6/5.0	76,016.0±10,477.4	46,036.6±8,851.8	47,791.3±6,314.4
TPAD 3	OLR 2 = 6.8/7.0	83,647.0±7,691.8	41,152.3±20,091.7	38,786.9±5,300.2

หมายเหตุ อัตราภาระบรทุกสารอินทรีย์หมายถึงปริมาณสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้าสู่ระบบในแต่ละครั้ง คิดเทียบจากอัตราภาระบรทุกสารอินทรีย์ที่จะป้อนเข้าถังแรกต่ออัตราภาระบรทุกสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้าถังที่สอง

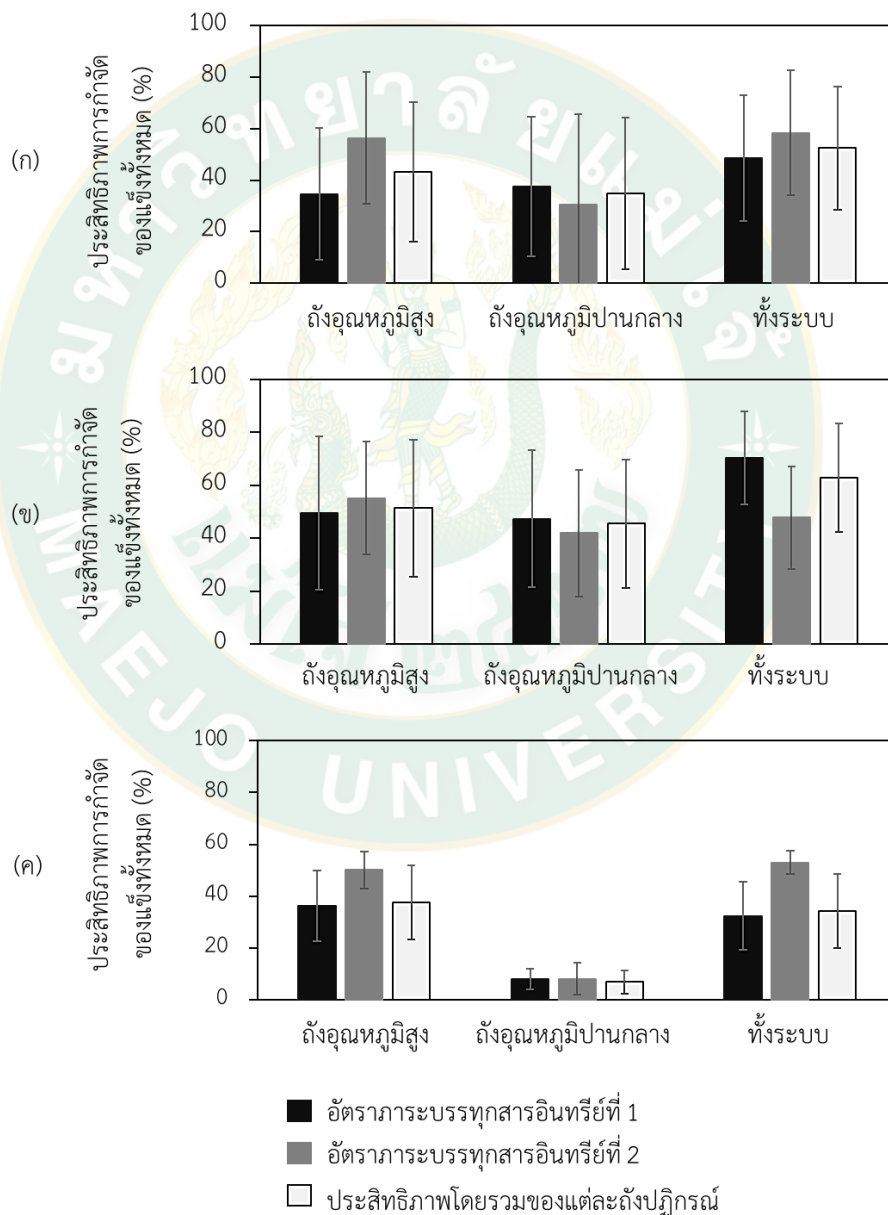
จากการทดลองได้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายของของแข็งทั้งหมดพบว่าประสิทธิภาพการกำจัดของแข็งทั้งหมดของทุกระบบมีค่าน้อยกว่า 50% โดยที่ระบบ TPAD 1 (ภาพ 32ก) มีการกำจัดของแข็งเฉลี่ยอยู่ในช่วง $43.33 \pm 27.06\%$ และ $34.73 \pm 29.47\%$ จากถังอุณหภูมิต่ำและปานกลางตามลำดับ ส่วนระบบ TPAD 2 (ภาพ 32ข) มีแนวโน้มการกำจัดของแข็งทั้งหมดคล้ายกับระบบ TPAD 1 ซึ่งในแต่ละถังสามารถกำจัดของแข็งได้เฉลี่ยอยู่ในช่วง $51.44 \pm 25.86\%$ และ $45.52 \pm 24.24\%$ ที่ถังอุณหภูมิต่ำและปานกลางตามลำดับ ในขณะที่ระบบ TPAD 3 (ภาพ 32ค) มีการกำจัดของแข็งถังอุณหภูมิต่ำและปานกลางอยู่ในช่วง $37.60 \pm 14.37\%$ และ $6.81 \pm 4.56\%$ ตามลำดับ

ส่วนประสิทธิภาพการกำจัดของแข็งระเหยง่ายพบว่าทั้งสามระบบมีแนวโน้มการกำจัดของแข็งระเหยง่ายไปในทางเดียวกันกับการกำจัดของแข็งทั้งหมด โดยทั่วไปแล้วค่าของแข็งระเหยง่ายเป็นส่วนของสารอินทรีย์ที่ระเหยไปได้ที่ $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ ทั้งนี้จะรวมถึงสารอินทรีย์และสารคงตัวต่างๆ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงค่าของแข็งระเหยง่ายภายใต้สภาวะไร้อากาศจะเปลี่ยนเป็นกรดไขมันระเหยง่ายและจะเปลี่ยนเป็นแก๊สชีวภาพในที่สุด ดังนั้นค่าของแข็งระเหยง่ายที่หายไปจึงเป็นไปในทางเดียวกันกับปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายและแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้น (Song et al., 2004) นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของของแข็งระเหยง่ายยังเป็นไปในทางเดียวกันกับค่าซีโอดีที่ลดลง

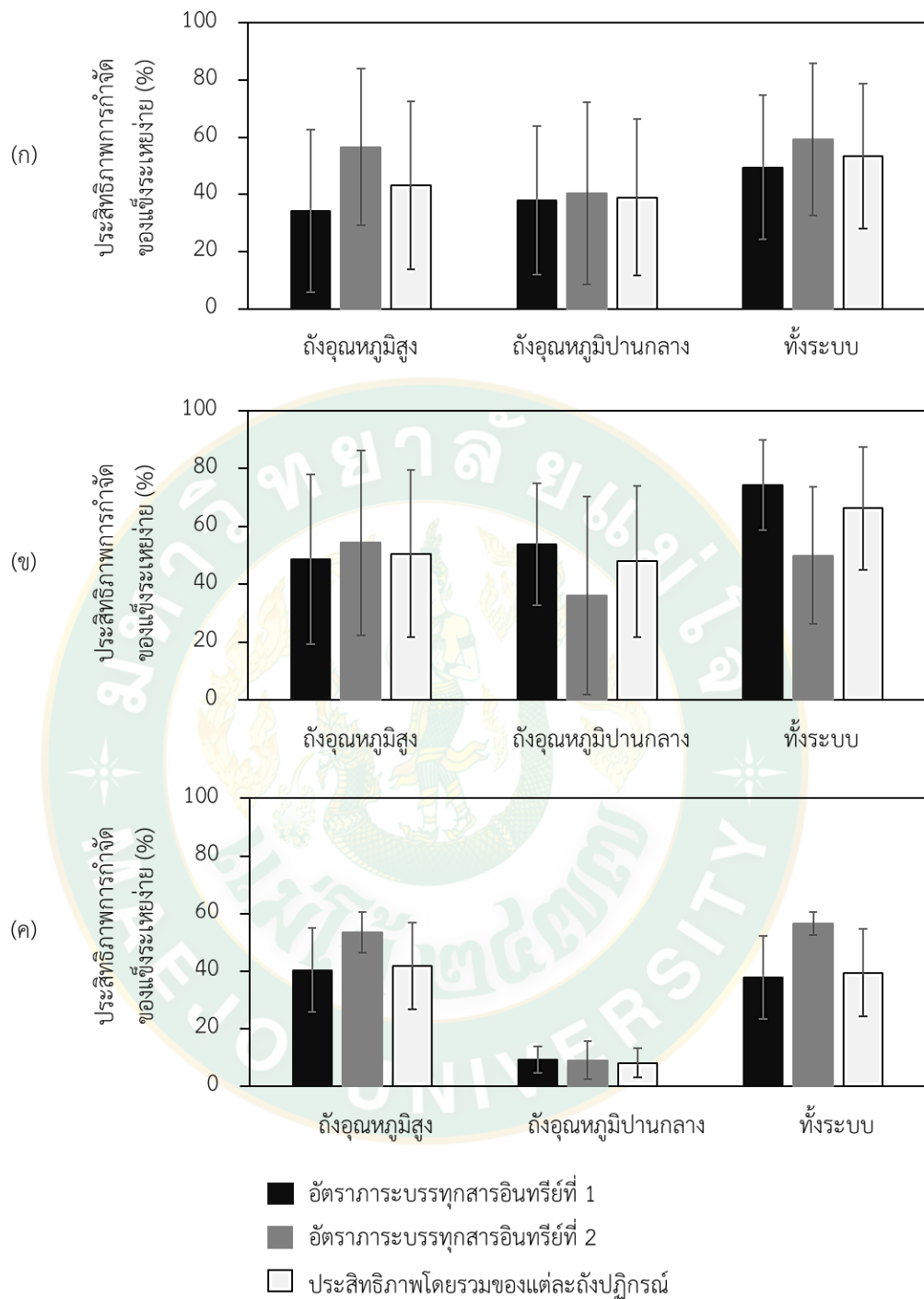
จากการวิเคราะห์การกำจัดของแข็งระเหยง่ายของระบบ TPAD 1 (ภาพ 33ก) พบว่ามีประสิทธิภาพการกำจัดโดยเฉลี่ยทั้งระบบอยู่ที่ $43.14 \pm 29.35\%$ และ $38.93 \pm 27.34\%$ จากถังอุณหภูมิต่ำและปานกลางตามลำดับ ส่วนที่ระบบ TPAD 2 (ภาพ 33ข) ถังอุณหภูมิต่ำสามารถกำจัดของแข็งระเหยได้สูงกว่าถังอุณหภูมิต่ำปานกลางโดยมีค่าเท่ากับ $50.60 \pm 28.83\%$ และ $47.93 \pm 26.10\%$ ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับในระบบ TPAD 3 (ภาพ 33ค) ที่ถังอุณหภูมิต่ำสามารถกำจัดของแข็งระเหยได้สูงกว่าถังอุณหภูมิต่ำปานกลาง โดยมีค่าเท่ากับ $41.80 \pm 15.08\%$ และ $8.10 \pm 5.14\%$ ตามลำดับ

จากการทดลองจะเห็นว่าผลการทดลองทุกระบบได้มีการกำจัดของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยลดลงที่ถังอุณหภูมิต่ำปานกลาง โดยจะพบว่าประสิทธิภาพการกำจัดที่ถังอุณหภูมิต่ำมีค่ามากกว่าอุณหภูมิต่ำปานกลางในทุกระบบอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยเฉพาะในระบบ TPAD 3 จะเห็นว่าถังอุณหภูมิต่ำมีประสิทธิภาพการกำจัดของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยได้มากกว่าถังอุณหภูมิต่ำปานกลางอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพการกำจัดโดยรวมของระบบ TPAD 3 น่าจะขึ้นอยู่กับถังอุณหภูมิต่ำ ในขณะที่ประสิทธิภาพการกำจัดของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยของถังอุณหภูมิต่ำและปานกลางของระบบ TPAD 1 และ 2 พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) ทั้งการที่ประสิทธิภาพการกำจัดของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยมีค่าน้อยในถังอุณหภูมิต่ำปานกลางน่าจะเป็นผลมาจากการสะสมตัวของสารอินทรีย์ในระบบโดยเฉพาะค่าของแข็งแขวนลอยซึ่งเป็นของแข็งที่ไม่ละลายน้ำแต่จะแขวนลอยอยู่ในน้ำจึงทำให้การวิเคราะห์ของแข็งมีค่าสูงประกอบ

กับที่อุณหภูมิสูงมีอัตราการย่อยสลายที่สูงกว่าและคาดว่าที่อุณหภูมิสูงเป็นถังแรกที่ได้รับของเสียเข้าระบบทำให้ของแข็งอินทรีย์ที่ย่อยสลายง่ายถูกย่อยสลายไปแล้ว เมื่อถ่ายของเสียเข้าถังอุณหภูมิปานกลางทำให้เหลือของแข็งที่ย่อยสลายยากซึ่งยากต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ (Cipolla et al., 2012) นอกจากนี้จากการพิจารณาผลของการเดินระบบด้วยการปรับใช้ OLR 2 ต่อประสิทธิภาพการกำจัดของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยง่าย พบว่าแต่ละระบบได้มีการกำจัดของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$)



ภาพ 32 ประสิทธิภาพการกำจัดของแข็งทั้งหมดโดยแยกตามอัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้ โดยที่ ก; ชุดการทดลอง TPAD 1, ข; ชุดการทดลอง TPAD 2, ค; ชุดการทดลอง TPAD 3



ภาพ 33 ประสิทธิภาพการกำจัดของแข็งระเหยง่ายโดยแยกตามอัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้ โดยที่ ก; ชุดการทดลอง TPAD 1, ข; ชุดการทดลอง TPAD 2, ค; ชุดการทดลอง TPAD

5. การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบหมักร่วม

จากการศึกษาในกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบผลิตแก๊สชีวภาพด้วยระบบ TPAD ที่ได้มีการปรับสภาวะการเดินระบบโดยใช้อัตราภาวะบรรทุksารอินทรีย์ 2 ค่าโดยจะมีการเก็บตัวอย่างสัปดาห์จากระบบ TPAD ทั้ง 3 ระบบมาทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ชุดไพรเมอร์ที่เหมาะสมและทำการศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบด้วยเทคนิค DGGE ซึ่งตำแหน่งและความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน DGGE gel จะแสดงถึงชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดเด่น ดังนั้นถ้ามีจำนวนของแถบดีเอ็นเอมากจะสามารถประมาณได้ว่าระบบนั้นมีความหลากหลายของจุลินทรีย์สูงและถ้ามีความเข้มมากจะแสดงได้ว่ามีปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ สูง แต่ทั้งนี้การใช้เทคนิค DGGE สามารถเกิด bias ที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจาก copy number หรือ artifacts ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Neilson et al., 2013) ที่ต้องนำมาพิจารณาเนื่องจากจะทำให้ข้อมูลการศึกษาความหลากหลายมีความผิดพลาดได้เช่นกัน นอกจากนี้ได้มีการพิจารณาความเข้มของแถบเพื่อหาสัดส่วนปริมาณของจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่มีการกระจายอยู่ในแต่ละตัวอย่างด้วยค่าความชุกชุมสัมพัทธ์ (Relative abundance) แล้วทำการเปรียบเทียบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแต่ละถึงปฏิกรณ์ด้วยดัชนีความหลากหลาย (diversity index) โดยการคำนวณจากค่า Shannon index (H') (Shannon and Weaver, 1998) ซึ่งจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อระบบได้มีจำนวนชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่หลากหลาย รวมทั้งได้มีการเปรียบเทียบความหลากหลายของโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในระบบหมักร่วมซึ่งจะแสดงในรูปแบบ Dendrogram สุดท้ายในส่วนแถบดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ที่สนใจจะถูกเลือกเพื่อนำไปเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์ซึ่งจะทำให้ทราบถึงความใกล้เคียงของชนิดพันธุ์จุลินทรีย์จากฐานข้อมูล NCBI

จากผลการศึกษาพบว่าดีเอ็นเอบางแถบปรากฏตลอดช่วงเวลาการทดลอง (common band) โดยคาดว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวจะสามารถพบได้ตลอดช่วงระยะเวลาการดำเนินระบบและเป็นแบคทีเรียชนิดเด่นที่มีความสำคัญต่อการผลิตแก๊สชีวภาพและอาจเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Major microbial group) และรักษาสภาพการทำงานของระบบ นอกจากนี้ยังพบว่าแถบดีเอ็นเอบางชนิดจะพบได้ในบางวันเท่านั้นหรือมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จางลงซึ่งคาดว่าจุลินทรีย์เหล่านี้ อาจจะเป็นจุลินทรีย์กลุ่มรอง (Minor microbial group) ซึ่งจะมีหน้าที่ส่งเสริมกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพหรือส่งเสริมการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ชนิดอื่นซึ่งมักจะมีความอ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมของระบบ (Shin et al., 2019) ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงดังรายละเอียดต่อไปนี้

5.1 การเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของกลุ่มประชากรแบคทีเรียตามสภาวะการดำเนินระบบที่แตกต่างกัน

การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบหมักร่วมทั้งสามระบบพบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียชนิดเด่น มีความหลากหลายและเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาการทดลอง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณและความเข้มข้นของของเสียที่เข้าระบบ รวมถึงปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตได้ในแต่ละวันโดยสังเกตได้จากจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่จะมีความเข้มและจางแตกต่างกันในแต่ละวัน โดยมีรายละเอียดของการเปลี่ยนแปลงในแต่ละระบบดังนี้

5.1.1 การเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 1

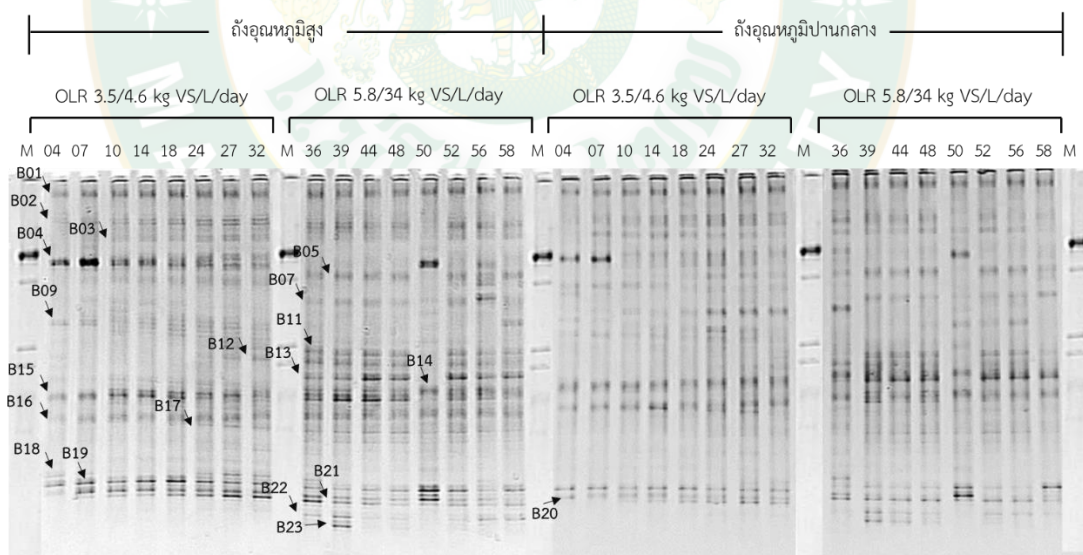
ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 1 แสดงในภาพ 34 โดยพบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอในถังอนุหมีสุงและปานกลางพบอยู่ประมาณ 11-13 แถบและ 8-17 แถบตามลำดับ (ภาพ 34) โดยพบว่ามีแถบดีเอ็นเอหมายเลข B15, B19, B20, B01, B21 และ B02 ปรากฏขึ้นในทุกวันตลอดการทดลองแต่จะมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ไม่เท่ากัน ซึ่งทั้ง 6 แถบมีความชุกชุมสัมพันธ์เฉลี่ยเท่ากับ $14.66 \pm 5.74\%$, $7.56 \pm 3.42\%$, $6.23 \pm 3.65\%$, $5.31 \pm 1.51\%$, $4.93 \pm 2.19\%$ และ $2.75 \pm 1.43\%$ ตามลำดับ (ภาพ 35) ซึ่งคาดว่าแถบดีเอ็นเอกลุ่มนี้ที่ตรวจพบตลอดระยะเวลาการทดลองน่าจะเป็นเชื้อตัวหลักที่อยู่ในระบบผลิตแก๊สชีวภาพและเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยมีความสามารถที่จะปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ซึ่งจะสังเกตได้จากความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่เปลี่ยนแปลงน้อยมากตลอดระยะเวลาการทดลอง

นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียบางแถบที่ปรากฏเฉพาะในถังอนุหมิโตอนุหมิหนึ่งเท่านั้น เช่น แถบหมายเลข B16 ซึ่งพบอยู่ในถังอนุหมีสุงที่มีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $6.89 \pm 3.50\%$ ตามลำดับ ในขณะที่จะพบแถบดีเอ็นเอหมายเลข B14 ซึ่งปรากฏเฉพาะในถังอนุหมิปานกลางเท่านั้นโดยมีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $9.78 \pm 4.77\%$ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียชนิดดังกล่าวมีความจำเพาะและสามารถเจริญได้ดีที่อนุหมิโตอนุหมิหนึ่งเท่านั้นโดยแถบดีเอ็นเอหมายเลข B16 อาจเป็นแบคทีเรียชนิดที่สามารถเจริญได้ดีที่อนุหมีสุงแต่เมื่อย้ายไปที่ถังอนุหมิปานกลางอาจทำให้แบคทีเรียชนิดนี้หยุดการเจริญหรือตายได้ทำให้ไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ที่ถังอนุหมิปานกลาง ส่วนแถบดีเอ็นเอหมายเลข B14 น่าจะเป็นชนิดที่สามารถเจริญได้ดีเฉพาะที่ถังอนุหมิปานกลางเมื่อมีการดำเนินระบบที่อนุหมีสุงขึ้นจึงไม่สามารถตรวจพบในช่วงอนุหมินั้นได้

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระหว่างที่มีการปรับใช้ OLR ในการดำเนินระบบที่แตกต่างกันพบว่าตรวจพบแถบดีเอ็นเอหมายเลข B04 จำนวนมากในถังอนุหมีสุงที่ OLR 1 หลังจากนั้นจะมีจำนวนลดลงเมื่อมีการเดินระบบด้วย OLR 2 แต่อย่างไรก็ตามจะพบแถบดี

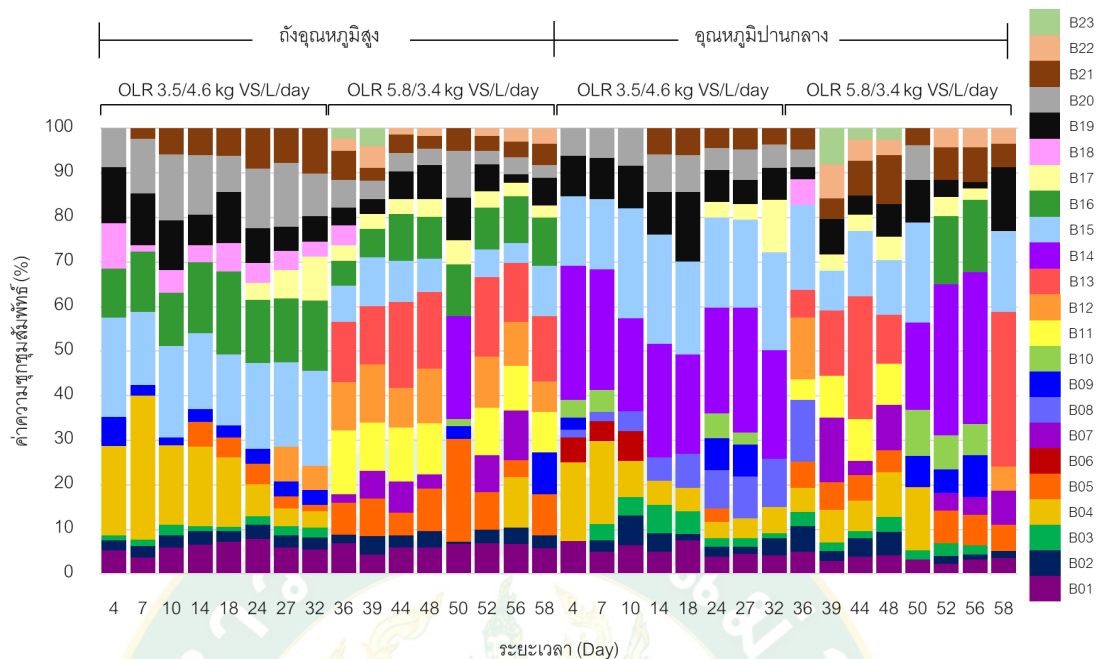
เอ็นเอหมายเลข B04 ตลอดช่วงการทดลองในถังอนุหมิปานกลางแต่จะมีความเข้มข้นลดลงตามระยะเวลาการทดลอง โดยมีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $7.75 \pm 7.37\%$ ซึ่งคาดว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการลดลงของสภาพต่างที่ลดลงตามระยะเวลาการทดลองของระบบนี้ นอกจากนี้ได้พบแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดอื่นที่ปรากฏขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนไปใช้ OLR 2 ในทั้งสองถึงปฏิกรณ์ เช่น แถบดีเอ็นเอหมายเลข B13, B05, B11, B12, B17 และ B07 โดยมีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $6.33 \pm 7.58\%$, $4.35 \pm 4.31\%$, $3.48 \pm 2.40\%$, $3.30 \pm 3.00\%$, $2.73 \pm 2.41\%$ และ $2.54 \pm 3.81\%$ ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าแบคทีเรียดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันระเหยและสภาพต่างที่พบว่ามีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเพิ่มขึ้นมากกว่า 1,100 มก.อะซิเตท/ล. และมากกว่า 2,000 มก.แคลเซียมคาร์บอเนต/ล. ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามยังมีแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่ปรากฏในระบบแต่จะพบในปริมาณน้อยโดยมีสัดส่วนค่าความชุกชุมสัมพันธ์เฉลี่ยที่น้อยกว่า 5% (เช่น แถบดีเอ็นเอหมายเลข B03, B06, B08, B09, B10, B18, B22 และ B23) ทั้งนี้แบคทีเรียที่พบทุกชนิดในระบบหมักร่วมน่าจะมึบทบาทหน้าที่ที่แตกต่างกัน ถึงแม้จะพบในปริมาณน้อยแต่อาจมีบทบาทในการสร้างสารหรือย่อยสลายสารอินทรีย์บางชนิดที่มีประโยชน์ต่อแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในระบบเดียวกัน



ภาพ 34 การเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรของแบคทีเรียในระบบ TPAD 1

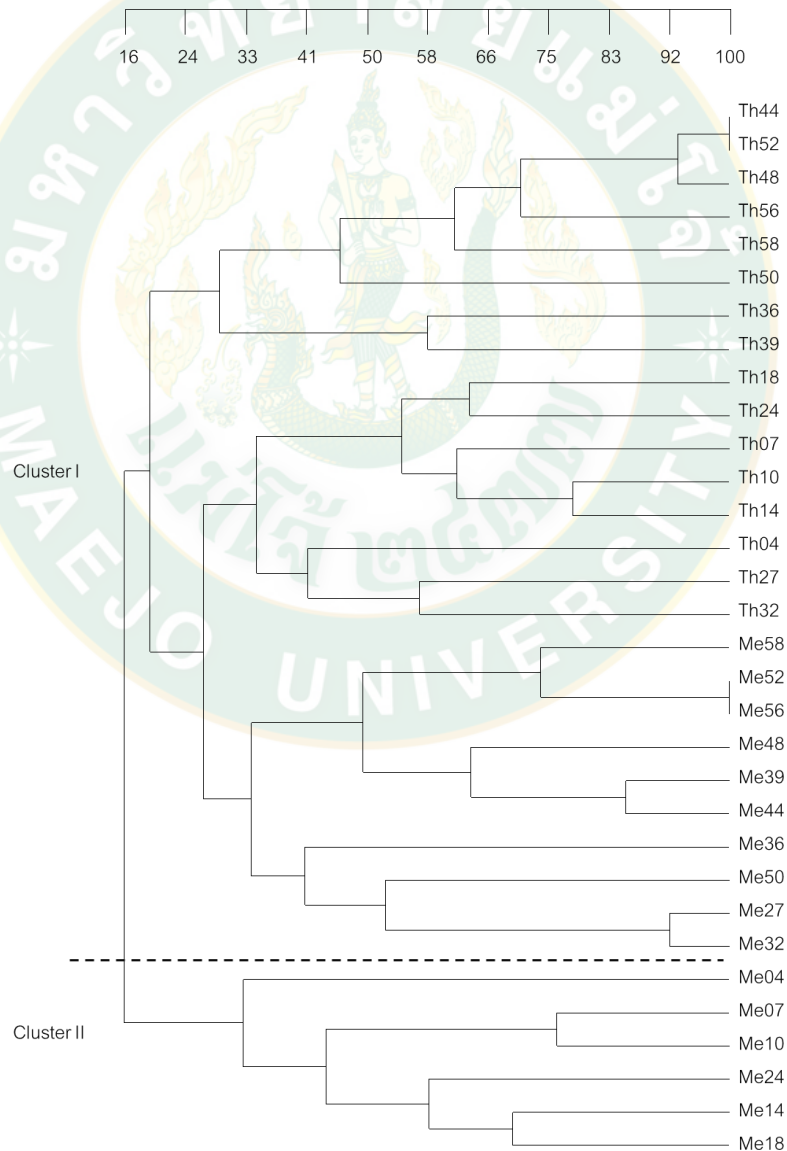
โดยที่ : M คือ Marker เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายประกอบด้วย *Sphingomonas terrae*, *Flavobacterium glanuli* *Pseudomonas sp.*, *Acidovorax soli* และ *Thauera butanivorans*



ภาพ 35 ค่าความชุกชุมสัมพัทธ์ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 1

เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียของระบบ TPAD 1 จาก cluster analysis ในรูปของ dendrogram (ภาพ 36) พบว่าสามารถจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรียออกเป็น 2 Cluster ที่แยกตามอุณหภูมิที่ใช้ในการเดินระบบและความแตกต่างของ OLR โดย Cluster I จะสามารถแบ่งกลุ่มย่อยออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยประชากรที่มาจากช่วงวันที่ 36-58 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่อยู่ในช่วงการเดินระบบด้วย OLR 2 (5.8/3.4 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน) ส่วนกลุ่มที่ 2 ของ Cluster I พบว่าเป็นการจัดกลุ่มประชากรที่มาจากทั้งสองถึงปฏิกรณ์ โดยสามารถแบ่งกลุ่มย่อยออกได้อีก 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 2.1 เป็นประชากรจากตัวอย่างวันที่ 4-32 ของถึงอุณหภูมิสูงที่การเดินระบบด้วย OLR 2 (3.5/4.6 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน) และกลุ่มที่ 2.2 ที่ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มประชากรที่มาจาก การเดินระบบด้วย OLR 2 ของถึงอุณหภูมิปานกลาง (ตัวอย่างวันที่ 36-58 และวันที่ 27 และ 32 (OLR 1) ซึ่งในกลุ่มนี้จะ เป็นประชากรจากช่วงท้ายของการเดินระบบด้วย OLR 1 รวมกับประชากรจากช่วงแรกที่ได้เดินระบบด้วย OLR 2 ซึ่งเป็นไปได้ว่าช่วงที่มีการปรับเปลี่ยนใช้ OLR 2 โครงสร้างของประชากรแบคทีเรียอาจยังไม่มีเปลี่ยนแปลงมากนักและแบคทีเรียในระบบกำลังจะปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง หลังจากนั้นแบคทีเรียเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงและเจริญเติบโตอย่างคงที่จึงทำให้มีโครงสร้างของประชากรแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงไปจากการเดินระบบด้วย OLR 1 สุดท้ายเป็นการจัดกลุ่ม Cluster II ของระบบ TPAD 1 พบว่าเป็นกลุ่มประชากรแบคทีเรียในช่วงที่เดินระบบด้วย OLR 1 ของถึงอุณหภูมิปานกลางซึ่งเป็นตัวอย่างที่มาจากวันที่ 4-24

จากการจัดกลุ่มทั้ง 2 Cluster จะพบว่ามีการจัดกลุ่มตามอุณหภูมิที่ใช้ดำเนินระบบ รวมทั้งได้มีการเปลี่ยนแปลงไปตามอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้และปริมาณสารอินทรีย์ที่เข้าระบบ ในช่วงที่มีการเปลี่ยนอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ซึ่งค่าซีโอดีเข้าระบบสำหรับ OLR 2 ของระบบ TPAD 1 มีค่าลดลงเนื่องจากการใช้สลัดจ์บ่อเกรอะชุดใหม่ในการเดินระบบ (ตาราง 19) ทำให้ระบบมีอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียลดลง จึงอาจทำให้มีแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้เนื่องจากไม่สามารถปรับสภาพให้เข้ากับปริมาณสารอินทรีย์ที่ลดลงหรือมีอาหารไม่เพียงพอ ในขณะเดียวกันอาจมีแบคทีเรียชนิดใหม่ขึ้นมาในช่วงนี้ รวมทั้งอาจมีแบคทีเรียชนิดอื่นจากสลัดจ์บ่อเกรอะเข้ามาเจริญในระบบอีกด้วย

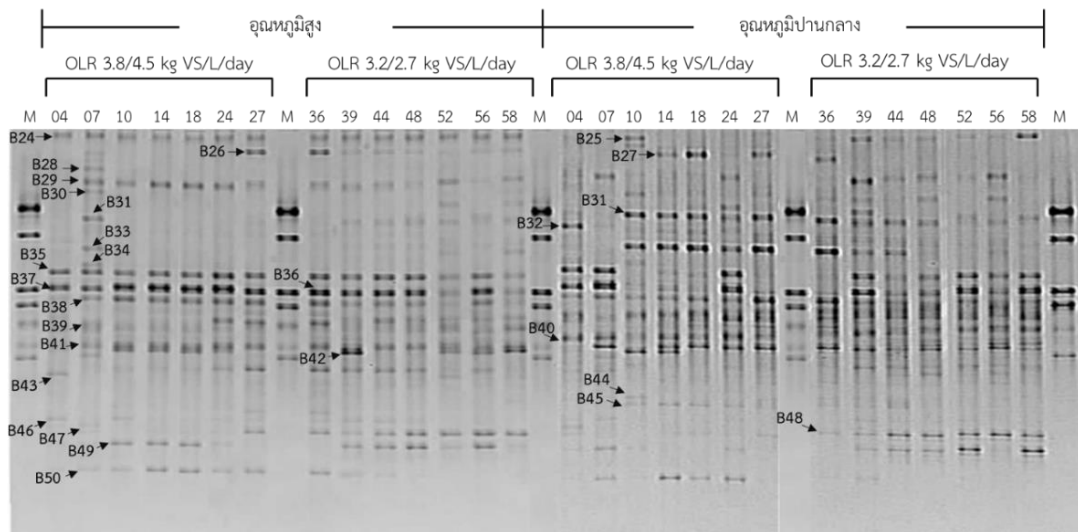


ภาพ 36 UPGMA dendrogram ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 1

5.1.2 การเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 2

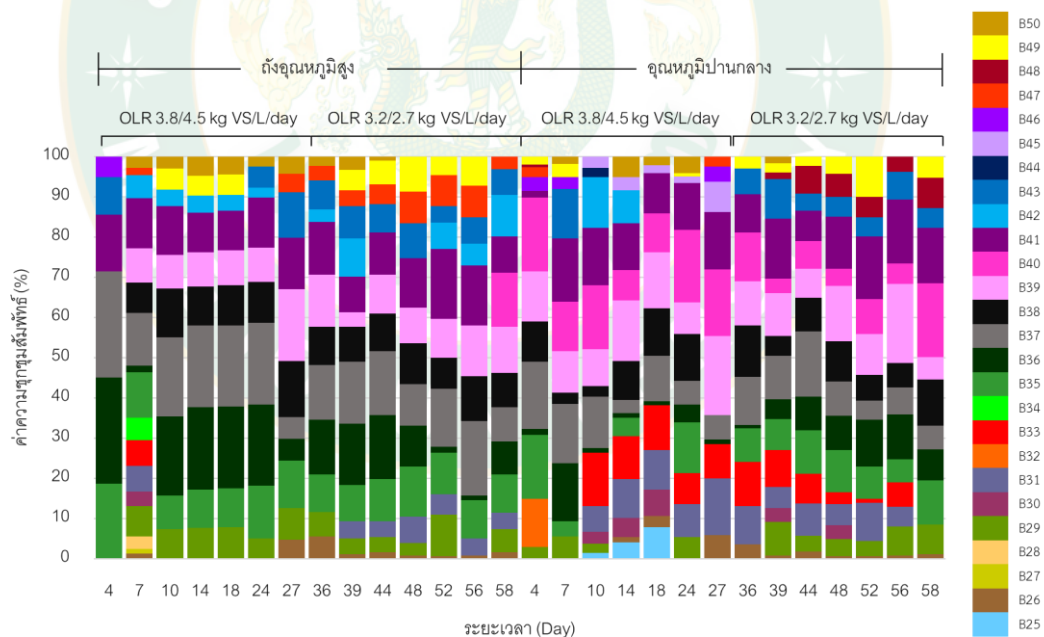
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรียของระบบ TPAD 2 พบว่าจำนวนประชากรชนิดเด่นที่พบในถังอุณหภูมิต่ำและปานกลางมีจำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ประมาณ 6-17 แถบและ 11-16 แถบตามลำดับ (ภาพ 37) โดยพบว่าแถบดีเอ็นเอหมายเลข B37, B41, B39, B36, B35, B38, B29 และ B49 เกิดขึ้นตลอดช่วงการทดลองทั้งในอุณหภูมิต่ำและปานกลางโดยมีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $12.78 \pm 5.82\%$, $12.11 \pm 3.19\%$, $10.56 \pm 3.89\%$, $9.23 \pm 7.54\%$, $8.99 \pm 3.18\%$, $8.46 \pm 2.80\%$, $4.55 \pm 2.12\%$ และ $2.87 \pm 2.39\%$ ตามลำดับ (ภาพ 38) คาดได้ว่าแถบดีเอ็นเอกลุ่มนี้ที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลองจะเป็นแบคทีเรียตัวหลักที่อยู่ในระบบผลิตแก๊สชีวภาพ ซึ่งสามารถเจริญในระบบได้ถึงแม้จะมีการปรับอัตราภาระบรรทุกระบบอินทรีย์และเปลี่ยนช่วงอุณหภูมิในการเดินระบบก็ตาม อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่ากลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวมีส่วนที่ลดลงในถังอุณหภูมิต่ำปานกลางและยังลดลงตามระยะเวลาการดำเนินระบบ โดยคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียจากระบบการผลิตลำไยอบแห้งซึ่งมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักที่ถูกใช้โดยแบคทีเรียไปอย่างรวดเร็วในช่วงแรกจึงทำให้สัดส่วนของแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีมากในช่วงแรกและลดลงตามระยะเวลาการทดลอง ในขณะที่เดียวกันพบว่ามีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอหมายเลข B40 และ B33 ซึ่งมีค่าชุกชุมสัมพันธ์เพิ่มขึ้นที่ถังอุณหภูมิต่ำปานกลางเท่ากับ $6.10 \pm 5.29\%$ และ $3.38 \pm 3.50\%$ ตามลำดับ และยังพบว่ายังมีบางแถบที่ปรากฏเฉพาะที่ถังอุณหภูมิต่ำเท่านั้น เช่น แถบดีเอ็นเอหมายเลข B42 และ B50 ซึ่งมีค่าชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $2.71 \pm 3.17\%$ และ $1.58 \pm 1.26\%$ ตามลำดับ โดยคาดว่าจะเกิดเป็นผลมาจากอุณหภูมิต่ำที่ใช้ดำเนินระบบเนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิในการเจริญที่แตกต่างกัน

นอกจากนี้ยังพบว่าการปรับใช้อัตราภาระบรรทุกระบบอินทรีย์ในการดำเนินระบบอาจส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นและลดลงของแถบดีเอ็นเอโดยบางแถบได้ปรากฏขึ้นมาใหม่และมีหลายแถบที่ได้หายไป เช่น แถบดีเอ็นเอหมายเลข B43, B47 และ B48 ที่ได้ปรากฏขึ้นมาในช่วงที่มีการปรับเปลี่ยนอัตราภาระบรรทุกระบบอินทรีย์ซึ่งพบว่าแถบดีเอ็นเอหมายเลข B43 จะปรากฏอยู่ในทั้งสองถังปฏิบัติการดำเนินระบบด้วยค่า OLR 2 ($3.2/2.7$ กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน) โดยมีค่าชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $4.58 \pm 2.38\%$ ในขณะที่จะพบแถบดีเอ็นเอหมายเลข B47 อยู่ในถังอุณหภูมิต่ำและแถบดีเอ็นเอหมายเลข B48 ในถังอุณหภูมิต่ำปานกลางที่การดำเนินระบบด้วย OLR 2 เท่านั้น โดยมีค่าชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $1.80 \pm 2.29\%$ และ $1.12 \pm 2.55\%$ ตามลำดับ นอกจากนี้การที่ตรวจพบแบคทีเรียทั้งสามแถบนี้เมื่อมีการใช้ค่า OLR 2 อาจจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนสไลด์จ่อเกรอะชุดใหม่ในการดำเนินระบบซึ่งทำให้มีแบคทีเรียบางชนิดที่มาจากสไลด์จ่อเกรอะชุดใหม่นี้เข้ามาเจริญในระบบหมักร่วมอีกด้วย



ภาพ 37 ผลการติดตามกลุ่มประชากรของแบคทีเรียในระบบ TPAD 2

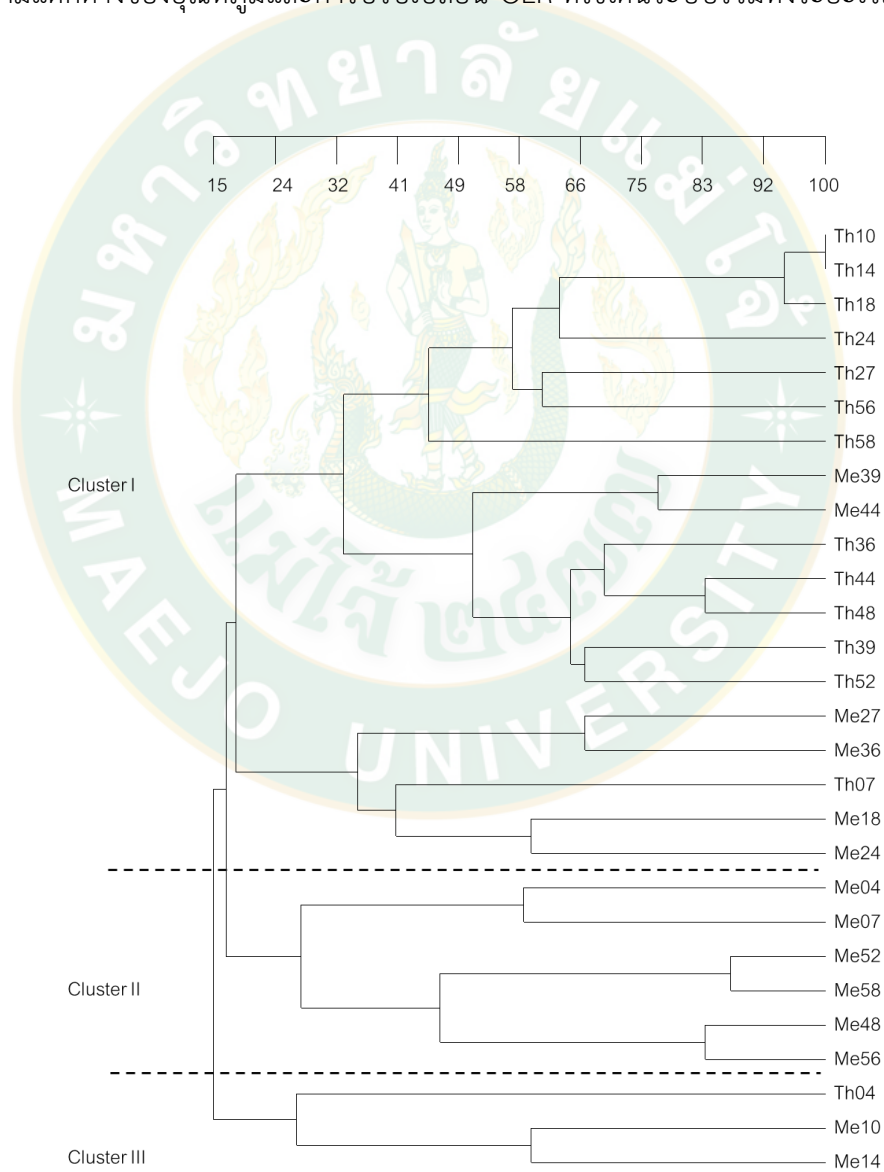
โดยที่ : M คือ Marker เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายประกอบด้วย *Sphingomonas terrae*, *Flavobacterium glanuli* *Pseudomonas sp.*, *Acidovorax soli* และ *Thauera butanivorans*



ภาพ 38 ค่าความชุกชุมสัมพัทธ์ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 2

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียของระบบ TPAD 2 จาก cluster analysis ในรูปของ dendrogram (ภาพ 39) พบว่ามีการจัดกลุ่มใหญ่ ออกเป็น 3 Cluster โดย Cluster I สามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้อีก 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1.1 ซึ่งเป็น

ประชากรจากตัวอย่างของถึงอุณหภูมิสูงวันที่ 10-27 (OLR 1) และวันที่ 56-58 (OLR 2) กลุ่มที่ 1.2 คือประชากรจากทั้งสองถึงปฏิกรณ์ที่การเดินระบบด้วย OLR 2 นั่นคือ วันที่ 36-52 (ถึงอุณหภูมิสูง) และวันที่ 39-44 (ถึงอุณหภูมิปานกลาง) และกลุ่มที่ 1.3 คือประชากรจากวันที่ 18-36 (OLR 1) ของถึงอุณหภูมิปานกลางและจากวันที่ 7 ของถึงอุณหภูมิสูง ส่วน Cluster II เป็นกลุ่ม 2.1 ซึ่งเป็นประชากรที่มาจากถึงอุณหภูมิปานกลางในวันที่ 4-7 และกลุ่มที่ 2.2 คือประชากรจากวันที่ 48-58 (OLR 2) ส่วน Cluster III เป็นกลุ่มที่ประกอบด้วยกลุ่มประชากรจากวันที่ 4 (OLR 1) ถึงอุณหภูมิสูง และวันที่ 10-14 (OLR 1) จากถึงอุณหภูมิปานกลาง จากการจัดกลุ่มดังกล่าวจะพบว่าน่าจะมีผลมาจากความแตกต่างของอุณหภูมิและการปรับเปลี่ยน OLR ที่ใช้เดินระบบรวมทั้งระยะเวลาในการเดินระบบ



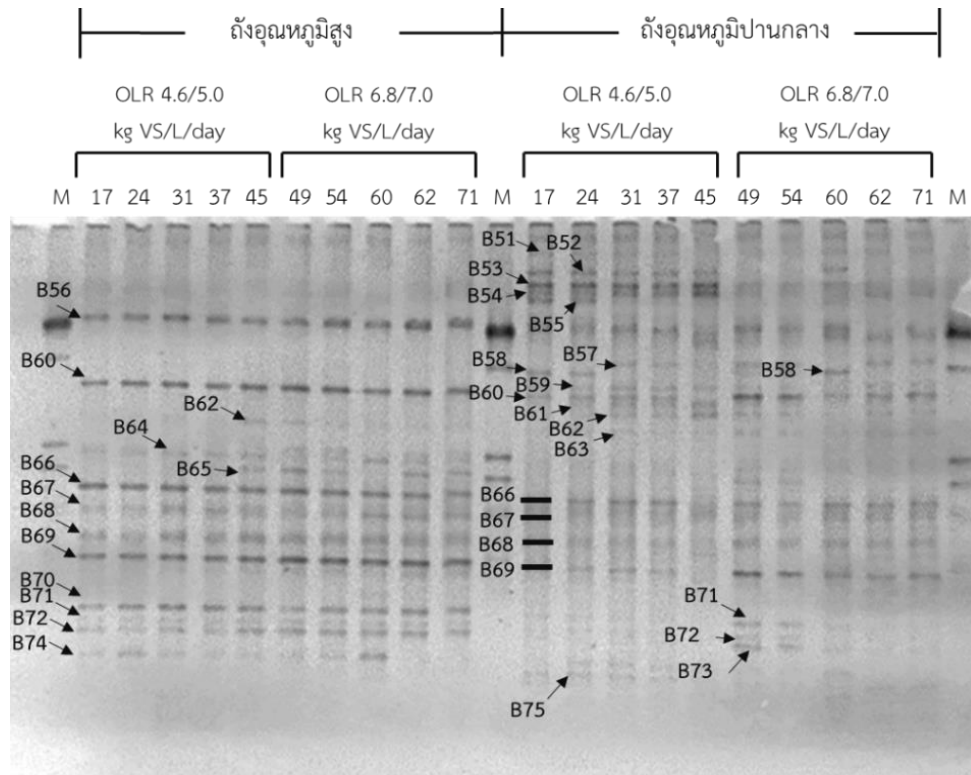
ภาพ 39 UPGMA dendrogram ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 2

5.1.3 การเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 3

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรแบคทีเรียจากระบบ TPAD 3 (แสดงในภาพ 40) พบว่าจำนวนประชากรชนิดเด่นที่พบที่ถังอุณหภูมิต่ำและปานกลางมีจำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ประมาณ 11-13 แถบ และ 8-17 แถบตามลำดับ (ภาพ 40) โดยจะพบว่ามีแถบดีเอ็นเอหมายเลข B69, B66, B68, B56, B67, B60, B72 และ B71 ที่ปรากฏอยู่ในทุกตัวอย่างทั้งจากถังอุณหภูมิต่ำและปานกลาง โดยมีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $16.10 \pm 9.58\%$, $13.43 \pm 4.69\%$, $11.21 \pm 5.27\%$, $10.85 \pm 5.72\%$, $9.75 \pm 4.59\%$, $7.65 \pm 3.81\%$, $2.11 \pm 1.37\%$ และ $1.93 \pm 0.90\%$ ตามลำดับ (ภาพ 41) ซึ่งคาดว่า เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีทั้งในช่วงอุณหภูมิต่ำและปานกลาง อย่างไรก็ตามได้พบว่าแถบดีเอ็นเอหมายเลข B56, B60, B66, B69, B70 และ B72 เป็นแถบที่มีความเข้มมากในตัวอย่างจากถังอุณหภูมิต่ำซึ่งคาดว่า เป็นแบคทีเรียที่อาจเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่มีบทบาทเกี่ยวกับการย่อยสลายเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบหลักของเปลือกลำไยให้เป็นสารอินทรีย์ที่มีขนาดเล็ก (น้ำตาลชนิดต่างๆ) เพื่อให้แบคทีเรียชนิดอื่นใช้ได้แล้วผลิตเป็นกรดไขมันระเหย ในขณะที่พบว่ามีบางแถบที่เกิดขึ้นในถังอุณหภูมิต่ำแต่มีความเข้มของแถบจางมาก เช่น แถบดีเอ็นเอหมายเลข B64, B67, B68, B71 และ B74 ซึ่งคาดว่าอาจเป็นแบคทีเรียกลุ่มรองที่มีบทบาทในการเปลี่ยนกรดไขมันระเหยให้เป็นกรดอินทรีย์หรือมีบทบาทอื่นที่เสริมการทำงานของแบคทีเรียชนิดหลัก

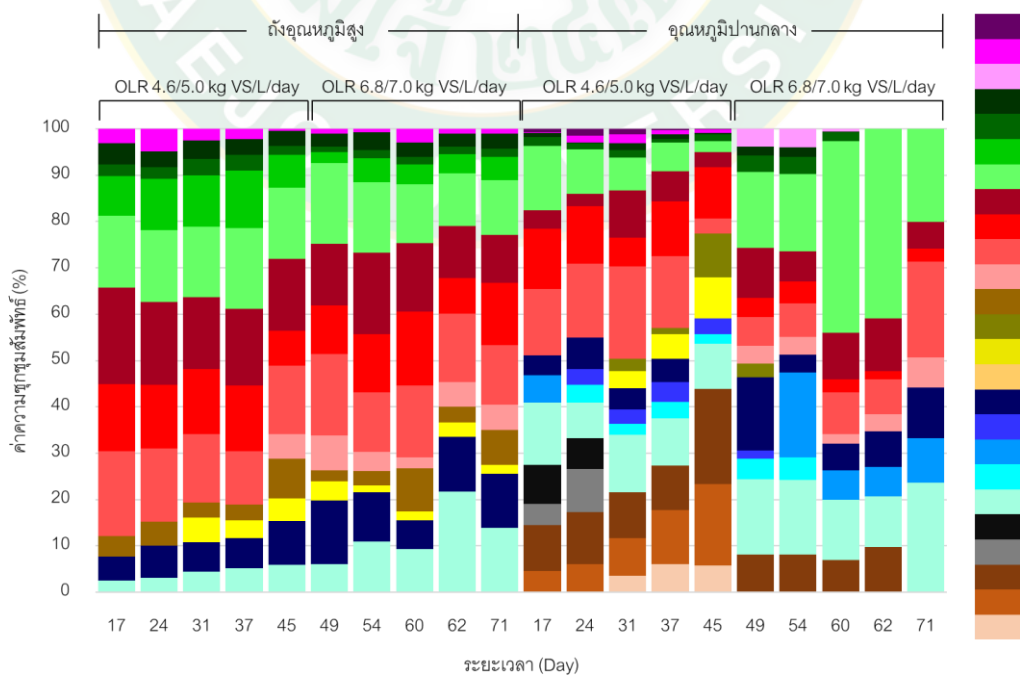
นอกจากนี้ยังพบว่ามีแถบดีเอ็นเอหมายเลข B51, B52, B53, B54 และ B55 ที่ปรากฏในช่วงแรกของถังอุณหภูมิต่ำปานกลางแต่จะมีความเข้มของแถบลดลงตามระยะเวลาการทดลองโดยเฉพาะในช่วงที่มีการเพิ่มค่า OLR 2 (6.8/7.0 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน) ในการเดินระบบ โดยคาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันระเหย (ที่มากกว่า 3,000 มก.อะซิเตท/ล.) ในช่วงท้ายของการทดลองจนทำให้มีค่ากรดไขมันต่อสภาพต่างที่มีแนวโน้มสูงขึ้น (มากกว่า 0.4) และทำให้มีค่าพีเอชลดลงจนน้อยกว่า 5.3 ตั้งแต่วันที่ 60 อาจทำให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้ไม่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีค่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่เดียวกันพบว่ามีบางแถบที่มีความเข้มเพิ่มขึ้น เช่น แถบดีเอ็นเอหมายเลข B60 และ B69 ซึ่งแบคทีเรียสองชนิดนี้น่าจะเป็นชนิดที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดได้และอาจมีบทบาทในการผลิตกรดไขมันที่สูงขึ้นในช่วงนี้

อย่างไรก็ตามยังพบว่ามีแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่ปรากฏบนเจลแต่จะพบว่ามีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เฉลี่ยที่น้อยกว่า 3% ทั้งนี้แบคทีเรียที่พบทุกชนิดในระบบหมักร่วมจะมีบทบาทหน้าที่ที่แตกต่างกัน ถึงแม้จะพบในปริมาณน้อยแต่มีบทบาทในการสร้างสารหรือย่อยสลายสารอินทรีย์บางชนิดที่มีประโยชน์ต่อแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในระบบเดียวกัน



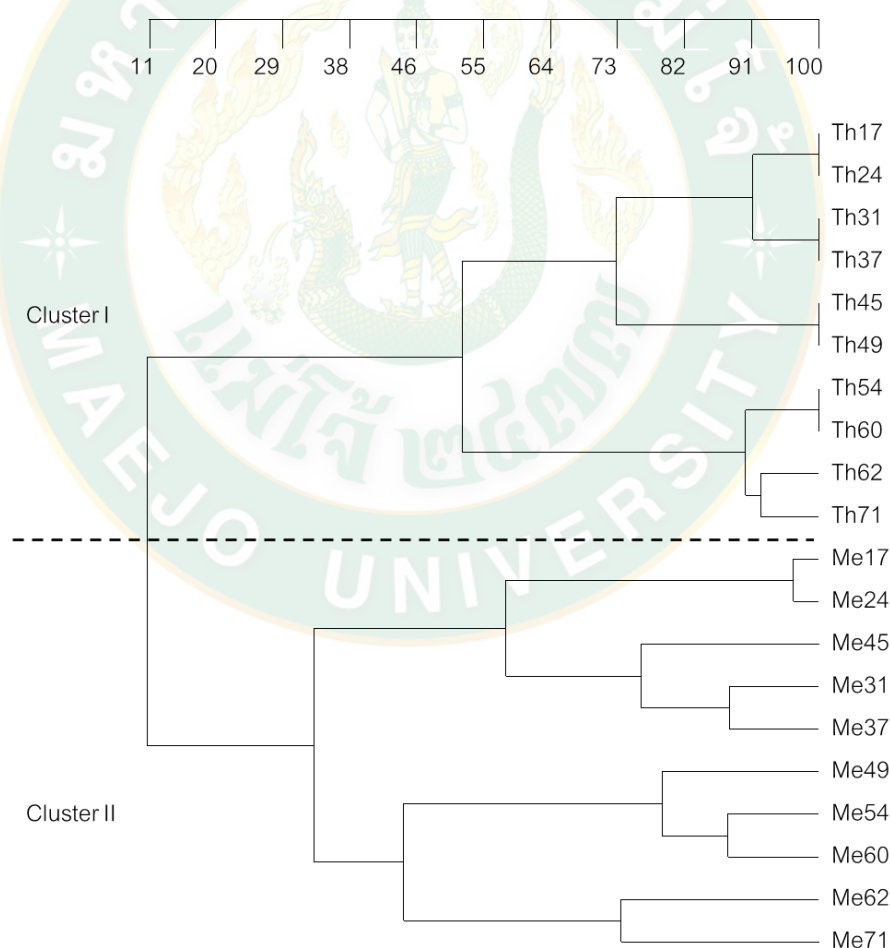
ภาพ 40 ผลการติดตามกลุ่มประชากรของแบคทีเรียในระบบ TPAD 3

โดยที่ : M คือ Marker เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายประกอบด้วย *Sphingomonas terrae*, *Flavobacterium glanuli* *Pseudomonas sp.*, *Acidovorax soli* และ *Thauera butanivorans*



ภาพ 41 ค่าความชุกชุมสัมพัทธ์ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 3

เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียจาก Cluster analysis ในรูปของ dendrogram (ภาพ 42) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มประชากรแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามอุณหภูมิที่ใช้ในการเดินระบบ โดยพบว่า Cluster I จะเป็นกลุ่มประชากรแบคทีเรียจากถึง อุณหภูมิสูง ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้อีก 2 กลุ่ม โดยกลุ่ม 1.1 คือประชากรแบคทีเรียจากวันที่ 17-36 (OLR 1) และวันที่ 45 และ 49 (OLR 2) และกลุ่มที่ 1.2 คือประชากรแบคทีเรียจากวันที่ 54-71 (OLR 2) สำหรับ Cluster II จะเป็นการจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรียจากถึงอุณหภูมิปานกลางทั้งหมด และสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย โดยกลุ่ม 2.1 คือประชากรจากวันที่ 17 และ 24 ส่วนกลุ่มที่ 2.2 คือประชากรจากวันที่ 31 และ 37 (OLR 1) และวันที่ 45 (OLR 2) ต่อมาเป็นการจัดกลุ่มที่ 2.3 คือประชากรจากวันที่ 49, 54 และ 60 และกลุ่มที่ 2.4 เป็นประชากรจากวันที่ 62 และ 71 ซึ่งกลุ่มที่ 3 และ 4 นี้เป็นการจัดกลุ่มประชากรจากการเดินระบบที่ OLR 2



ภาพ 42 UPGMA dendrogram ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 3

จากการเปรียบเทียบความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในระบบผลิตแก๊สชีวภาพทั้ง 3 ระบบโดยทำการเปรียบเทียบจำนวนและปริมาณของประชากรแบคทีเรียด้วยค่า Shannon index (H') (ตาราง 22-24) โดยที่ค่า Shannon index ที่มีค่ามากจะแสดงถึงความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียที่มีค่าสูง ผลการวิเคราะห์พบว่าความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในระบบ TPAD 1 จากถังอุณหภูมิต่ำพบว่ามีค่า Shannon index มากกว่าถังอุณหภูมิต่ำปานกลางทั้ง 2 อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์สำหรับการดำเนินระบบที่ OLR 1 และ 2 ของถังอุณหภูมิต่ำมีค่าเท่ากับ 2.233 ± 0.162 และ 2.465 ± 0.165 ตามลำดับ ส่วนถังอุณหภูมิต่ำปานกลางมีค่าเท่ากับ 2.184 ± 0.071 และ 2.271 ± 0.230 ตามลำดับ (ตาราง 22) ซึ่งคาดว่าอาจเป็นผลมาจากการใช้สลัดจ์บ่อเกรอะเป็นวัตถุดิบเดียวที่มีการเก็บไว้ในบ่อเกรอะเป็นเวลานาน ทำให้สารอินทรีย์ที่ย่อยสลายง่ายส่วนใหญ่ถูกย่อยสลายไปแล้วภายใต้สภาวะไร้อากาศและส่งผลให้สารอินทรีย์ในสลัดจ์บ่อเกรอะอยู่ในสภาพคงตัวเมื่อป้อนของเสียเข้าระบบโดยที่ถังอุณหภูมิต่ำเป็นถังแรกทำให้แบคทีเรียใช้สารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ง่ายไปหมดจึงมีจุลินทรีย์หลายชนิดเจริญเติบโตที่ถังอุณหภูมิต่ำ เมื่อนำของเสียจากถังอุณหภูมิต่ำต่อเข้าถังอุณหภูมิต่ำปานกลางจึงทำให้เชื้อบางชนิดที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำหยุดการเจริญ เนื่องจากไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ และยังคงเกี่ยวข้องกับระยะเวลาการเจริญเติบโตของเชื้อซึ่งเมื่ออยู่ในถังอุณหภูมิต่ำเชื้ออาจจะเจริญไปจนถึงระยะคงที่แล้ว (Stationary Phase) เมื่อป้อนของเสียเข้าถังอุณหภูมิต่ำปานกลางเชื้อจึงเริ่มเข้าสู่ระยะเซลล์ตาย (Death phase) ประกอบกับมีปริมาณสารอินทรีย์ที่เข้าระบบลดลงตามระยะเวลาการทดลอง (มีการเก็บสลัดจ์บ่อเกรอะไว้ในถังพักสลัดจ์ที่มีการกวนผสมก่อนที่จะนำไปใช้) จึงอาจทำให้ถังอุณหภูมิต่ำปานกลางมีความหลากหลายของแบคทีเรียน้อยกว่าถังอุณหภูมิต่ำ

ส่วนระบบ TPAD 2 ผลการวิเคราะห์พบว่าความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในถังอุณหภูมิต่ำมีค่า Shannon index น้อยกว่าถังอุณหภูมิต่ำปานกลางทั้ง 2 อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ โดยการดำเนินระบบที่ OLR 1 และ 2 ของถังอุณหภูมิต่ำมีค่าเท่ากับ 2.174 ± 0.281 และ 2.384 ± 0.065 ตามลำดับ ส่วนที่ถังอุณหภูมิต่ำปานกลางมีค่าเท่ากับ 2.328 ± 0.121 และ 2.452 ± 0.094 ตามลำดับ (ตาราง 23) ในขณะเดียวกันระบบ TPAD 3 (ตาราง 24) พบว่าระบบมีความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในถังอุณหภูมิต่ำน้อยกว่าถังอุณหภูมิต่ำปานกลางที่การเดินระบบด้วย OLR 1 แต่เมื่อมีการปรับไปใช้ OLR 2 กลับพบว่าระบบมีความหลากหลายของแบคทีเรียที่ถังอุณหภูมิต่ำปานกลางลดลงจนมีค่าน้อยกว่าถังอุณหภูมิต่ำโดยมีค่า Shannon index เฉลี่ยที่ OLR 1 และ 2 เท่ากับ 2.255 ± 0.084 และ 2.301 ± 0.037 ตามลำดับ ส่วนถังอุณหภูมิต่ำปานกลางมีค่าเท่ากับ 2.462 ± 0.086 และ 2.076 ± 0.269 ตามลำดับ ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าระบบ TPAD 2 และ TPAD 3 มีความ

หลากหลายของแบคทีเรียในถังอุณหภูมิปานกลางมากกว่าถังอุณหภูมิสูงซึ่งคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโดยช่วงอุณหภูมิปานกลางเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อหลายชนิด (Yu et al., 2014) นอกจากนี้จากค่าสารอินทรีย์ในรูปของซีไอดีที่เข้าระบบยังมีค่าไม่แตกต่างกันทั้งสอง OLR ซึ่งเป็นผลของการใช้น้ำเสียลำไยและเปลือกลำไยเป็นวัตถุดิบในการหมักร่วมจึงให้ระบบมีปริมาณสารอินทรีย์ที่คงที่ถึงแม้ว่าสล็อตจ๋บ่อเกรอะจะมีค่าซีไอดีที่ลดลงก็ตาม นอกจากนี้การหมักร่วมยังทำให้ระบบมีประเภทของสารอินทรีย์หรือสารอาหารที่หลากหลายและยังเป็นการปรับค่าซีไอดี : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส ให้มีเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในระบบด้วย (Guo et al., 2014) และเป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อมีการดำเนินระบบ TPAD 3 ที่ OLR 2 ทำให้ความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเพิ่มใช้อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ที่สูงเกินไปจนอาจทำให้แบคทีเรียที่เจริญในช่วงอุณหภูมิปานกลางไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็วได้ ซึ่งสังเกตได้จากภาพ 40 พบว่ามีแถบตีเอ็นเอของแบคทีเรียหลายแถบได้จางลงไปจากช่วงที่มีการใช้ OLR 1 แต่จะมีบางแถบเท่านั้นที่มีความเข้มเพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่าความแตกต่างของอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์มีผลต่อความหลากหลายของแบคทีเรีย โดยพบว่าการปรับใช้ค่า OLR 2 ของทุกระบบได้มีค่า Shannon index เพิ่มขึ้นจากการเดินระบบด้วย OLR 1 ของทั้ง 2 ถึงปฏิกรณ์ ยกเว้นถังอุณหภูมิปานกลางของระบบ TPAD 3 ที่พบว่าการเดินระบบที่ OLR 2 ได้มีค่า Shannon index ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ส่งผลให้ระบบมีความหลากหลายของแบคทีเรีย ทั้งนี้การเพิ่มค่าอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์อาจมีผลให้ระบบมีการเจริญของแบคทีเรียสร้างกรดเพิ่มขึ้น โดยจะพบว่าในช่วงท้ายของการเดินระบบที่ OLR 2 พบว่ากรดไขมันระเหยได้มีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Gao et al. (2019) ที่พบว่าการใช้อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ในการเดินระบบให้สูงขึ้นมีผลให้ระบบมีความหลากหลายของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นผลของการเจริญของแบคทีเรียสร้างกรด รวมทั้งอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนสล็อตจ๋บ่อเกรอะชุดใหม่ในการดำเนินระบบจึงอาจทำให้มีเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่เจริญขึ้นมา อย่างไรก็ตามผลของการใช้ค่า OLR 2 ที่ลดลงของระบบ TPAD 2 ส่งผลให้ระบบมีความหลากหลายของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นทั้งในถังอุณหภูมิสูงและปานกลาง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการใช้ค่า OLR 2 นั้นได้มีการใช้ปริมาณน้ำเสียลำไยมากกว่าการดำเนินระบบด้วยค่า OLR 1 ทั้งนี้ในน้ำเสียลำไยจะมีองค์ประกอบของน้ำตาลเป็นหลักจึงอาจทำให้มีแบคทีเรียเจริญได้ง่ายกว่าเมื่อใช้ในปริมาณมาก เนื่องจากน้ำตาลเป็นสารอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายทางชีวภาพ ในขณะที่ระบบ TPAD 3 พบว่าที่ถังอุณหภูมิสูงที่การเดินระบบด้วย OLR 1 ระบบมีความหลากหลายของแบคทีเรียน้อยกว่าการปรับใช้ค่า OLR 2 ที่สูงขึ้นส่วนที่ถังอุณหภูมิปานกลางพบว่าแบคทีเรียได้มีความหลากหลายลดลงเมื่อมีการเดินระบบด้วยค่า OLR 2 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับปริมาณกรดไขมัน

ระเหยที่เพิ่มขึ้น (มากกว่า 2,000 มก.อะซิเตท/ล.) จนทำให้มีอัตราส่วนของกรดไขมันระเหยต่อค่าสภาพต่างมีค่าสูงถึง 1.27 ในช่วงที่มีการใช้ค่า OLR 2 ซึ่งอาจเป็นผลของการใช้อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ที่สูงเกินไป (overloading) จะทำให้ระบบมีปริมาณสารอินทรีย์ในปริมาณมากและมีการสะสมของกรดไขมันระเหยที่ทำให้ค่าพีเอชลดลงและจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจึงทำให้การเดินระบบด้วยค่า OLR 2 มีความหลากหลายของแบคทีเรียลดลง แต่หากพิจารณากรดไขมันระเหยจะพบว่าที่ OLR 2 มีค่ามากกว่า 2,000 มก.อะซิเตท/ล.ในถังอนุหมีสสูงเช่นเดียวกับถังอนุหมี่ปานกลาง ซึ่งคาดว่าแบคทีเรียในช่วงอนุหมี่ปานกลางอาจมีความอ่อนไหวต่อปริมาณกรดไขมันระเหยมากกว่าแบคทีเรียที่อนุหมีสสูง (Liu et al., 2017) อย่างไรก็ตามการยับยั้งปฏิกิริยา hydrolysis ในถังอนุหมีสสูงเมื่อใช้ OLR ที่สูงขึ้น อาจทำได้โดยการหมุนเวียนน้ำทิ้งหรือการถ่ายของเสียออกระบบซึ่งจะช่วยลดการสะสมกรดไขมันระเหยและช่วยปรับปรุงการผลิตแก๊สชีวภาพในถังปฏิกรณ์สูงเนื่องจากเป็นผลของการเจือจางและการปรับค่าพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมได้ (Zuo et al., 2013)

ตาราง 23 ค่า Shannon index (H') ของแบคทีเรียจากระบบ TPAD 1

อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ (กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน)	ระยะเวลา (วัน)	Shannon index (H')	
		อนุหมีสสูง	อนุหมี่ปานกลาง
OLR 1 = 3.5/4.6	4	2.073	2.105
	7	1.958	2.178
	10	2.158	2.226
	14	2.247	2.161
	18	2.257	2.178
	24	2.373	2.319
	27	2.423	2.211
	32	2.378	2.096
	OLR 2 = 5.8/3.4	36	2.599
39		2.576	2.503
44		2.472	2.348
48		2.467	2.521
50		2.076	2.093
52		2.474	2.082
56		2.548	2.046
58	2.510	2.035	

ตาราง 24 ค่า Shannon index (H') ของแบคทีเรียจากระบบ TPAD 2

อัตราภาวะบรรทุกลสารอินทรีย์ (กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน)	ระยะเวลา (วัน)	Shannon index (H')	
		อุณหภูมิสูง	อุณหภูมิปานกลาง
OLR 1 = 3.8/4.5	4	1.667	2.203
	7	2.622	2.276
	10	2.186	2.344
	14	2.195	2.531
	18	2.159	2.388
	24	2.106	2.376
	27	2.280	2.181
OLR 2 = 3.2/2.7	36	2.355	2.354
	39	2.467	2.562
	44	2.372	2.519
	48	2.381	2.549
	52	2.373	2.457
	56	2.278	2.379
	58	2.463	2.341

ตาราง 25 ค่า Shannon index (H') ของแบคทีเรียจากระบบ TPAD 3

ค่าอัตราภาวะบรรทุกลสารอินทรีย์ (กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน)	ระยะเวลา (วัน)	Shannon index (H')	
		อุณหภูมิสูง	อุณหภูมิปานกลาง
OLR 1 = 4.6/5.0	17	2.140	2.402
	24	2.207	2.503
	31	2.299	2.537
	37	2.272	2.528
	45	2.357	2.342
OLR 2 = 6.8/7.0	49	2.261	2.391
	54	2.286	2.347
	60	2.320	1.901
	62	2.282	1.842
	71	2.356	1.899

5.2 การเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของกลุ่มประชากรอาร์เคียตามสภาวะการดำเนินระบบที่แตกต่างกัน

สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบหมักร่วมทั้งสามระบบ โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE พบว่าทั้ง 3 ระบบมีประชากรอาร์เคียชนิดเด่นที่มีความหลากหลายและเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิที่ใช้ดำเนินระบบ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณและความเข้มข้นของของเสียที่เข้าระบบ รวมถึงปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตได้ในแต่ละวัน โดยสังเกตได้จากจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่จะมีความเข้มและจางแตกต่างกันในแต่ละวัน นอกจากนี้ได้มีการเปรียบเทียบความใกล้เคียงสายพันธุ์ของอาร์เคียที่สนใจจากฐานข้อมูล NCBI BLAST โดยมีรายละเอียดของแต่ละระบบดังนี้

5.2.1 การเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 1

การเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 1 ซึ่งเป็นระบบที่ใช้สัลด์จ๋บ่อเกอร์เป็นวัตถุดิบเดียวในการผลิตแก๊สชีวภาพได้แสดงในภาพ 43 โดยพบว่าที่ถังอุณหภูมิสูงและปานกลางมีจำนวนแถบดีเอ็นเออยู่อย่างน้อยในช่วง 3-7 แถบและ 3-8 แถบตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่เลือกมาทั้งหมด 12 ตำแหน่ง ได้แก่หมายเลข A01-A12 เพื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอจาก DGGE gel กับฐานข้อมูล NCBI BLAST (ตาราง 25) โดยแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมีสัดส่วนที่สูงและต่ำแตกต่างกันตามระยะเวลาการดำเนินการศึกษาดังแสดงในภาพ 44 บางแถบเกิดขึ้นตลอดช่วงการทดลองทั้งในอุณหภูมิสูงและปานกลางแต่จะพบว่ามีความเข้มและจางที่แตกต่างกัน บางแถบมีความเข้มที่อุณหภูมิสูงมากกว่าอุณหภูมิปานกลาง และบางแถบมีความเข้มข้นที่อุณหภูมิปานกลางมากกว่าที่อุณหภูมิสูง ในขณะที่บางแถบแถบเข้มข้นหรือจางลงในละอัตรค่าบรรทุกสารอินทรีย์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแถบดีเอ็นเอหมายเลข A06 และ A09 เป็นแถบที่ปรากฏเฉพาะในถังอุณหภูมิสูง ในขณะที่เดียวกันแถบดีเอ็นเอหมายเลข A05 และ A12 เป็นแถบที่ปรากฏเฉพาะในถังอุณหภูมิปานกลาง

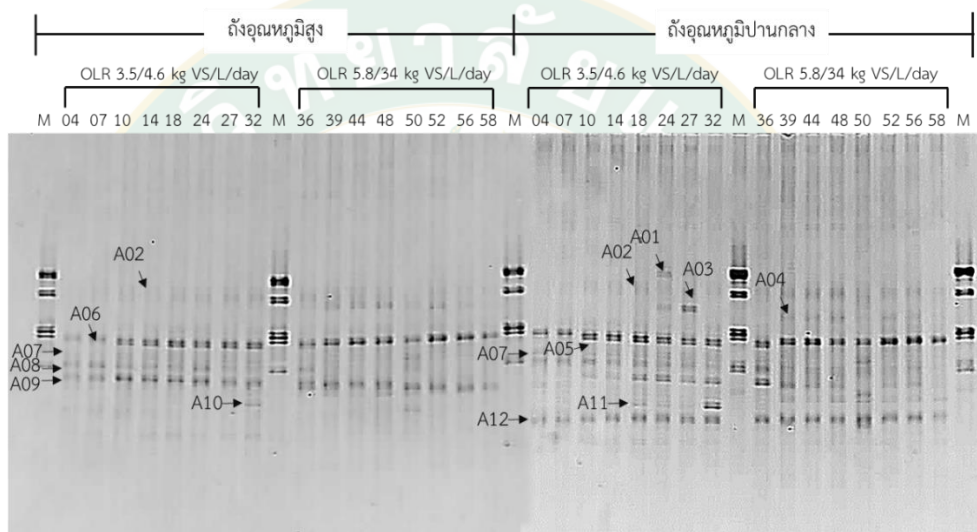
ผลการศึกษาพบว่าดีเอ็นเอหมายเลข A06 มีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $24.58 \pm 7.71\%$ ซึ่งตรงกับเชื้อ *Methanothermobacter thermoflexus* (90%, sequence similarity) และแถบดีเอ็นเอหมายเลข A09 ที่มีความเข้มมากในถังอุณหภูมิสูงมากกว่าในถังอุณหภูมิปานกลางโดยมีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $23.28 \pm 12.29\%$ พบว่าใกล้เคียงกับเชื้อ *Methanothermobacter defluvi* (87%, sequence similarity) ในขณะที่พบแถบดีเอ็นเอหมายเลข A12 มีความเข้มมากเฉพาะถังอุณหภูมิปานกลางซึ่งมีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $15.45 \pm 7.93\%$ จะเทียบได้ใกล้เคียงกับเชื้อ *Methanobacterium subterraneum* (95%, sequence similarity) และดีเอ็นเอหมายเลข A05 ซึ่งมีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $19.96 \pm 9.92\%$ จะเทียบได้ใกล้เคียงกับเชื้อ *Methanobacterium*

flexile ทั้งนี้จากการเปรียบเทียบความใกล้เคียงของสายพันธุ์อาร์เคียพบว่าแถบดีเอ็นเอที่สนใจเป็นแบบที่เรียสร้างมีเทนและคาดว่ามิบพบาทำในการผลิตแก๊สชีวภาพมากที่สุด

ในการผลิตแก๊สชีวภาพของระบบ TPAD 1 จะเห็นว่าที่ถังอุณหภูมิต่ำมี *Methanothermobacter thermoflexus* (A06) และ *Methanothermobacter defluvii* (A09) เป็นแบคทีเรียสร้างมีเทนที่อยู่ในสกุล *Methanothermobacter* ที่สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิสูงซึ่งนับว่าเป็นแบคทีเรียสร้างมีเทนที่สำคัญกับระบบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Guo et al., 2014) ที่พบว่า *Methanothermobacter* เป็นแบคทีเรียสร้างมีเทนชนิดเด่นที่อยู่ในถังอุณหภูมิสูงและเป็น hydrogenotrophic methanogens ซึ่งสามารถใช้ H_2/CO_2 และ formate เป็นแก๊สมีเทนได้ (Kotelnikova et al., 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Methanothermobacter* เป็นแบคทีเรียสร้างมีเทนที่สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิสูงถึง 60-65 °C (Cheng et al., 2011) และจะเจริญได้ช้าที่อุณหภูมิ 37 °C (Kotelnikova et al., 1993) ด้วยเหตุนี้จึงอาจทำให้ไม่พบกลุ่มนี้ในถังอุณหภูมิต่ำ และยังพบว่า *Methanothermobacter thermoflexus* และ *Methanothermobacter defluvii* สามารถเจริญเติบโตได้ที่ค่าพีเอช 7.5-8.5 และ 6.0-7.5 (Kotelnikova et al., 1993) ซึ่งสอดคล้องกับค่าพีเอชในถังอุณหภูมิสูงโดยมีค่าเท่ากับ 7.69 ± 0.15

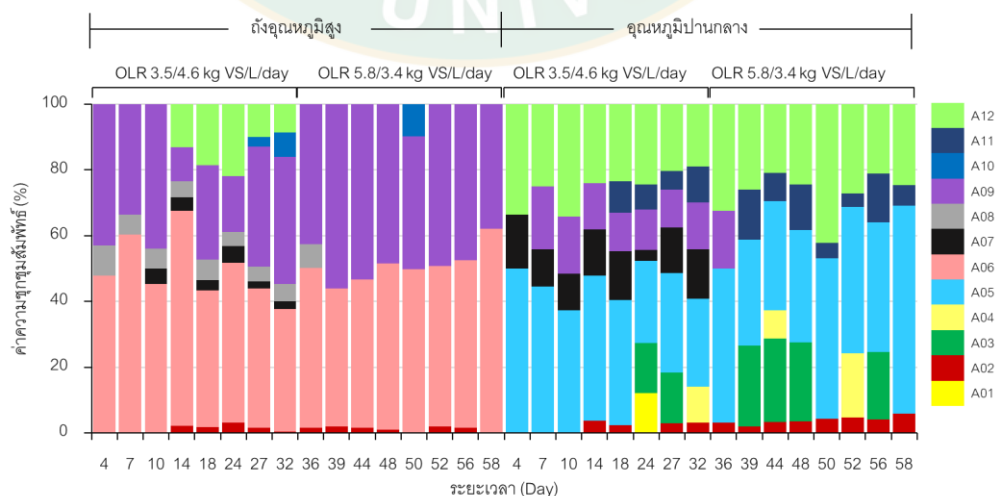
ในขณะที่เดียวกันพบว่าที่ถังอุณหภูมิต่ำมี *Methanobacterium flexile* (A05) และ *Methanobacterium subterraneum* (A12) เป็นแบคทีเรียสร้างมีเทนสำคัญในการผลิตแก๊สชีวภาพซึ่งอยู่ในสกุล *Methanobacterium* ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ (Li et al., 2015) พบว่า *Methanobacterium* เป็นแบคทีเรียสร้างมีเทนที่สำคัญในช่วงอุณหภูมิต่ำด้วยการใช้ H_2/CO_2 และ formate และยังมีงานวิจัยของ Battumur et al. (2016) ที่ได้ศึกษาความหลากหลายของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบผลิตแก๊สชีวภาพด้วยมูลสุกรซึ่งได้ดำเนินระบบที่อุณหภูมิ 37 °C ผลการทดลองพบว่า KOR-1 เป็นแบคทีเรียสร้างมีเทนชนิดเด่นในระบบผลิตแก๊สชีวภาพ และผลการเทียบสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ยังพบว่า KOR-1 มีความใกล้เคียงกับ *Methanobacterium formicum* (98%) และ *Methanobacterium ivanovii* (93%) ซึ่งเป็นแบคทีเรียสร้างมีเทนโดยสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 25-50 °C และสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 38 °C *Methanobacterium* ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำในช่วง 3-50 °C (Krivushin et al., 2010) แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ 55 °C (Joulian et al., 2000) โดยมีรายงานว่า *Methanobacterium subterraneum* สามารถเจริญได้ดีในช่วงค่าพีเอช 7.8-8.8 (Kotelnikova et al., 1998) ส่วน *Methanobacterium flexile* จะเจริญในช่วงค่าพีเอช 7.0-7.5 (Zhu et al., 2011) ซึ่งสอดคล้องกับค่าพีเอชในถังอุณหภูมิต่ำของระบบ TPAD 1 พบว่าอยู่ในช่วง 7.72 ± 0.14 อาจกล่าวได้ว่าอาร์เคียทั้ง 2 ชนิดนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับผลิตแก๊สมีเทนที่ถังอุณหภูมิต่ำของระบบ TPAD 1 แม้จะมีปริมาณแก๊สชีวภาพน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับถังอุณหภูมิสูงก็ตาม

นอกจากนี้จากสัดส่วนของแถบดีเอ็นเอยังพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของอาร์เคียชนิดอื่นที่ปรากฏใน DGGE gel แต่มีสัดส่วนน้อยมาก ซึ่งสังเกตได้จากความไม่คงที่ของความเข้มของแถบได้ปรากฏในแต่ละวัน เช่นดีเอ็นเอหมายเลข A01, A02, A03, A04, A07, A08, A10 และ A11 โดยแถบเหล่านี้พบว่าได้มีค่าความชุกชุมสัมพันธ์น้อยกว่า 5% ดังนั้นจะพบว่าการปรับใช้อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ที่แตกต่างกันนั้น ไม่ได้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรอาร์เคีย เนื่องจากเป็นระบบที่ใช้วัตถุดิบเดียวกันในการดำเนินระบบ ซึ่งเชื้อหลักและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นน่าจะสอดคล้องกับอุณหภูมิที่ใช้ดำเนินระบบที่แตกต่างกัน



ภาพ 43 ผลการติดตามกลุ่มประชากรของอาร์เคียในระบบ TPAD 1

โดยที่ : M คือ Marker เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายประกอบด้วย *Sphingomonas terraе*, *Flavobacterium glanuli* *Pseudomonas sp.*, *Acidovorax soli* และ *Thauera butanivorans*

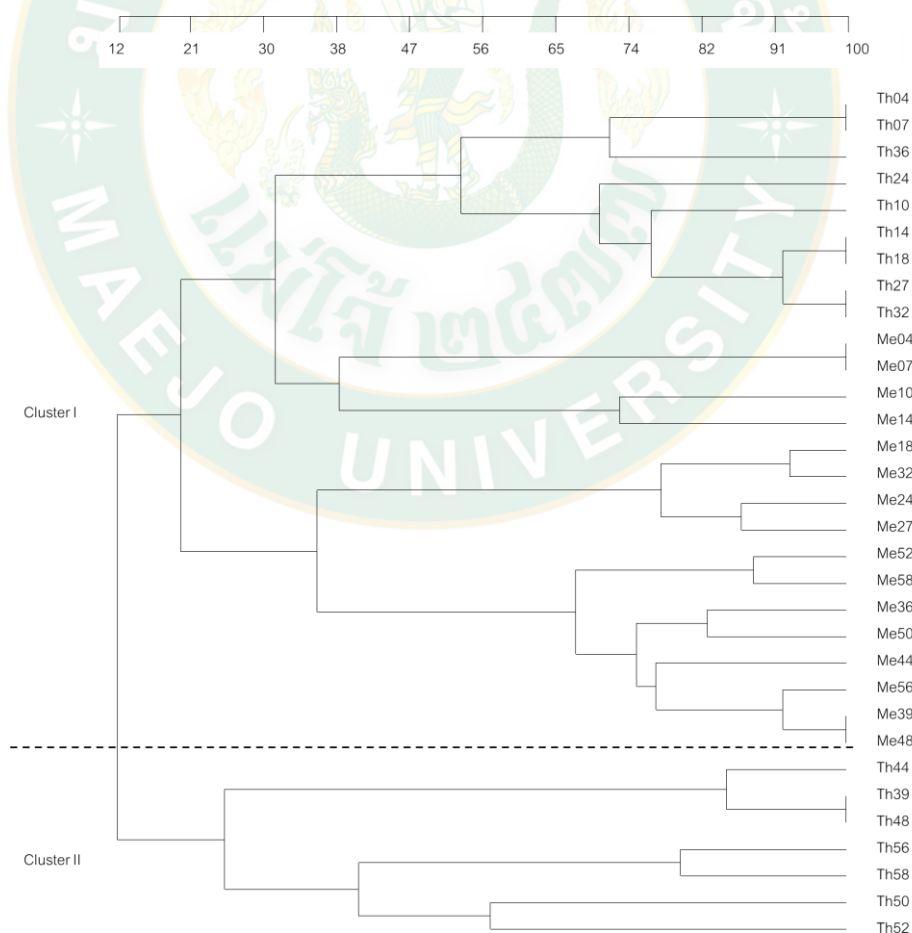


ภาพ 44 ค่าความชุกชุมสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 1

ตาราง 26 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสแถบดีเอ็นเอจาก DGGE gel ของระบบ TPAD 1 กับฐานข้อมูล NCBI BLAST

Sample	A05	A06	A09	A12
Description	<i>Methanobacterium flexile</i>	<i>Methanothermobacter thermoflexus</i>	<i>Methanothermobacter defluvii</i>	<i>Methanobacterium subterraneum</i>
Identity (%)	96	90	87	95
Accession	NR_116276.1	NR_028249.1	NR_028248.1	NR_028247.1
Source	Lake sediment	Anaerobic digester sludge operating on waste waters containing methacrylates	Anaerobic digester sludge operating on waste waters containing methacrylates	Deep granitic groundwater at depths of 68,409 and 420 m
Growth substrate	H ₂ /CO ₂ and formate	H ₂ /CO ₂ and formate	H ₂ /CO ₂ and formate	H ₂ /CO ₂ and formate
Temperature (°C)	35-38	45-70	45-65	20-40
pH	7.0-7.5	7.5-8.5	6.0-7.5	7.8-8.8
Reference	Zhu et al. (2011)	Kotelnikova et al. (1993)	Kotelnikova et al. (1993)	Kotelnikova et al. (1998)

เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างประชากรอาร์เคียของระบบ TPAD 1 จาก cluster analysis ในรูปของ dendrogram (ภาพ 45) ผลการทดลองสามารถแบ่งกลุ่มประชากรอาร์เคียออกเป็น 2 Cluster โดย Cluster I พบว่าเป็นกลุ่มประชากรทั้งในถึงอุณหภูมิสูงและปานกลาง และยังแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยซึ่งแต่ละกลุ่มย่อยยังมีการแบ่งกลุ่มได้อีก 2 กลุ่มทำให้ Cluster I มีการจัดกลุ่มประชากรได้เป็น 4 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มที่ 1.1 คือประชากรอาร์เคียที่มาจากวันที่ 4-14 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มาจาก OLR 1 ของถึงอุณหภูมิปานกลาง ส่วนกลุ่มที่ 1.2 ประกอบด้วยประชากรจากวันที่ 4-36 ส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างจาก OLR 1 ของถึงอุณหภูมิสูง กลุ่มที่ 1.3 คือประชากรจากวันที่ 18-32 เป็นตัวอย่างจาก OLR 1 ของถึงอุณหภูมipานกลาง และกลุ่มที่ 1.4 เป็นประชากรวันที่ 36-58 ซึ่งมาจาก OLR 2 ของถึงอุณหภูมipานกลาง สำหรับ Cluster II เป็นมีกลุ่มประชากรแตกต่างจากกลุ่มตัวอย่างอื่น โดยเป็นตัวอย่างที่มาจากถึงอุณหภูมิสูงในประชากรวันที่ 30-52 (OLR 2) ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าการเปรียบเทียบโครงสร้างของกลุ่มประชากรได้มีการจัดกลุ่มตามอุณหภูมิที่ใช้และยังพบว่า OLR มีผลโครงสร้างประชากรอาร์เคีย



ภาพ 45 UPGMA dendrogram ของกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 1

5.2.2 การเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 2

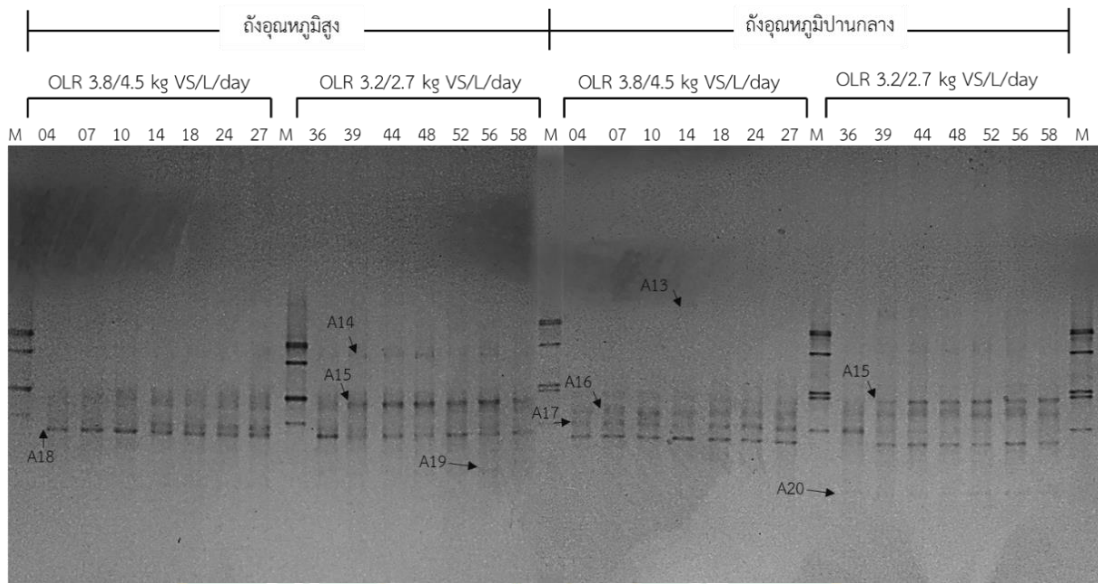
ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 2 ซึ่งเป็นระบบที่ใช้สลัดจ์บ่อเกรอะร่วมกับน้ำเสียจากการผลิตลำไยอบแห้งในการผลิตแก๊สชีวภาพ ได้แสดงในภาพ 46 โดยพบว่าที่ถึงอุณหภูมิสูงและปานกลางมีจำนวนแถบดีเอ็นเออยู่อย่างน้อยประมาณ 5-8 แถบและ 6-9 แถบตามลำดับ ซึ่งได้เลือกแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นทั้งหมด 8 ตำแหน่ง ได้แก่หมายเลข A13-A20 เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสแถบดีเอ็นเอจาก DGGE gel กับฐานข้อมูล NCBI BLAST (ตาราง 26) โดยแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นทั้ง 8 จะมีสัดส่วนที่เปลี่ยนแปลงและแตกต่างตามระยะเวลาในการดำเนินระบบ จะเห็นได้ว่าประชากรอาร์เคียชนิดเด่นได้มีการเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิที่ใช้ดำเนินระบบ ซึ่งมีความสัมพันธ์ตามระยะเวลาการทดลองโดยจะสังเกตได้จากจำนวนและความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏโดยจะมีความเข้มและจางแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลา อุณหภูมิและอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ โดยพบว่าแถบดีเอ็นเอหมายเลข A18 เป็นแถบที่พบได้ในทุกตัวอย่างแต่จะมีความเข้มของแถบลดลงที่ถึงอุณหภูมิปานกลาง โดยมีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $30.15 \pm 20.11\%$ ซึ่งจากการเปรียบเทียบความใกล้เคียงของสายพันธุ์พบว่าตรงกับเชื้อ *Methanothermobacter defluvii* (69%, sequence similarity) นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสังเกตว่าสัดส่วนของดีเอ็นเอแถบ A18 มีสัดส่วนที่แตกต่างกันในแต่ละค่าอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์โดยจะสังเกตเห็นมีสัดส่วนมากที่สุดในช่วงที่มีการเดินระบบด้วยอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์แรก (3.8/4.5 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน) สำหรับถึงอุณหภูมิสูง ซึ่งในระบบ TPAD 1 ได้พบอาร์เคียชนิดนี้อยู่ในระบบหมักร่วมซึ่งคาดว่าจะเป็นอาร์เคียที่มาจากสลัดจ์บ่อเกรอะและคาดว่าเป็นแบคทีเรียชนิดหลักที่ใช้ H_2/CO_2 และ formate ในระบบผลิตแก๊สชีวภาพ

นอกจากนี้ยังพบว่าการปรับค่าอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์มีผลต่อการหายไปและปรากฏของเชื้อใหม่ขึ้นในทั้งสองถึงปฏิกรณ์ โดยความเข้มของแถบดีเอ็นเอจะแตกต่างกันตามระยะเวลาในการดำเนินระบบ นั่นคือ แถบดีเอ็นเอหมายเลข A15 มีความเข้มของแถบเพิ่มขึ้นเมื่อค่าอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ลดลงเป็น 3.2/2.7 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน ซึ่งแถบนี้มีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $33.35 \pm 15.13\%$ และใกล้เคียงกับเชื้อ *Methanobacterium movens* (90%, sequence similarity) ในขณะที่เดียวกันพบแถบดีเอ็นเอหมายเลข A17 ที่มีความเข้มของแถบลดลงเมื่อลดอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ โดยมีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $18.97 \pm 14.99\%$ ซึ่งใกล้เคียงกับเชื้อ *Methanosarcina thermophila* (91%, sequence similarity) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการปรับใช้อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์มีผลต่อการปรากฏและหายไปของอาร์เคียเป็นอย่างมาก จากตาราง 26 จะเห็นว่าอาร์เคียทั้ง 3 ชนิดมีการใช้สับสเตรทที่แตกต่างกันโดย *Methanobacterium movens* (A15) จะใช้ H_2 และ CO_2 เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนในการผลิตแก๊สมีเทนส่วน *Methanosarcina thermophila* (A17) จะใช้ acetate, methanol หรือ methylated amines

และอาจจะเจริญซ้ำเมื่อระบบมี H_2 และ CO_2 สูง ทั้งนี้การลดลงของ *Methanosarcina thermophila* อาจเกี่ยวข้องกับระบบได้มีปริมาณ H_2 และ CO_2 สูงเกินไปในช่วงที่เดินระบบด้วย อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์แรก อย่างไรก็ตามจะมี *Methanothermobacter defluvii* (A18) ที่สามารถใช้ H_2 , CO_2 , formate และไม่ใช่ acetate ซึ่งเป็นสับสเตรในการเจริญและผลิตแก๊สชีวภาพของ *Methanosarcina thermophila* ในทางตรงกันข้ามที่อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ที่สองมีการเจริญ *Methanobacterium movens* คาดว่าเป็นผลมาจากระบบได้มีปริมาณ H_2 และ CO_2 สูง จึงอาจทำให้ส่งผลต่อการเจริญของ *Methanosarcina thermophila* ลดลง (Zinder et al., 1985) จะเห็นว่านอกจากอุณหภูมิและอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ที่มีผลต่อการเจริญของอาร์เคียแล้วยังพบว่าสับสเตรยังมีผลต่อการเจริญของอาร์เคียด้วย นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอชนิดอื่นที่ปรากฏบน DGGE gel อีกหลายแถบโดยจะพบว่ามีความเข้มของแถบที่แตกต่างกันซึ่งคาดว่าแถบดีเอ็นเอที่พบนี้อาจเป็นอาร์เคียกลุ่มรองที่สามารถใช้สับสเตรชนิดอื่นที่มีปริมาณน้อยโดยจะพบว่าแถบดีเอ็นเอหมายเลข A13, A14, A16, A19 และ A20 ที่มีค่าความชุกชุมสัมพันธ์น้อยกว่า 3%

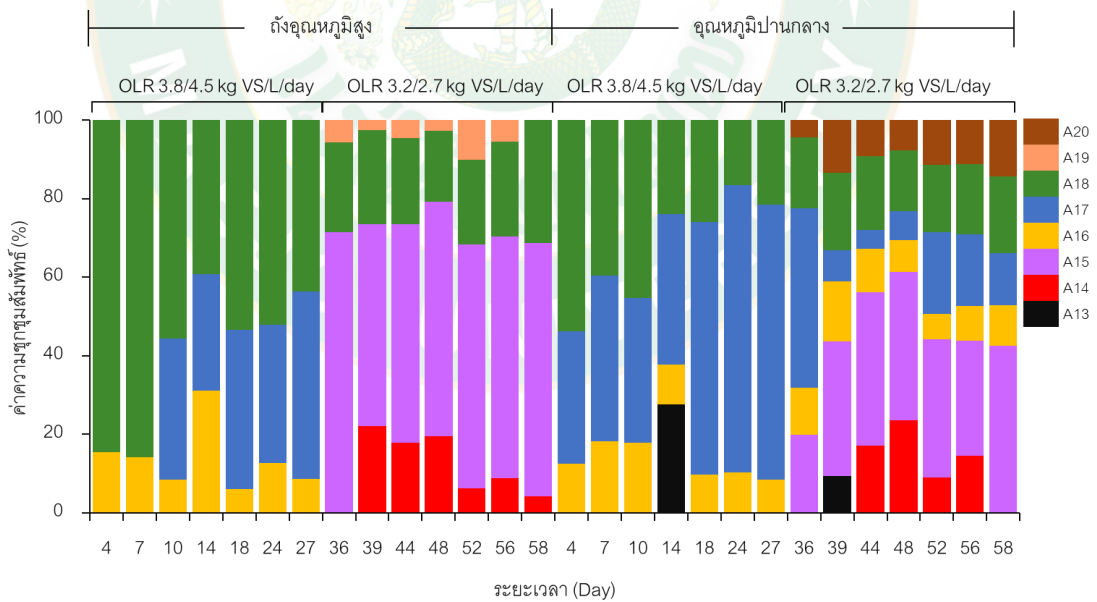
เป็นที่น่าสนใจว่าอาร์เคียทั้ง 3 ชนิดที่พบอยู่ในสกุล *Methanothermobacter*, *Methanobacterium* และ *Methanosarcina* ซึ่งน่าจะมีความสำคัญกับระบบผลิตแก๊สชีวภาพ โดยผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yu et al. (2014) ที่ได้ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบผลิตแก๊สชีวภาพจากขยะชีวภาพกับสลัดจ์ระบบบำบัดน้ำเสียด้วยระบบ TPAD โดยได้พบว่ามี *Methanobacterium* และ *Methanosarcina* เป็นแบคทีเรียสร้างมีเทนชนิดเด่นที่พบในทุกถังปฏิกรณ์ ในขณะที่เดียวกัน *Methanothermobacter* เป็นแบคทีเรียสร้างมีเทนที่พบเฉพาะในถังอุณหภูมิสูงเท่านั้น

เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างประชากรอาร์เคียของระบบ TPAD 2 จาก cluster analysis ในรูปของ dendrogram (ภาพ 48) ผลการทดลองสามารถแบ่งกลุ่มประชากรอาร์เคียออกเป็น 2 Cluster ตามอุณหภูมิที่ใช้ โดย Cluster I เป็นการจับกลุ่มของประชากรในถังอุณหภูมิสูงทั้งหมด สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่มโดยกลุ่มที่ 1.1 จะเป็นประชากรจากวันที่ 4-14 (OLR 1) และ 56-58 (OLR 2) กลุ่มที่ 1.2 จะเป็นประชากรวันที่ 39-52 (OLR 2) และกลุ่มที่ 1.3 จะเป็นกลุ่มประชากรจากวันที่ 18-36 (OLR 1) สำหรับ Cluster II พบว่าจะเป็นการจับกลุ่มประชากรจากถังอุณหภูมิปานกลางทั้งหมดและสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 2.1 คือประชากรจากวันที่ 36-52 (OLR 2) และกลุ่มที่ 2.2 คือประชากรวันที่ 4-27 (OLR 1) และ 56-58 (OLR 2) ซึ่งพบที่มีความแตกต่างกันตามอุณหภูมิและอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้



ภาพ 46 ผลการติดตามกลุ่มประชากรของอาร์เคียในระบบ TPAD 2

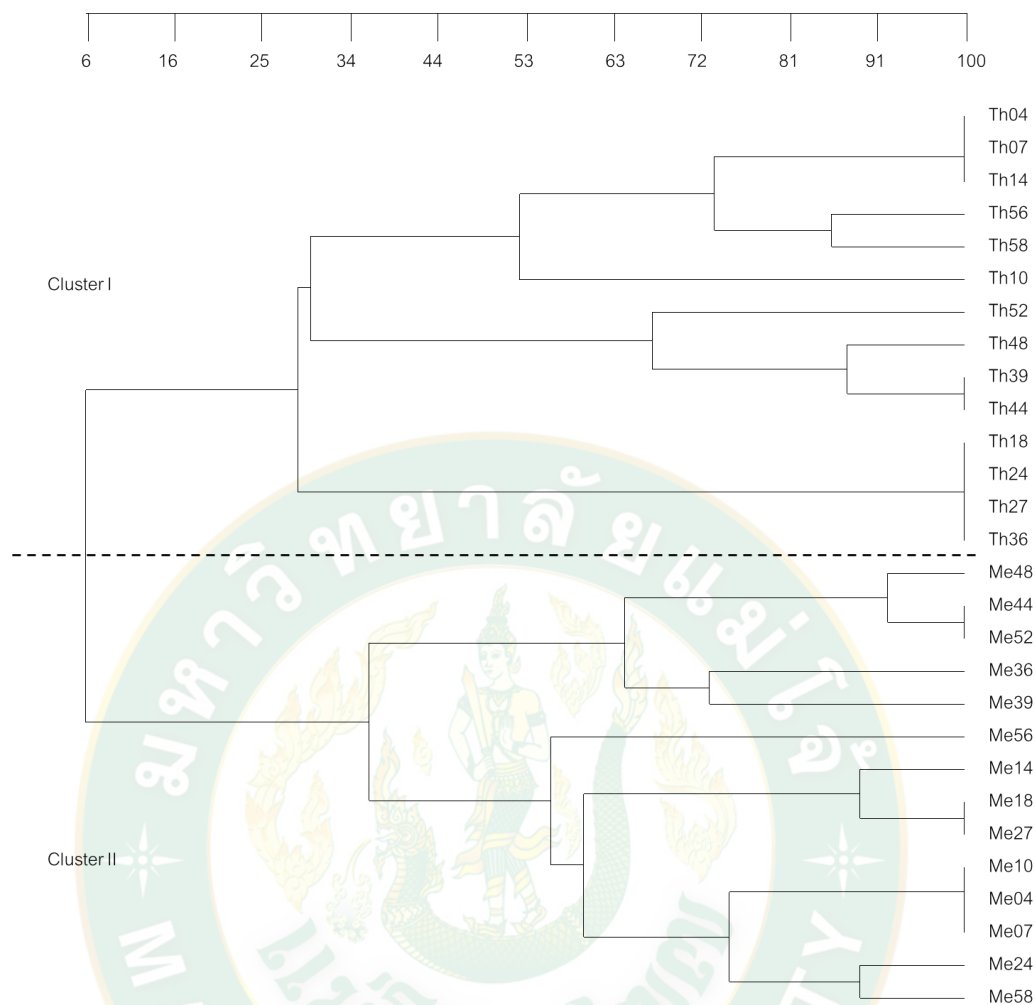
โดยที่ : M คือ Marker เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายประกอบด้วย *Sphingomonas terrae*, *Flavobacterium glanuli* *Pseudomonas sp.*, *Acidovorax soli* และ *Thauera butanivorans*



ภาพ 47 ค่าความชุกชุมสัมพัทธ์ของกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 2

ตาราง 27 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสแถบดีเอ็นเอจาก DGGE gel ของระบบ TPAD 2 กับฐานข้อมูล NCBI BLAST

Sample	A15	A17	A18
Description	<i>Methanobacterium movens</i>	<i>Methanosarcina thermophila</i>	<i>Methanothermobacter defluvi</i>
Identity (%)	90	91	69
Accession	NR_116289.1	NR_044725.1	NR_028248.1
Source	sediments	thermophilic digester sludge	Anaerobic digester sludge operating on waste waters containing methacrylates
Growth substrate	H ₂ /CO ₂	acetate, methanol, or methylated amines and may occur slowly on H ₂ /CO ₂	H ₂ /CO ₂ and formate
Temperature (°C)	35-38	45-55	45-65
pH	7.2-7.5	6.0-7.0	6.0-7.5
Reference	Zhu et al. (2011)	Zinder et al. (1985)	Kotelnikova et al. (1993)



ภาพ 48 UPGMA dendrogram ของกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 2

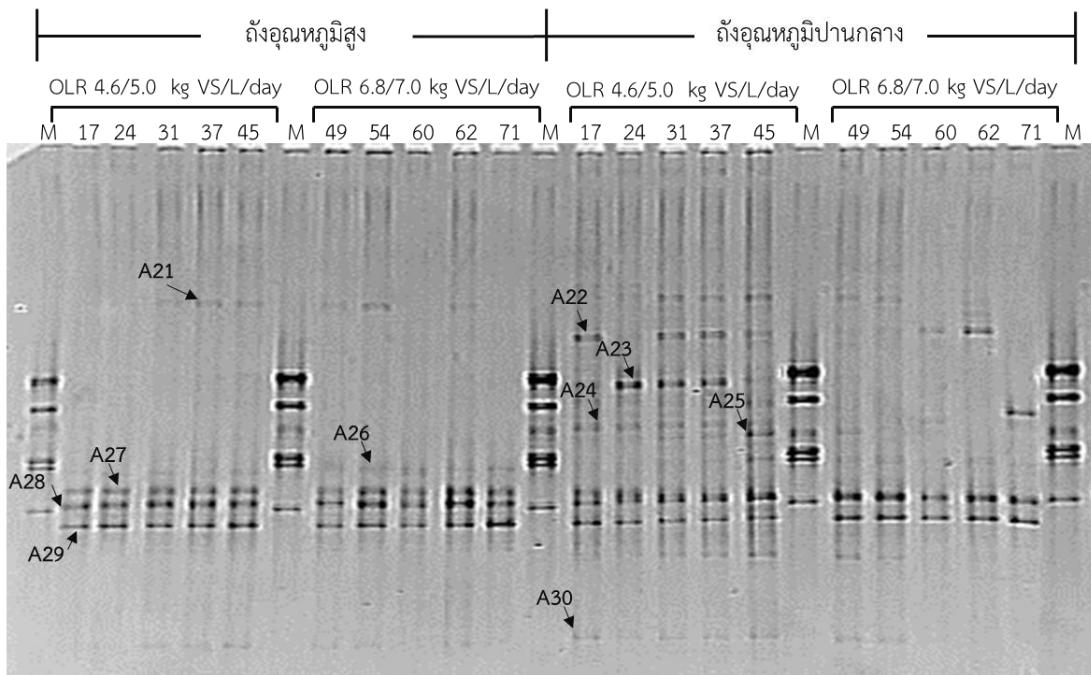
5.2.3 การเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 3

ผลการศึกษการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 3 ซึ่งเป็นระบบที่ใช้สลัดจ์บ่อเกรอะร่วมกับเปลือกกล้วยในการผลิตแก๊สชีวภาพ แสดงในภาพ 49 ซึ่งพบว่าที่ถังอุณหภูมิสูงและปานกลางมีจำนวนแถบดีเอ็นเออยู่อย่างน้อยประมาณ 6-10 แถบและ 6-13 แถบตามลำดับ ซึ่งได้เลือกแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นทั้งหมด 10 ตำแหน่ง ได้แก่หมายเลข A21-A30 เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสแถบดีเอ็นเอจาก DGGE gel กับฐานข้อมูล NCBI BLAST (ตาราง 27) โดยผลการศึกษาพบว่าประชากรอาร์เคียชนิดเด่นได้มีการเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ อัตราการะบรทุกสารอินทรีย์และระยะเวลาในการดำเนินระบบดังแสดงในภาพ 50 จะเห็นได้ว่าแถบดีเอ็นเอหมายเลข A28 และ A29 เป็นแถบที่พบได้ทุกตัวอย่างคาดว่าจะป็นอาร์เคียชนิดหลักที่มีบทบาทในการผลิตแก๊สชีวภาพซึ่งสังเกตได้จากความเข้มของแถบดีเอ็นเอแทบจะไม่เปลี่ยนแปลงตลอดการทดลองทั้งในถังอุณหภูมิสูงและปานกลางโดยมีค่าความซุกซุมสัมพันธ์เท่ากับ $29.39 \pm 10.68\%$ และ $20.25 \pm 5.54\%$ ตามลำดับ

ทั้งนี้จากการเปรียบเทียบความใกล้เคียงของสายพันธุ์พบว่าแถบดีเอ็นเอหมายเลข A28 ตรงกับเชื้อ *Methanobacterium formicum* (90% sequence similarity) และแถบดีเอ็นเอหมายเลข A29 ตรงกับเชื้อ *Methanothermobacter defluvii* (95% sequence similarity) ซึ่งอาร์เคียทั้ง 2 กลุ่ม (*Methanobacterium* และ *Methanothermobacter*) สามารถพบทั้งในอุณหภูมิสูงและปานกลางโดยได้มีรายงานว่าในกลุ่มอาร์เคียที่ใช้ H_2/CO_2 และ formate ในการผลิตแก๊สมีเทน (Bryant and Boone, 1987); Kotelnikova et al. (1993) (ตาราง 27)

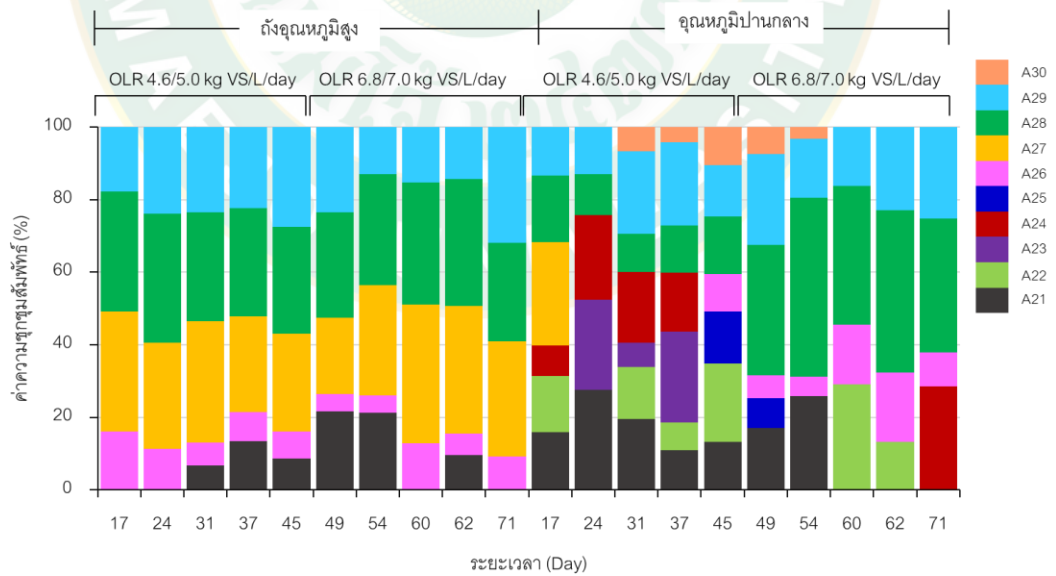
อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของอาร์เคียตามอุณหภูมิพบว่า *Methanothermobacter defluvii* มีสัดส่วนลดลงที่ถึงอุณหภูมิปานกลางซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Kotelnikova et al. (1993) ที่ได้รายงานว่าอาร์เคียชนิดนี้มีการเจริญช้าลงในช่วงอุณหภูมิปานกลางในระบบผลิตแก๊สชีวภาพ และเป็นที่น่าสังเกตว่าจะพบแถบดีเอ็นเอหมายเลข A27 ที่มีความเข้มมาก เฉพาะถึงอุณหภูมิสูงเท่านั้นโดยมีค่าความชุกชุมสัมพันธ์เท่ากับ $16.70 \pm 4.76\%$ ที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Methanothermobacter thermoflexus* (73% sequence similarity) ซึ่งเป็นไปได้ว่าจะเป็นอาร์เคียที่สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิสูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kotelnikova et al. (1993) ที่ได้ค้นพบอาร์เคียชนิดนี้ในระบบผลิตแก๊สชีวภาพจากน้ำเสียที่มี methacrylates โดยอาร์เคียชนิดนี้จะเจริญที่ช่วงอุณหภูมิสูงและจะเจริญได้ช้าเมื่อดำเนินระบบที่ $37^\circ C$ ด้วยเหตุนี้จึงอาจทำให้ไม่พบอาร์เคียชนิดนี้ในถึงอุณหภูมิปานกลางของระบบนี้

นอกจากนี้จากสัดส่วนของแถบดีเอ็นเอยังพบว่ามีอาร์เคียชนิดอื่นที่ปรากฏใน DGGE gel แต่จะพบว่ามีสัดส่วนน้อยมาก ซึ่งสังเกตได้จากความไม่คงที่ของความเข้มของแถบได้ปรากฏในแต่ละวัน เช่น แถบดีเอ็นเอหมายเลข A21, A22, A23, A24, A25, A26 และ A30 โดยแถบเหล่านี้มีค่าความชุกชุมสัมพันธ์น้อยกว่า 5% ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรอาร์เคียที่เกิดขึ้นมีความสอดคล้องกับอุณหภูมิที่ใช้ดำเนินระบบที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามการใช้อัตราสารอาหารอินทรีย์ที่แตกต่างกันในการดำเนินระบบพบว่าไม่ได้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์เชื้อซึ่งอาจเป็นผลมาจากเป็นระบบที่ใช้วัตถุดิบเดียวกันในการทดลอง ถึงแม้ว่าจะมีการใช้สไลด์จ็อบเกอร์อะชุดใหม่ในการดำเนินระบบก็ตาม



ภาพ 49 ผลการติดตามกลุ่มประชากรของอาร์เคียในระบบ TPAD 3

โดยที่ : M คือ Marker เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายประกอบด้วย *Sphingomonas terrae*, *Flavobacterium glanuli* *Pseudomonas sp.*, *Acidovorax soli* และ *Thauera butanivorans*



ภาพ 50 ค่าความชุกชุมสัมพัทธ์ของกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 3

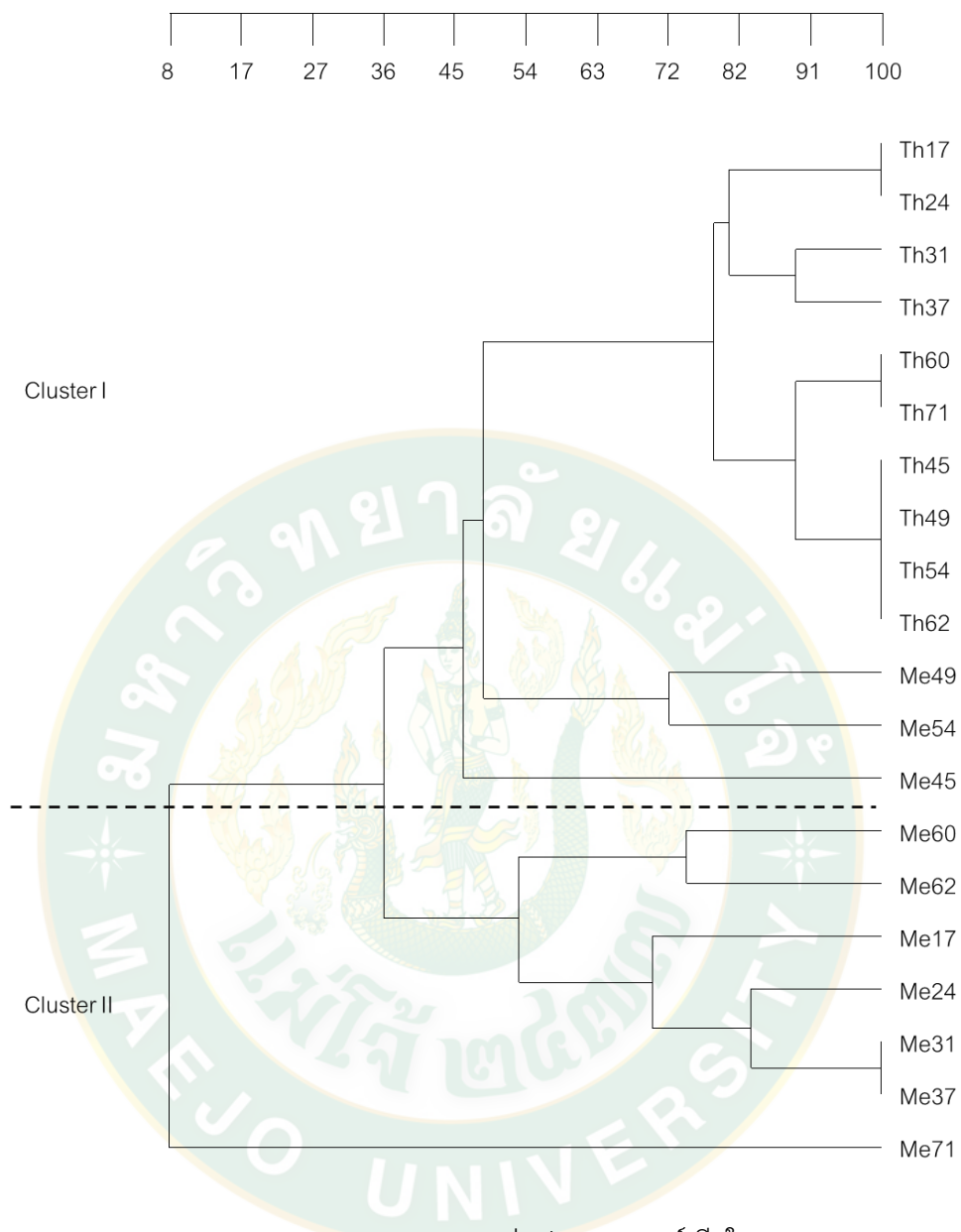
ตาราง 28 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสแถบดีเอ็นเอจาก DGGE gel ของระบบ TPAD 3 กับฐานข้อมูล NCBI BLAST

Sample	A27	A28	A29
Description	<i>Methanothermobacter thermoflexus</i>	<i>Methanobacterium formicum</i>	<i>Methanothermobacter defluvii</i>
Identity (%)	73	90	95
Accession	NR_028249.1	NR_115168.1	NR_028248.1
Source	Anaerobic digester sludge operating on waste waters containing methacrylates	anaerobic sewage sludge digester	Anaerobic digester sludge operating on waste waters containing methacrylates
Growth substrate	H ₂ /CO ₂ and formate	H ₂ /CO ₂	H ₂ /CO ₂ and formate
Temperature (°C)	55	25-50	45-65
pH	7.9-8.2	6.6-6.8	6.0-7.5
Reference	Kotelnikova et al. (1993)	Bryant andBoone (1987)	Kotelnikova et al. (1993)

เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างประชากรอาร์เคียของระบบ TPAD 3 จาก cluster analysis ในรูปของ dendrogram (ภาพ 51) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มประชากรอาร์เคียออกเป็น 2 Cluster ตามอุณหภูมิที่ใช้โดย Cluster I เป็นการจัดกลุ่มของประชากรในถังอุณหภูมิสูงทั้งหมด สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่มโดยกลุ่มที่ 1.1 คือประชากรจากวันที่ 17-37 (OLR 1) และกลุ่มที่ 1.2 คือประชากรวันที่ 49-71 (OLR 2) ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มนี้เป็นประชากรจากถังอุณหภูมิสูงทั้งหมด และเป็นที่น่าสังเกตว่ากลุ่มที่ 1.3 คือกลุ่มประชากรจากวันที่ 45-54 (OLR 2) ของถังอุณหภูมิปานกลาง สำหรับ Cluster II พบว่ามีการจัดกลุ่มประชากรของถังอุณหภูมิปานกลางทั้งหมดและสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 2.1 คือประชากรจากวันที่ 17-37 (OLR 1) และ 50-62 (OLR 2) และกลุ่มที่ 2.2 ประชากรวันที่ 71 (OLR 2) ซึ่งพบว่ามี ความแตกต่างกันตามอุณหภูมิและอัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้

จากการพิจารณาการจัดกลุ่มของประชากรอาร์เคียทั้ง 3 ระบบแล้วพบว่าได้มีการจัดกลุ่มกันตามอุณหภูมิและค่าอัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้ โดยจะเห็นว่าระบบได้มีการจัดกลุ่มประชากรที่ใกล้เคียงกันในช่วงท้ายของการเดินระบบที่ OLR 1 และช่วงเริ่มต้นของ OLR 2 ที่แต่ละถังปฏิกรณ์ ซึ่งคาดว่าอาจจะเป็นผลจากในช่วงท้ายของ OLR 1 แบคทีเรียชนิดเดิมยังคงสามารถเจริญอยู่ในระบบได้ เมื่อปรับไปใช้ OLR 2 อาจทำให้แบคทีเรียชนิดเดิมมีปริมาณลดลงหรืออาจมีแบคทีเรียชนิดใหม่เจริญขึ้นมาในช่วงเดินระบบด้วย OLR 2 เนื่องจากเป็นการปรับเปลี่ยนปริมาณอินทรีย์ที่เข้าระบบจึงอาจทำให้แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถปรับสภาพให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปได้

จากการเปรียบเทียบความหลากหลายของประชากรอาร์เคียในระบบผลิตแก๊สชีวภาพทั้ง 3 ระบบโดยทำการเปรียบเทียบจำนวนและปริมาณของประชากรอาร์เคียด้วยค่า Shannon index (H') (ตาราง 28-30) ซึ่ง Shannon index ที่มีค่ามากจะแสดงถึงความหลากหลายของประชากรอาร์เคียที่มีค่าสูง ผลการวิเคราะห์พบว่าความหลากหลายของประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 1 การดำเนินระบบที่ OLR 1 และ 2 ของถังอุณหภูมิสูงมีค่าเท่ากับ 1.527 ± 0.357 และ 1.158 ± 0.160 ตามลำดับ ส่วนที่ถังอุณหภูมิปานกลางมีค่าเท่ากับ 1.538 ± 0.263 และ 1.286 ± 0.226 ตามลำดับ (ตาราง 28) สำหรับระบบ TPAD 2 พบว่าการเดินระบบที่ OLR 1 และ 2 ของถังอุณหภูมิสูงมีค่าเท่ากับ 0.800 ± 0.269 และ 0.974 ± 0.150 ตามลำดับ และที่ถังอุณหภูมิปานกลางที่ค่าเท่ากับ 0.963 ± 0.185 และ 1.578 ± 0.119 ตามลำดับ (ตาราง 29) และระบบ TPAD 3 พบว่าการเดินระบบที่ OLR 1 และ 2 ของถังอุณหภูมิสูงมีค่าเท่ากับ 1.413 ± 0.088 และ 1.391 ± 0.096 ตามลำดับ และที่ถังอุณหภูมิปานกลางที่ค่าเท่ากับ 1.773 ± 0.141 และ 1.405 ± 0.142 ตามลำดับ (ตาราง 30)



ภาพ 51 UPGMA dendrogram ของกลุ่มประชากรอาร์เคียในระบบ TPAD 3

จากการเปรียบเทียบความหลากหลายของประชากรอาร์เคียในระบบผลิตแก๊สชีวภาพทั้ง 3 ระบบด้วยค่า Shannon index (H') พบว่าประชากรอาร์เคียในถังอุณหภูมิปานกลางมีค่า Shannon index มากกว่าถังอุณหภูมิตั้ง 2 อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ที่ใช้ดำเนินระบบ แสดงให้เห็นว่าถังอุณหภูมิปานกลางมีความหลากหลายของประชากรอาร์เคียที่มากกว่าถังอุณหภูมิตั้ง

อย่างไรก็ตามผลในภาพรวมจะพบว่าทั้ง 3 ระบบจะมีความหลากหลายของอาร์เคียในถังอุณหภูมิปานกลางมากกว่าถังอุณหภูมิตั้ง ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีที่ว่าถังอุณหภูมิปานกลางเป็นถังปฏิกรณ์ที่ 2 สำหรับรองรับของเสียจากถังอุณหภูมิตั้ง ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดปฏิกิริยา acetogenesis และ methanogenesis ด้วยเหตุนี้จึงอาจทำให้ในถังอุณหภูมิปานกลางมีความหลากหลายของอาร์เคียมากกว่าถังอุณหภูมิตั้ง (Pervin et al., 2013) ดังนั้นจึงอนุมานได้ว่าความหลากหลายของอาร์เคียในถังอุณหภูมิปานกลางอาจมีการเจริญและตอบสนองกับสับสเตรทที่ผลิตจากแบคทีเรียสร้างกรดได้ดี

นอกจากนี้ยังพบว่าความแตกต่างของอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์มีผลต่อความหลากหลายของอาร์เคีย โดยพบว่าการปรับใช้ค่า OLR 2 ของระบบ TPAD 1 มีค่า Shannon index ลดลงจากการเดินระบบด้วย OLR 1 ของถัง 2 ถึงปฏิกรณ์ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการใช้สัลดัจบ่อเกรอะเป็นวัตถุดิบเดี่ยวและจากการเปลี่ยนสัลดัจบ่อเกรอะชุดใหม่ในการทดลองของ OLR 2 ซึ่งทำให้มีสารอินทรีย์เข้าระบบน้อยกว่าการเดินระบบด้วย OLR 1 ไปมากจึงอาจทำให้มีสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญของอาร์เคียในถังอุณหภูมิตั้งและปานกลางของการเดินระบบด้วย OLR 2 ส่วนระบบ TPAD 2 พบว่าการปรับไปใช้ค่า OLR 2 ที่ลดลงจาก 3.8/4.5 เป็น 3.2/2.7 กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน ส่งผลให้มีค่าความหลากหลายเพิ่มขึ้นทั้งอุณหภูมิตั้งและอุณหภูมิปานกลาง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการลดลงของอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ทำให้มีความหลากหลายของอาร์เคียเพิ่มขึ้น ทั้งนี้คาดว่าเป็นผลของการเปลี่ยนสัลดัจบ่อเกรอะชุดใหม่ในการทดลองจึงทำให้มีการปรากฏเชื้อชนิดใหม่ขึ้นมา ในขณะที่เชื้อเก่ากลับมีการเจริญลดลง (ภาพ 49) ในขณะที่ระบบ TPAD 3 พบว่าการปรับไปใช้ OLR 2 ส่งผลให้ถังอุณหภูมิตั้งและถังอุณหภูมิปานกลางมีค่า Shannon index ลดลงซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ในการดำเนินระบบที่ทำให้ระบบมีปริมาณสารอินทรีย์มากเกินไปที่ระบบจะรักษาสสมดุลของระบบได้ส่งผลให้มีแบคทีเรียสร้างกรดเจริญได้อย่างรวดเร็วและมีการสะสมของไขมันระเหยมากกว่า 3,500 มก. อะซิเตท/ล. จนส่งผลให้ระบบไม่สามารถรักษาค่าพีเอชในช่วงที่เหมาะสมได้และส่งผลให้ระบบมีความหลากหลายของอาร์เคียลดลง

ตาราง 29 ค่า Shannon index (H') ของอาร์เคียจากระบบ TPAD 1

อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ (กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน)	ระยะเวลา (วัน)	Shannon index (H')		
		อุณหภูมิสูง	อุณหภูมิต่ำ	
OLR 1 = 3.5/4.6	4	1.259	1.307	
	7	0.951	1.270	
	10	1.372	1.283	
	14	1.288	1.370	
	18	1.858	1.576	
	24	1.747	1.874	
	27	1.774	1.806	
	32	1.963	1.819	
	OLR 2 = 5.8/3.4	36	1.347	1.134
		39	1.271	1.425
44		1.196	1.575	
48		1.075	1.446	
50		1.292	0.993	
52		1.144	1.307	
56		1.094	1.436	
58		0.843	0.975	

ตาราง 30 ค่า Shannon index (H') ของอาร์เคียจากระบบ TPAD 2

อัตราภาาระบบรทุกสารอินทรีย์ (กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน)	ระยะเวลา (วัน)	Shannon index (H')	
		อุณหภูมิสูง	อุณหภูมิปานกลาง
OLR 1 = 3.8/4.5	4	0.432	0.961
	7	0.407	1.041
	10	0.903	1.034
	14	1.091	1.299
	18	0.871	0.861
	24	0.970	0.760
	27	0.927	0.788
	OLR 2 = 3.2/2.7	36	0.741
39		1.109	1.667
44		1.107	1.591
48		1.035	1.591
52		1.029	1.638
56		1.013	1.718
58		0.783	1.464

ตาราง 31 ค่า Shannon index (H') ของอาร์เคียจากระบบ TPAD 3

ค่าอัตราภาาระบบรทุกสารอินทรีย์ (กก.ของแข็งระเหย/ลบ.ม.-วัน)	ระยะเวลา (วัน)	Shannon index (H')	
		อุณหภูมิสูง	หภูมิปานกลาง
OLR 1 = 4.6/5.0	17	1.332	1.727
	24	1.316	1.553
	31	1.422	1.851
	37	1.519	1.817
	45	1.474	1.916
	OLR 2 = 6.8/7.0	49	1.503
54		1.461	1.379
60		1.285	1.344
62		1.406	1.283
71		1.301	1.372

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพจากสัลดจ์บ่อเกรอะร่วมกับของเสียจากการแปรรูปลำไยอบแห้งด้วยระบบ TPAD โดยการตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ ควบคู่กับการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction - Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) ซึ่งผลการทดลองพบว่าการใช้วัตถุดิบและการควบคุมสภาวะในการดำเนินระบบด้วยความแตกต่างของอุณหภูมิและค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ส่งผลให้ระบบมีกลุ่มประชากรแบคทีเรียและอาร์เคียในแต่ละถังปฏิกรณ์ที่มีความแตกต่างกันรวมไปถึงระบบสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้แตกต่างกันไปด้วย

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพพบว่าการทดลองที่ถังอุณหภูมิสูงของระบบ TPAD 3 สามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้ดีที่สุดเท่ากับ $11,397.13 \pm 3,106.23$ มล./วัน ที่อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ 4.6/5.0 กก.ของแข็งระเหย/ล.-วัน และมีปริมาณแก๊สมีเทนเท่ากับ 48.75% ส่วนถังอุณหภูมี่ปานกลางมีปริมาณแก๊สชีวภาพเกิดขึ้นเท่ากับ $2,637.62 \pm 1,108.33$ มล./วัน และมีแก๊สมีเทนเท่ากับ 56%

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของค่าซีไออดี ค่าของแข็งทั้งหมดและค่าของแข็งระเหยที่ป้อนเข้าระบบ รวมถึงประสิทธิภาพการกำจัดปริมาตรสารอินทรีย์ดังกล่าว พบว่าระบบ TPAD 3 ที่ใช้เปลือกลำไยเป็นวัตถุดิบในการหมักร่วมมีปริมาณสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้าระบบสูงกว่าระบบอื่นที่การเดินระบบด้วยค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่ต่างกันทั้ง 2 ค่า ส่วนประสิทธิภาพการกำจัดค่าซีไออดี ค่าของแข็งทั้งหมด และค่าของแข็งระเหย พบว่าถังปฏิกรณ์อุณหภูมิสูงของทุกระบบมีประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ดีกว่าถังอุณหภูมี่ปานกลางและพบว่าระบบ TPAD 2 มีประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ได้สูงกว่าระบบ TPAD 1 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งถังอุณหภูมิสูงของระบบ TPAD 2 สามารถกำจัดค่าซีไออดีได้มากที่สุดเท่ากับ $63.85 \pm 15.02\%$ ในขณะที่ถังอุณหภูมี่ปานกลางสามารถกำจัดซีไออดีเท่ากับ $47.13 \pm 19.83\%$ ส่วนของประสิทธิภาพการกำจัดค่าของแข็งทั้งหมดและของแข็งระเหยพบว่าถังอุณหภูมิสูงของระบบ TPAD 2 มีประสิทธิภาพการในการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ $51.44 \pm 25.86\%$ และ $50.60 \pm 28.83\%$ ตามลำดับ

ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรแบคทีเรียและอาร์เคียด้วยเทคนิค PCR-DGGE พบว่าในทุกการทดลองประชากรแบคทีเรียในระบบมีความหลากหลาย โดยพบว่าค่า Shannon index (H') มีค่าสูงขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ในการดำเนินระบบทั้งในถังอุณหภูมิสูงและปานกลาง ยกเว้นถังอุณหภูมี่ปานกลางของการเดินระบบแบบ TPAD 3 ที่มีค่า

Shannon index (H') ลดลงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอัตราภาระบรรทุสารอินทรีย์ ในขณะที่เดียวกันยังพบว่าระบบ TPAD 2 และ 3 ระบบมีความหลากหลายของแบคทีเรียที่ถึงอุณหภูมิปานกลางมากกว่าถึงอุณหภูมิสูง แต่จะพบว่าระบบ TPAD 1 มีค่า Shannon index (H') ลดลงในถึงอุณหภูมิปานกลาง ส่วนความหลากหลายของประชากรอาร์เคียพบว่าค่า Shannon index (H') ระบบ TPAD 1 และ 3 มีค่าลดลงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอัตราภาระบรรทุสารอินทรีย์ทั้งในอุณหภูมิสูงและปานกลาง แต่จะพบว่า มีค่าสูงขึ้นที่ระบบ TPAD 2 ทั้งในอุณหภูมิสูงและปานกลาง อย่างไรก็ตามได้พบว่าทุกระบบได้มีค่า Shannon index (H') สูงขึ้นที่ถึงอุณหภูมิปานกลาง นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบกลุ่มประชากรแบคทีเรียและอาร์เคียจะพบว่าทั้ง 3 ระบบมีความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียมากกว่าอาร์เคีย นอกจากนี้ยังพบว่าในทุกระบบมี *Methanothermobacter* และ *Methanobacterium* เป็นแบคทีเรียสร้างมีเทนชนิดเด่นแต่จะพบ *Methanosarcina* ในระบบ TPAD 2 เท่านั้น จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงค่าอัตราภาระบรรทุสารอินทรีย์และอุณหภูมิที่แตกต่างกันในการดำเนินระบบของแต่ละการทดลอง รวมถึงการใช้วัตถุดิบในการหมักร่วมที่ต่างกันจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์และประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ โดยจะพบว่าการใช้เปลือกกล้วยเป็นวัตถุดิบในการหมักร่วมสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้มากกว่าการใช้น้ำเสียจากการแปรรูปปลาโยบอบแห้งและการใช้สลัดจ์บ่อเกรอะเป็นวัตถุดิบเดี่ยว การศึกษานี้จึงชี้ให้เห็นว่าการใช้วัตถุดิบที่มีค่าของแข็งสูงมาเป็นวัสดุหมักร่วมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพด้วยระบบหมักแบบเฟสอุณหภูมิ และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. จากงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเปลือกผลไม้มีศักยภาพที่สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตแก๊สชีวภาพได้ซึ่งประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตและการแปรรูปผลไม้และวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีความหลากหลาย ดังนั้นการศึกษานำของเสียจากกระบวนการดังกล่าวมาผลิตเป็นพลังงานทดแทนจึงเป็นทางออกในการกำจัดของเสียที่น่าสนใจ
2. จากผลการศึกษาประสิทธิภาพพบว่าค่าซีโอดีที่เหลืออยู่ในน้ำออกยังมีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐานน้ำทิ้ง (มากกว่า 120 mg/l) รวมถึงยังคงมีแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมดและฟีคัลโคลิฟอร์มที่ยังมีค่ามากกว่า 20,000 และ 4,000 MPN/100 ml ดังนั้นควรจะมีการลดค่าซีโอดีให้ได้ตามมาตรฐานก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมและควรที่จะมีการนำสลัดจ์ที่ผ่านการย่อยสลายไปปรับสภาพให้อยู่ในสภาพคงตัวก่อนนำไปใช้ประโยชน์

บรรณานุกรม

- Abed, R. M. M. and Grötzschel, S. 2005. Chapter 6 Applications of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and microsensor techniques in oil biodegradation studies. In M. Al-Azab and W. El-Shorbagy (Eds.), **Developments in Earth and Environmental Sciences** (pp. 75-91): Elsevier.
- Adekunle, K. F. and Okolie, J. A. 2015. A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, 06(03), 205-212.
- Akgul, D., Cella, M. A. and Eskicioglu, C. 2017. Influences of low-energy input microwave and ultrasonic pretreatments on single-stage and temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) of municipal wastewater sludge. **Energy**, 123, 271-282.
- Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A. and Ahmad Asad, S. 2014. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. **The Scientific World Journal**, 1-21.
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 59(1), 143-169.
- Anjum, M., Khalid, A., Qadeer, S. and Miandad, R. 2017. Synergistic effect of co-digestion to enhance anaerobic degradation of catering waste and orange peel for biogas production. **Waste Management & Research**, 35(9), 967-977.
- Anjum, M., Khalid, A., Qadeer, S. and Miandad, R. 2017. Synergistic effect of co-digestion to enhance anaerobic degradation of catering waste and orange peel for biogas production. **Waste Manag Res**, 35(9), 967-977.
- Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., Osimani, A., Petruzzelli, A. and Clementi, F. 2007. The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, 120(2), 136-145.
- Arras, W., Hussain, A., Hausler, R. and Guiot, S. R. 2019. Mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic acidogenic fermentation of food waste in batch: Effect of inoculum source. **Waste Management**, 87,(279-287).

- Badawy, M. I. and Ali, M. E. M. 2006. Fenton's peroxidation and coagulation processes for the treatment of combined industrial and domestic wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, 136(3), 961-966.
- Bardiya, N., Somayaji, D. and Khanna, S. 1996. Biomethanation of banana peel and pineapple waste. **Bioresource technology**, 58(1), 73-76.
- Battumur, U., Yoon, Y.-M. and Kim, C.-H. 2016. Isolation and Characterization of a New Methanobacterium formicum KOR-1 from an Anaerobic Digester Using Pig Slurry. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, 29(4), 586-593.
- Bernatzky, R. (1989). Restriction fragment length polymorphism. In **Plant molecular biology manual** (pp. 467-484): Springer.
- Betts, W. B. 2012. **Biodegradation: natural and synthetic materials**. Springer Science & Business Media.
- Bitton, G. 2005. **Wastewater microbiology**. 3rd ed. John Wiley and Sons., NJ., 746 p.
- Boonsawang, P., Rerngnarong, A., Tongurai, C. and Chaiprapat, S. 2014. Effect of nitrogen and phosphorus on the performance of acidogenic and methanogenic reactors for treatment of biodiesel wastewater. **Songklanakarin J. Sci. Technol**, 36, 643-649.
- Borowski, S. 2015. Temperature-phased anaerobic digestion of the hydromechanically separated organic fraction of municipal solid waste with sewage sludge. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 105, 106-113.
- Bryant, M. P. and Boone, D. R. 1987. Isolation and characterization of Methanobacterium formicum MF. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 37(2), 171-171.
- Ceron-Vivas, A., Cáceres, K., Rincón, A. and Cajigas, Á. 2019. Influence of pH and the C/N ratio on the biogas production of wastewater. **Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia**, 92, 70-79.
- Chandra, R., Takeuchi, H. and Hasegawa, T. 2012. Hydrothermal pretreatment of rice straw biomass: a potential and promising method for enhanced methane production. **Applied Energy**, 94, 129-140.
- Chen, K., Eargle, J., Sarkar, K., Gruebele, M. and Luthey-Schulten, Z. 2010. Functional Role of Ribosomal Signatures. **Biophysical Journal**, 99(12), 3930-3940.

- Cheng, L., Dai, L., Li, X., Zhang, H. and Lu, Y. 2011. Isolation and characterization of *Methanothermobacter crinale* sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from the Shengli oil field. **Applied and environmental microbiology**, 77(15), 5212-5219.
- Ciotola, R., Martin, J., Tamkin, A., Castañó, J., Rosenblum, J., Bisesi, M. and Lee, J. 2014. The influence of loading rate and variable temperatures on microbial communities in anaerobic digesters. **Energies**, 7(2), 785-803.
- Cipolla, A., Delbrassine, F., Da Lage, J.-L. and Feller, G. 2012. Temperature adaptations in psychrophilic, mesophilic and thermophilic chloride-dependent alpha-amylases. **Biochimie**, 94(9), 1943-1950.
- Dague, R. 1991. **High pH Effects in Anaerobic Treatment of Liquid Industrial Byproducts**. pp. 377-386. In Proc 45th Purdue Industrial Waste Conference proceedings. Chelsea, MI, USA.: Lewis Publishers, Inc.
- Dahunsi, S. O., Oranusi, S. and Efeovbokhan, V. E. 2017. Cleaner energy for cleaner production: Modeling and optimization of biogas generation from Carica papaya (Pawpaw) fruit peels. **Journal of Cleaner Production**, 156, 19-29.
- Dooms, M., Benbelkacem, H. and Buffière, P. 2018. High solid temperature phased anaerobic digestion from agricultural wastes: Putting several reactors in sequence. **Biochemical Engineering Journal**, 130, 21-28.
- El-Kamah, H., Tawfik, A., Mahmoud, M. and Abdel-Halim, H. 2010. Treatment of high strength wastewater from fruit juice industry using integrated anaerobic/aerobic system. **Desalination**, 253(1), 158-163.
- Elbeshbishy, E. and Nakhla, G. 2012. Batch anaerobic co-digestion of proteins and carbohydrates. **Bioresource technology**, 116, 170-178.
- Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, 56(3), 297-314.
- Etnier, C., Braun, D., Grenier, A., Macrellis, A., Miles, R. J. and White, T. C. (2005). **Micro-scale evaluation of phosphorus management: alternative wastewater systems evaluation: Project No. WU-HT-03-22**. Prepared for the National Decentralized Water Resources Capacity Development Project, Washington University, St. Louis, MO, by Stone Environmental, Inc., Montpelier, VT.

- Gao, M., Guo, B., Zhang, L., Zhang, Y. and Liu, Y. 2019. Microbial community dynamics in anaerobic digesters treating conventional and vacuum toilet flushed blackwater. **Water Research**, 160, 249-258.
- Garcia-Peña, E. I., Parameswaran, P., Kang, D., Canul-Chan, M. and Krajmalnik-Brown, R. 2011. Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: process and microbial ecology. **Bioresource Technology**, 102(20), 9447-9455.
- Garibyan, L. and Avashia, N. 2013. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). **The Journal of investigative dermatology**, 133(3), 1-8.
- Gerardi, M. H. 2003. **The Microbiology of Anaerobic Digesters**. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons. Inc.
- Ghiasian, M., Akhavan Sepahy, A., Amoozegar, M. A., Saadatmand, S. and Shavandi, M. 2017. Bacterial diversity determination using culture-dependent and culture-independent methods. **Global Journal of Environmental Science and Management**, 3(2), 153-164.
- Giraffa, G. and Neviani, E. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. **International journal of food microbiology**, 67(1-2), 19-34.
- Guo, W., Liu, C., Zou, S. and Zhang, M. 2006. Progress in research and application of homoacetogen. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, 12(6), 874-877.
- Guo, X., Wang, C., Sun, F., Zhu, W. and Wu, W. 2014. A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings. **Bioresource Technology**, 152, (420-428).
- Haider, M. R., Zeshan, Yousaf, S., Malik, R. N. and Visvanathan, C. 2015. Effect of mixing ratio of food waste and rice husk co-digestion and substrate to inoculum ratio on biogas production. **Bioresource Technology**, 190, (451-457).
- Halalsheh, M., Noaimat, H., Yazajeen, H., Cuello, J., Freitas, B. and Fayyad, M. 2010. Biodegradation and seasonal variations in septage characteristics. **Environmental Monitoring and Assessment**, 172, (419-426).

- Han, Y., Sung, S. and Dague, R. R. 1997. Temperature-phased anaerobic digestion of wastewater sludges. **Water Science and Technology**, 36(6-7), 367-374.
- Henze, M. and Harremoës, P. 1983. Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors—a literature review. **Water science and technology**, 15(8-9), 1-101.
- Hogg, J. C. and Lehane, M. J. 1999. Identification of Bacterial Species Associated with the Sheep Scab Mite (*Psoroptes ovis*) by Using Amplified Genes Coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, 65(9), 4227-4229.
- Huang, X., Yun, S., Zhu, J., Du, T., Zhan, C. and Li, X. 2016. Mesophilic anaerobic co-digestion of aloe peel waste with dairy manure in the batch digester: Focusing on mixing ratios and digestate stability. **Bioresource technology**, 218, (62-68).
- Huang, X., Yun, S., Zhu, J., Du, T., Zhang, C. and Li, X. 2016. Mesophilic anaerobic co-digestion of aloe peel waste with dairy manure in the batch digester: Focusing on mixing ratios and digestate stability. **Bioresource technology**, 218, (62-68).
- Hummelink, N. 2016. **Transforming the Infectious Septage into Biogas by Co-digestion Process**. Master degree. Chulalongkorn University.
- Huser, B. A., Wuhrmann, K. and Zehnder, A. J. 1982. *Methanothrix soehngenii* gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. **Archives of Microbiology**, 132(1), 1-9.
- Janda, J. M. and Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of clinical microbiology**, 45(9), 2761-2764.
- Jang, H. M., Ha, J. H., Park, J. M., Kim, M.-S. and Sommer, S. G. 2015. Comprehensive microbial analysis of combined mesophilic anaerobic–thermophilic aerobic process treating high-strength food wastewater. **Water Research**, 73, (291-303).
- Joulain, C., Patel, B., Ollivier, B., Garcia, J.-L. and Roger, P. A. 2000. *Methanobacterium oryzae* sp. nov., a novel methanogenic rod isolated from a Philippines ricefield. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 50(2), 525-528.
- Kafle, G. K. and Kim, S. H. 2013. Anaerobic treatment of apple waste with swine manure for biogas production: batch and continuous operation. **Applied Energy**, 103, (61-72).

- Kaksonen, A. 2006. Molecular approaches for microbial community analysis. [Online]. Available http://wiki.biomine.skelleftea.se/biomine/molecular/index_32.htm (8 June 2018).
- Kim, Y. M., Jang, H. M., Lee, K., Chantrasakdakul, P., Kim, D. and Park, K. Y. 2015. Changes in bacterial and archaeal communities in anaerobic digesters treating different organic wastes. **Chemosphere**, 141, (134-137).
- Koottatep, T., Surinkul, N., Polprasert, C., Kamal, A., Koné, D., Montangero, A., Heinss, U. and Strauss, M. 2005. Treatment of septage in constructed wetlands in tropical climate: lessons learnt from seven years of operation. **Water science and technology**, 51(9), 119-126.
- Kotelnikova, S., Macario, A. J. and Pedersen, K. 1998. *Methanobacterium subterraneum* sp. nov., a new alkaliphilic, eurythermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 48(2), 357-367.
- Kotelnikova, S., Obraztsova, A. Y., Gongadze, G. M. and Laurinavichius, K. 1993. *Methanobacterium thermoflexum* sp. nov. and *Methanobacterium defluvii* sp. nov., Thermophilic Rod-Shaped Methanogens Isolated from Anaerobic Digester Sludge. **Systematic and Applied Microbiology**, 16, (427-435).
- Krivushin, K. V., Shcherbakova, V. A., Petrovskaya, L. E. and Rivkina, E. M. 2010. *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 60(2), 455-459.
- Kuthi, F. A. A., Norzali, N. and Badri, K. H. 2016. Thermal characteristics of microcrystalline cellulose from oil palm biomass. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, 20(5), 1112-1122.
- Leigh, J. A. 1983. Levels of water-soluble vitamins in methanogenic and non-methanogenic bacteria. **Applied and environmental microbiology**, 45(3), 800-803.
- Lettinga, G., Rebac, S. and Zeeman, G. 2001. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. **TRENDS in Biotechnology**, 19(9), 363-370.
- Levén, L., Eriksson, A. R. and Schnürer, A. 2007. Effect of process temperature on

- bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. **FEMS microbiology ecology**, 59(3), 683-693.
- Li, Y.-F., Nelson, M. C., Chen, P.-H., Graf, J., Li, Y. and Yu, Z. 2015. Comparison of the microbial communities in solid-state anaerobic digestion (SS-AD) reactors operated at mesophilic and thermophilic temperatures. **Applied microbiology and biotechnology**, 99(2), 969-980.
- Li, Y. and Khanal, S. K. 2016. Chapter 17 Fundamentals of Anaerobic Digestion. In YEBO LI. **Bioenergy: principles and applications** (pp. 313-336). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Lin, C.-Y., Chang, F.-Y. and Chang, C.-H. 2000. Co-digestion of leachate with septage using a UASB reactor. **Bioresource Technology**, 73(2), 175-178.
- Lin, C.-Y. and Chou, J. 1998. Aerobic digestion of septage. **Bioresource Technology**, 64(3), 219-224.
- Liu, C., Wang, W., Anwar, N., Ma, Z., Liu, G. and Zhang, R. 2017. Effect of Organic Loading Rate on Anaerobic Digestion of Food Waste under Mesophilic and Thermophilic Conditions. **Energy & Fuels**, 31(3), 2976-2984.
- Lv, W., Zhang, W. and Yu, Z. 2013. Evaluation of system performances and microbial communities of two temperature-phased anaerobic digestion systems treating dairy manure. **Bioresource Technology**, 143, (431-438).
- Lv, W., Zhang, W. and Yu, Z. 2016. Volume ratios between the thermophilic and the mesophilic digesters of a temperature-phased anaerobic digestion system affect their performance and microbial communities. **New Biotechnology**, 33(1), 245-254.
- Lv, X. C., Jiang, Y. J., Liu, J., Guo, W. L., Liu, Z. B., Zhang, W., Rao, P. F. and Ni, L. 2017. Evaluation of different PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of fungal community structure in traditional fermentation starters used for Hong Qu glutinous rice wine. **International Journal of Food Microbiology**, 255, (58-65).
- Manyuchi, M. M., Mbohwa, C. and Muzenda, E. 2018. Anaerobic treatment of opaque beer wastewater with enhanced biogas recovery through Acti-zyme bioaugmentation. **South African Journal of Chemical Engineering**, 26, (74-79).

- McKendry, P. 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresource Technology**, 83(1), 37-46.
- Metcalfe, L., Eddy, H. P. and Tchobanoglous, G. 1979. Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse. McGraw-Hill: New York.
- Muyzer, G., De Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, 59(3), 695-700.
- Myers, C. M. and Evans, P. D. 1985. An FMRFamide antiserum differentiates between populations of antigens in the ventral nervous system of the locust, *Schistocerca gregaria*. **Cell and tissue research**, 242(1), 109-114.
- Neilson, J. W., Jordan, F. L. and Maier, R. M. 2013. Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. **Journal of microbiological methods**, 92(3), 256-263.
- Noyola, A., Morgan-Sagastume, J. M. and Lopez-Hernandez, J. E. 2006. Treatment of biogas produced in anaerobic reactors for domestic wastewater: odor control and energy/resource recovery. **Reviews in environmental science and bio/technology**, 5(1), 93-114.
- Odedina, M. J., Charnnok, B., Saritpongteeraka, K. and Chaiprapat, S. 2017. Effects of size and thermophilic pre-hydrolysis of banana peel during anaerobic digestion, and biomethanation potential of key tropical fruit wastes. **Waste Management**, 68, (128-138).
- Oosterkamp, M. J., Méndez-García, C., Kim, C.-H., Bauer, S., Ibáñez, A. B., Zimmerman, S., Hong, P.-Y., Cann, I. K. and Mackie, R. I. 2016. Lignocellulose-derived thin stillage composition and efficient biological treatment with a high-rate hybrid anaerobic bioreactor system. **Biotechnology for biofuels**, 9(1), 1-15.
- Orozco, R. S., Hernández, P. B., Morales, G. R., Núñez, F. U., Villafuerte, J. O., Lugo, V. L., Ramírez, N. F., Díaz, C. E. B. and Vázquez, P. C. 2014. Characterization of lignocellulosic fruit waste as an alternative feedstock for bioethanol production. **BioResources**, 9(2), 1873-1885.
- Papadopoulos, F. H., Tsihrintzis, V. A. and Zdragas, A. G. 2011. Removal of faecal

- bacteria from septage by treating it in a full-scale duckweed-covered pond system. **Journal of environmental management**, 92(12), 3130-3135.
- Paudel, S., Kang, Y., Yoo, Y.-S. and Seo, G. T. 2017. Effect of volumetric organic loading rate (OLR) on H₂ and CH₄ production by two-stage anaerobic co-digestion of food waste and brown water. **Waste Management**, 61, (484-493).
- Pawongrat, R. 2015. Pretreatment processes for enhancing the efficiency of ethanol production from lignocellulosic-agricultural wastes. **Veridian E-journal Science and Technology Silpakorn University**, 2(1), 143-157.
- Pervin, H. M., Dennis, P. G., Lim, H. J., Tyson, G. W., Batstone, D. J. and Bond, P. L. 2013. Drivers of microbial community composition in mesophilic and thermophilic temperature-phased anaerobic digestion pre-treatment reactors. **Water Research**, 47(19), 7098-7108.
- Pullammanappallil, P. C., Chynoweth, D. P., Lyberatos, G. and Svoronos, S. A. 2001. Stable performance of anaerobic digestion in the presence of a high concentration of propionic acid. **Bioresource technology**, 78(2), 165-169.
- Pycke, B., Etchebehere, C., Van de Caveye, P., Negroni, A., Verstraete, W. and Boon, N. 2011. A time-course analysis of four full-scale anaerobic digesters in relation to the dynamics of change of their microbial communities. FG Pycke et al. A time-course analysis of four full-scale anaerobic digesters. **Water Science and Technology**, 63(4), 769-775.
- Reginato, V. and Antônio, R. V. 2015. Fermentative hydrogen production from agroindustrial lignocellulosic substrates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 323-335.
- Ren, J., Yuan, X., Li, J., Ma, X., Zhao, Y., Zhu, W., Wang, X. and Cui, Z. 2014. Performance and microbial community dynamics in a two-phase anaerobic co-digestion system using cassava dregs and pig manure. **Bioresource Technology**, 155, (342-351).
- Riau, V., De la Rubia, M. A. and Perez, M. 2010. Temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) to obtain class A biosolids: a semi-continuous study. **Bioresource Technology**, 101(8), 2706-2712.
- Ritchie, D., Edwards, C., McDonald, I. and Murrell, J. 1997. Detection of methanogens

- and methanotrophs in natural environments. **Global Change Biology**, 3(4), 339-350.
- Saady, N. M. C. 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, 38(30), 13172-13191.
- Sanz, J. L. and Köchling, T. 2007. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process Biochemistry**, 42(2), 119-133.
- Schuchmann, K. and Müller, V. 2016. Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria. **Applied and environmental microbiology**, 82(14), 4056-4069.
- Schuettpeitz, D. H. 1969. **Fecal and total coliform tests in water quality evaluation**. Department of Natural Resources Madison.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A. and Harada, H. 1999. Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. **Applied and environmental microbiology**, 65(3), 1280-1288.
- Shannon, C. E. and Weaver, W. 1998. **The mathematical theory of communication**. University of Illinois press.
- Shin, J., Cho, S.-K., Lee, J., Hwang, K., Chung, J. W., Jang, H.-N. and Shin, S. G. 2019. Performance and Microbial Community Dynamics in Anaerobic Digestion of Waste Activated Sludge: Impact of Immigration. **Energies**, 12(3), 1-15.
- Smith, M. R. and Mah, R. A. 1978. Growth and methanogenesis by Methanosarcina strain 227 on acetate and methanol. **Applied and Environmental Microbiology**, 36(6), 870-879.
- Song, Y.-C., Kwon, S.-J. and Woo, J.-H. 2004. Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic-and thermophilic digestion of sewage sludge. **Water research**, 38(7), 1653-1662.
- Speece, R. E. 1964. Nutrient requirements and biological solids accumulation in anaerobic digestion. **Advances in water pollution research**, 2, 305-322.
- Suksong, W., Tukanghan, W., Promnuan, K., Kongjan, P., Reungsang, A., Insam, H. and O-

- Thong, S. 2019. Biogas production from palm oil mill effluent and empty fruit bunches by coupled liquid and solid-state anaerobic digestion. **Bioresource Technology**.
- Sun, M.-T., Fan, X.-L., Zhao, X.-X., Fu, S.-F., He, S., Manasa, M. R. K. and Guo, R.-B. 2017. Effects of organic loading rate on biogas production from macroalgae: Performance and microbial community structure. **Bioresource Technology**, 235, 292-300.
- Sung, S. and Santha, H. 2003. Performance of temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) system treating dairy cattle wastes. **Water Research**, 37(7), 1628-1636.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. and Stensel, H. (2003). **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. George Tchobanoglous and Franklin Burton (Ed.) New York: Metcalf & Eddy, Inc.
- Tian, G., Yang, B., Dong, M., Zhu, R., Yin, F., Zhao, X., Wang, Y., Xiao, W., Wang, Q. and Zhang, W. 2018. The effect of temperature on the microbial communities of peak biogas production in batch biogas reactors. **Renewable Energy**, 123, 15-25.
- U.S. EPA. 1994. **Guide to Septage Treatment and Disposal**. Washington: EPA Office of Research and Development.
- U.S. EPA. 1999. **Decentralized Systems Technology Fact Sheet Septage Treatment/Disposal**. Washington: EPA Office of Research and Development.
- Vijayaraghavan, K., Ahmad, D. and Ibrahim, M. K. B. 2006. Biohydrogen generation from jackfruit peel using anaerobic contact filter. **International Journal of Hydrogen Energy**, 31(5), 569-579.
- Viswanath, P., Devi, S. S. and Nand, K. 1992. Anaerobic digestion of fruit and vegetable processing wastes for biogas production. **Bioresource technology**, 40(1), 43-48.
- Wang, X., Lu, X., Li, F. and Yang, G. 2014. Effects of Temperature and Carbon-Nitrogen (C/N) Ratio on the Performance of Anaerobic Co-Digestion of Dairy Manure, Chicken Manure and Rice Straw: Focusing on Ammonia Inhibition. **PLoS ONE**, 9(5), 1-7.
- Wanlapa, S., Wachirasiri, K., Sithisam-ang, D. and Suwannatup, T. 2015. Potential of

- Selected tropical fruit peels as dietary fiber in functional foods. **International Journal of Food Properties**, 18(6), 1306-1316.
- Xu, F., Wang, Z.-W., Tang, L. and Li, Y. 2014. A mass diffusion-based interpretation of the effect of total solids content on solid-state anaerobic digestion of cellulosic biomass. **Bioresource technology**, 167(178-185).
- Yen-Phi, V. T., Rechenburg, A., Vinneras, B., Clemens, J. and Kistemann, T. 2010. Pathogens in septage in Vietnam. **Science of The Total Environment**, 408(9), 2050-2053.
- Yu, D., Kurolo, J. M., Lähde, K., Kymäläinen, M., Sinkkonen, A. and Romantschuk, M. 2014. Biogas production and methanogenic archaeal community in mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion processes. **Journal of Environmental Management**, 143(54-60).
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E. and Guan, L. L. 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Appl Environ Microbiol**, 76(12), 3776-3786.
- Zhou, S., Nikolausz, M., Zhang, J., Riya, S., Terada, A. and Hosomi, M. 2016. Variation of the microbial community in thermophilic anaerobic digestion of pig manure mixed with different ratios of rice straw. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 122, 334-340.
- Zhu, J., Liu, X. and Dong, X. 2011. *Methanobacterium movens* sp. nov. and *Methanobacterium flexile* sp. nov., isolated from lake sediment. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 61(12), 2974-2978.
- Zinder, S., Sowers, K. and Ferry, J. G. 1985. *Methanosarcina thermophila* sp. nov., a thermophilic, acetotrophic, methane-producing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 35(4), 522-523.
- Zuo, Z., Wu, S., Zhang, W. and Dong, R. 2013. Effects of organic loading rate and effluent recirculation on the performance of two-stage anaerobic digestion of vegetable waste. **Bioresource Technology**, 146, 556-561.
- กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2553. คู่มือการปฏิบัติงานเกี่ยวกับการออกแบบการผลิตการควบคุมคุณภาพและการใช้ก๊าซชีวภาพ (Biogas) สำหรับโรงงานอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร:

กรมโรงงานอุตสาหกรรม

กรมควบคุมมลพิษ. 2545. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบติดกับที่ (Onsite Treatment). [Online].

Available http://www.pcd.go.th/info_serv/water_wt.html. (8 กรกฎาคม 2561).

กระทรวงพลังงาน. 2554. คู่มือการพัฒนาและการลงทุนผลิตพลังงานทดแทน. กรุงเทพมหานคร:

บริษัท เอเปิล คอนซัลแตนท์ จำกัด.

กระทรวงสาธารณสุข. 2558. การจัดการสิ่งปฏิกูล (แบบครบวงจร). นนทบุรี: สำนักงาน

พระพุทธศาสนาแห่งชาติ.

คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ. 2537. พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อม

แห่งชาติ พ.ศ. ๒๕๓๕. [Online]. Available

http://infofile.pcd.go.th/law/3_14_water.pdf?CFID=1436869&CFTOKEN=45769662

. (8 กรกฎาคม 2561).

ัญญาลักษณ์ ชุ่มใจ. 2560. ผลของอัตราส่วนผสมและอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ต่อการผลิต

แก๊สชีวภาพจากการย่อยสลายร่วมของสลัดจ์บ่อเกรอะและเปลือกกล้วยโดยที่แพด.

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นริรัตน์ แม้นทิม. 2552. ประสิทธิภาพของระบบบำบัดสิ่งปฏิกูลในการกำจัดจุลินทรีย์และปรสิธ.

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นุกูล อินทระสังขา, จรรย์รัตน์ พ่วงฟู, ดอกกรัก ชัยสาร, นพดล ศุภระกาญจน์ และ ยงยุทธ ปรีดาลัมพะ

บุตร. 2550. การศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำทิ้งจากการเลี้ยงสัตว์น้ำ

ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล. มหาวิทยาลัยทักษิณ.

ประชาชาติธุรกิจออนไลน์. 2560. ทะลัก! “ลำไย” เชียงใหม่-ลำพูน ล้นตลาด 2.6 แสนตัน.

[Online]. Available <https://www.prachachat.net/local-economy/news-10351> (8

กรกฎาคม 2561).

พลกฤษณ์ คุ่มกล้า. 2557. การผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าว. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระ

นคร.

มติชนออนไลน์. 2560. สถานการณ์ผลผลิตลำไยปี 60 บริหารจัดการอย่างเป็นระบบ ไม่กระทบ

ผลผลิต-ราคา. [Online]. Available

https://www.matichon.co.th/publicize/news_587446 (08 กรกฎาคม 2560).

คีตลา จันทร์เทศ. 2553. การวิเคราะห์ความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์อีจีเอส

บีโดยใช้เทคนิค PCR-DGGE. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิชัย ศุภลักษณ์, เศรษฐสิทธิ์ แสงโสภณจิตร และ กัญญา จิระเจริญรัตน์. 2552. การศึกษาความ

หลากหลายของแบคทีเรียในระบบลำไส้ของไก่โดยวิธีทางชีวโมเลกุล. สถาบันเทคโนโลยี

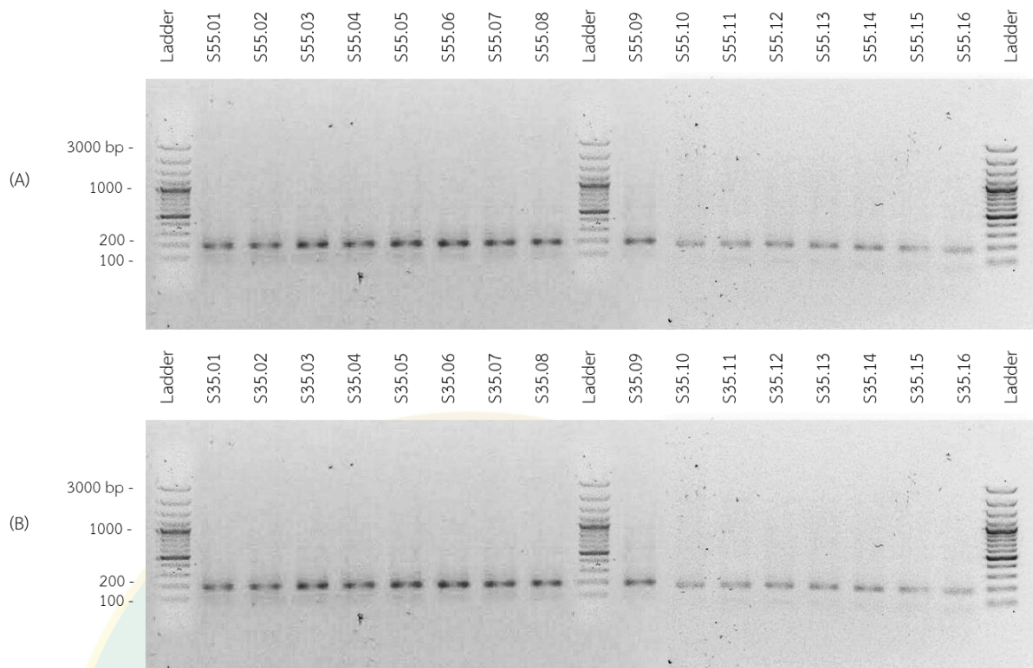
พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

- ศุภันธุ์ รัฐเมือง, สุนันทา เลาว์ฉัยศิริ และ กรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา. 2557. การผลิตแก๊สชีวภาพจาก
สิ่งปฏิกูล. *Journal Science Technology MSU*, 34(1), 53-62.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. การศึกษาต้นทุนและผลตอบแทนการแปรรูปลำไยอบแห้ง ปี
2548. *เศรษฐกิจการเกษตร*, 109, 1-43.
- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2561. **สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2561.**
กรุงเทพมหานคร: สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร.
- สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม. 2558. **การจัดการสิ่งปฏิกูล (แบบครบวงจร).** นนทบุรี: สำนักงาน
พระพุทธศาสนาแห่งชาติ.
- หทัยรัตน์ เปียดตะคุ. 2556. **การผลิตก๊าซชีวภาพจากเปลือกลำไยและเปลือกลำไยและเปลือกลิ้นจี่
โดยการย่อยสลายร่วมกับมูลไก่.** วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- อภรทิพย์ เปี้ยปาน. 2556. **การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ Hexagon OBTI
และชุดทดสอบ One-Step Fecal Occult Blood (FOB) ที่ใช้ในการตรวจคราบโลหิต
มนุษย์ในงานนิติวิทยาศาสตร์.** นิติวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยศิลปกร.

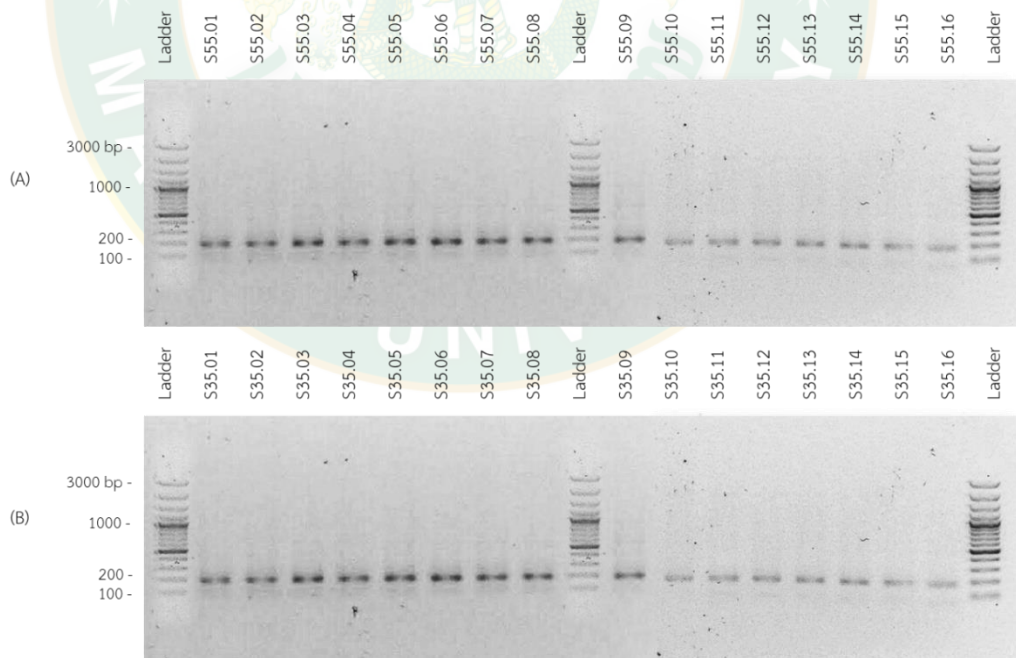


ภาคผนวก

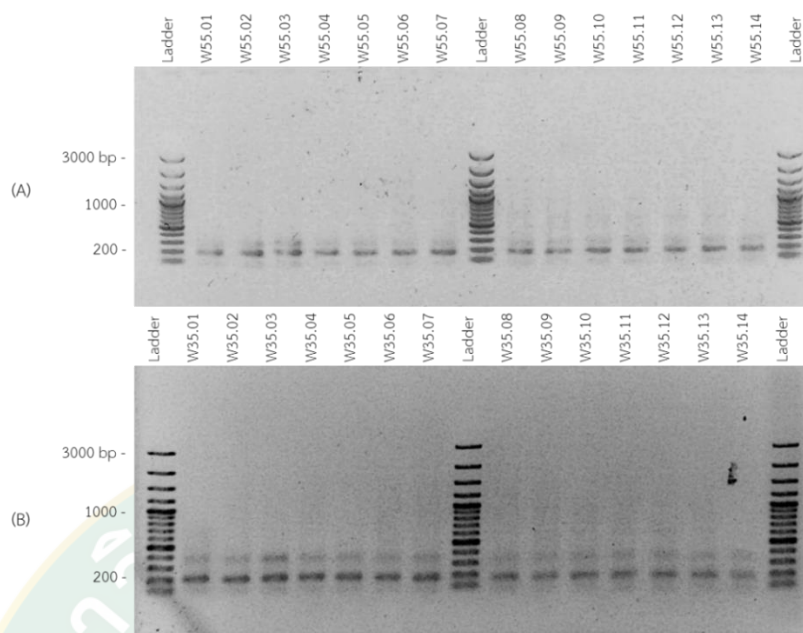
ผลการตรวจสอบผลผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis



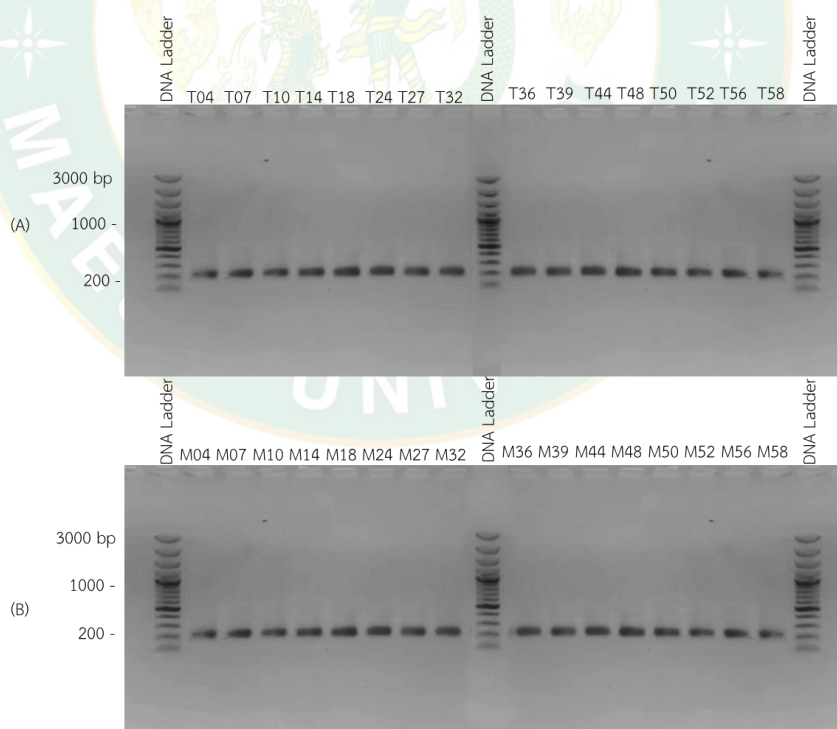
ภาพภาคผนวก การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของอาร์เคียที่ได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอในระบบ TPAD 1 โดยที่ A; Thermophilic digester, B; Mesophilic digester



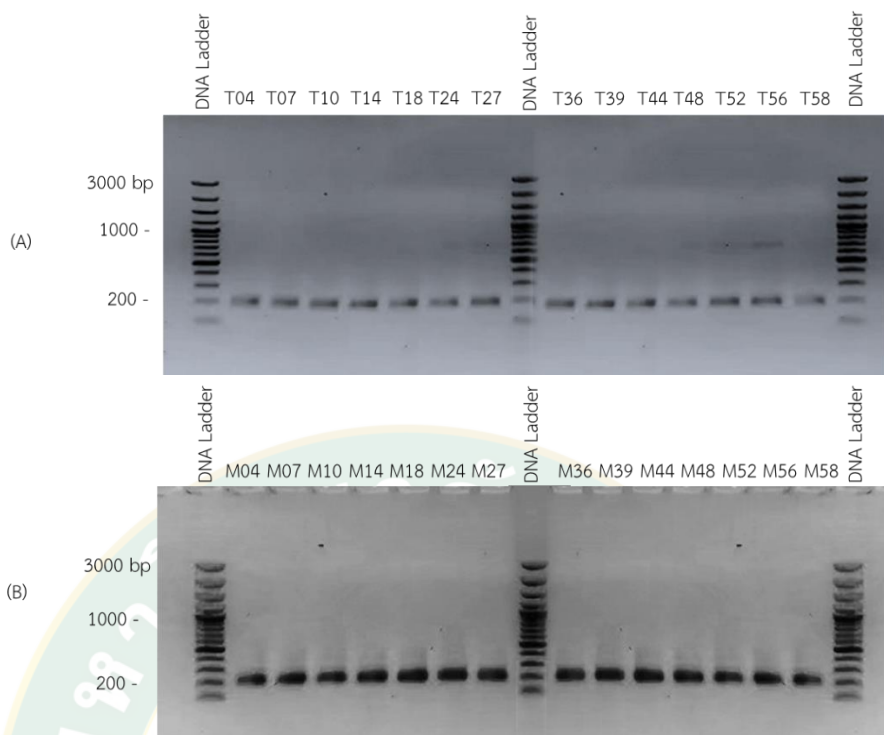
ภาพภาคผนวก ฉ-2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของอาร์เคียที่ได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอในระบบ TPAD 2 โดยที่ A; Thermophilic digester, B; Mesophilic digester



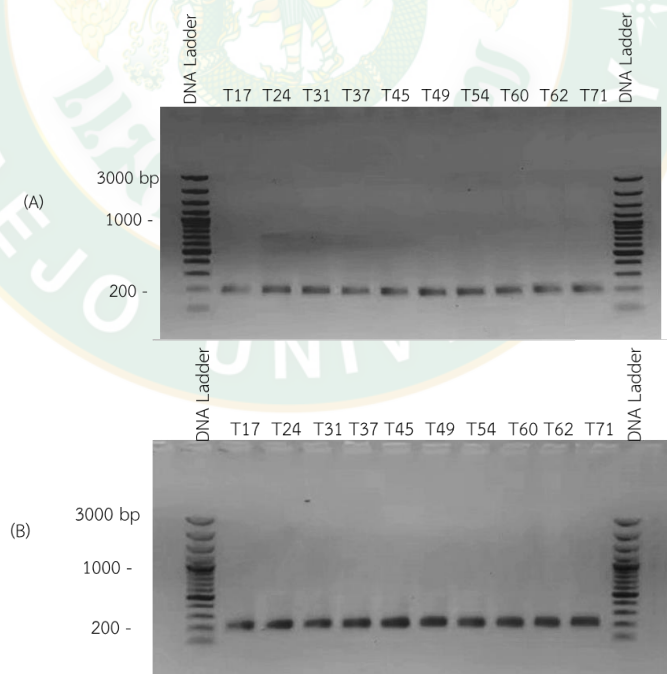
ภาพภาคผนวก ฉ-3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของอาร์เคียที่ได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอในระบบ TPAD 3 โดยที่ A; Thermophilic digester, B; Mesophilic digester



ภาพภาคผนวก ฉ-4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอในระบบ TPAD 1 โดยที่ A; Thermophilic digester, B; Mesophilic digester



ภาพภาคผนวก ฉ-5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอในระบบ TPAD 2 โดยที่ A; Thermophilic digester, B; Mesophilic digester



ภาพภาคผนวก ฉ-6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอในระบบ TPAD 3 โดยที่ A; Thermophilic digester, B; Mesophilic digester

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	กุลธิดา เฉลิมแสน
เกิดเมื่อ	03 เดือนพฤษภาคม 2536
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2558 : สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ พ.ศ. 2554 : สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสตรีรราชินูทิศ จังหวัดอุดรธานี
ประวัติการทำงาน	การเข้าร่วมงานประชุมวิชาการ พ.ศ. 2562 การนำเสนองานวิจัยในงาน การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 48 ร่วมกับการประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 9 จัดโดยมหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม เรื่อง กลุ่มจุลินทรีย์ชนิดเด่นในระบบผลิตแก๊สชีวภาพจากสลัดจ์บ่อเกรอะร่วมกับเปลือกกล้วย พ.ศ. 2561 การนำเสนองานวิจัยในงาน Science and technology conference ครั้งที่ 16 จัดโดยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เรื่อง การเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จากการหมักร่วมระหว่างสลัดจ์บ่อเกรอะกับของเสียจากกระบวนการแปรรูปลำไยอบแห้งสีทอง พ.ศ. 2559 การนำเสนองานวิจัยในงาน พะเยาวิจัย ครั้งที่ 6 จัดโดยมหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา เรื่อง การบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันจากร้านหมูกระทะด้วย <i>Pseudomonas</i> sp. พ.ศ. 2557 การนำเสนองานวิจัยในงาน Science and technology conference ครั้งที่ 12 จัดโดยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เรื่อง คุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่มจากตู้จ่ายน้ำหยอดเหรียญที่ตั้งใกล้บริเวณมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่