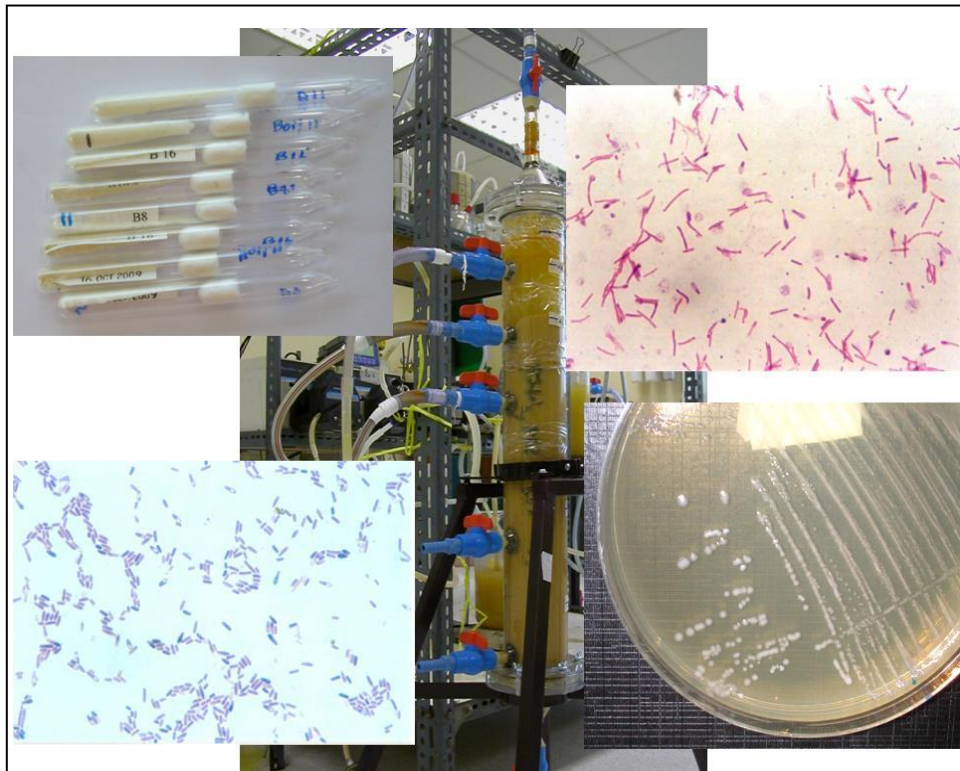


ว.

โครงการวิจัยที่ ภ. 49-20/ย. 4 / รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน
จากขยะเศษอาหาร



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ. 49-20

การจัดการมลพิษและการสร้างมูลค่าเพิ่มจากโรงงานกำจัดขยะมูลฝอย

ชุมชนและชนบท

โครงการย่อยที่ 4

การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

จากขยะเศษอาหาร

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

จากขยะเศษอาหาร

โดย

พัชรัตน์ นาดพิณิช

ปรีชา พลอยภัทรภิญโญ

เรวดี อนุวัฒนา

บรรณาธิการ

นฤมล รื่นไวย์

ลิขิต หาญจางสิทธิ์

บุญเรียม น้อยชุมแพ

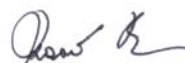
พิศุทธิ์ พลับสวาท

วัชรวิวรรณ ทรัพย์รุ่งเรือง

วว. กรุงเทพฯ 2554

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย



(นางเกษมศรี หอมจีน)

ผู้ว่าการ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณบริษัท เสริมสุข จำกัด (มหาชน) ที่ได้อนุเคราะห์ เชื้อจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียยูเอสบี เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการคัดเลือกสายพันธุ์ผลิต ก๊าซไฮโดรเจนในงานวิจัยของโครงการนี้. ขอขอบคุณพนักงานประจำโรงอาหารสถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เทคโนโลยี คลองห้า ในการให้ความสะดวก การเก็บตัวอย่างน้ำเสียเศษอาหาร.

คณะผู้วิจัย

พฤษภาคม 2553

คณะผู้วิจัย

ผู้อำนวยการโครงการ	นายปรีชา	พลอยภัทรภิญโญ
หัวหน้าโครงการ	นางพัทธนันท์	นาถพินิจ
ผู้ช่วยหัวหน้าโครงการ	นางสาวเรวดี	อนุวัฒนา
งานคัดเลือกสายพันธุ์	นางพัทธนันท์	นาถพินิจ
	นางสาวลาวัลย์	ชตานนท์
	นางสาวภูษิตา	วรรณิสสร
	นายบัณฑิต	ฝั่งสินธุ์
	นางสาวประวีณา	พุ่มแก้ว
งานควบคุมระบบ	นางพัทธนันท์	นาถพินิจ
	นางสาวเพียว	แย้มกุล
งานวิเคราะห์	นางพัทธนันท์	นาถพินิจ
	นางสาวเพียว	แย้มกุล
	นางสาวดรรรชนี	พานพิกุล
งานเขียนรายงาน	นางพัทธนันท์	นาถพินิจ
งานพิมพ์	นางพัทธนันท์	นาถพินิจ

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
คณะผู้วิจัย	ข
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	ฉ
คำย่อ	ช
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	3
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	22
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	31
4. สรุปผลการทดลอง	56
5. ผลการศึกษาเบื้องต้นทางด้านการตลาดและผลกระทบของโครงการ	59
6. ข้อเสนอแนะ	60
7. เอกสารอ้างอิง	63

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1. องค์ประกอบทางฟิสิกส์ของขยะมูลฝอย	5
ตารางที่ 2. องค์ประกอบทางเคมีของเศษผักและผลไม้	5
ตารางที่ 3. สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนในกระบวนการหมัก ไม่ใช้อากาศแบบไม่ใช้แสง (Ilgi and Fikret 2006)	10
ตารางที่ 4. ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์	26
ตารางที่ 5. ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์	27
ตารางที่ 6. ขั้นตอนการวิเคราะห์พารามิเตอร์ของการทดลอง	30
ตารางที่ 7. ลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏในกลุ่มตัวอย่างอ้างอิง ที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้น	32
ตารางที่ 8. ลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏในกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัด ขั้นต้นด้วยวิธีการต้ม (boil)	34
ตารางที่ 9. ลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏในกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัด ขั้นต้นด้วยวิธีการปรับกรด	35
ตารางที่ 10. ร้อยละก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากกลุ่มตัวอย่างอ้างอิงที่ ไม่ผ่านการบำบัด	37
ตารางที่ 11. ร้อยละก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัด ขั้นต้นด้วยวิธีการต้ม	38
ตารางที่ 12. การจำแนกชนิด และสายพันธุ์จุลินทรีย์	39
ตารางที่ 13. สมบัติของน้ำเสียจากโรงอาหาร วว. เทคโนโลยีคลองห้า	40
ตารางที่ 14. ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากระดับพีเอชต่างๆ ที่ระยะเวลาเก็บกัก 24 ชั่วโมง	42
ตารางที่ 15. ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากระดับพีเอชต่างๆ ที่ระยะเวลาเก็บกัก 48 ชั่วโมง	43

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 16. สมบัติของน้ำเสียก่อน-หลังเข้าถังหมักที่อัตราภาระรับ ชีโอดี 20 ก./ล.-วัน	47
ตารางที่ 17. สมบัติของน้ำเสียก่อน-หลังเข้าถังหมัก ที่อัตราภาระรับ ชีโอดี 30 ก./ล.-วัน	48
ตารางที่ 18. ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดก๊าซกับอัตราส่วน กรดบิวทีริกต่อกรดแอสिटิก และกรดโพรไพโอนิกต่อกรดแอสिटิก	54

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1. ขั้นตอนในการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยกระบวนการที่ไม่ใช้อากาศ	8
รูปที่ 2. ชุดทดลองการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องในระดับห้องปฏิบัติการ	28
รูปที่ 3. ผังการทำงานระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจนระดับห้องปฏิบัติการ	28
รูปที่ 4. ตัวกลางพลาสติกที่ใช้	28
รูปที่ 5. ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏของกลุ่มตัวอย่างอ้างอิงที่ไม่ผ่านการบำบัด	33
รูปที่ 6. ลักษณะการย้อมแกรมของกลุ่มตัวอย่างอ้างอิงที่ไม่ผ่านการบำบัด (กำลังขยาย 100 เท่า)	33
รูปที่ 7. ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏของกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้น ด้วยวิธีการต้ม	34
รูปที่ 8. ลักษณะการย้อมแกรมของกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้น ด้วยวิธีการต้ม (กำลังขยาย 100 เท่า)	35
รูปที่ 9. ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏของกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้น ด้วยวิธีการปรับ pH	36
รูปที่ 10. ลักษณะการย้อมแกรมของกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้น ด้วยวิธีการปรับ pH (กำลังขยาย 100 เท่า)	36
รูปที่ 11. เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่เก็บไว้ในหลอดสูญญากาศ (lyophilize)	37
รูปที่ 12. ผลการทดสอบจำแนกชนิด และสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยชุดทดสอบ API 32A	39
รูปที่ 13. ระดับพีเอชหลังการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	43
รูปที่ 14. ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของแต่ละระดับพีเอชใน 24 และ 48 ชั่วโมง	45
รูปที่ 15. ร้อยละไฮโดรเจนของแต่ละระดับพีเอชใน 24 และ 48 ชั่วโมง	45
รูปที่ 16. ปริมาณซีโอดีเข้า-ออก และประสิทธิภาพการกำจัด	49
รูปที่ 17. ปริมาณบีโอดีเข้า-ออก และประสิทธิภาพการกำจัด	49
รูปที่ 18. ระดับพีเอชเข้า-ออกจากถังหมักก๊าซไฮโดรเจน	50
รูปที่ 19. ปริมาณกรดอินทรีย์เข้า-ออก และอัตราส่วนกรดอินทรีย์ออก และเข้า	50

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 20. ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน และประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	51
รูปที่ 21. ปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น และร้อยละก๊าซไฮโดรเจนและ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	51
รูปที่ 22. อัตราส่วนระหว่างกรดโฟสไฟโอนิกกับกรดแอสีติก และกรดบิวทิริกกับกรดแอสีติก	54

คำย่อ

pH	หมายถึง	ระดับพีเอช (ความเป็นกรด-ด่าง)
BOD	หมายถึง	บีโอดี
COD	หมายถึง	ซีโอดี
VFA	หมายถึง	กรดอินทรีย์ระเหยง่าย (กรดอินทรีย์)
H ₂	หมายถึง	ก๊าซไฮโดรเจน
CH ₄	หมายถึง	ก๊าซมีเทน
CO ₂	หมายถึง	ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
MLSS	หมายถึง	ปริมาณตะกอนจุลินทรีย์ ที่อบที่ อุณหภูมิ 150°ซ.
MLVSS	หมายถึง	ปริมาณตะกอนจุลินทรีย์ ที่อบที่ อุณหภูมิ 550°ซ.
UASB	หมายถึง	Upflow Anaerobic Sludge Blanket (ระบบบำบัดน้ำเสียแบบไหลขึ้น, ยูเอสบี)
UAFB	หมายถึง	Upflow Anaerobic Fixed Bed (ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตรึงฟิล์มแบบไหลขึ้น)

ISOLATION OF MICROORGANISM FOR HYDROGEN PRODUCTION FROM FOOD WASTES

Patthanant Natpinit, Preecha Ploypatarapinyo and Rewadee Anuwattana

ABSTRACT

The objective of this investigation was to isolate the microorganisms for hydrogen production from food wastes. The seed sludge was anaerobic and in granular form in the UASB from SermSuk Public Co., Ltd. In accordance with primary treatment, the anaerobic granule was divided into 3 samples : no treatment (blank), boiling at 90°C for 15 min. and adjusting pH 4.3-4.5 for 1 month. For the first and second samples, the H₂ – producing bacteria could be isolated at 14 and 6 colonies, respectively, of which 3 and 2 colonies were chosen to identify the species. The species of H₂-producing bacteria were *Clostridium*, spp. such as *Clostridium acetobutyricum* chosen as starting seed sludge, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tyrobutyricum* and *Clostridium botulinum*. The MLSS of hydrogen forming bacteria were 92,216 mg/l with 0.5 liters. The reactor was of upflow anaerobic fixed bed (UAFB) with 15 pieces of polyethylene media having a diameter of 4 cm and 4 cm in height each. In this study, the diluted wastewater that had the maximum influent COD of 52,395 mg/l was used by starting COD loading rate from 20 to 30 kgCOD/m².d at HRT 1 day while pH was maintained at 4.3-4.5. The average gas production rates were 0.15 and 0.19 L-H₂/gCODr.d, respectively. The percentage of hydrogen was 44% and 34%, respectively. F/M for hydrogen production was started from 1.23 to 1.53 gCOD/gVSS. The ratio of VFA_{eff/inf} was 4.20 and 3.50 respectively. The ratio of butyric and acetic (C₄/C₂) was nearly 1.0. On the contrary, the ratio of propionic and acetic (C₃/C₂) was equal or less than 0.1. The C₄/C₂ ratio indicated the performance of hydrogen production.

การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน จากขยะเศษอาหาร

พัชรนันท์ นาทพินิจ¹, ปรีชา พลอยภักทรภิญโญ¹ และ เรวดี อนุวัฒนา¹

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากขยะเศษอาหาร. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเมล็ดตะกอนจุลินทรีย์ในระบบยูเอสบีของ บริษัท เสริมสุข จำกัด (มหาชน) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตัวอย่างตามการบำบัดขั้นต้น ได้แก่ กลุ่มไม่มีการบำบัด (กลุ่มอ้างอิง), กลุ่มที่ผ่านการบำบัดด้วยการต้มที่ 90°C. 15 นาที และกลุ่มที่ผ่านการปรับพีเอชที่ 4.3-4.5 เป็นเวลา 1 เดือน. ใน 2 กลุ่มตัวอย่างแรกสามารถคัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 14 และ 6 โคโลนี, ตามลำดับ โดยเลือก 3 และ 2 โคโลนีไปจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ ซึ่งจัดว่าเป็นกลุ่ม *Clostridium spp.* ได้แก่ *Clostridium acetobutyricum* (ที่ถูกเลือกไปใช้ในระบบต่อเนื่อง), *Clostridium perfringens*, *Clostridium tyrobutyricum* และ *Clostridium botulinum*. ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ 92,216 มก./ล. ที่ปริมาตร 0.5 ลิตร. ถังหมักออกแบบเป็นระบบตรึงฟิล์มแบบไหลขึ้น ซึ่งมีตัวกลางที่ทำด้วยพลาสติกพอลิเอทิลีนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม. และสูง 4 ซม จำนวน 15 ชิ้น. ในการทดลองนี้ได้เจือจางน้ำเสียเศษอาหาร โดยมีซีโอดีสูงสุดที่ 52,395 มก./ล. และเริ่มป้อนน้ำเสียที่อัตราการรับซีโอดี 20-30 กก.ซีโอดี/ลบ.ม.-วัน ที่ระยะเวลาเก็บกัก 1.0 วัน และรักษาระดับพีเอชที่ 4.3-4.5, อัตราการเกิดก๊าซเฉลี่ยเป็น 0.15 และ 0.19 ล. ไฮโดรเจน/ก.ซีโอดีที่ถูกกำจัด-วัน. ร้อยละก๊าซไฮโดรเจนเป็น 44 และ 34, ตามลำดับ. อัตราส่วนของอาหารและจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ 1.23 ถึง 1.53 ก.ซีโอดี/ก.วีเอสเอส. อัตราส่วนของกรดอินทรีย์ออกและเข้าเป็น 4.20 และ 3.50, ตามลำดับ. อัตราส่วนของกรดบิวทิริกและกรดแอสซิติค ควรมีค่าใกล้เคียง 1.0. ในทางตรงกันข้ามอัตราส่วนของกรดโพรไพโอนิกและกรดแอสซิติคมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.1 ซึ่งอัตราส่วนของกรดบิวทิริกและกรดแอสซิติคถือว่าเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.

¹ ฝ่ายเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและทรัพยากร, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1. บทนำ

1.1 ที่มาโครงการ

ก๊าซไฮโดรเจนถือว่าเป็นแหล่งพลังงานที่สะอาด สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท. นอกจากนี้ ยังสามารถใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงได้เป็นอย่างดี. ก๊าซไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ให้พลังงานที่มีค่าความร้อนสูงประมาณ 122,000 กิโลจูลต่อ กิโลกรัม ซึ่งสูงกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงกลุ่มไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ประมาณ 2.75 เท่า (Ilgi and Fikret 2006). การเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนมีประสิทธิภาพสูง เมื่อทำปฏิกิริยากับก๊าซออกซิเจน จะได้น้ำ และพลังงานความร้อน ซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม, โดยไม่ก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นสาเหตุของก๊าซเรือนกระจกหรือภาวะโลกร้อนมากกว่าพลังงานเชื้อเพลิงประเภทอื่นๆ. ปัจจุบันมีการนำก๊าซไฮโดรเจนไปใช้กับเซลล์เชื้อเพลิง (fuel cell) ในการผลิตไฟฟ้าหรือนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงเช่นเดียวกับก๊าซมีเทน, นำไปเป็นสารตั้งต้นการผลิตในอุตสาหกรรมสารเคมี, การเกิดไฮโดรเจนชั้นของไขมันและน้ำมันในอุตสาหกรรมอาหาร, การผลิตอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และโลหะ, การกำจัดซัลเฟอร์ในน้ำมันเชื้อเพลิง และการเปลี่ยนรูปก๊าซโซลีน เป็นต้น (Ilgi and Fikret 2006).

ก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตได้หลายวิธี เช่น กระบวนการเปลี่ยนรูปสารไฮโดรคาร์บอน (เช่น ก๊าซมีเทน) ด้วยไอน้ำ (steam reforming of hydrocarbon), กระบวนการอิเล็กโทรไลซิสด้วยน้ำ (electrolysis of water), ก๊าซซิฟิเคชัน (gasification), การหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนแบบใช้แสงและไม่ใช้แสง (anaerobic dark fermentation and photo fermentation) เป็นต้น (Armor 1999). ในกระบวนการเปลี่ยนรูปก๊าซมีเทนด้วยไอน้ำ เป็นกระบวนการที่ไอน้ำทำปฏิกิริยากับก๊าซมีเทน แล้วได้ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิต. ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นถือว่าเป็นก๊าซเรือนกระจก วิธีการนี้จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมมากนัก. นอกจากนี้ กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในวิธีการอื่นๆ จะเกิดสารประกอบบางชนิดที่เป็นพิษเช่นเดียวกัน เช่น สารประกอบฮาโลเจนไฮโดรคาร์บอนจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ และซัลเฟอร์ เป็นต้น (Armor 1999). สำหรับกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการชีวภาพ โดยวิธี dark fermentation (Lay *et al.* 1998, นาถพิณีและคณะ 2552) และ photosynthesis (Guan *et al.* 2004; Levin *et al.* 2004; Winkler *et al.* 2002), วัตถุดิบที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นของเสียอุตสาหกรรม โดยเฉพาะของเสียอินทรีย์ เช่น น้ำเสียอุตสาหกรรมที่มีบีโอดีสูงหรือน้ำเสียเศษอาหาร เป็นต้น. วิธีการผลิตนี้ นอกจากจะได้

พลังงานไฮโดรเจนแล้ว ยังเป็นการกำจัดของเสียไม่ให้เกิดปัญหามลพิษทางด้านสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่งด้วย.

ปัญหาขยะเศษอาหารในปัจจุบันมีความสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกัน เนื่องจากประเทศมีการขยายตัว, ปริมาณประชากรในประเทศเพิ่มมากขึ้น, ทำให้ปริมาณขยะอินทรีย์เพิ่มมากขึ้นด้วย โดยเฉพาะขยะเศษอาหาร. ปัญหาที่เกิดขึ้นจากขยะเศษอาหารนั้น ส่วนใหญ่เป็นน้ำชะขยะ (leachate) ซึ่งก่อให้เกิดกลิ่นรบกวนและเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรคชนิดต่างๆ. ในปี พ.ศ. 2550 มีปริมาณขยะมูลฝอยเกิดขึ้นทั่วประเทศประมาณ 14.72 ล้านตันหรือวันละ 40,332 ตัน, เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2549 ประมาณ 0.12 ล้านตัน. โดยในเขตกรุงเทพมหานครมีปริมาณขยะที่เก็บได้ประมาณวันละ 8,532 ตัน. เขตเทศบาลเมืองและเมืองพัทยาคาดว่าจะมีประมาณวันละ 13,600 ตันและนอกเขตเทศบาลประมาณวันละ 18,200 ตัน (กรมควบคุมมลพิษ 2550). ขยะเศษอาหารส่วนใหญ่มาจากร้านอาหาร, ร้านอาหาร หรือภัตตาคาร, ซึ่งบางครั้งเศษอาหารเหล่านี้ถูกระบายลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติ และเป็นสาเหตุหนึ่งของการทำให้เกิดน้ำเสียในแหล่งน้ำสาธารณะ.

องค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมีของขยะมูลฝอย แสดงได้ดังตารางที่ 1 และ 2, พบว่า ร้อยละ 70-80 ของขยะทั้งหมดเป็นขยะที่ย่อยสลายได้ และเป็นเศษผักร้อยละ 75-85 ของปริมาณขยะทั้งหมด. การจัดการขยะมูลฝอยโดยการหมักปุ๋ยหรือหมักก๊าซชีวภาพเป็นทางเลือกหนึ่ง. เนื่องจากสมบัติทางเคมีของขยะมูลฝอยมีคาร์บอนร้อยละ 40-50, โดยเฉพาะเศษผักผลไม้ในตารางที่ 2 มีคาร์บอนสูงถึงร้อยละ 50 สามารถนำมาหมักย่อยสลายสารอินทรีย์ให้ได้ก๊าซชีวภาพ ได้แก่ ก๊าซมีเทน โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic digestion) ได้. จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถจัดการขยะมูลฝอยได้อย่างมีประสิทธิภาพ และนำก๊าซมีเทนมาใช้เป็นพลังงานได้.

ตารางที่ 1. องค์ประกอบทางกายภาพของขยะมูลฝอย

ลักษณะมูลฝอย	หน่วย	ตลาด	ชุมชน	สถานที่กำจัดมูลฝอย
เศษผักอาหาร	ร้อยละ	70.59	52.95	57.36
กระดาษ	ร้อยละ	5.86	7.59	7.16
พลาสติก	ร้อยละ	12.54	14.38	13.92
ยาง	ร้อยละ	1.23	1.98	1.79
หนัง	ร้อยละ	1.48	0.52	0.76
ผ้า	ร้อยละ	0.71	3.84	3.06
ไม้	ร้อยละ	1.50	2.82	2.49
แก้ว	ร้อยละ	2.38	3.70	3.37
โลหะ	ร้อยละ	1.67	1.92	1.86
หิน, กระเบื้อง	ร้อยละ	0.20	2.28	1.76
อื่นๆ	ร้อยละ	1.81	6.69	5.47
BULK	กก./ม ³	189.35	198.35	196.10
DENSE	กก./ม ³	228.44	292.64	276.59
ความชื้น	ร้อยละ	59.47	52.58	54.30
ค่าความร้อน	แคลอรี/กก.	2,261.62	2,156.46	2,174.75

หมายเหตุ : BULK = ความหนาแน่นมูลฝอยปกติ (กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร)

DENSE = ความหนาแน่นมูลฝอยในขยะขนส่ง (กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร)

ที่มา : มุลินธิชัยพัฒนา (2543)

ตารางที่ 2. องค์ประกอบทางเคมีของเศษผักผลไม้

พารามิเตอร์	ร้อยละ
ความชื้น	83.4
ของแข็งระเหยได้	14.8
คาร์บอน	49.62
ไฮโดรเจน	5.58
ไนโตรเจน	1.57
ฟอสฟอรัส	0.22
ซัลเฟอร์	0.19

ที่มา : มุลินธิชัยพัฒนา (2543)

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางชีวภาพ จุลินทรีย์ที่จะนำมาเป็นหัวเชื้อในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้น สามารถนำเชื้อจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนมาผ่านการบำบัดขั้นต้น (pretreatment) โดยผ่านการหมักแบบไม่ใช้อากาศ แล้วนำไปต้มหรือปรับกรด (Lay *et al.* 1998; Kim *et al.* 2004; นาถพิณี (และคณะ 2552). โดยตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียมีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ผสมกันอยู่ ซึ่งบางชนิดสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้. จากการศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจน พบว่า แบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาพไม่ใช้อากาศและไม่ใช้แสง (dark fermentation) มีอยู่หลายกลุ่ม แบ่งตามกลไกทางชีวเคมีที่ใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบ่งได้ 3 ระบบ ได้แก่ *Clostridial system* (Das and Vegioroglu 2001), *Escherichia coli system* และ *Desulfuricans system*. โดย 2 ระบบแรกสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้อย่างมีนัยสำคัญ คือ *Clostridial system* สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด 4 mole H₂/mole glucose. ส่วน *Escherichia coli system* ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 2 mole H₂/mole glucose (Ilgı and Fikret 2006). โดยส่วนใหญ่ให้ก๊าซไฮโดรเจนประมาณร้อยละ 30 (Das and Vegioroglu 2001; Ginkel *et al.* 2004). นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาการผลิตพลังงานไฮโดรเจนด้วยวิธี photofermentation โดยใช้แบคทีเรียที่สามารถใช้แสงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้, แต่มีข้อจำกัดที่มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่ำ, ต้องใช้พื้นที่มาก และการประยุกต์ใช้ในงานได้จริงนั้นค่อนข้างยุ่งยาก (Benemann 1997; Levin *et al.* 2004; Nath and Das 2004).

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เหมาะสม ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยกระบวนการหมัก และใช้น้ำเสียเศษอาหารเป็นวัตถุดิบ. ทั้งนี้เนื่องจาก น้ำเสียเศษอาหารมีสารอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายได้ เพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ เช่น ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทน ที่เป็นพลังงานทดแทน และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยช่วยประหยัดการนำเข้าน้ำมันดิบได้ปีละหมื่นล้านบาท และเป็นวิธีการกำจัดขยะเศษอาหารได้อีกทางหนึ่งด้วย.

1.2 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

- 1.2.1 คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.
- 1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากขยะเศษอาหาร.

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. เปรียบเทียบหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการต้ม และการปรับกรด.

2. คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้.

3. ทดลองหาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในระดับ

Anaerobic activity test.

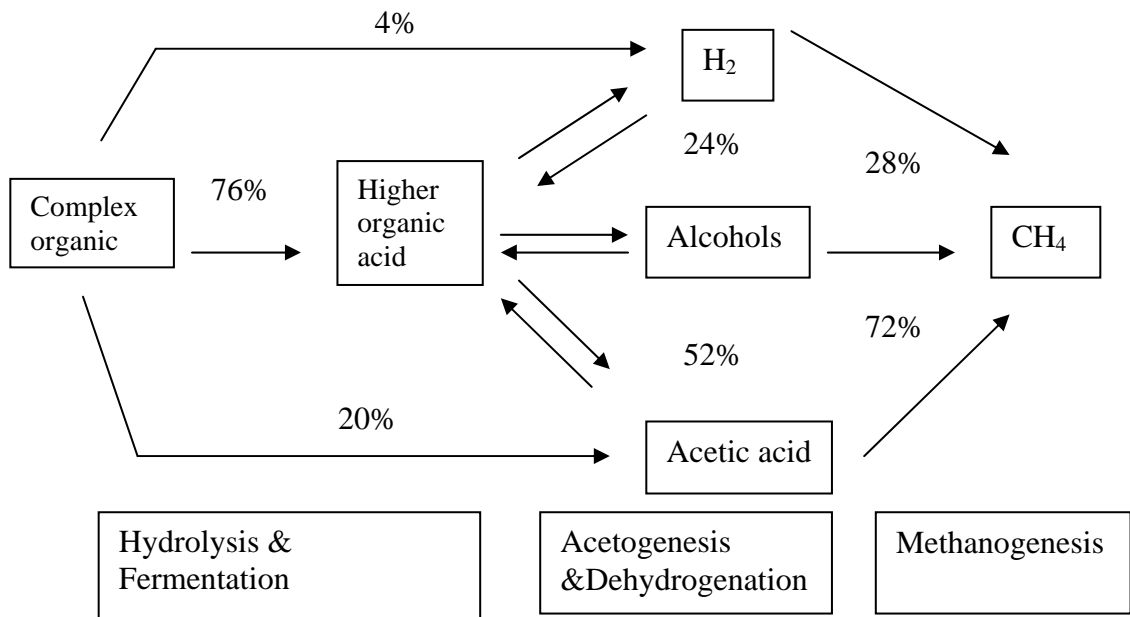
4. ศึกษาหาวิธีการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน.

5. ศึกษาสภาวะและปัจจัยที่สำคัญในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.

6. สรุปและประเมินผลการวิจัยและจัดทำรายงาน.

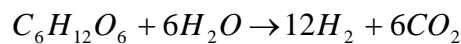
1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากหลักการทำงานของกระบวนการหมักในสภาวะแบบไม่ใช้ออกซิเจน ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกระบวนการ 3 ส่วน คือ 1) การย่อยสลายให้โมเลกุลเล็กลง (hydrolysis), 2) การสร้างกรด (acidogenesis), และ 3) การสร้างก๊าซมีเทน (methanogenesis) รายละเอียดแสดงได้ดังรูปที่ 1. ก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้น ได้แก่ ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทน ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนได้หลายรูปแบบ เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมัน, นำไปใช้ผลิตกระแสไฟฟ้าได้ เป็นต้น. โดยที่ก๊าซไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นในกระบวนการหมักกรด หรือ acidogenesis ซึ่งเปลี่ยนสารอินทรีย์ไปเป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile fatty acid; VFA) และยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนร่วมด้วย, ถ้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกลุ่ม *Clostridium spp.* (Das and Vegioroglu 2001). สำหรับก๊าซมีเทนจะเกิดขึ้นในกระบวนการสร้างก๊าซมีเทน (methanogenesis) ซึ่งเปลี่ยนกรดอินทรีย์ที่ระเหยง่ายไปเป็นก๊าซมีเทน โดยใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Methanothrix* หรือ *Methanosarcina* (Hulshoff-Pol 1994; Buswell and Mueller 1952).



รูปที่ 1. ขั้นตอนในการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยกระบวนการที่ไม่ใช้ออกาส.

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ โดยใช้วิธีการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาพไม่มีออกซิเจนและไม่ใช้แสง (Anaerobic Dark Fermentation) หรือเกิดขึ้นในขั้นตอน acidogenesis ในขั้นตอนการสร้างกรด ดังรูปที่ 1. โดยตามทฤษฎีจะให้ไฮโดรเจน 12 โมล จาก 1 โมลของกลูโคส (Vavilin *et al.* 1995) ดังสมการ,



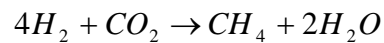
แต่ถ้าพิจารณาทางด้าน Thermodynamics กระบวนการนี้จะให้ไฮโดรเจนสูงเพียง 4 โมล และกรดน้ำส้ม 2 โมล (Fang and Liu 2002) ดังแสดงในสมการ,



แต่จากผลการทดลองพบว่า ไฮโดรเจนที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 2-3 โมลต่อ 1 โมลของกลูโคส ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดกรดบิวทีริก (Vavilin *et al.* 1995) ดังสมการ,



นอกจากนี้ ยังพบว่า มีปฏิกิริยาการใช้ไฮโดรเจน 2 ปฏิกิริยา ได้แก่ ปฏิกิริยาการเกิดกรด
โพรไพโอติกและปฏิกิริยาเกิดก๊าซมีเทน (methanogenesis) (Vavilin *et al.* 1995) ดังสมการ,



จะเห็นได้ว่า มีหลายปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักกรด (acidogenesis). ดังนั้น ถ้า
ต้องการผลิตก๊าซไฮโดรเจนให้ได้ในปริมาณสูง จึงจำเป็นต้องควบคุมให้เกิดปฏิกิริยาเฉพาะผลิต
กรดแอสติกและกรดบิวทริก. ในขณะที่เดียวกันต้องยับยั้งปฏิกิริยาที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจน โดยต้อง
ควบคุมไม่ให้มีปริมาณของกรดโพรไพโอติกมากเกินไป และไม่ควรมีการผลิตก๊าซมีเทนร่วมด้วย.
กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีหมักนี้ มีความเป็นไปได้ในทางเทคนิคและมีความเหมาะสม
อย่างมาก เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นก่อนการเกิดก๊าซมีเทนในกระบวนการหมักในสภาวะไม่ใช้
อากาศ และสามารถใช้กับของเสียต่างๆ ได้ โดยไม่ต้องการแสงในการทำงาน.

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนในกระบวนการหมักไม่ใช้อากาศแบบไม่ใช้แสง
(anaerobic dark fermentation) แบ่งได้ 3 กลุ่มใหญ่ คือ *Clostridial* system (Das and Vegioroglu
2001), *Escherichia coli* system และ *Desulfuricans* system, ซึ่ง 2 ระบบแรกสามารถผลิตก๊าซ
ไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ. สายพันธุ์จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน
แสดงได้ดังตารางที่ 3.

ตารางที่ 3. สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนในกระบวนการหมักไม่ใช้อากาศแบบไม่ใช้แสง
(Igi and Fikret 2006)

จุลินทรีย์	แหล่งอาหาร	ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	เอกสารอ้างอิง
<i>Klebsiella oxytoca</i> HP1	กลูโคส (50mM)	1 mole/mole glucose	Minnan <i>et al.</i> 2005
	ซูโครส (50mM)	1.5 mole/mole sucrose	Minnan <i>et al.</i> 2005
	ซูโครส (50mM)	3.6 mole/mole sucrose	Minnan <i>et al.</i> 2005
<i>Escherichia coli</i>	กลูโคส (20 g/L)	4.73×10^{-8} mole/mole glucose	Podesta <i>et al.</i> 1997
<i>Escherichia cloacae</i> IIT-BT08	กลูโคส (1%)	2.2 mole/mole glucose	Kumar and Das 2000
	ซูโครส (10 g/L)	6 mole/mole sucrose	Kumar and Das 2000
<i>Escherichia aerogenes</i>	แป้ง (20 g glucose/L)	1.09 mole/mole glucose	Fabiano and Perego 2002
	มอลทาส (2% sucrose)	1.5 mole/mole sucrose	Tanisho and Ishiwata 1994
	กลูโคส (10 g/L)	850 mL/L hr	Yokoi <i>et al.</i> 1997
<i>Clostridium</i> spp.	เซลลูโลส (25 g/L)	2.18 mmole/g cellulose	Lay 2001
	กลูโคส (20 g/L)	1.7 mole/mole glucose	Lin and Chang 2004
	กลูโคส (10 g/L)	640 mL/hr	Oh <i>et al.</i> 2004
<i>Clostridium pasteurium</i>	ซูโครส (20 g/L)	4.8 mole/mole sucrose	Lin and Chang 2004
	แป้ง (24 g/L)	106 mL/g starch	Liu and Shen 2004
<i>Clostridium acetobutyricum</i>	กลูโคส	2 mole/mole glucose	Chin <i>et al.</i> 2003
<i>Clostridium butyricum</i> +	แป้ง (2%)	2.5 mole/mole glucose	Yokoi <i>et al.</i> 1998
<i>Escherichia aerogenes</i>	แป้ง (2%)	2.6 mole/mole glucose	Yokoi <i>et al.</i> 1998
	กากมันฝรั่ง (0.5%)	2.4 mole/mole glucose	Yokoi <i>et al.</i> 2001
	กากมันฝรั่ง (2%)	2.7 mole/mole glucose	Yokoi <i>et al.</i> 2002
<i>Clostridium termolacticum</i>	แลคโทส (29 mmole/L)	3 mole/mole lactose	Collet <i>et al.</i> 2004
<i>Thermonaerobacterium</i>	แป้ง (4.6 g/L)	92 mL/g starch	Zhang <i>et al.</i> 2003
	เซลลูโลส (5 g/L)	102 mL/ g cellulose	Lay 2001
	น้ำเสียเศษอาหาร (6 g VS/L)	1.8 mole/mole hexose)	Shin <i>et al.</i> 2004
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	แป้ง (5 g/L)	3.33 mole/mole starch	Kanai <i>et al.</i> 2005

KOD1

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมัก จะเริ่มต้นเดินระบบ (start-up) โดยใช้ตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน (heat treatment) เช่นต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที เพื่อฆ่าแบคทีเรียกลุ่มสร้างก๊าซมีเทน (methanogens) ซึ่งใช้ก๊าซไฮโดรเจนในการผลิตก๊าซมีเทน ส่วนแบคทีเรียสร้างก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen-producing bacteria) สามารถอยู่รอดได้ในรูปสปอร์.

Lay *et al.* (1998) ได้ทดลองผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากของเสียผสม ได้แก่ เศษอาหารจากโรงอาหาร, กากอุจจาระ (night soil) และกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนผ่านการย่อยแล้ว (digested sludge), โดยใช้แบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจน (hydrogen-producing bacteria) และกากตะกอนจุลินทรีย์ที่ผ่านการย่อย (digested sludge). กากตะกอนจุลินทรีย์นี้ได้ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน (temperature treatment) โดยการต้มให้เดือด 15 นาที. จากผลการทดลองแบบรุ่นผลิต (batch) พบว่า ตะกอนจุลินทรีย์ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ ทัดเทียมจุลินทรีย์กลุ่ม *Clostridium*. โดยตะกอนจุลินทรีย์ที่ปรับสภาพด้วยความร้อนให้ประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน (hydrogen yield) สูงถึง 140 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมเชื้อจุลินทรีย์. เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium* ในสภาวะการทดลอง พบว่า ก๊าซชีวภาพที่ผลิตได้ประกอบด้วยก๊าซไฮโดรเจนสูงถึงร้อยละ 60 และไม่มีก๊าซมีเทนในก๊าซชีวภาพที่ผลิตได้, ที่พีเอช 5.6 กรดอินทรีย์ที่ผลิตได้เป็นกรดบิวทริก และแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้สูงสุดเป็นบิวทิลแอลกอฮอล์.

Kim *et al.* (2004) ได้ทำการทดลองความเป็นไปได้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำเสียอาหาร (food waste) โดยการเติมตะกอนจุลินทรีย์จากถังหมักของระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน. โดยนำตะกอนจุลินทรีย์มาผ่านความร้อนที่ 90°C. เป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มใช้ก๊าซไฮโดรเจน และเพื่อให้แบคทีเรียกลุ่มสร้างก๊าซไฮโดรเจนปรับตัวอยู่ในสภาพสปอร์. ทำการทดลองในระบบหมักแบบรุ่นผลิต ควบคุมที่อุณหภูมิ 35°C. และพีเอชในช่วง 5-6 ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกและโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์. จากผลการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดมีค่า 122.9 มิลลิลิตรต่อกรัมคาร์โบไฮเดรตหรือ 0.123 ลูกบาศก์เมตรไฮโดรเจนต่อกิโลกรัมซีไอดี ที่อัตราน้ำเสียต่อตะกอนจุลินทรีย์เป็น 87:13. นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับปริมาณกรดบิวทริกที่เกิดขึ้น โดยกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้ส่วนใหญ่เป็นกรดแอสติกและกรดบิวทริก, และมีแอลกอฮอล์เกิดขึ้นในปฏิกิริยาคด้วย. ถ้าควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วง 5-6, กรดอินทรีย์สามารถสะสมอยู่ในระบบได้สูง

ซึ่งอาจมีค่าสูงถึง 15,000 มิลลิกรัมต่อลิตร. กรดอินทรีย์ที่สูงนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มสร้างก๊าซมีเทนได้ และแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่ตรวจพบเป็นกลุ่ม *Clostridium*.

Han and Shin (2004) ได้ทำการศึกษาการควบคุมการผลิตไฮโดรเจนจากเศษอาหาร โดยการควบคุมอัตราการเจือจาง (dilution rate, D) ซึ่งเป็นส่วนกลับของระยะเวลาเก็บกัก (hydraulic retention time, HRT). เศษอาหารที่ใช้อยู่ในลักษณะของแข็งผสมกับตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสีย. ส่วนกากตะกอนที่ทดลองถูกปรับสภาพด้วยการต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งแบคทีเรียสร้างก๊าซมีเทนไม่ให้เจริญเติบโต, แต่แบคทีเรียกลุ่มสร้างก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งส่วนใหญ่เป็น *Clostridium* สามารถมีชีวิตอยู่ได้ โดยปรับตัวเองให้อยู่ในรูปสปอร์. จากนั้น สูบน้ำตะกอนจุลินทรีย์ผ่านกากเศษอาหาร พบว่า สภาพที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการหมักสูงสุด (total fermentation efficiency) ที่อัตราเจือจาง 2.3 วัน^{-1} หรือระยะเวลาเก็บกัก 10.4 ชั่วโมง, ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนร้อยละ 19.3, มีกรดอินทรีย์ร้อยละ 36.5 และเอทานอลร้อยละ 15. การเพิ่มอัตราเจือจางหรือลดระยะเวลาเก็บกักลง จะทำให้เกิดการสะสมกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น, ระดับพีเอชลดต่ำลง, ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มสร้างก๊าซมีเทน ที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจนและกรดอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน. ดังนั้น ก๊าซไฮโดรเจนที่ถูกผลิตขึ้นจึงไม่ถูกนำไปใช้ต่อ. จากผลการทดลองนี้บ่งชี้ให้เห็นว่า ที่ระดับพีเอช 5 สามารถยับยั้งขั้นตอนการสร้างก๊าซมีเทน (methanogenesis) ได้อย่างดี. นอกจากนี้ ยังพบว่า อัตราส่วนระหว่างกรดบิวทริกและกรดแอสिटิก มีความสัมพันธ์โดยตรงต่ออัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งสอดคล้องกับด้านเทอร์โมไดนามิกของ 2 ปฏิกิริยาการสร้างกรดทั้งสองชนิด ดังนี้:



$$\Delta G = -184.2 \text{ kJ/mol}$$



$$\Delta G = -257.1 \text{ kJ/mol}$$

Duangmanee *et al.* (2003) ได้ทำการทดลองเตรียมหัวเชื้อผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยการต้มเชื้อจุลินทรีย์ในระบบหมักแบบไม่ใช้อากาศที่อุณหภูมิ 70°C . เป็นเวลา 20 นาที, ให้ก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดถึงร้อยละ 70 ในถังปฏิกรณ์แบบครึ่งฟิล์ม. การใช้ความร้อนหรือต้มเชื้อเป็นการกำจัดแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างสปอร์ที่ไม่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนออกไป เมื่อผ่านการให้ความร้อนจะเหลือแต่กลุ่ม *Clostridium spp.* เป็นกลุ่มสร้างสปอร์และสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้. นอกจากนี้ ยัง

พบว่า มีนักวิจัยหลายท่านศึกษาถึงวิธีการให้ความร้อนแบบต่างๆ เช่น Lay (2002) และ Okamoto *et al.* (2000) ได้ใช้วิธีการให้ความร้อน โดยป้อนไอน้ำคัมหัวเชื้อเป็นเวลา 15 นาที. แต่ Ginkel *et al.* (2001) ได้ใช้วิธีให้ความร้อนโดยการอบที่ 104°C. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งจะช่วยกระตุ้นแบคทีเรียกลุ่มสร้างก๊าซไฮโดรเจนและช่วยคัดเลือกกลุ่มสร้างสปอร์, ทั้งนี้ยังช่วยกำจัดแบคทีเรียกลุ่มใช้ไฮโดรเจนด้วย. นอกจากนี้ Doyle (2002) ใช้หัวเชื้อกลุ่ม *Clostridium butyricum* และ *Clostridium perfringens* เป็นหัวเชื้อ ซึ่งกระตุ้นเชื้อโดยให้ความร้อนที่ 100°C. เป็นเวลา 15-20 นาที, แต่อุณหภูมิที่ดีที่สุดคือ 75-80°C.

Cheng *et al.* (2003) ได้ศึกษาวิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic hydrogen fermentation, AHF) มีวัตถุประสงค์เป็นคาร์โบไฮเดรตกับโปรตีนใช้เชื้อกลุ่ม *Clostridium tyrobutyricum*, การสังเคราะห์แสงด้วยเชื้อกลุ่ม *Rhodospseudomonas palustris* (photosynthetic). นอกจากนี้ ได้ศึกษาการคัดเลือกเชื้อกลุ่ม heterotrophs ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน และศึกษาการนำตะกอนส่วนเกินไปใช้ประโยชน์ โดยนำไปหมักผลิตก๊าซมีเทน. ผลการทดลองพบว่า ระดับพีเอชมีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chang *et al.* (2002) ระดับพีเอชน้อยกว่า 5.5 จะมีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ถึงร้อยละ 95. นอกจากนี้ยังพบว่า เปปโตเนนเป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับจุลินทรีย์ โดยที่ร้อยละ 50 ของอินทรีย์ไนโตรเจนถูกเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนีย และอีกร้อยละ 25 ถูกนำไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์.

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (Ginkel *et al.* 2001; Lay 2002), pH (Fang and Liu 2002; Ginkel *et al.* 2001), partial pressure hydrogen (Mizuno *et al.* 2000; Bai *et al.* 2003a), Fe (Lee *et al.* 2001) และชนิดของแบคทีเรีย. สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม *Clostridium spp.*, *Enterobacteria* และ *E.coli* (Taguchi *et al.* 1995; Karube *et al.* 1982; Rachman *et al.* 1998; Nandi *et al.* 2001). นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาสายพันธุ์ผสมของแบคทีเรียในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดย Fang *et al.* (2002) ศึกษากระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตในรูปกลูโคส ด้วยจุลินทรีย์กลุ่ม mesophilic และ Ueno *et al.* (2001) ได้ศึกษาคลายคลึงกับ Fang แต่เปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นเซลลูโลสและใช้จุลินทรีย์กลุ่ม thermophilic แทน ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่า. จากการทดลองของ Bai *et al.* (2003)(b) พบเชื้อ *Clostridium sporogenes-like* เมื่อใช้น้ำเสียประเภท

โปรตีน และพบเชื้อ *Clostridium celerecrescens-like* และ *Clostridium diolos-like* เมื่อใช้น้ำเสียประเภทคาร์โบไฮเดรต.

Vavilin *et al.* (1995) ได้ทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ว่าในขั้นตอน acidogenesis มีปฏิกิริยา 2 ปฏิกิริยาแข่งขัน ได้แก่ ปฏิกิริยาสร้างไฮโดรเจน โดย Butyrate-producing bacteria กับปฏิกิริยาใช้ไฮโดรเจน โดย Propionate-producing bacteria ดังสมการ,



Horiuchi *et al.* (2002) ได้ทดลองผลของระดับพีเอชต่อชนิดกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้ในขั้นตอนการหมักกรด. ผลการทดลองนี้ที่ใช้กลูโคสเป็นสารอาหารและระบบหมักเป็นแบบ Chemostat พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6-7 สำหรับการผลิตกรดบิวทิริก แต่ถ้าเพิ่มค่าพีเอชสูงถึง 8 พบว่า กรดอินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นกรดแอสซิติคและกรดโพรไพโอนิก. ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณการเกิดกรดบิวทิริก. จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ชนิดของกรดอินทรีย์สามารถควบคุมได้โดยการปรับระดับพีเอชในระบบ.

Hawkes *et al.* (2002) ได้รวบรวมข้อมูลการทดลองต่างๆ เพื่อประเมินสถานะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการหมัก. โดยสรุปว่า สถานะการควบคุมระบบควรมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.5-6.0 อุณหภูมิที่ 30 °ซ. และระยะเวลาเก็บกัก 8-12 ชั่วโมง. ในการติดตามการทำงานของระบบ ควรตรวจวัดชนิดของกรดอินทรีย์ โดยให้มีกรดแอสซิติคและกรดบิวทิริก, แต่ต้องป้องกันไม่ให้มีกรดโพรไพโอนิกเกิดขึ้น, เนื่องจากการเกิดกรดโพรไพโอนิกจะใช้ก๊าซไฮโดรเจน ดังแสดงในสมการ,



Yu *et al.* (2002) ทดลองการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียผลิตไวน์จากข้าวเจ้า โดยใช้ระบบยูเอสบี (UASB) ควบคุมที่อุณหภูมิในช่วง 35-55°ซ. พบว่า ที่ 55 °ซ. ระบบมีประสิทธิภาพ

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดที่ระยะเวลาเก็บกัก 2 ชั่วโมง ที่พีเอช 5.5 และอัตราการรับซีโอดี เป็น 408 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน. โดยระบบสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในอัตรา 9.33 ลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมวีเอสเอสต่อวัน หรือ 2.14 โมลไฮโดรเจนต่อโมลเฮกโซส และ องค์ประกอบในก๊าซชีวภาพมีไฮโดรเจนร้อยละ 61 และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 38. นอกจากนี้ยังพบว่า ระบบยูเอเอสบีมีประสิทธิภาพสูงสามารถรองรับอัตราการรับซีโอดีได้สูงมาก เนื่องจากระบบสามารถรักษาปริมาณตะกอนจุลินทรีย์ได้สูงถึง 9,400-11,700 มิลลิกรัมต่อลิตร.

Mizuno *et al.* (2000) ได้ทำการทดลองเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจาก กลูโคส โดยการลด partial pressure ของก๊าซไฮโดรเจน, ก๊าซไนโตรเจนถูกใช้ไล่ก๊าซไฮโดรเจนใน ถึงปฏิกรณ์แบบ CSTR, ควบคุมระบบทดลองที่พีเอช 6, อุณหภูมิ 35°C., ระยะเวลาเก็บกัก 8 ชั่วโมง และอัตราป้อนกลูโคสเป็น 27.02 กรัมต่อลิตรต่อวัน พบว่า อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้น จาก 0.85 เป็น 1.43 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส เมื่อมีการเป่าไล่ก๊าซไฮโดรเจนโดยก๊าซ ไนโตรเจน. นอกจากนี้ยังพบว่า กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็นกรดบิวทิริกและกรดแอสिटิก.

Yu and Fang (2001) ได้ศึกษาขั้นตอนการหมักกรด (acidification) ของน้ำเสียผลิตภัณฑ์ นม ที่มีค่าซีโอดีอยู่ในช่วง 2,000-30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการทดลองทั้งแบบรุ่นผลิตและ ต่อเนื่อง (continuous) ซึ่งควบคุมพีเอชที่ 5.5 และอุณหภูมิ 37°C. โดยในส่วนของทดลองแบบรุ่น ผลิตได้ควบคุมระบบที่ระยะเวลาเก็บกัก 12 ชั่วโมงและอัตราการรับซีโอดีเป็น 4-60 กิโลกรัมต่อ ลูกบาศก์เมตรต่อวัน. จากผลการทดลอง พบว่า สารคาร์โบไฮเดรตถูกย่อยสลายได้รวดเร็วกว่าสาร โปรตีนและน้ำมัน ตามลำดับ. ในส่วนของการทดลองแบบต่อเนื่องพบว่า ทั้งปริมาณก๊าซไฮโดรเจน และกรดอินทรีย์เพิ่มสูงขึ้น เมื่อค่าซีโอดีของน้ำเสียและอัตราการรับซีโอดีเพิ่มสูงขึ้น. อัตราส่วน เชื้อจุลินทรีย์ต่อซีโอดีเป็น 0.258 กรัมวีเอสเอสต่อกรัมซีโอดีที่ถูกกำจัดของระบบทดลอง ซึ่งสูงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับระบบผลิตก๊าซมีเทนเป็น 0.066 กรัมวีเอสเอสต่อกรัมซีโอดีที่ถูกกำจัด. จากผล การทดลอง สรุปได้ว่า สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดมีอัตราการรับซีโอดีที่เหมาะสมอยู่ที่ 24 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน.

Fang and Liu (2002) ได้ศึกษาผลของพีเอชต่ออัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกลูโคสโดย จุลินทรีย์ผสม (mixed culture), ที่อุณหภูมิ 36°C., ระยะเวลาเก็บกัก 6 ชั่วโมงและอัตราการรับ กลูโคสเป็น 28 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน, พบว่า ที่พีเอช 5.5 จะให้ก๊าซไฮโดรเจนร้อยละ สูงสุดที่ 64, อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็น 2.1 ± 0.1 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส, อัตรา

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่อเชื้อจุลินทรีย์เป็น 4.6 ± 0.4 ลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมวีเอสเอสต่อวัน, กรดอินทรีย์ที่ผลิตได้ส่วนใหญ่เป็นกรดแอสติกในช่วงร้อยละ 15.3-34.1 และกรดบิวทริกในช่วงร้อยละ 31.2-45.6 ที่เหลือเป็นกรดอินทรีย์อื่นๆ และแอลกอฮอล์ต่างๆ. นอกจากนี้ พบว่า ถ้าเพิ่มพีเอชให้สูงกว่า 5.5 จะเริ่มมีก๊าซมีเทนในก๊าซชีวภาพที่ผลิตได้.

Yu and Fang (2003) ได้ศึกษาระบบการหมักกรดในการย่อยสลายสารเจลาติน โดยใช้ระบบหมักแบบไหลขึ้น, ควบคุมค่าซีไอดีในน้ำเสียที่ 4,000 มิลลิกรัมต่อลิตรและอัตราการรับซีไอดีที่ 48 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน, พบว่า อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการหมักกรดมีไม่มากนัก ซึ่งสังเกตได้จากค่าพลังงานกระตุ้น (activation energy) ต่ำเพียง 1.83 กิโลแคลอรีต่อโมล. เมื่อระบบมีค่าพีเอชที่ 6 จะให้ประสิทธิภาพในขั้นตอนการหมักกรดสูงสุด, แต่ถ้าต้องการความเข้มข้นสูงสุดของกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์ ควรควบคุมพีเอชในช่วง 6-6.5 และถ้าต้องการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด ต้องควบคุมค่าพีเอชให้ต่ำกว่า 5.5. ถ้าค่าพีเอชสูงกว่า 5.5 พบว่า ก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้จะถูกใช้หมดไป เพื่อนำไปผลิตเป็นกรดแอสติกหรือกรดโพรไพโอนิก.

Morimoto *et al.* (2004) ได้รายงานผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากกลูโคส โดยใช้จุลินทรีย์ไม่ใช้ออกซิเจนจากธรรมชาติ ซึ่งได้มาจากตะกอนจุลินทรีย์ของระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์ม, ตะกอนจากการหมักปาล์มน้ำมันและเชื้อจากการทำปุ๋ยหมักในฟิลิปปินส์ พบว่า ประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดมีค่า 2.1 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ที่อุณหภูมิ 50-60 °ซ. และที่พีเอช 5-6. โดยที่พีเอช 4 จะพบว่า ก๊าซชีวภาพที่ผลิตได้ไม่มีก๊าซมีเทน ซึ่งแสดงว่าที่ระดับพีเอชต่ำนี้ สามารถยับยั้งขั้นตอนการสร้างก๊าซมีเทนได้อย่างสมบูรณ์.

Shin *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเศษอาหาร โดยเปรียบเทียบระหว่าง 2 อุณหภูมิต่ำ 37 °ซ. (mesophilic) กับอุณหภูมิสูง 55 °ซ. (thermophilic) ในประเทศเกาหลี พบว่า เศษอาหารถูกทิ้งในขยะมูลฝอยสูงถึงร้อยละ 25.4. ในการศึกษานี้ได้ใช้ระบบหมักแบบรุ่นผลิต พบว่า ตะกอนจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิสูงมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าตะกอนจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำ. โดยที่อุณหภูมิสูงให้ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดที่ 1.8 โมลไฮโดรเจนต่อโมลเฮกโซส, ก๊าซชีวภาพที่ผลิตได้ประกอบด้วยก๊าซไฮโดรเจนร้อยละ 64 และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 36, โดยมีก๊าซมีเทนต่ำกว่าร้อยละ 0.13. แบคทีเรียที่ตรวจพบเป็น *Thermosacherolytim* และ *Desulfotomaculum geothermicum* ที่อุณหภูมิสูง และตรวจพบ *Thermotogales* และ *Bacillus* ที่อุณหภูมิต่ำ.

Bai *et al.* (2003c) ได้ทำการศึกษาระยะเวลาเก็บกักที่เวลาต่างๆ ต่ออัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนและการเจริญเติบโต ซึ่งพบว่า ที่ระยะเวลาเก็บกัก 6 ชั่วโมง จะเกิดก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดที่ 5.6 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อกรัมชีโอดี. นอกจากนี้ ยังได้ทดลองการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียประเภทต่างๆ เช่น โพรตีน, คาร์โบไฮเดรต และไขมัน. โดยเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์จากกลูโคส (ชีโอดี 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร), เปปโตน 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร, พบว่า ก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากน้ำเสียประเภทคาร์โบไฮเดรตจะมีปริมาณมากกว่าน้ำเสียประเภทโพรตีน. ทั้งนี้เนื่องจากโพรตีนจะใช้เวลาในการย่อยสลายสารอินทรีย์นานกว่า และต้องเปลี่ยนอินทรีย์ในโตรเจนไปเป็นก๊าซแอมโมเนียก่อน. จากการทดลอง พบว่า ตัวบ่งชี้ในการเกิดก๊าซไฮโดรเจนคือกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ. โดยสถานะที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีและมีปริมาณสูง จะต้องมีการควบคุมที่มากกว่ากรดแอสซิดิกและมากกว่ากรดโพสไฟโอนิก ตามลำดับ. ของน้ำเสียที่ออกจากระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจน, ซึ่งถ้าระบบมีการควบคุมแอสซิดิกและกรดโพสไฟโอนิกมากจะผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้น้อย. นอกจากนี้ ยังพบว่าปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเก็บกักลดลง (อย่างน้อย 2 ชั่วโมง) เนื่องจากอัตราการเจริญเติบโตเป็น 1/6 ชั่วโมง⁻¹. การเกิดกรดบิวทริกเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาเก็บกักลดลงจาก 12 ชั่วโมงเป็น 6 ชั่วโมง. นอกจากนี้ ยังพบว่า ระยะเวลาเก็บกักนานจะพบก๊าซแอมโมเนีย ซึ่งมีผลทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนลดลง.

Yokoi *et al.* (1995) พบว่า โพรตีนเป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับแบคทีเรียผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยที่โพรตีนมีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งแหล่งโพรตีนที่สำคัญคือ พอลิเพปโทน. อย่างไรก็ตาม พบว่า พอลิเพปโทนสามารถทำปฏิกิริยากับกลูโคสและเกิดสารที่มีผลการยับยั้งต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้. Ueno *et al.* (2001) ได้ศึกษาทดลองแหล่งโพรตีน 2 ชนิดคือ แอมโมเนียและส่วนผสมระหว่างแอมโมเนียและเพปโทน และพบว่า ส่วนผสมแอมโมเนียและเพปโทนสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีกว่าแอมโมเนียเพียงอย่างเดียว.

ความแตกต่างของวัตถุดิบมีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งเป็นที่รู้กันดีว่า คาร์โบไฮเดรตเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Taguchi *et al.* 1992; Yokoi *et al.* 1950; Ueno *et al.* 2001) ซึ่งให้ปริมาณไฮโดรเจนมากกว่าโพรตีน. Bai *et al.* (2003b) ได้ศึกษาอัตราส่วนระหว่างกลูโคสกับเพปโทนที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งพบว่า อัตราส่วนที่มีกลูโคสร้อยละ 60 และเพปโทนร้อยละ 40 จะสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ 6.4 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อกรัมชีโอดี. แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะสามารถช่วยรักษาสภาวะบัฟเฟอร์ให้กับระบบ

ด้วยในสภาวะการสร้างกรด. จากการศึกษาของ Ueno *et al.* (2001) พบว่า เพปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีกว่าแอมโมเนีย.

Brosseau *et al.* (1986) พบว่า การเกิดก๊าซไฮโดรเจน และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ควรเกิดขึ้นในเวลาเดียวกัน โดยที่กลูโคสร้อยละ 60 และเพปโทนร้อยละ 40 เป็นช่วงที่ดีที่สุดที่มีการเกิดก๊าซไฮโดรเจน และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยอัตราที่ใกล้เคียงกัน. แต่ถ้าอัตราส่วนระหว่างกลูโคสและเพปโทนต่างจากนี้ อาจจะทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีอัตราเร็วกว่าการเกิดก๊าซไฮโดรเจนได้.

Fang and Liu (2002) และ Ginkel *et al.* (2001) พบว่า ระดับพีเอชที่เหมาะสมในการควบคุมการเกิดก๊าซไฮโดรเจนควรอยู่ที่ 5.5. การหมักคาร์โบไฮเดรตเพื่อให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนนั้น ตัวบ่งชี้ระบบคือ กรดแอซิดิกและกรดบิวทิริก (Jones and Woods 1986). โดยกรดแอซิดิก คือ ผลผลิตหลัก, กรดบิวทิริกจะเกิดขึ้นในสารอินทรีย์ที่มีความหลากหลายมาก โดยผลิตได้ 1.7 มิลลิโมลต่อกรัมซีไอดี. แต่ถ้าเป็นเพปโทนตัวบ่งชี้ได้แก่ กรดแอซิดิกและแอมโมเนีย ซึ่งถ้ามีกรดแอซิดิกมาก จะให้ก๊าซไฮโดรเจนลดลง เนื่องจากก๊าซไฮโดรเจนถูกนำไปผลิตเป็นกรดแอซิดิกอย่างต่อเนื่อง, แต่ระดับพีเอชจะมีแนวโน้มสูงขึ้น เนื่องจากแอมโมเนียช่วยรักษาสภาวะบัฟเฟอร์ของระบบ ซึ่งต่างจากคาร์โบไฮเดรตที่มีระดับพีเอชลดลง. Bai *et al.* (2003b) ใช้กรดแอซิดิกเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพของระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจน, ถ้าแหล่งวัตถุดิบมีความซับซ้อนมาก กรดอินทรีย์ที่ได้จะมีความหลากหลายมากขึ้น.

Claassen *et al.* (2004) ได้ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากขานอ้อย โดยเปลี่ยนเซลล์ลูโลสให้กลายเป็นแป้งโดยใช้ *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. ในการหมัก ซึ่งเป็น thermophilic bacterium จะได้น้ำตาลกลุ่มซูโครสและฟรักโทสมากกว่ากลูโคส ซึ่งสามารถนำมาผลิตเป็นก๊าซไฮโดรเจนได้. นอกจากการคั้นน้ำอ้อยไปผลิตเป็นน้ำตาลและผลิตก๊าซไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องแล้วพบว่า อ้อยสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 2.1 คิวบิกเมตรต่อเฮกตาร์.

Chang and Lin (2003) ได้ศึกษาถึงลักษณะของถังปฏิกรณ์ที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยดัดแปลงมาจากระบบยูเอเอสบี, เนื่องจากการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้นได้ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจนเช่นเดียวกับการผลิตก๊าซมีเทน (Hansel and Lindblad 1988; Taguchi *et al.* 1992; Aoyama *et al.* 1997; Kataoka *et al.* 1997; Yokoi *et al.* 1995). ระบบยูเอเอสบีเป็นถัง

ปฏิกรณ์ที่มีประสิทธิภาพสูง, ระยะเวลาเก็บกักสั้น. ลักษณะของถังปฏิกรณ์ยูเอเอสบีขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างส่วนสูง, ความกว้างและเส้นผ่าศูนย์กลาง (Haandel van and Lettinga 1994), โดยทั่วไปอัตราส่วนระหว่างส่วนสูงและเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 5-12. ลักษณะของถังปฏิกรณ์ที่มีอัตราส่วนระหว่างส่วนสูงและเส้นผ่าศูนย์กลางมาก จะสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีกว่าถังปฏิกรณ์ที่มีอัตราส่วนระหว่างส่วนสูงและเส้นผ่าศูนย์กลางน้อย (Haandel van and Lettinga 1994). นอกจากนี้ ยังพบว่า อัตราส่วนระหว่างส่วนสูงและเส้นผ่าศูนย์กลางที่เหมาะสมอยู่ที่ 7.4. ความเร็วไหลขึ้นมีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรง. โดยที่ความเร็วไหลขึ้นเพิ่มขึ้นที่ 0.33 เมตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ระยะเวลาเก็บกักลดลงที่ 8 ชั่วโมง จะมีอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดที่ 2.9 โมลไฮโดรเจนต่อโมลซูโครส. เชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบเป็น *Clostridium butyricum* (มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ 1.3-2.2 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส, (Kataoka *et al.* 1997) และ *Bacillus licheniformis* (มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ 1.5 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส (Kumar *et al.* 1995). นอกจากนี้ ยังพบว่า กรดอินทรีย์เป็นตัวบ่งชี้สำหรับการเกิดก๊าซไฮโดรเจน (Chen *et al.* 2001) โดยมีอัตราส่วนระหว่างกรดแอซีติกต่อกรดบิวทิริกในช่วง 0.57-0.66 (Chang and Lin 2003).

Gavala *et al.* (2003) ได้ทดลองเปรียบเทียบระบบ CSTR และ UASB ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกลูโคสที่มีซีไอดี 10 กรัมต่อลิตร. โดยระบบ CSTR มีขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาเก็บกัก 12, 8, 6, 4 และ 2 ชั่วโมง. สำหรับระบบ UASB มีขนาด 210 มิลลิลิตร ที่ความเร็วไหลขึ้น 450-600 เซนติเมตรต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลาเก็บกัก 12, 6 และ 2 ชั่วโมง. จากผลการทดลองพบว่า ระบบ UASB สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าระบบ CSTR. โดยอัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนของระบบ CSTR สูงขึ้นเมื่อระยะเวลาเก็บกักลดลงจนถึง 4 ชั่วโมง, โดยมีมิลลิโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิโมลกลูโคสต่อชั่วโมงสูงสุด. สำหรับระบบ UASB ในระบบที่มีความเร็วไหลขึ้นต่ำๆ มีอัตราการผลิตก๊าซได้สูงกว่าระบบที่มีความเร็วไหลขึ้นสูง, ซึ่งปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ได้มีมากกว่าระบบ CSTR. นอกจากนี้ ยังพบว่า กรดแอซีติกและกรดบิวทิริกในระบบ UASB มีปริมาณมากกว่าระบบ CSTR ประมาณ 2-4 เท่าเช่นเดียวกัน.

Chang and Lin (2002) พัฒนาระบบยูเอเอสบีมาผลิตก๊าซไฮโดรเจน พบว่า โดยทั่วไประบบยูเอเอสบีสำหรับการผลิตก๊าซมีเทนจะเดินระบบแบบต่อเนื่อง, ช่วงการสร้างเม็ดตะกอนจะใช้เวลาอย่างน้อย 2 เดือน และปรับสมดุลให้เสถียรอีกประมาณ 3 เดือน. แต่สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะต้องใช้เวลามากกว่าประมาณ 5 เดือน จึงปรับสมดุลให้เสถียร เพื่อที่จะสามารถผลิต

ก๊าซไฮโดรเจนได้คงที่และมีประสิทธิภาพสูง. นอกจากนี้ Chang *et al.* (2002) ได้พัฒนาระบบเมมเบรนเข้าร่วมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เพื่อเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ในระบบ. โดยสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ 110 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อกรัมวีเอสเอสต่อวัน หรือ 673 มิลลิโมลต่อลิตรต่อวัน, ได้ก๊าซไฮโดรเจนร้อยละ 57 คิดเทียบได้เท่ากับ 8.4 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดี. นอกจากนี้ได้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลผลิตแล้วยังได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์, กรดบิวทิริกและเอทานอลด้วย.

Lin *et al.* (2002) พบว่า น้ำเสียที่ผ่านการหมักก๊าซไฮโดรเจนจากระบบแบบไม่ใช้อากาศแล้ว สามารถนำมาผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่อด้วยการสังเคราะห์แสง ซึ่งจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์แสงได้ในสภาวะไม่ใช้อากาศ โดยใช้ระบบ CSTR ที่ไม่จำเป็นต้องมีการสูบน้ำวน (recycle). แต่ถ้ามีการสูบน้ำวนจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้สูงสุดที่ระยะเวลาเก็บกัก 40 ชั่วโมง และมีเวลาเก็บกักตะกอนที่ 7.5 วัน, อัตราส่วนการสูบน้ำวนเท่ากับ 1, ซึ่งสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 3.9 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อกรัมวีเอสเอสต่อวัน โดยที่มีปริมาณจุลินทรีย์ 940 มิลลิกรัมต่อลิตร. นอกจากนี้ ยังพบว่า เอทานอลสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสงได้ แต่ไม่ควรมีเกิน 178 มิลลิกรัมต่อลิตร, ความคุมระดับพีเอชในกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ 4.2-4.7, ความคุมไม่ให้มีแอมโมเนียเกิน 20 มิลลิกรัมในไฮโดรเจนต่อลิตรและซัลไฟด์ไม่เกิน 2 มิลลิโมลต่อลิตร.

ในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศจำเป็นต้องระบายก๊าซไฮโดรเจนออกจากถังปฏิกรณ์ให้ได้มากที่สุด เพื่อลด partial pressure ของก๊าซไฮโดรเจนภายในถัง. เนื่องจากถ้ามี partial pressure ของก๊าซไฮโดรเจนสูง จะมีผลยับยั้งการเกิดก๊าซไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่อง ไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นมาจะถูกนำไปใช้เป็นที่เทนหรือกรดแอสติกได้มากขึ้น. การอัดก๊าซในไฮโดรเจนเข้าไปในถัง (Bai and Cheng 2002) หรือนำเมมเบรนมาใช้ในการแยกก๊าซไฮโดรเจนออกจากระบบ โดยใช้หลักการเคลื่อนที่ของมวลสาร (mass transfer) ระหว่างไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งก๊าซทั้งหมดจะถูกปั๊มสูญญากาศเข้าเมมเบรนเพื่อแยกก๊าซออกจากกัน.

Liang *et al.* (2003) ได้ทดลองการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้ระบบเมมเบรนร่วมกับระบบบำบัดแบบชีวภาพ (membrane bio reactor, MBR) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ 200 มก./ล. เพิ่มขึ้นจนถึง 5,000 มก./ล., ทดลองกับน้ำเสียกลูโคสที่มีซีโอดี 80 กรัมต่อลิตรต่อวันที่ 55°C., มีอัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนที่ 28.1 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมงหรือ 4.58 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อ

กรัมวีเอสเอสต่อชั่วโมงหรือ 8.43 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดี, ซึ่งมีค่าน้อยกว่าในทฤษฎี คือ 12 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อกรัมกลูโคส. โดยทั่วไปตะกอนจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมักเป็นตะกอนเบา ทำให้หลุดออกนอกระบบได้ง่าย, แต่จะแยกด้วยถังตกตะกอนได้ยาก (Andreensen *et al.* 1989) และมักใช้ควบคู่กับระบบหมักที่ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Cheng *et al.* 1999). Liang *et al.* (2003) จึงได้นำเมมเบรนมาช่วยในการแยกตะกอนจุลินทรีย์ออกจากน้ำเสีย โดยสามารถรักษาปริมาณตะกอนได้ตั้งแต่ 2,000-15,000 มิลลิกรัมวีเอสเอสต่อวัน, สามารถป้องกันการอุดตันด้วยการสูบล้างตะกอนกลับที่อัตราความเร็วไหลขึ้นมากกว่า 2 เมตรต่อวินาที โดยใช้เมมเบรนชนิดพอลิซัลโฟน พื้นที่ 0.042 ตารางเมตรต่อขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร. สภาพที่ใช้ควบคุมคือ อุณหภูมิ 55±2 °ซ., อัตราส่วนซูโครสต่อเพปโทนเป็น 4:1, ระดับพีเอชในช่วง 5.5-6.5, ปริมาตร 2 ลิตรต่อวัน, หัวเชื้อเป็นจุลินทรีย์จากระบบยูเอเอสบี ผ่านการให้ความร้อนจนเดือด เป็นเวลา 20 นาที. นอกจากนี้ Liang *et al.* (2001) ได้ทดลองเปรียบเทียบระหว่างระบบ MBR และ CSTR ที่ระยะเวลาเก็บกัก 6 ชั่วโมง, พบว่า ระบบ MBR มีอัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนสูงกว่ามาก, กรดอินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบเป็นกรดแอซิดิก มีผลให้ระดับพีเอชลดลง. โดยในช่วงเริ่มต้น พบว่า อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนขึ้นกับอัตราส่วนของสารอินทรีย์กับปริมาณจุลินทรีย์ (VSS) (Ginkel *et al.* 2001) เมื่ออัตราส่วนระหว่างอาหารต่อจุลินทรีย์ (food/microbial, F/M) มีค่าเพิ่มขึ้น อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นด้วย. อัตราส่วนที่เหมาะสมอยู่ที่ 4-16 กรัมซีโอดีต่อกรัมวีเอสเอสต่อวัน ซึ่งกรดแอซิดิกที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ระดับพีเอชลดลง ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วย (Ginkel *et al.* 2001; Cheng *et al.* 2002).

2. วัสดุ อุปกรณ์ และการดำเนินงานวิจัย

2.1 วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

2.1.1 ชุดทดลองในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์

2.1.1.1 Anaerobic Jar ขนาด 2.5 ลิตร, 7 ลิตร

2.1.1.2 Anaerobic Pack ขนาด 2.5 ลิตร, 7 ลิตร

2.1.1.3 ตัวดูดซับออกซิเจน

2.1.1.4 งานเลี้ยงเชื้อพลาสติก

2.1.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ Cooked meat, Reinforced Clostridial medium (RCM)

2.1.1.6 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ยี่ห้อ TOMY รุ่น SS -325

2.1.1.7 ตู้ปลอดเชื้อ ยี่ห้อ HEAL FORCE รุ่น SF SAFE 1200

2.1.1.8 ตู้บ่มที่ 37°C ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น INE 600

2.1.2 ชุดทดลองในการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

2.1.2.1 ขวดวัคซีนพร้อมฝายาง และฝาอะลูมิเนียม ขนาด 120 มล.

2.1.2.2 ขวดวัคซีนพร้อมฝายาง และฝาอะลูมิเนียม ขนาด 50 มล.

2.1.2.3 กระบอกนิตยาขนาด 60 มล. พร้อมเข็มนิตยา

2.1.2.4 กระบอกนิตยาขนาด 6 มล. พร้อมเข็มนิตยา

2.1.3 ชุดทดลองระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจนระดับห้องปฏิบัติการ (bench scale)

2.1.3.1 ปุ่มสูบน้ำเสียแบบรีด ยี่ห้อ Masterflex

2.1.3.2 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Horiba

2.1.3.3 ถังน้ำเสีย ถังหมัก และถังเก็บก๊าซ

- ถังไฮโดรเจนเข้า (H₂ influent tank)

- ถังไฮโดรเจนออก (H₂ effluent tank)

- ถังเก็บก๊าซ (gas bag)

- ถังหมักไฮโดรเจน (H₂ reactor tank)

2.1.3.4 กล่องวัดปริมาณก๊าซ (Gas counter box)

2.1.4 ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์

2.1.4.1 ชุดวิเคราะห์ซีไอดี

2.1.4.2 ชุดวิเคราะห์บีไอดี

2.1.4.3 ชุดวิเคราะห์กรดอินทรีย์ ค่าความเป็นด่าง และไปคาร์บอเนต

2.1.4.4 เครื่องวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟี ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC 2014

2.1.4.5 อุปกรณ์ และเครื่องแก้วที่จำเป็น

2.2 แผนการวิจัย

ปีที่ 1 เป็นการศึกษาคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ และทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

- กลุ่มตัวอย่างจุลินทรีย์มี 3 กลุ่ม คือกลุ่มตัวอย่างอ้างอิง (blank) ที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้น, กลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการต้มที่ 90°C. เป็นเวลา 15 นาที และกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการปรับกรดที่ระดับพีเอช 4-4.3 เป็นเวลา 1 เดือน.

- คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ ด้วยเทคนิคการเทเพลต (pour plate) และการเขี่ยเชื้อ (cross streak).

- จำแนกชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์ ด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) โดยใช้ชุดทดสอบ API 32A.

- ทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ด้วยวิธี biochemical hydrogen potential test (BHP test).

ปีที่ 2 เป็นการศึกษาสภาวะการทำงานที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนระดับห้องปฏิบัติการ, โดยมีขั้นตอนดำเนินงานดังนี้:

- ออกแบบและสร้างชุดทดลองระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับห้องปฏิบัติการ,

- เพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์,

- ศึกษาปริมาณเศษอาหาร และสมบัติน้ำเสียเศษอาหาร โรงอาหาร วว. เทคโนโลยี,

- ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ ระดับพีเอช, อัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์ (F/M), อัตราส่วนกรดบิวทิริกต่อกรดแอสติก และอัตราส่วนกรดโพธิโอไนคต่อกรดแอสติก เป็นต้น,

- ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ระดับพีเอช, ซีไอดี, บีไอดี, กรดอินทรีย์, อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจน และร้อยละก๊าซไฮโดรเจน.

2.3 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการทดลองระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับห้องปฏิบัติการ เป็นน้ำเสียเศษอาหาร โดยเก็บตัวอย่างจากโรงอาหาร วว. เทคโนโลยี คลองห้า ปทุมธานี, มาใช้ในการทดลอง. โดยเตรียมให้มีปริมาณซีโอดีที่ 20 กรัมต่อลิตร เพื่อให้จุลินทรีย์ปรับตัวและสามารถยึดเกาะตัวกลางพลาสติก ให้สามารถเก็บรักษาอยู่ภายในถังหมักได้ เนื่องจากในช่วงเริ่มต้นจะเกิดการฟุ้งของตะกอนในระบบ, ถ้าควบคุมระบบไม่ดี จะทำให้เกิดการสูญเสียตะกอนในระบบได้.

2.4 ตะกอนจุลินทรีย์ที่ใช้

2.4.1 ตะกอนจุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์

เก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ และแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างอ้างอิงที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้น, กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการต้มที่ 90°C. เป็นเวลา 15 นาที และกลุ่มที่ 3 เป็นตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการปรับกรดที่ระดับพีเอช 4-4.3 เป็นเวลา 1 เดือน.

2.4.2 ตะกอนจุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับชุดทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ

ตะกอนจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากการคัดเลือกสายพันธุ์แล้วและมีการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยเลือกสายพันธุ์ที่มีร้อยละก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดมาทดลองระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Clostridium acetobutyricum*.

2.5 การดำเนินงานวิจัย

2.5.1 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ ซึ่งมีหลักการทำงานดังนี้:

2.5.1.1 เตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ โดยการเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างอ้างอิงที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้น, กลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการต้มที่ 90°C. เป็นเวลา 15 นาที และกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการปรับกรดที่ระดับพีเอช 4-4.3 เป็นเวลา 1 เดือน.

2.5.1.2 นำกลุ่มตัวอย่างแต่ละชนิดมาปั่นให้ละเอียด เพื่อทำการเจือจางที่อัตราส่วน 10^{-2} - 10^{-8} , แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมด้วย RCM ผสมกับ agar 1.5% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว, ด้วยเทคนิคการเทเพลต จำนวนการเจือจางละ 3 เพลต. นำไปเก็บในกล่องไม่ใช้อากาศ

(anaerobic jar) ที่บรรจุตัวดูดซับออกซิเจนและตัวบ่งชี้สถานะไม่ใช้อากาศ, แล้วจึงนำไปบ่มที่ตู้อบอุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.

2.5.1.3 คัดแยกชนิดจุลินทรีย์ตามลักษณะภายนอกที่ปรากฏ และนำแต่ละโคโลนีไปเพาะเลี้ยงเชื้อต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM ผสมกับ agar 1.5% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว, ด้วยเทคนิคการเทียบเชื้อจำนวนโคโลนีละ 3 เพลต. นำไปเก็บในกล่องไร้อากาศ ที่บรรจุตัวดูดซับออกซิเจนและตัวบ่งชี้สถานะไม่ใช้อากาศ, แล้วจึงนำไปบ่มที่ตู้อบอุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำโคโลนีแต่ละชนิดไปย้อมแกรม และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อบันทึกลักษณะที่ปรากฏ.

2.5.1.4 ถ้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ในข้อ 2.5.1.3 ยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำซ้ำอีกจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์.

2.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธี BHP test มีหลักการทำงานดังนี้:

2.5.2.1 นำโคโลนีที่ได้จากข้อ 2.5.1 แต่ละชนิดมาเจือลงในขวดวัคซีนที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM ปริมาตร 100 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว.

2.5.2.2 ทำการปล่อยออกซิเจน โดยการเป่าก๊าซไนโตรเจนลงไปในช่วงปริมาตร 120 มล. อย่างช้าๆ.

2.5.2.3 ปิดฝาขวดด้วยจุกยางและฝาอะลูมิเนียม, นำไปบ่มที่ตู้อบอุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.

2.5.2.4 ทำการวัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้น, เก็บก๊าซที่ได้ใส่ในขวดเก็บก๊าซด้วยวิธีการแทนที่น้ำ และนำไปวิเคราะห์ร้อยละก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวิเคราะห์ก๊าซโครมาโทกราฟี (ถ้าปริมาตรก๊าซที่ได้มีน้อยให้นำไปบ่มต่อจนได้เวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาวัดปริมาตรก๊าซ และเก็บก๊าซ).

2.5.2.5 นำโคโลนีที่ผลิตก๊าซได้ไปเก็บรักษาไว้ในรูปของ lyophilize ตัวอย่างละ 5 หลอด

2.5.2.6 คัดเลือกโคโลนีที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดไปจำแนกชนิด และสายพันธุ์จุลินทรีย์ ด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) โดยใช้ชุดทดสอบ API 32A อย่างน้อย 2 ชนิดของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง.

2.5.3 การเพิ่มปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ มีขั้นตอนการดำเนินการ ดังนี้

2.5.3.1 นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ 1 สายพันธุ์ในหลอดสูญญากาศ (lyophilize) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่มีส่วนประกอบต่างๆ ดังตารางที่ 4 ปริมาตร 5 มล. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.

2.5.3.2 นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้มาเติมอาหารในปริมาณเท่าตัว ดังแสดงได้ดังตารางที่ 5 แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง. เมื่อได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปใส่ลงในถังหมัก ขนาด 7 ลิตร ให้สามารถเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ได้จนมีปริมาตร 7 ลิตร.

2.5.3.3 กระตุ้นเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักต่อไป ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในอัตรา 1 ลิตรต่อวัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน.

2.5.3.4 นำสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดมาเหวี่ยงแยกตะกอน เพื่อรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ ให้เข้มข้น โดยให้มีความเข้มข้นประมาณ 100,000 มก./ล.

ตารางที่ 4. ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์

สารเคมี	หน่วย	ปริมาณ
Phosphate buffer	มก./ล.	60
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	ก./ล.	273
K ₂ HPO ₄	ก./ล.	105
Nutrient	มล./ล.	8.4
NH ₄ Cl	ก./ล.	135.44
NaHCO ₃	ก./ล.	212.66
KH ₂ PO ₄	ก./ล.	100
MgSO ₄ ·7H ₂ O	ก./ล.	10
NaCl	ก./ล.	1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	ก./ล.	1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	ก./ล.	1
MnSO ₄ ·H ₂ O	ก./ล.	0.92
FeSO ₄ ·7H ₂ O	ก./ล.	0.61
CoCl ₂ ·6H ₂ O	ก./ล.	0.21
NiCl ₂ ·6H ₂ O	ก./ล.	0.12
ZnCl ₂	ก./ล.	0.06
Sucrose	ก./ล.	20

ตารางที่ 5. ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

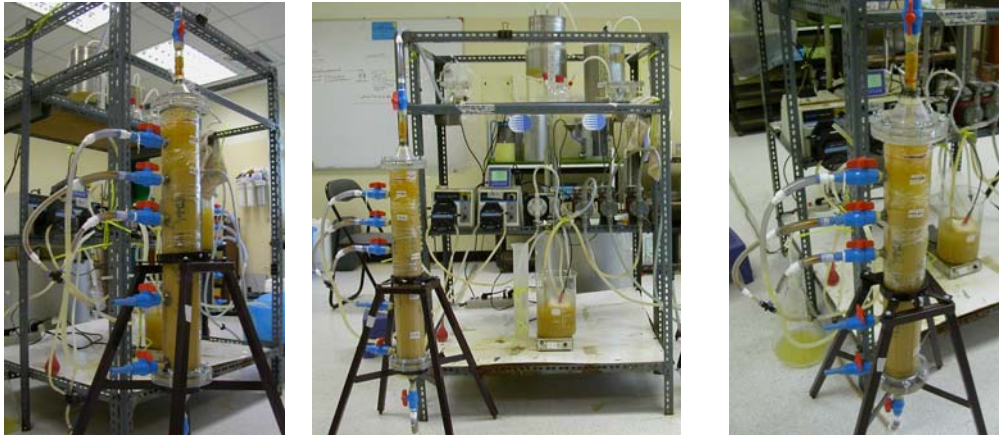
ลำดับที่	หน่วย	ปริมาณหัวเชื้อ	ปริมาณอาหาร	ปริมาณรวม
1	มล.	lyophilize	5	5
2	มล.	5	5	10
3	มล.	10	15	25
4	มล.	25	25	50
5	มล.	50	50	100
6	มล.	100	150	250
7	มล.	250	250	500
8	มล.	500	500	1000
9	มล.	1000	1000	2000
10	มล.	2000	2000	4000
11	มล.	4000	3000	7000

2.5.4 การทดลองระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจนระดับห้องปฏิบัติการ (bench scale) มีหลักการทำงานดังนี้:

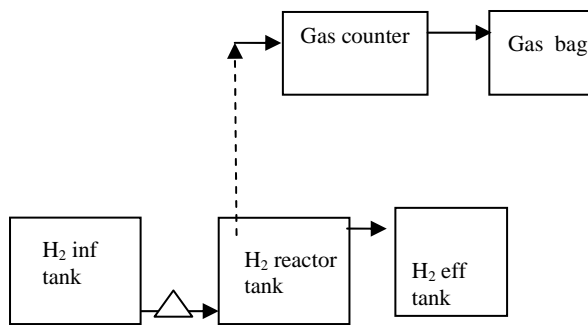
2.5.4.1 ออกแบบและสร้างชุดทดลองต่อเนื่องในระดับห้องปฏิบัติการ ดังแสดงดังรูปที่ 2.

2.5.4.2 นำโคโลนีที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด มาทำการเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ให้มีปริมาตรอย่างน้อย 7 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์.

2.5.4.3 ทดลองระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจนระดับห้องปฏิบัติการ (bench scale) หลักการทำงานของชุดทดลองเป็นไปตามรูปที่ 3 ดังนี้.



รูปที่ 2. ชุดทดลองการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องในระดับห้องปฏิบัติการ.



รูปที่ 3. ผังการทำงานระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจนระดับห้องปฏิบัติการ.



รูปที่ 4. ตัวกลางพลาสติกที่ใช้.

น้ำเสียที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำเสียเศษอาหาร โดยทำการเตรียมน้ำเสียที่ซีโอดีเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตรและปรับพีเอชมากกว่าหรือเท่ากับ 5.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10. นำมาเติมในถังไฮโดรเจนเข้า (H₂ influent tank) ซึ่งจะถูกลบโดยปั๊มไฮโดรเจน (H₂ pump) ไปยังถังหมักไฮโดรเจน (H₂ reactor tank) ทางด้านล่าง, ซึ่งออกแบบเป็นระบบตรึงฟิล์มแบบไหลขึ้น (upflow anaerobic fixed bed, UAFB) โดยใช้ตัวกลางพลาสติกดั่งรูปที่ 4 และควบคุมการสูบน้ำด้วยเครื่องตั้งเวลา ตามอัตราภาระซีโอดีที่กำหนดไว้. น้ำเสียที่ผ่านการหมักจะไหลล้นลงถังไฮโดรเจนออก (H₂ effluent tank), ก๊าซที่เกิดขึ้นจะไหลเข้ากล่องวัดปริมาณก๊าซ (gas counter box) และถุงเก็บก๊าซ (gas bag).

ระบบตรึงฟิล์มแบบไหลขึ้นได้ถูกนำมาใช้ในการทดลองนี้ เนื่องจากตะกอนจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่มีลักษณะเป็นตะกอนเบาแขวนลอยอยู่ในน้ำ ไม่สามารถรวมตัวกันเป็นตะกอนจุลินทรีย์ลักษณะเม็ด เช่นเดียวกับตะกอนจุลินทรีย์ในระบบยูเอเอสบี ทำให้ตะกอนจุลินทรีย์ไหลหลุดออกนอกระบบได้ง่ายหากใช้ระบบยูเอเอสบีในการทดลอง. ดังนั้น จึงได้ออกแบบระบบเป็นระบบตรึงฟิล์มแบบไหลขึ้น โดยมีการใส่ตัวกลางพลาสติกรูปทรงตะกร้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม. สูง 4 ซม. ดั่งรูปที่ 4 ไว้ในถังหมักจำนวน 15 ชิ้น, นำตะกอนจุลินทรีย์บริสุทธิ์เข้มข้นที่เตรียมได้ใส่เข้าไปในถังหมัก. โดยในช่วงเริ่มต้นจะกระตุ้นเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารอาหารสังเคราะห์ก่อน เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถเกาะตัวอยู่ในตัวกลางพลาสติกได้ ซึ่งใช้สารอาหารสังเคราะห์ในอัตรา 1 ลิตรต่อวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อน จึงเริ่มดำเนินการทดลองโดยป้อนน้ำเสียเศษอาหารที่อัตราภาระรับซีโอดีเริ่มต้นที่ 20 กรัมต่อลิตรต่อวันในอัตรา 2 ลิตรต่อวัน.

ก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นจะวิเคราะห์ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ก๊าซโครมาโทกราฟี. สำหรับน้ำเสียจะเก็บตัวอย่าง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น พีเอช, ซีโอดี, บีโอดี, กรดอินทรีย์ระเหยง่าย, กรดแอสซิติค, กรดโพรไพโอนิก และกรดบิวทิริก เป็นต้น.

2.6 แผนวิเคราะห์น้ำเสีย

ในการทดลองของแต่ละวัน มีการเก็บน้ำเสียเข้าและออกจากถังหมัก, เพื่อวิเคราะห์หาคุณภาพของน้ำเสียตามวิธีการของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995) ในซึ่งแสดงได้ดังตารางที่ 6.

ตารางที่ 6. ขั้นตอนการวิเคราะห์พารามิเตอร์ของการทดลอง

รายการ	ถังหมักไฮโดรเจน		วิธีวิเคราะห์
	น้ำเสียเข้า	น้ำเสียออก	
pH	ทุกวัน	ทุกวัน	pH meter
COD	ทุกวัน	ทุกวัน	Close reflux and spectroscopy
BOD	ทุกวัน	ทุกวัน	Incubation and titration
VFA	ทุกวัน	ทุกวัน	Anderson method
Acetic acid	ทุกวัน	ทุกวัน	GC-FID
Propionic acid	ทุกวัน	ทุกวัน	GC-FID
Butyric acid	ทุกวัน	ทุกวัน	GC-FID
H ₂ , N ₂ , CH ₄ , CO ₂	ทุกวัน	ทุกวัน	GC-TCD

2.7 การวิเคราะห์ผลการศึกษา

2.7.1 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

- ความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชกับประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.
- ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาเก็บกักกับประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.

2.7.2 ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของระบบต่อเนื่องในระดับห้องปฏิบัติการ

โดยการวิเคราะห์หาประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี, บีโอดี, อัตราการเกิดก๊าซในหน่วยลิตรต่อกรัมซีโอดีที่ถูกกำจัด, อัตราส่วนกรดบิวทริกต่อกรดแอสติก, อัตราส่วนกรดโพรไพโอนิกต่อกรดแอสติก และอัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์.

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การทดลองการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน จากน้ำเสียเศษอาหาร ได้แบ่งงานออกเป็น 2 ส่วน คือ การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด และการทดลองระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ระบบตรึงฟิล์มแบบไหลขึ้น. เริ่มดำเนินการตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2551 จนถึง 31 พฤษภาคม 2553 โดยมีขั้นตอนการทำงาน, ดังต่อไปนี้.

3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์.

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธี BHP test.

3.3 การจำแนกชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์.

3.4 การสำรวจสมบัติน้ำเสียเศษอาหารที่โรงอาหาร วว. เทคโนโลยี คลองห้า ปทุมธานี.

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

- ความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชกับประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.
- ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาเก็บกักกับประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.

3.6 การศึกษาประสิทธิภาพของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของระบบต่อเนื่องในระดับห้องปฏิบัติการ.

3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์

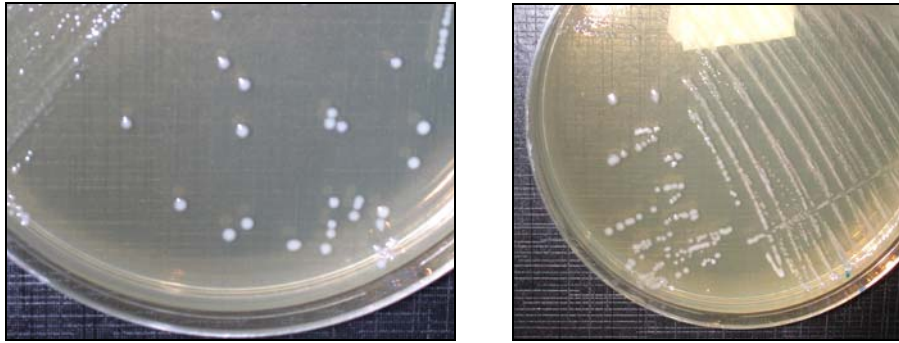
3.1.1 กลุ่มตัวอย่างอ้างอิง (blank) ที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้น

จากการทดลอง พบว่า สามารถคัดแยกชนิดจุลินทรีย์ตามลักษณะภายนอกที่ปรากฏได้ 17 โคโลนี จึงนำแต่ละโคโลนีไปเพาะเลี้ยงเชื้อต่อ เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และนำโคโลนีแต่ละชนิดไปย้อมแกรม และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อบันทึกลักษณะที่ปรากฏ. ผลการทดลอง แสดงได้ดังตารางที่ 7.

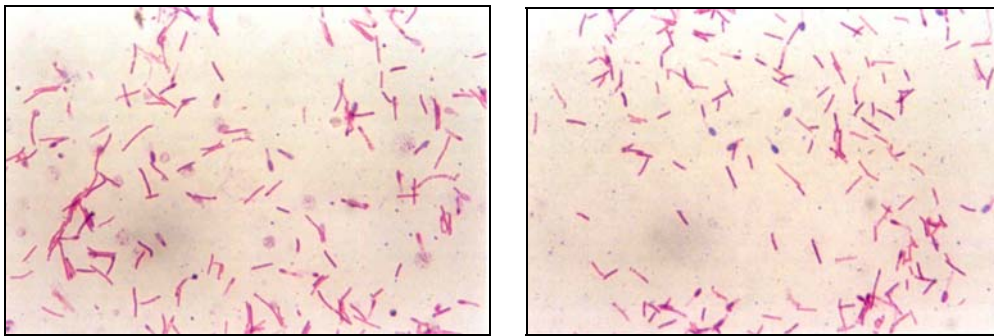
ตารางที่ 7. ลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏในกลุ่มตัวอย่างอ้างอิงที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้น

รหัส ตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	ลักษณะการย้อมแกรม
B-1	กลมแบนใส ขอบหัก ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก	ท่อนติดสีน้ำเงิน
B-2	กลมแบนสีครีม ขอบหัก ผิวเรียบ มันวาว ขนาดกลาง	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน มีสปอร์
B-3	กลมสีขาวยุ่น ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก	ท่อนยาวติดสีน้ำเงิน
B-4	กลมแบนสีครีม ขอบบางหักมาก ผิวเรียบ มันวาว	ท่อนสั้นสีน้ำเงิน มีสปอร์ที่ปลายเซลล์
B-5	กลมนูน สีขาวยุ่น นูนตรงกลาง ขอบหัก ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน
B-6	กลมนูน สีขาวยุ่น ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก	กลมติดสีน้ำเงิน
B-7	กลมนูน ใส ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็กมาก ขึ้นเป็น กลุ่มๆ กระจายทั่วจานเพาะเลี้ยง	ท่อนติดสีน้ำเงิน
B-8	กลมนูน สีขาวยุ่น นูนตรงกลาง ขอบหัก ผิวขรุขระ ขนาดใหญ่	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน มีสปอร์ขนาดใหญ่
B-9	กลมนูน สีขาว ขอบเรียบ ผิวขรุขระ มีจุดปุ่มตรงกลาง ขนาดเล็ก	ท่อนติดสีน้ำเงิน
B-10	กลมแบน สีครีม ขอบหัก ผิวเรียบ	ท่อนติดสีน้ำเงิน
B-11	กลมแบน สีครีม ขอบหัก ผิวเรียบ มันวาว ขนาดใหญ่	ท่อนยาวติดสีน้ำเงิน
B-12	กลมแบน สีครีม ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดใหญ่	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงินมีสปอร์ที่ปลายเซลล์
B-13	กลมนูน สีขาวยุ่น ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก	ท่อนติดสีน้ำเงิน
B-14	กลมแบน สีครีม นูนตรงกลาง ขอบหัก ผิวไม่เรียบ มันวาว	ท่อนขนาดใหญ่ ติดสีน้ำเงิน
B-15	กลมนูน สีขาวยุ่น ขอบเรียบ ผิวเรียบ ขนาดเล็ก	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน
B-16	กลมนูน สีครีม ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดใหญ่	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน มีสปอร์ที่ปลายเซลล์
B-17	กลมนูน ใส ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็กมาก ขึ้นเป็น กลุ่มๆ	ท่อนติดสีน้ำเงิน

จากตารางที่ 7 เห็นได้ว่า ลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏมีลักษณะกลม แบนหรือนูน, มีสีขาวยุ่นหรือสีครีม, ผิวเรียบหรือขรุขระ และมีขนาดเล็ก กลาง ใหญ่, ขอบหักหรือเรียบ, เมื่อนำไปย้อมแกรม และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้วพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ติดสีน้ำเงิน มีลักษณะเป็นท่อนสั้น และบางตัวอย่างมีสปอร์เกิดขึ้นด้วย, ดังรูปที่ 5-6.



รูปที่ 5. ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏของกลุ่มตัวอย่างอ้างอิงที่ไม่ผ่านการบำบัด.



รูปที่ 6. ลักษณะการย้อมแกรมของกลุ่มตัวอย่างอ้างอิงที่ไม่ผ่านการบำบัด (กำลังขยาย 100 เท่า).

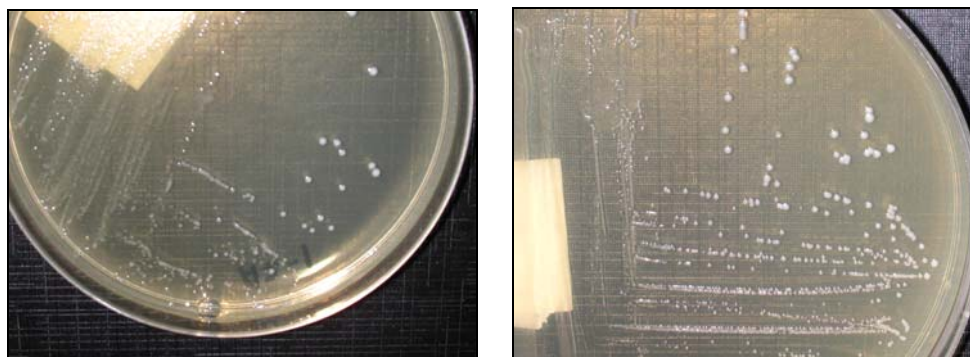
3.1.2 กลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการต้มที่ 90°ซ เป็นเวลา 30 นาที

โดยใช้ตัวอย่างชนิดเดียวกับกลุ่มตัวอย่างอ้างอิงที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้น. จากการดำเนินการทดลองพบว่า สามารถคัดแยกชนิดจุลินทรีย์ตามลักษณะภายนอกที่ปรากฏได้ 12 โคโลนี จึงนำแต่ละโคโลนีไปเพาะเลี้ยงเชื้อต่อ เพื่อใช้ได้เชื้อบริสุทธิ์. แล้วจึงนำโคโลนีแต่ละชนิดไปย้อมแกรม และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อบันทึกลักษณะที่ปรากฏ, ผลการทดลองแสดงได้ดังตารางที่ 8.

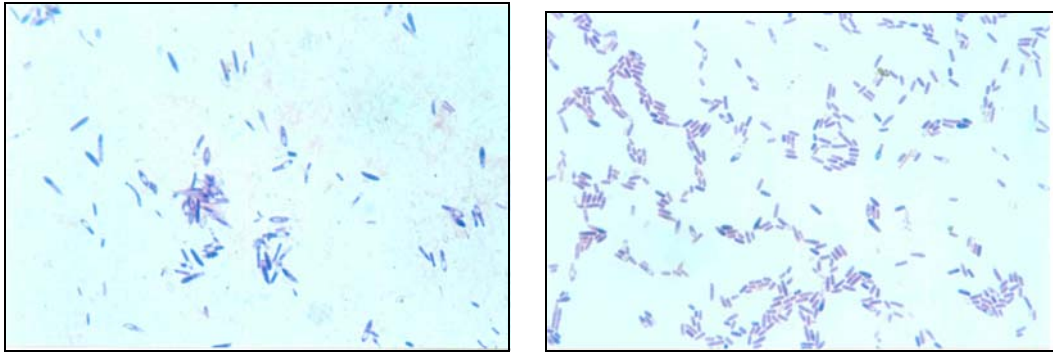
ตารางที่ 8. ลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏในกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการต้ม (boil)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	ลักษณะการย้อมแกรม
Boil-1	กลมมนูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน
Boil-2	กลมแบน สีครีม ขอบหยัก ผิวมันวาวเยิ้ม ขนาดกลาง	ท่อนสั้นหนาติดสีน้ำเงิน
Boil -3	กลมแบน สีขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ ผิวขรุขระ ไม่มันวาว ขนาดเล็ก	ท่อนสั้นหนาติดสีน้ำเงิน
Boil -4	กลมมนูน สีขาวขุ่น นูนตรงกลาง ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก	ท่อนสั้นผอมบางติดสีน้ำเงิน
Boil -5	กลมแบน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก	ท่อนติดสีน้ำเงิน
Boil -6	กลมแบน นูนตรงกลาง สีครีม ขอบบางหยัก ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน
Boil -7	กลมมนูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน
Boil -8	กลมมนูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็กมาก	ท่อนสั้นหนาติดสีน้ำเงิน
Boil -9	กลมมนูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน
Boil -10	กลมแบน สีขาวขุ่น นูนตรงกลาง ขอบบางหยัก ผิวเรียบ ขนาดกลาง	ท่อนบางติดสีน้ำเงิน มีสปอร์
Boil -11	กลมมนูน สีครีม ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดใหญ่	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน มีสปอร์
Boil -12	กลมมนูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก	ท่อนติดสีน้ำเงิน

จากตารางที่ 8 เห็นได้ว่า ลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏมีลักษณะคล้ายคลึงกับกลุ่มตัวอย่างอ้างอิงที่ไม่ผ่านการบำบัด คือ ลักษณะของโคโลนีกลม แบน หรือนูน, มีสีขาวขุ่น หรือสีครีม, ผิวเรียบหรือขรุขระ, และมีขนาดเล็ก กลาง ใหญ่, ขอบหยักหรือเรียบ. เมื่อนำไปย้อมแกรม และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้วพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ติดสีน้ำเงิน, มีลักษณะเป็นท่อนสั้น และบางตัวอย่างมีสปอร์เกิดขึ้นด้วย, ดังรูปที่ 7-8.



รูปที่ 7. ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏของกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้น ด้วยวิธีการต้ม.



รูปที่ 8. ลักษณะการย้อมแกรมของกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้น ด้วยวิธีการต้ม.
(กำลังขยาย 100 เท่า)

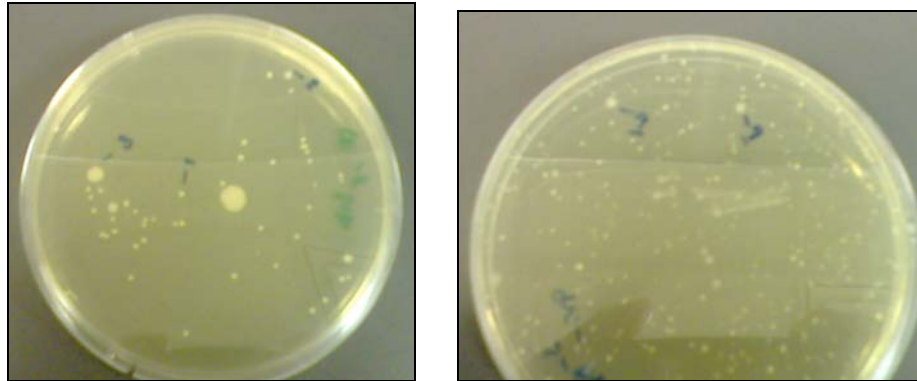
3.1.3 กลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการปรับกรด

ที่ระดับพีเอช 4-4.3 เป็นเวลา 1 เดือน, พบว่า สามารถแยกคัดแยกชนิดจุลินทรีย์ตามลักษณะภายนอกที่ปรากฏได้ 3 โคลินิ จึงนำแต่ละโคลินิไปเพาะเลี้ยงเชื้อต่อ เพื่อใช้ได้เชื้อบริสุทธิ์. แล้วจึงนำโคลินิแต่ละชนิดไปย้อมแกรม และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อบันทึกลักษณะที่ปรากฏ, ผลการทดลองแสดงได้ดังตารางที่ 9.

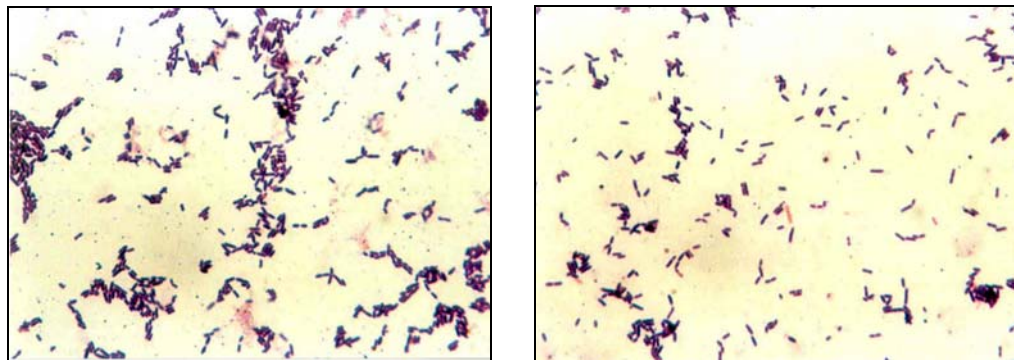
ตารางที่ 9. ลักษณะของโคลินิที่ปรากฏในกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการปรับกรด

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคลินิที่ปรากฏ	ลักษณะการย้อมแกรม
pH-1	กลม แบนสีขาวย ขอบหยัก ผิวขรุขระ	-
pH-2	กลม นูนสีขาวยใส ขอบเรียบ ผิวเรียบ	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน
pH-3	กลม นูนสีขาวย ขอบเรียบ ผิวเรียบ	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน

จากตารางที่ 9 พบว่ามีเพียง 3 โคลินิที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM โดยลักษณะของโคลินิที่ปรากฏมีลักษณะกลม แบน หรือนูน, มีสีขาวย, ขอบหยักหรือเรียบ, ผิวเรียบหรือขรุขระ, เมื่อนำไปย้อมแกรม และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้วพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ติดสีน้ำเงิน มีลักษณะเป็นท่อนสั้น, ดังรูปที่ 9-10.



รูปที่ 9. ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏของกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้น ด้วยวิธีการปรับ pH.



รูปที่ 10. ลักษณะการย้อมแกรมของกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้น ด้วยวิธีการปรับ pH (กำลังขยาย 100 เท่า).

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธี BHP test

3.2.1 กลุ่มตัวอย่างอ้างอิงที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้น

จากตารางที่ 10 พบว่า กลุ่มตัวอย่างอ้างอิงที่ไม่ผ่านการบำบัด มี 14 โคโลนีที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้. โดยมี 6 โคโลนีที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าร้อยละ 60 และได้เลือก 3 โคโลนีได้แก่ B-8, B-11 และ B-16 ที่มีลักษณะแตกต่างกันไปทำการจำแนกชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์. พบว่า B-16 มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากที่สุด. เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ในหลอดสูญญากาศ (lyophilize), ดังรูปที่ 11.



รูปที่ 11. เชื้อจุลินทรีย์บริสซูทรีที่เก็บไว้ในหลอดสุญญากาศ (lyophilize).

ตารางที่ 10. ร้อยละก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากกลุ่มตัวอย่างอ้างอิงที่ไม่ผ่านการบำบัด

ตัวอย่าง	ปริมาณก๊าซทั้งหมด (มล.)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	%H ₂
B-1	16.5	22.49	0.00	9.14	68.37
B-2	7	35.44	0.00	42.97	21.59
B-3	0	-	-	-	-
B-4	13.5	60.95	0.00	14.27	24.78
B-5	12.67	63.36	0.00	10.82	25.82
B-6	0	-	-	-	-
B-7	10	55.38	0.00	13.43	31.19
B-8	56	20.33	0.00	11.84	67.84
B-9	3	0.00	0.00	89.86	10.14
B-10	51	17.84	0.00	6.99	75.17
B-11	58.5	25.06	0.00	7.28	67.66
B-12	41	40.19	0.00	12.39	47.42
B-13	0	-	-	-	-
B-14	80.33	16.18	0.00	8.34	75.48
B-15	15	63.68	0.00	15.04	21.28
B-16	152	15.13	0.00	12.26	72.61
B-17	8	60.77	0.00	10.57	28.67

หมายเหตุ : ตัวหนา แสดงถึงตัวอย่างที่เลือกไปจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์

3.2.2 กลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการต้ม

จากตารางที่ 11 พบว่า กลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการต้ม มี 6 โคโลนีที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยมี 4 โคโลนีที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าร้อยละ 60 และได้เลือก 2 โคโลนีได้แก่ Boil-2 และ Boil-11 ที่มีลักษณะแตกต่างกันไปทำการจำแนกชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์. พบว่า Boil-11 มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากที่สุด เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้รูปของ lyophilize เช่นเดียวกัน.

ตารางที่ 11. ร้อยละก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการต้ม

ตัวอย่าง	ปริมาณก๊าซทั้งหมด (มล.)	%N ₂	%CH ₄	%CO ₂	%H ₂
Boil-1	0	-	-	-	-
Boil-2	138.5	8.71	0.00	19.63	71.67
Boil -3	0	-	-	-	-
Boil -4	3	0.00	0.03	74.03	25.93
Boil -5	0	-	-	-	-
Boil -6	35.5	19.26	0.00	16.81	63.93
Boil -7	0	-	-	-	-
Boil -8	0	-	-	-	-
Boil -9	5	0.00	0.00	63.84	36.16
Boil -10	125	9.44	0.00	11.51	79.05
Boil -11	124.5	9.70	0.00	10.11	80.19
Boil -12	0	-	-	-	-

หมายเหตุ : ตัวหนา แสดงถึงตัวอย่างที่เลือกไปจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์

3.2.3 กลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการปรับกรด

เมื่อทำการทดสอบการเกิดก๊าซไฮโดรเจนกับกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการปรับกรด พบว่า ทั้ง 3 ตัวอย่างไม่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้.

3.3 การจำแนกชนิด และสายพันธุ์จุลินทรีย์

จากการทดลองดังกล่าวข้างต้น ได้เลือกตัวอย่างรหัสหมายเลข B-8, B-11, B-16, Boil-2 และ Boil-11 มาทำการตรวจสอบเพื่อจำแนกชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์ ด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) โดยใช้ชุดทดสอบ API 32A ดังรูปที่ 12. ผลการจำแนกชนิด และสายพันธุ์จุลินทรีย์ แสดงได้ดังตารางที่ 12.



รูปที่ 12. ผลการทดสอบจำแนกชนิด และสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยชุดทดสอบ API 32A.

ตารางที่ 12. การจำแนกชนิด และสายพันธุ์จุลินทรีย์

ตัวอย่าง	ชนิดสายพันธุ์ จุลินทรีย์	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	ลักษณะการย้อมแกรม	Vol gas (ml)	%H ₂
B8	<i>Clostridium perfringens</i>	กลมมนูน สีขาวขุ่น นูนตรงกลาง ขอบหยัก ผิวขรุขระ ขนาดใหญ่	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน มีสปอร์ขนาดใหญ่	56	67.84%
B11	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	กลมแบน สีครีม ขอบหยัก ผิวเรียบ มันวาว ขนาดใหญ่	ท่อนยาวติดสีน้ำเงิน	58.5	67.66%
B16	<i>Clostridium acetobutyricum</i>	กลมมนูน สีครีม ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดใหญ่	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน มีสปอร์ที่ปลายเซลล์	152	72.61%
Boil 2	<i>Clostridium botulinum</i>	กลมแบน สีครีม ขอบหยัก ผิวมัน วาวเยิ้ม ขนาดกลาง	ท่อนสั้นหนาติด สีน้ำเงิน	138.5	71.67%
Boil 11	<i>Clostridium acetobutyricum</i>	กลมมนูน สีครีม ขอบเรียบ ผิวเรียบ มันวาว ขนาดใหญ่	ท่อนสั้นติดสีน้ำเงิน มีสปอร์	124.5	80.19%

หมายเหตุ : ตัวหนา แสดงถึงสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการทดลองระบบต่อเนื่อง

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธี BHP test พบว่า ตัวอย่าง B-16 และ Boil 11 คือ *Clostridium acetobutyricum* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด, จึงเลือกสายพันธุ์ชนิดนี้มาทำการทดลองในระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับห้องปฏิบัติการอย่างต่อเนื่อง.

ในช่วงเริ่มต้นทดลองระบบต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการ ได้มีการเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์สายพันธุ์ *Clostridium acetobutyricum* ซึ่งได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ MLSS 92,216 มก./ล. และ MLVSS 73,773 มก./ล. ในปริมาตร 0.5 ลิตร.

3.4 การสำรวจสมบัติน้ำเสียเศษอาหารที่โรงอาหาร วว. เทคโนโลยีคลองห้า

จากการสำรวจสมบัติน้ำเสียเศษอาหารที่โรงอาหาร วว. เทคโนโลยี คลองห้า ซึ่งมีร้านค้าที่จำหน่ายอาหารข้าว จำนวน 2 ร้าน, ก๋วยเตี๋ยว จำนวน 2 ร้าน, ขนมหวานและน้ำดื่ม จำนวน 1 ร้าน, พบว่า ปริมาณน้ำเสียเศษอาหารที่เกิดขึ้นโดยเฉลี่ยในแต่ละวันประมาณ 8-10 ลิตร ขึ้นกับจำนวนร้านค้าที่เปิดจำหน่ายในแต่ละวัน. สำหรับค่าความสกปรกหรือค่าซีไอดีและบีไอดีของน้ำเสียเศษอาหารแสดงได้ดังตารางที่ 13, ซึ่งมีค่าเฉลี่ยซีไอดีและบีไอดีอยู่ที่ 68,544 มก./ล และ 22,848 มก./ล., ตามลำดับ. จากการทดลองที่ผ่านมาของนาถพินิจและคณะ (2552) พบว่า สมบัติของน้ำเสียเศษอาหารที่โรงอาหาร วว. บางเขน มีค่าความสกปรกค่อนข้างสูงมากกว่า โดยเฉพาะซีไอดีและบีไอดี โดยมีค่าเฉลี่ยที่ 111,551 มก./ล. และ 55,776 มก./ล., ตามลำดับ

ตารางที่ 13. สมบัติของน้ำเสียจากโรงอาหาร วว. เทคโนโลยีคลองห้า

พารามิเตอร์	หน่วย	ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย
ซีไอดี	มิลลิกรัมต่อลิตร	36,556-97,866	68,544
บีไอดี	มิลลิกรัมต่อลิตร	12,185-32,622	22,848

จากตารางที่ 13 จะเห็นได้ว่า สมบัติของน้ำเสียเศษอาหารที่ วว. เทคโนโลยี คลองห้า มีค่าค่อนข้างต่ำมาก ซึ่งต่างจากน้ำเสียเศษอาหารที่โรงอาหาร วว. บางเขน. ดังนั้นจึงทำการทดลองในช่วงของน้ำเสียที่มีความเข้มข้นต่ำๆ เพื่อหาความเป็นไปได้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียที่มีความเข้มข้นต่ำ. ในช่วงเริ่มต้น เตรียมน้ำเสียให้มีซีไอดีประมาณ 20,000 มก./ล. สำหรับป้อนเข้าสู่กระบวนการหมักก๊าซไฮโดรเจน โดยกระตุ้นให้เชื้อจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์คุ้นเคยกับน้ำเสีย

ประเภทนี้ก่อน และกำหนดระยะเวลาเก็บกักน้ำเสียในช่วงเริ่มต้นที่ 1 วัน แล้วจึงเพิ่มความเข้มข้นน้ำเสียให้มากขึ้น.

3.5 การศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ในการผลิตก๊าซ

ในกระบวนการหมักก๊าซไฮโดรเจน ถือว่ากระบวนการนี้เป็นการย่อยสลายเบื้องต้น ซึ่งสารอินทรีย์ส่วนใหญ่จะกลายเป็นกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแอสติก, กรดโพรไพโอนิก และกรดบิวทริก เป็นส่วนใหญ่, ซึ่งในกระบวนการนี้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้. ระดับพีเอชที่ได้หลังจากผลิตก๊าซไฮโดรเจนแล้วจะมีค่าต่ำในช่วง 4.3-4.5 (นาถพินิจและคณะ 2552; Fang and Liu 2002; Ginkel *et al.* 2001)

จากการทดลองของนาถพินิจและคณะ (2552) พบว่า สภาพะการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ผสม (mix culture) ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้น ไม่สามารถปรับระดับพีเอชของน้ำเสียเริ่มต้นที่พีเอชกลางได้ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ผสมมีเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างก๊าซมีเทนรวมอยู่ด้วย. ถ้าระดับพีเอชเริ่มต้นมีค่าใกล้เคียงที่เป็นกลางหรือระดับพีเอชมากกว่าหรือเท่ากับ 7 อาจจะส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มสร้างก๊าซมีเทนสามารถเปลี่ยนกรดอินทรีย์ที่เชื้อกลุ่มสร้างก๊าซไฮโดรเจนผลิตขึ้นมาไปผลิตเป็นก๊าซมีเทนได้ หรือมีแนวโน้มการใช้ก๊าซไฮโดรเจนไปผลิตกรดโพรไพโอนิกเพิ่มขึ้น และทำให้ตรวจพบก๊าซมีเทนได้. ดังนั้น ระดับพีเอชของน้ำเสียเริ่มต้น จึงเป็นข้อจำกัดในการใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน. โดยจากการทดลองที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสม ได้มีการควบคุมระดับพีเอชของน้ำเสียเริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 5-5.5 เพื่อให้ผ่านการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแล้วอยู่ในช่วง 4.3-4.5, ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีค่าในช่วง 0.11-0.12 ลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดีที่ถูกกำจัด.

ดังนั้น ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Clostridium acetobutyricum* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด ซึ่งระดับพีเอชของน้ำเสียเริ่มต้นน่าจะสามารถปรับให้มีค่าใกล้เคียงสถานะที่เป็นกลางหรือที่ 7 ได้ เพื่อให้สามารถเกิดกรดอินทรีย์ได้มากที่สุด โดยที่ระดับพีเอชมีช่วงกว้างมากขึ้นในการลดจาก 7 มาเป็นในช่วง 4.3-4.5. เนื่องจากการทดลองที่ผ่านมาของนาถพินิจและคณะ (2552) พบว่า อัตราส่วนกรดอินทรีย์ออกและเข้าอย่างน้อย 1.78 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ. อัตราส่วนระหว่างกรดอินทรีย์ออกและเข้ามีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งปริมาณกรดอินทรีย์ที่

ได้หลังจากการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาณมาก แสดงว่า ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จะมีปริมาณสูงมากขึ้นด้วยและส่งผลให้ระดับพีเอชลดต่ำลง.

การทดลองนี้ จึงศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับพีเอชของน้ำเสียเริ่มต้นกับระยะเวลาเก็บกัก และระยะเวลาเก็บกักกับประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เพื่อนำไปใช้ในการทดลองการผลิตก๊าซไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องในระดับห้องปฏิบัติการ.

3.5.1 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับพีเอชของน้ำเสียเริ่มต้นและประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

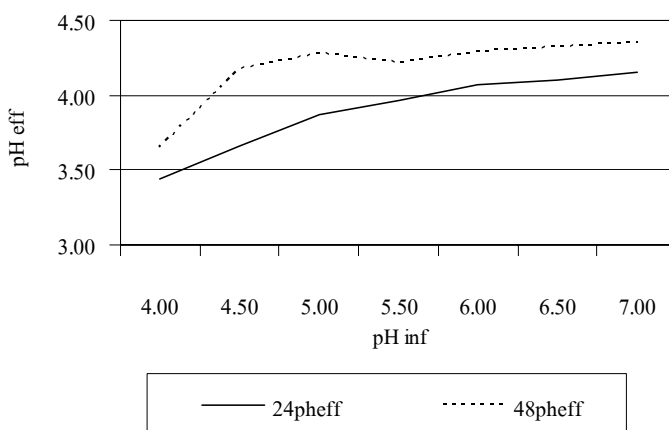
การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับพีเอชของน้ำเสียเริ่มต้นและประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้ทำการทดลองโดยใช้วิธีการเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธี BHP test ที่ระยะเวลาเก็บกัก 24 และ 48 ชั่วโมง. ผลการทดลองดังตารางที่ 14-15 และรูปที่ 13.

ตารางที่ 14. ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากระดับพีเอชต่างๆ ที่ระยะเวลาเก็บกัก 24 ชั่วโมง

pH _{inf}	pH _{eff}	Vol total gas (ml.)	%H ₂	Vol H ₂ /d (ml.)
blank	6.12	3.00	19.24	0.58
4.00	3.44	25.00	51.23	12.81
4.50	3.67	35.00	61.78	21.62
5.00	3.88	42.50	65.57	27.81
5.50	3.97	53.00	67.80	35.93
6.00	4.08	66.00	69.25	45.70
6.50	4.10	71.50	72.72	51.95
7.00	4.16	75.50	67.43	50.85

ตารางที่ 15. ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากระดับพีเอชต่างๆ ที่ระยะเวลาเก็บกัก 48 ชั่วโมง

pH _{inf}	pH _{eff}	Vol total gas (ml.)	%H ₂	Vol H ₂ (ml.)	Vol H ₂ /d (ml.)
blank	6.15	3.00	20.21	0.61	0.30
4.00	3.66	86.00	68.59	58.99	29.49
4.50	4.17	127.00	63.75	80.96	40.48
5.00	4.22	131.00	73.07	95.72	47.86
5.50	4.30	140.50	75.42	105.97	52.98
6.00	4.28	147.50	72.96	107.62	53.81
6.50	4.32	146.50	79.20	116.02	58.01
7.00	4.35	154.00	74.79	115.18	57.59



รูปที่ 13. ระดับพีเอชหลังการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.

จากตารางที่ 14-15 และ รูปที่ 13 พบว่า ระดับพีเอชหลังการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ระยะเวลาเก็บกักที่ 24 และ 48 ชั่วโมงของทุกระดับพีเอชก่อนผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ 4 ถึง 7, จะได้ระดับพีเอชหลังการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่ำกว่า 4.5 โดยอยู่ในช่วง 3.44-4.35. นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระยะเวลาเก็บกัก 48 ชั่วโมง, ที่ระดับพีเอชตั้งแต่ 5.0-7.0 สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากระดับพีเอชหลังการผลิตก๊าซไฮโดรเจนใกล้เคียง 4.3, โดยเฉพาะที่ระดับพีเอช 7 เนื่องจากมีช่วงกว้างของระดับพีเอชที่สามารถลดให้ลงมาอยู่ที่ 4.3 ได้มากกว่าที่ระดับพีเอชอื่นๆ. นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่า ที่ระยะเวลาเก็บกัก 24 ชั่วโมง ทุกระดับพีเอชก่อนผลิตก๊าซ

ไฮโดรเจนมีระดับพีเอชหลังการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่ำกว่า 4.30 และมีค่าต่ำกว่าที่ระยะเวลาเก็บกัก 48 ชั่วโมง ทุกระดับพีเอชเดียวกัน. ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่ำกว่า เนื่องจากที่ระยะเวลาเก็บกัก 48 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการเกิดก๊าซไฮโดรเจนสูงกว่า เนื่องจากการเกิดก๊าซไฮโดรเจนจะมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดร่วมอยู่ด้วย. ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สามารถละลายน้ำและมีผลทำให้ระดับพีเอชสูงขึ้น ซึ่งใน 24 ชั่วโมงแรกมีการเกิดก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้น้อย จึงทำให้ระดับพีเอชหลังการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ระยะเวลาเก็บกัก 48 ชั่วโมงสูงกว่า. นอกจากนี้ การควบคุมระดับพีเอชหลังการผลิตก๊าซไฮโดรเจนให้อยู่ในช่วง 4.3-4.5 จะทำให้มีประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูง ดังการทดลองที่ผ่านมาของนาถพิณี และคณะ (2552).

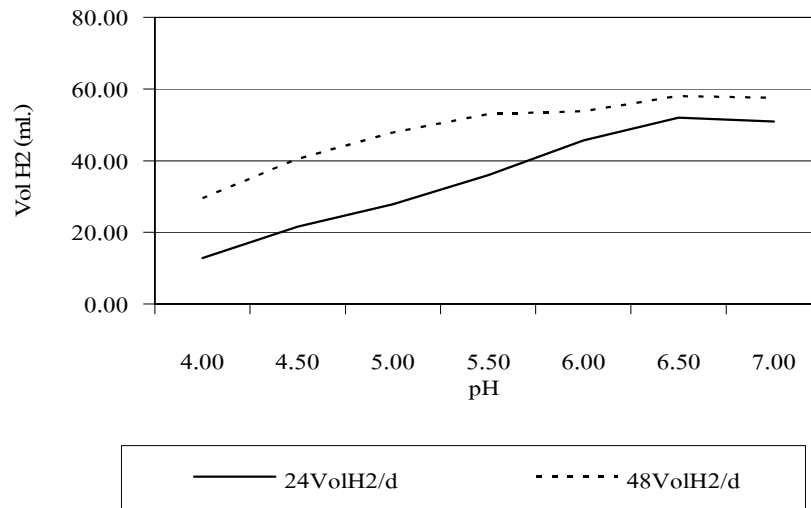
3.5.2 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาเก็บกักกับประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

จากตารางที่ 14-15 และรูปที่ 14-15 พบว่า ที่ระยะเวลาเก็บกัก 48 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงกว่าที่ระยะเวลาเก็บกักที่ 24 ชั่วโมง, โดยมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นและร้อยละก๊าซไฮโดรเจนที่สูงกว่าทุกระดับพีเอชก่อนผลิตก๊าซไฮโดรเจน. ทั้งนี้เนื่องจากระดับพีเอชหลังการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ได้ทุกระดับพีเอชที่ระยะเวลาเก็บกัก 48 ชั่วโมงมีค่าสูงกว่า 24 ชั่วโมง ทำให้จุลินทรีย์สามารถทำงานได้ดีกว่า, ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากการทดลองของ Fang and Liu (2002) และ Ginkel *et al.* (2001) ที่พบว่า จุลินทรีย์ในกลุ่มสร้างกรดนี้สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด หรือที่พีเอช 4.5-5.5.

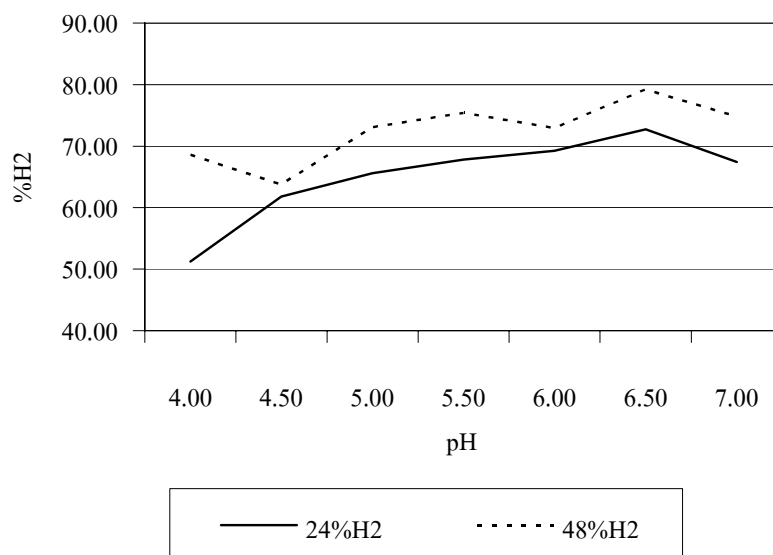
เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการทดลองแบบรุ่นผลิต คือ มีการเติมน้ำเสียในครั้งเดียวและทำการทดลองที่ระยะเวลาเก็บกัก 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง โดยแยกชุดการทดลองกัน, ซึ่งจุลินทรีย์จะทำงานได้ดีในช่วง 24-48 ชั่วโมงในการผลิตกรดอินทรีย์ โดยเปลี่ยนสารที่มีโมเลกุลใหญ่ไปเป็นกรดอินทรีย์. ดังนั้น ในปริมาณอาหารที่เท่ากันเมื่อมีระยะเวลาเก็บกักยาวนานขึ้น จุลินทรีย์สามารถนำอาหารที่มีมาผลิตกรดอินทรีย์และก๊าซไฮโดรเจนได้มากขึ้น. จากการทดลอง จะเห็นได้ว่า อัตราการเกิดก๊าซเฉลี่ยต่อวันที่ระยะเวลาเก็บกัก 48 ชั่วโมง มีค่าสูงกว่าที่ระยะเวลาเก็บกัก 24 ชั่วโมง. แสดงว่า อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมงมีค่ามาก ซึ่งสอดคล้องกับช่วงระยะเวลาในการการกระตุ้นเชื้อกลุ่ม *Clostridium spp.* ในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมง.

จากการทดลองที่ผ่านมาของนาถพิณีและคณะ (2552) พบว่า ในการทดลองระบบต่อเนื่องในระดับห้องปฏิบัติการที่ระยะเวลา 1 วัน มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากกว่า 2 และ

3 วัน, ตามลำดับ. ทั้งนี้เนื่องจากว่าที่ระยะเวลาเก็บกัก 1 วัน ระบบสามารถรักษาระดับพีเอชหลังการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในช่วง 4.3-4.5 ได้คงที่ยาวนานมากกว่าที่ระยะเวลาเก็บกักมากกว่า 1 วัน. ดังนั้น ในการทดลองระบบต่อเนื่องในระดับห้องปฏิบัติการจะใช้ระยะเวลาเก็บกักที่ 1 วันในการเดินระบบ.



รูปที่ 14. ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของแต่ละระดับพีเอชใน 24 และ 48 ชั่วโมง.



รูปที่ 15. ร้อยละไฮโดรเจนของแต่ละระดับพีเอชใน 24 และ 48 ชั่วโมง.

3.6 ประสิทธิภาพของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของระบบต่อเนื่อง ในระดับห้องปฏิบัติการ

น้ำเสียเศษอาหารที่ใช้ในการทดลอง มีปริมาณซีโอดีในแต่ละวันแตกต่างกันมาก ดังแสดงในตารางที่ 13. จะเห็นได้ว่า มีค่าต่ำสุดและสูงสุด เป็น 36,550 และ 97,866 มก./ล., ตามลำดับ. จึงทำให้มีการเตรียมน้ำเสียได้ค่อนข้างลำบาก เนื่องจากในช่วงเริ่มต้นการทดลอง น้ำเสียเศษอาหารที่ได้มีความเข้มข้นสูง จึงจำเป็นต้องเจือจางน้ำเสียให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 20,000 มก./ล. เมื่อดำเนินการทดลองมาถึงช่วงที่เปลี่ยนความเข้มข้นให้มีความสูงขึ้น พบว่า น้ำเสียเศษอาหารที่ได้ในช่วงหลังนี้จะมีค่าความสกปรกค่อนข้างต่ำมาก. ทำให้อัตราการระเหยไอดีที่เข้าระบบไม่สามารถควบคุมได้ตามที่กำหนดไว้ มีผลทำให้ไม่จำเป็นต้องเจือจางน้ำเสียเข้าระบบและได้เพิ่มปริมาณซีโอดีถึง 52,000 มก./ล. ระดับพีเอชของน้ำเสียเศษอาหารมีค่าน้อยกว่า 4 ซึ่งมีความเป็นกรดสูงมาก ไม่สามารถนำมาใช้ได้โดยตรง. ดังนั้น ต้องมีการปรับสภาพน้ำเสียให้อยู่ในระดับพีเอชประมาณ 7.0 ในช่วงเริ่มต้น โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10, ก่อนที่จะป้อนเข้าสู่ถังหมักไฮโดรเจน เพื่อไม่ให้มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ และให้ระบบสามารถรองรับกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นได้ โดยที่ระดับพีเอชในถังหมัก ไม่เปลี่ยนแปลงมากนักหรือเข้าสู่สมดุลแล้วจึงลดระดับพีเอชเริ่มต้นให้อยู่ที่ 5.0.

สมบัติของน้ำเสียเศษอาหารที่ใช้ในการทดลองมีความแตกต่างกันมาก จึงได้ทำการทดลอง 2 อัตราการรับซีโอดีที่ 20 และที่ 30 กรัมต่อลิตรต่อวัน. ประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในแต่ละอัตราการรับซีโอดีแสดงได้ดังตารางที่ 16-17 และรูปที่ 16-21 จะเห็นได้ว่า ประสิทธิภาพการบำบัดซีโอดี และบีโอดีที่อัตราการรับซีโอดี 20 กรัมต่อลิตรต่อวัน ดังรูปที่ 16-17, มีค่าเฉลี่ยที่ร้อยละ 30.00 และ 25.40, ตามลำดับ. ที่อัตราการรับซีโอดี 30 กรัมต่อลิตรต่อวัน มีค่าเฉลี่ยที่ร้อยละ 26.66 และ 23.66, ตามลำดับ. ทั้งสองอัตราการรับซีโอดีมีประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดีไม่เกินร้อยละ 30 ซึ่งเป็นไปตามการทดลองของนาถพินิจและคณะ (2552). จะเห็นได้ว่า เมื่ออัตราการรับซีโอดีสูงขึ้น ประสิทธิภาพการบำบัดซีโอดีและบีโอดีจะลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของซีโอดีมีมากขึ้นแต่มีระยะเวลาเก็บกักเท่าเดิม ทำให้ระยะเวลาเก็บกักไม่เพียงพอที่จะย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มี. สอดคล้องกับการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยพบว่า เมื่อระยะเวลาเก็บกักมากขึ้น จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้มากขึ้น.

ตารางที่ 16. สมบัติของน้ำเสียก่อน-หลังเข้าถังหมักที่อัตราภาระรับซีโอดี 20 ก./ล.-วัน

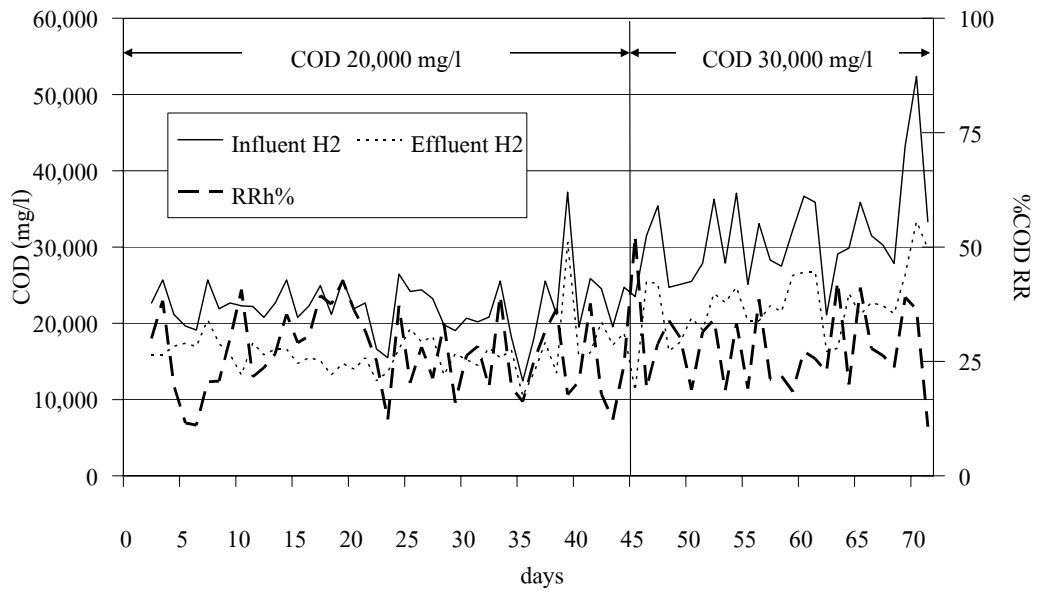
พารามิเตอร์	หน่วย	น้ำเสียก่อนเข้าถังหมัก		น้ำเสียหลังออกถังหมัก		ประสิทธิภาพ การกำจัด
		ต่ำสุด-สูงสุด	ค่าเฉลี่ย	ต่ำสุด-สูงสุด	ค่าเฉลี่ย	
พีเอช	-	5.10-7.29	6.66	3.39-6.14	4.40	
ซีโอดี	มก./ล.	12,432-37,200	22,656	10,416-30,600	15,859	30.00%
บีโอดี	มก./ล.	6,000-14,500	8,340	5,200-10,200	6,222	25.40%
กรดอินทรีย์	มก./ล.*	429-1,571	771	2,400-5,714	4,829	526.33%**
อัตราภาระ รับซีโอดี	กก./ลบ.ม.-วัน	19.59-27.94	22.66			
อัตราส่วนกรดอินทรีย์ออกต่อ กรดอินทรีย์เข้า		2.27-9.39	4.20			
อัตราการเกิด ก๊าซไฮโดรเจน	L/gCODr-d	0.05-0.31	0.15			
ปริมาณก๊าซ ไฮโดรเจน	%	22.08-52.21	43.99			
MLSS	มก./ล.		92,216			
MLVSS	มก./ล.		73,773			
ปริมาตร	ลิตร		0.50			
เชื้อจุลินทรีย์						
ปริมาณอาหาร	ก.ซีโอดี/		1.23			
ต่อจุดซีพี	ก.วีเอสเอส					

หมายเหตุ * มีลิกรัมต่อลิตรในรูปของกรดแอสซิติค ** ร้อยละการเพิ่มขึ้นของกรดอินทรีย์

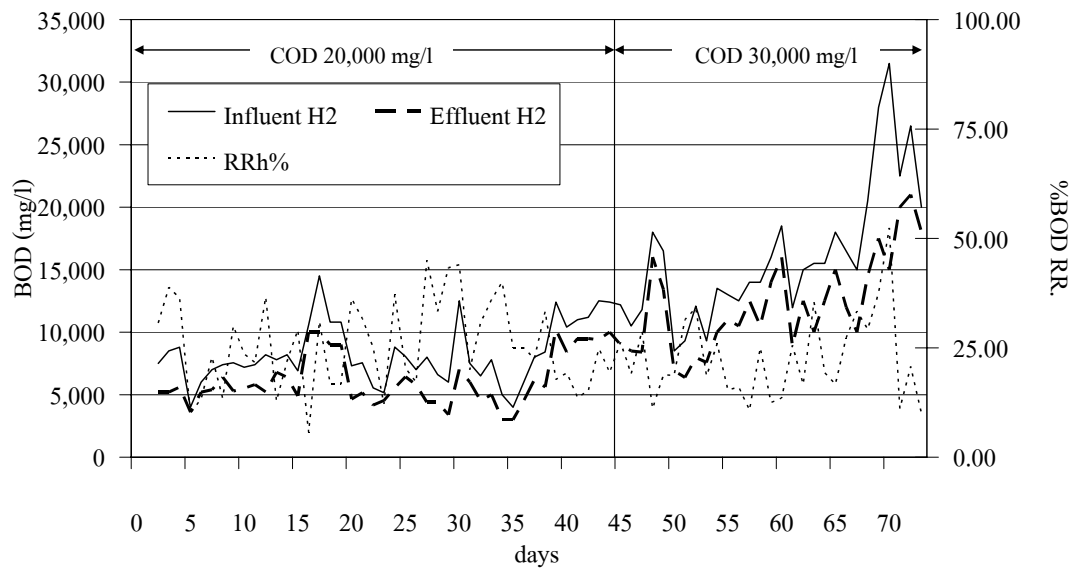
ตารางที่ 17. สมบัติของน้ำเสียก่อน-หลังเข้าถังหมัก ที่อัตราภาระรับซีโอดี 30 ก./ล.-วัน

พารามิเตอร์	หน่วย	น้ำเสียก่อนเข้าถังหมัก		น้ำเสียหลังออกถังหมัก		ประสิทธิภาพ การกำจัด
		ต่ำสุด-สูงสุด	ค่าเฉลี่ย	ต่ำสุด-สูงสุด	ค่าเฉลี่ย	
พีเอช	-	4.26-5.45	4.92	3.92-5.58	4.88	
ซีโอดี	มก./ล.	21,115-52,395	32,016	16,334-33,342	23,481	26.66%
บีโอดี	มก./ล.	8,499-31,500	16,212	6,374-21,000	12,376	23.66%
กรดอินทรีย์	มก./ล.*	857-2,286	1,514	3,628-7,800	5,144	239.76%**
อัตราภาระ รับซีโอดี	กก./ลบ.ม.-วัน	11.87-39.29	32.02			
อัตราส่วนกรดอินทรีย์ออกต่อ กรดอินทรีย์เข้า		2.00-5.73	3.50			
อัตราการเกิด ก๊าซไฮโดรเจน	L/gCODr-d	0.12-0.34	0.19			
ปริมาณก๊าซ ไฮโดรเจน	%	27.70-41.00	34.15			
MLSS	มก./ล.		104,402			
MLVSS	มก./ล.		83,522			
ปริมาตร	ลิตร		0.50			
เชื้อจุลินทรีย์						
ปริมาณอาหาร	ก.ซีโอดี/ก.วี		1.53			
ต่อจุลชีพ	เอสเอส					

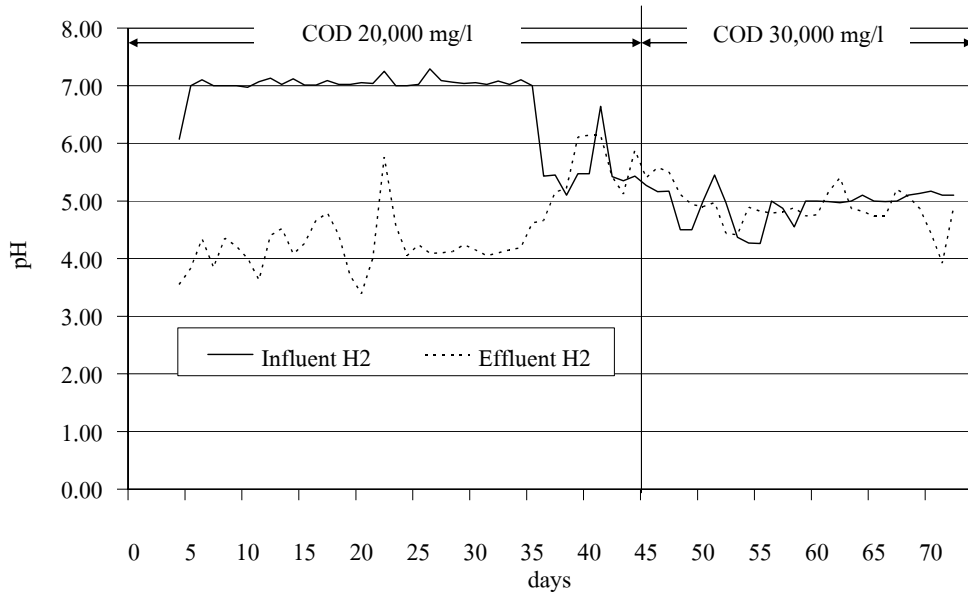
หมายเหตุ * มิลลิกรัมต่อลิตรในรูปของกรดแอสซิติค ** ร้อยละการเพิ่มขึ้นของกรดอินทรีย์



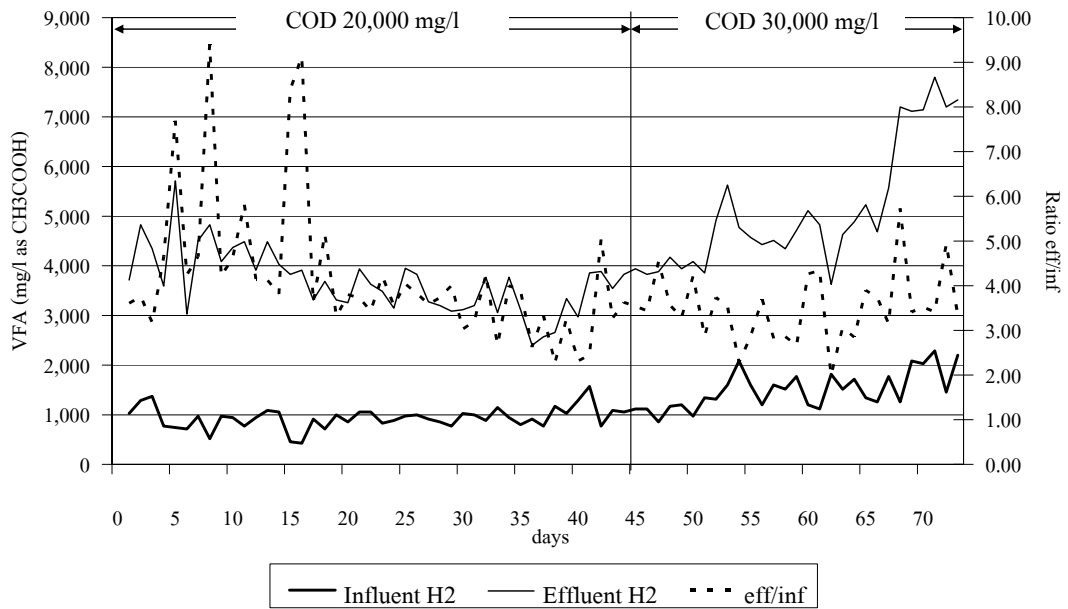
รูปที่ 16. ปริมาณซีโอดีเข้า-ออก และประสิทธิภาพการกำจัด.



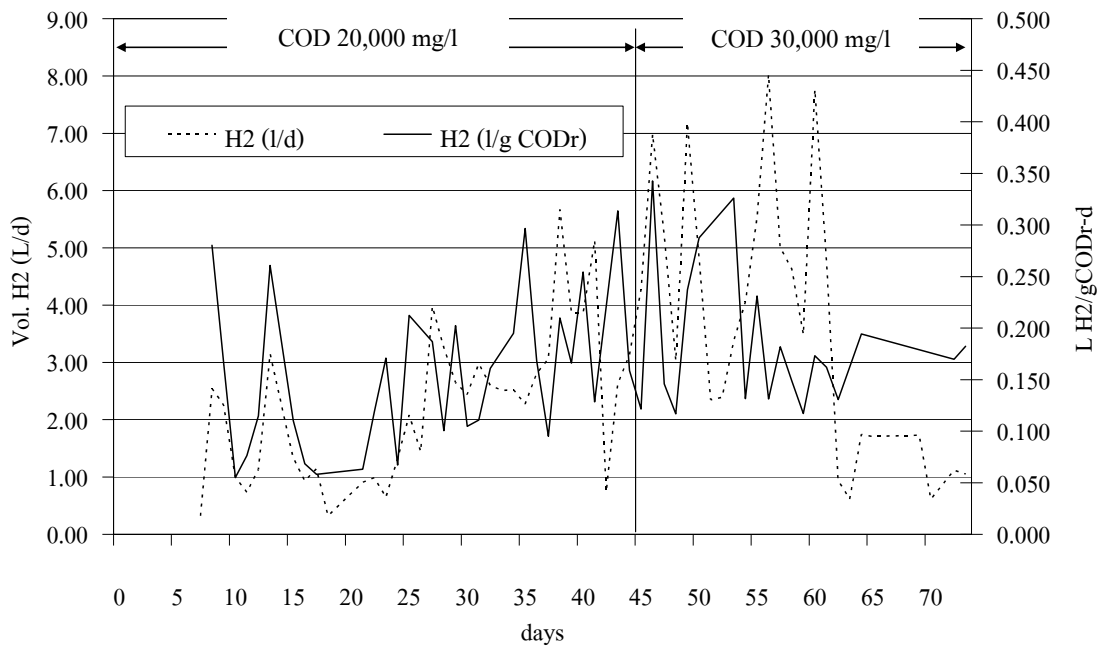
รูปที่ 17. ปริมาณบีโอดีเข้า-ออก และประสิทธิภาพการกำจัด.



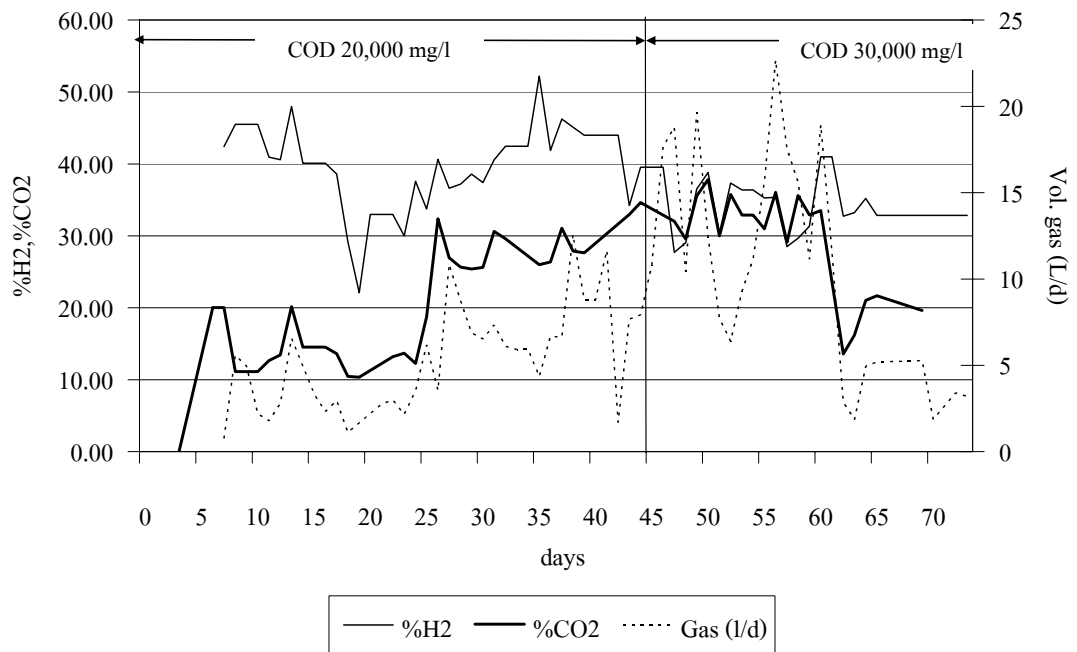
รูปที่ 18. ระดับพีเอชเข้า-ออกจากถังหมักก๊าซไฮโดรเจน.



รูปที่ 19. ปริมาณกรดอินทรีย์เข้า-ออก และอัตราส่วนกรดอินทรีย์ออก และเข้า.



รูปที่ 20. ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน และประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.



รูปที่ 21. ปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น และร้อยละก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์.

จากรูปที่ 18 จะเห็นได้ว่า ในช่วงเริ่มต้นในการเดินระบบที่อัตราภาระรับซีโอดีที่ 20 กรัมต่อลิตรต่อวัน, ระดับพีเอชของน้ำเสียก่อนเข้าถังหมักไฮโดรเจนจะควบคุมไว้ที่ 7.00 เพื่อให้สามารถเกิดกรดอินทรีย์ให้ได้มากที่สุด และให้ระดับพีเอชที่ออกจากถังหมักมีแนวโน้มคงที่ในช่วง 4.3-4.5, แล้วจึงลดระดับพีเอชของน้ำเสียก่อนเข้าถังหมักลงให้มีค่าที่ 5.00, เพื่อให้ระบบสามารถรักษาสภาวะสมดุลของระบบหรือระดับพีเอชให้คงที่ได้. จะเห็นได้ว่า ระดับพีเอชของน้ำเสียที่ออกจากถังหมักมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วง 4.3-4.5 ที่อาจจะมียุทธศาสตร์แนวโน้มสูงขึ้นบ้าง แต่จะมีค่าไม่เกิน 4.5, ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Fang and Liu (2002) และ Ginkel *et al.* (2001) ที่ว่า ระดับพีเอชที่เหมาะสมในการควบคุมการเกิดก๊าซไฮโดรเจนควรอยู่ที่ 5.5 และที่ระดับพีเอช 5 สามารถยับยั้งขั้นตอนการสร้างก๊าซมีเทนได้เป็นอย่างดี (Han and Shin 2004).

จากรูปที่ 19 พบว่า กรดอินทรีย์ที่ระเหยง่ายที่อัตราภาระรับซีโอดีที่ 20 กรัมต่อลิตรต่อวัน มีค่าเฉลี่ยที่ 771 มก./ล. ในรูปกรดแอสติก ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่อัตราภาระรับซีโอดีที่ 30 กรัมต่อลิตรต่อวัน ที่ค่าเฉลี่ย 1,514 มก./ล. ในรูปกรดแอสติก. สำหรับอัตราส่วนกรดอินทรีย์ออกต่อกรดอินทรีย์เข้าที่อัตราภาระรับซีโอดีที่ 20 กรัมต่อลิตรต่อวัน มีค่าเฉลี่ยที่ 4.20, ซึ่งมีความมากกว่าที่อัตราภาระรับซีโอดีที่ 30 กรัมต่อลิตรต่อวัน ที่ค่าเฉลี่ย 3.50. เห็นได้ว่า เมื่ออัตราภาระรับซีโอดีสูงขึ้นปริมาณกรดอินทรีย์และซีโอดีเพิ่มขึ้นตามไปด้วย, สอดคล้องกับการทดลองของ Yu and Fang (2001). ทำให้อัตราส่วนกรดอินทรีย์ออกต่อกรดอินทรีย์เข้ามีแนวโน้มลดลง เนื่องจากสมบัติของน้ำเสียก่อนเข้ามีความเข้มข้นสูงเกินไป. ทำให้แนวโน้มกรดอินทรีย์ของน้ำเสียที่ออกจากถังหมักมีร้อยละการเพิ่มขึ้นที่ต่ำกว่า จึงทำให้อัตราส่วนกรดอินทรีย์ออกต่อกรดอินทรีย์เข้ามีค่าต่ำกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของนาถพนิจและคณะ (2552) ที่ว่า อัตราส่วนของกรดอินทรีย์ออกต่อกรดอินทรีย์เข้าถังหมัก (VFA_{eff}/inf) มีแนวโน้มลดลงเมื่ออัตราภาระรับซีโอดีเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากกรดอินทรีย์ก่อนเข้าถังหมักมีค่าสูงมาก ทำให้ระบบไม่สามารถรักษาระดับพีเอชของน้ำเสียให้คงที่ได้, จึงทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตกรดอินทรีย์ลดลง. อัตราส่วนของกรดอินทรีย์ออกต่อกรดอินทรีย์เข้าควรมีค่าอย่างน้อย 1.78 เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนอย่างมีนัยสำคัญ.

สำหรับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Clostridium acetobutyricum* ที่ใช้ตอนเริ่มต้นมีความเข้มข้นที่ 92,216 มก./ล. ในรูปของ MLSS และที่ 73,773 มก./ล. ในรูปของ MLVSS ปริมาตร 0.5 ลิตร, ดังแสดงได้ดังตารางที่ 16. ดังนั้น ที่อัตราภาระรับซีโอดีที่ 20 กรัมต่อลิตรต่อวัน มีอัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์ หรือ F/M ของถังหมักไฮโดรเจนอยู่ที่ 1.23 กรัมซีโอดีต่อกรัมวีเอสเอส. โดยมีปริมาณของซีโอดีเฉลี่ยในระบบที่สภาวะสมดุลที่ 45.31 กรัมต่อวัน และมีปริมาณ

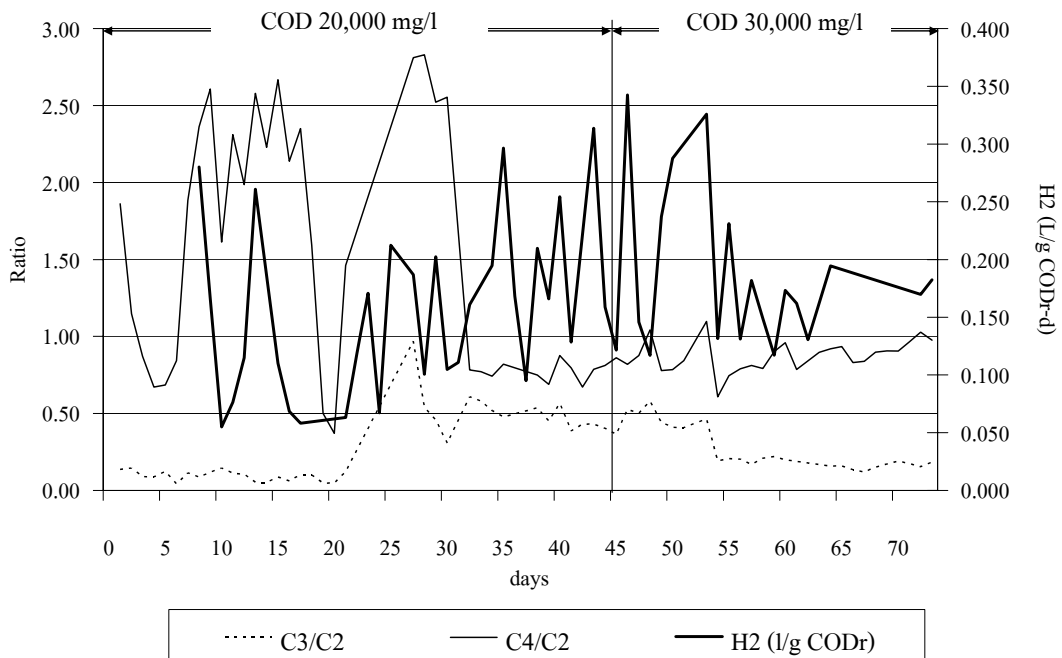
เชื้อจุลินทรีย์ในถังหมัก 36.89 กรัม ในรูปของ MLVSS. เมื่อเดินระบบไปประมาณ 45 วัน ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเป็น 104,402 มก./ล. ในรูปของ MLSS และที่ 83,522 มก./ล. ในรูปของ MLVSS, จึงเพิ่มปริมาณซีโอดีเข้าระบบเป็นที่อัตราการรับซีโอดีที่ 30 กรัมต่อลิตรต่อวัน ดังตารางที่ 16. ดังนั้น อัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์หรือ F/M ของถังหมักไฮโดรเจนอยู่ที่ 1.53 กรัมซีโอดีต่อกรัมวีเอสเอส. โดยมีปริมาณของซีโอดีเฉลี่ยในระบบที่สถานะสมดุลที่ 64.03 กรัมต่อวัน และมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมัก 41.76 กรัม ในรูปของ MLVSS. จากการทดลองของ Liang *et al.* (2001) พบว่า อัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมควรอยู่ที่ 4-16 กรัมซีโอดีต่อกรัมวีเอสเอส ซึ่งมีค่าสูงมาก เมื่อเทียบกับอัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดลองนี้.

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนที่ได้ พบว่าที่อัตราการรับซีโอดีที่ 20 และ 30 กรัมต่อลิตรต่อวัน มีค่าเฉลี่ยเป็น 0.15 และ 0.19 ลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดีที่ถูกกำจัดต่อวัน, ดังแสดงได้ดังรูปที่ 20. จะเห็นได้ว่าเมื่ออัตราการรับซีโอดีสูงขึ้น อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากการทดลอง Yu and Fang (2001). เนื่องจากประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดีต่ำลง, แต่ปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ทำให้อัตราการเกิดก๊าซสูงขึ้นด้วย. นอกจากนี้ ยังพบว่า เมื่ออัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์สูงขึ้น อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนสูงขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Liang *et al.* (2001), เนื่องจากมีสารอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไปเป็นกรดอินทรีย์และก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มมากขึ้น.

จากรูปที่ 21 เห็นได้ว่า ร้อยละก๊าซไฮโดรเจนที่ได้ของอัตราการรับซีโอดีที่ 30 กรัมต่อลิตรต่อวัน มีค่าต่ำกว่าที่ 20 กรัมต่อลิตรต่อวัน โดยมีค่าเฉลี่ยเป็นร้อยละ 34.15 และร้อยละ 43.99, ตามลำดับ, เนื่องจากการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์. ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในช่วงแรกๆ ที่อัตราการรับซีโอดีที่ 20 กรัมต่อลิตรต่อวัน จะละลายในน้ำ, เพื่อเพิ่มสภาวะบัฟเฟอร์ให้ระบบให้สามารถรองรับกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นได้ โดยที่ระดับพีเอชไม่ลดต่ำกว่าค่าที่ควบคุมไว้ จึงทำให้อัตราการเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในช่วงแรกมีค่าต่ำกว่า. ทั้งนี้เมื่อก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ละลายจนถึงจุดอิ่มตัวหรือระบบเข้าสู่สถานะสมดุลแล้วที่ระดับพีเอชในช่วง 4.3-4.5, ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะละลายน้ำได้น้อยลง ทำให้อัตราการเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นและร้อยละก๊าซไฮโดรเจนลดลงที่อัตราการรับซีโอดีที่ 30 กรัมต่อลิตรต่อวัน. จากการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่า อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Clostridium acetobutyricum* มีค่าสูงกว่าเชื้อจุลินทรีย์ผสมของนาถพิณิจและคณะ (2552) ที่มีอัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนที่ 0.12 ลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดีที่ถูกกำจัดต่อวัน.

ตารางที่ 18. ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดก๊าซกับอัตราส่วนกรดบิวทริกต่อกรดแอซีติก แลกรดโพรไพโอนิกต่อกรดแอซีติก

อัตราการรับชีโอดี (ก.ชีโอดี/ล.-วัน)	อัตราส่วนกรด โพรไพโอนิกต่อกรด แอซีติก	อัตราส่วนกรดบิวทริก ต่อกรดแอซีติก	อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจน (ล./ก.ชีโอดีที่ถูกกำจัด-วัน)
20	0.09	1.66	0.13
20	0.41	1.01	0.18
30	0.16	0.92	0.17



รูปที่ 22. อัตราส่วนระหว่างกรดโพรไพโอนิกกับกรดแอซีติก และกรดบิวทริกกับกรดแอซีติก.

จากการทดลองของ Bai *et al.* (2003c) พบว่าปริมาณกรดอินทรีย์แต่ละชนิดที่ผลิตได้ ได้แก่ กรดแอซีติก, กรดโพรไพโอนิก และกรดบิวทริก, เป็นต้น มีผลต่อปริมาณการเกิดก๊าซไฮโดรเจนด้วย. จากการทดลองนี้ได้อัตราส่วนของกรดโพรไพโอนิกต่อกรดแอซีติก (C3/C2) และอัตราส่วนของกรดบิวทริกต่อกรดแอซีติก (C4/C2) ดังตารางที่ 18 และรูปที่ 22. จะเห็นได้ว่าอัตราส่วนของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดแบ่งออกได้เป็น 3 ช่วง. ในช่วงแรกที่อัตราการรับชีโอดีที่ 20 กรัมต่อลิตรต่อวันนั้น มีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของกรดโพรไพโอนิกต่อกรดแอซีติก (C3/C2) และ

อัตราส่วนของกรดบิวทริกต่อกรดแอสติก (C4/C2) เป็น 0.09 และ 1.66, ตามลำดับ. โดยมีอัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนเฉลี่ยเป็น 0.13 ลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมชีโอดีที่ถูกกำจัดต่อวัน. ช่วงที่สองที่อัตราการรับชีโอดีที่ 20 กรัมต่อลิตรต่อวันเช่นเดียวกัน, แต่มีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของกรดโพรไพโอเนตต่อกรดแอสติก (C3/C2) และอัตราส่วนของกรดบิวทริกต่อกรดแอสติก (C4/C2) เป็น 0.41 และ 1.01, ตามลำดับ. โดยมีอัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนเฉลี่ยเป็น 0.18 ลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมชีโอดีที่ถูกกำจัดต่อวัน. ส่วนในช่วงที่สามที่อัตราการรับชีโอดีที่ 30 กรัมต่อลิตรต่อวัน มีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของกรดโพรไพโอเนตต่อกรดแอสติก (C3/C2) และอัตราส่วนของกรดบิวทริกต่อกรดแอสติก (C4/C2) เป็น 0.16 และ 0.92, ตามลำดับ. โดยมีอัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนเฉลี่ยเป็น 0.17 ลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมชีโอดีที่ถูกกำจัดต่อวัน.

จะเห็นได้ว่า ในช่วงแรกและช่วงที่สองอัตราส่วนของกรดโพรไพโอเนตต่อกรดแอสติกเพิ่มขึ้น, เมื่ออัตราส่วนของกรดบิวทริกต่อกรดแอสติกลดลง ทำให้อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น. แต่ในช่วงที่สองและสามพบว่าอัตราส่วนของกรดบิวทริกต่อกรดแอสติก ใกล้เคียงกัน เมื่ออัตราส่วนของกรดโพรไพโอเนตต่อกรดแอสติกลดลง ทำให้อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนมีค่ามาก ใกล้เคียงกัน และลดลงตามอัตราส่วนของกรดบิวทริกต่อกรดแอสติก. แสดงว่าอัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนขึ้นกับอัตราส่วนของกรดบิวทริกและกรดแอสติกเป็นหลัก. จากการทดลองของ Vavilin *et al.* (1995) พบว่า จะเกิดปฏิกิริยาการแข่งขันกันระหว่างปฏิกิริยาการเกิดกรดบิวทริกและกรดโพรไพโอเนต, โดยที่การเกิดกรดบิวทริกจะให้ก๊าซไฮโดรเจน แต่การเกิดกรดโพรไพโอเนตเป็นการใช้ก๊าซไฮโดรเจน. แสดงว่า ถ้าได้กรดบิวทริกสูงกว่ากรดโพรไพโอเนต จะได้ก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น. จากการทดลองของ Horiuchi *et al.* (2002) พบว่า ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณการเกิดกรดบิวทริก. ดังนั้น อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนนั้นจึงขึ้นกับอัตราส่วนของกรดบิวทริกต่อกรดแอสติกเป็นหลัก ซึ่งควรมีค่าใกล้เคียง 1 และอัตราส่วนของกรดโพรไพโอเนตต่อกรดแอสติกควรมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.1 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chang and Lin (2003) ที่ได้อัตราส่วนระหว่างกรดบิวทริกต่อกรดแอสติกในช่วง 1.52-1.75. นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Bai *et al.* (2003c) ที่ว่าตัวบ่งชี้ในการเกิดก๊าซไฮโดรเจนคือ กรดบิวทริกต้องมีปริมาณมากกว่ากรดแอสติกและมากกว่ากรดโพรไพโอเนต, ตามลำดับ.

4. สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากขยะเศษอาหาร สามารถสรุปได้ดังนี้.

เทคนิคการบำบัดขั้นต้นสำหรับปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศกลุ่มสร้างก๊าซมีเทน เพื่อให้ได้จุลินทรีย์กลุ่มสร้างก๊าซไฮโดรเจนนั้นสามารถทำได้โดยใช้วิธีการต้มที่ 90°C. เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที, เพื่อกำจัดจุลินทรีย์กลุ่มก๊าซมีเทนที่เหลือเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถสร้างสปอร์ได้.

จากการคัดเลือกสายพันธุ์พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการต้มที่ 90°C. เป็นเวลา 15 นาที, จะได้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Clostridium spp.* เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *Clostridium acetobutyricum*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* และ *Clostridium tyrobutyricum* เป็นต้น, ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูง. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองระบบต่อเนื่อง คือ สายพันธุ์ *Clostridium acetobutyricum*.

ถังหมักก๊าซไฮโดรเจนสำหรับเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ในกรณีที่ใช้ระบบการไหลขึ้น (upflow system) ควรใช้ตัวกลางร่วมด้วย, โดยออกแบบเป็นระบบตรึงฟิล์มแบบไหลขึ้น (upflow anaerobic fixed bed; UAFB) เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Clostridium spp.* มีลักษณะเป็นตะกอนเบา, ไม่สามารถรวมตัวเป็นตะกอนเม็ดได้ แต่สามารถสร้างสปอร์หรือเส้นใยไว้สำหรับยึดเกาะตัวกลางได้, จึงควรเลือกใช้ระบบตรึงฟิล์มแบบไหลขึ้นมากกว่าระบบยูเอสบี (upflow anaerobic sludge blanket; UASB) หรือสามารถใช้ระบบกวนสมบูรณ์ (completely stirred tank reactor, CSTR) หรือกึ่งกวนสมบูรณ์ (semi complete mix reactor, SCM) ได้ เพื่อเพิ่มพื้นที่การสัมผัสให้มากขึ้น.

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบรุ่นผลิต ควรออกแบบให้มีระยะเวลาเก็บกักนาน, เพื่อให้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากที่สุด และระดับพีเอชเริ่มต้นของการหมักสามารถเริ่มต้นได้ที่ระดับพีเอช 7, เพื่อให้ระดับพีเอชในถังหมักหลังการผลิตก๊าซไฮโดรเจนไม่ต่ำกว่า 4.3. สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบต่อเนื่อง ควรออกแบบให้มีระยะเวลาเก็บกักน้อย, เพื่อให้สภาวะบัพเฟอร์ภายในถังหมักไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก. โดยเฉพาะ

ระดับพีเอชหลังการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ควรมีค่าระหว่าง 4.3-4.5, โดยปรับระดับพีเอชของน้ำเสีย เริ่มต้นได้ที่ 5-5.5 เพื่อมิให้สภาวะบัฟเฟอร์ในถังหมักเปลี่ยนแปลงมาก.

จากการทดลองในระบบต่อเนื่อง พบว่า ประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดีและบีโอดี ที่อัตราการรับซีโอดี 20 กรัมต่อลิตรต่อวัน มีค่าเฉลี่ยเป็นร้อยละ 30.00 และ 25.40, ตามลำดับ และที่ อัตราการรับซีโอดี 30 กรัมต่อลิตรต่อวัน มีค่าเฉลี่ยเป็นร้อยละ 26.66 และ 23.66, ตามลำดับ. ทั้งสองอัตราการรับซีโอดีมีประสิทธิภาพการกำจัดซีโอดีไม่เกินร้อยละ 30 สำหรับกรดอินทรีย์ พบว่า ทั้ง 2 อัตราการรับซีโอดี ที่ 20 และ 30 กรัมต่อลิตรต่อวันมี อัตราส่วนกรดอินทรีย์ออกต่อ กรดอินทรีย์เข้ามากกว่า 3, ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 4.2 และ 3.5, ตามลำดับ.

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองระบบต่อเนื่อง คือ สายพันธุ์ *Clostridium acetobutyricum* ที่ใช้ตอนเริ่มต้นมีอัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์หรือ F/M ของถังหมักไฮโดรเจนอยู่ที่ 1.23 กรัม ซีโอดีต่อกรัมวีเอสเอส ที่อัตราการรับซีโอดีที่ 20 กรัมต่อลิตรต่อวัน และเพิ่มขึ้นเป็น 1.53 กรัม ซีโอดีต่อกรัมวีเอสเอส ที่อัตราการรับซีโอดีที่ 30 กรัมต่อลิตรต่อวัน.

อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนที่ได้ พบว่า ที่อัตราการรับซีโอดีที่ 20 และ 30 กรัมต่อลิตรต่อวัน มีค่าเฉลี่ยเป็น 0.15 และ 0.19 ลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมซีโอดีที่ถูกกำจัดต่อวัน. โดยที่อัตราการรับซีโอดีสูงขึ้น อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้นด้วย. นอกจากนี้ ยังพบว่า เมื่ออัตราส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์สูงขึ้น อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนสูงขึ้นด้วยเช่นเดียวกัน. ร้อยละของก๊าซไฮโดรเจนที่ได้ของทั้ง 2 อัตราการรับซีโอดีเป็น 43.99 และ 34.15, ตามลำดับ. เนื่องจากในช่วงเริ่มต้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะละลายน้ำ เพื่อเพิ่มสภาวะบัฟเฟอร์ให้ระบบให้รองรับกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นได้, จึงทำให้ร้อยละก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในช่วงแรกมีค่าต่ำกว่า. เมื่อก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ละลายจนถึงจุดอิ่มตัว, ร้อยละก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จึงเพิ่มขึ้น และร้อยละก๊าซไฮโดรเจนจึงลดลง.

ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณการเกิดกรดบิวทิริก. ดังนั้น อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนนั้นจึงขึ้นกับอัตราส่วนของกรดบิวทิริกต่อกรดแอสिटิก (C4/C2) เป็นหลัก ซึ่งควรมีค่าใกล้เคียง 1 และอัตราส่วนของกรดโพรไพโอนิกต่อกรดแอสिटิก (C3/C2) ควรมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.1. จากการทดลองได้อัตราส่วนของกรดบิวทิริกต่อกรดแอสिटิก

(C4/C2) และอัตราส่วนของกรดโพรไพโอนิกต่อกรดแอสติก (C3/C2) เป็น 3 ช่วง คือ ช่วงแรกได้ 0.09 และ 1.66, ตามลำดับ, โดยมีอัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนเฉลี่ยเป็น 0.13 ลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมชีโอดีที่ถูกกำจัดต่อวัน. ช่วงที่ 2 ได้ 0.41 และ 1.01, ตามลำดับ, โดยมีอัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนเฉลี่ยเป็น 0.18 ลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมชีโอดีที่ถูกกำจัดต่อวัน. ช่วงที่ 3 ได้ 0.16 และ 0.92, ตามลำดับ, โดยมีอัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนเฉลี่ยเป็น 0.17 ลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมชีโอดีที่ถูกกำจัดต่อวัน.

5. ผลการศึกษาเบื้องต้นทางด้านการตลาดและผลกระทบของโครงการ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยและพัฒนาในขั้นวิจัยพื้นฐาน ซึ่งการทดลองได้ทำการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ, เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ และผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสายพันธุ์บริสุทธิ์ สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน, จึงควรมีงานวิจัยต่อยอด เพื่อนำสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มารวมกันพัฒนาเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์สำเร็จรูป สำหรับผลิตก๊าซไฮโดรเจน, เพื่อที่จะสามารถจำหน่ายได้ในท้องตลาด. นอกจากนี้ ยังสามารถถ่ายทอดกระบวนการคัดเลือกสายพันธุ์, กระบวนการเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์, ตลอดจนการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์สำเร็จรูปสู่เชิงพาณิชย์ได้. ที่สำคัญควรพัฒนาต่อยอดขยายระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับโรงงานนำทาง เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการเผยแพร่องค์ความรู้ที่ได้ในการพัฒนาพลังงานทดแทนต่อไป.

6. ข้อเสนอแนะ

พลังงานไฮโดรเจนถือว่าเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานจากน้ำมันเชื้อเพลิงได้เป็นอย่างดี ซึ่งก๊าซไฮโดรเจนนี้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับการเผาไหม้ที่มีประสิทธิภาพสูง, สะอาด และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม, หลังจากการเผาไหม้จะได้เพียงน้ำและพลังงานความร้อนเท่านั้น. ด้วยเหตุนี้ พลังงานไฮโดรเจนจึงไม่ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก และไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ. ทั้งนี้ พลังงานไฮโดรเจนสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในครัวเรือน เช่นเดียวกับการใช้ก๊าซหุงต้ม, น้ำมันเชื้อเพลิง หรือก๊าซชีวภาพ, เป็นต้น และสามารถนำไปใช้กับเซลล์เชื้อเพลิง (fuel cell) ในการผลิตไฟฟ้าได้ ซึ่งสามารถนำพลังงานไฮโดรเจนที่ได้ไปใช้เป็นเชื้อเพลิงของยานยนต์ได้.

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคโนโลยีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศและไม่ใช้แสง, ซึ่งก๊าซไฮโดรเจนที่ได้สามารถนำมาใช้ในครัวเรือน ร่วมกับก๊าซชีวภาพหรือก๊าซมีเทนจากกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศได้ เช่นเดียวกัน. โดยก๊าซไฮโดรเจนที่ได้มีค่าความร้อนสูงกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ ประมาณ 2.75 เท่า, แต่การใช้ในเซลล์เชื้อเพลิง หรือในยานยนต์ จำเป็นต้องมีการทำก๊าซไฮโดรเจนให้บริสุทธิ์ก่อน, โดยการกำจัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้สารละลายต่างหรือใช้ตัวดูดซับ เพื่อให้ก๊าซไฮโดรเจนมีความบริสุทธิ์มากขึ้น, จึงจะสามารถนำไปใช้กับเซลล์เชื้อเพลิงและยานยนต์ได้.

6.1 ศักยภาพในกลุ่มอุตสาหกรรมหรือชนบท

1. ความต้องการของภาคอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับวัตถุดิบทางการเกษตร เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น. เนื่องจากอุตสาหกรรมการเกษตรมีของเสียที่มีค่าความสกปรกสูงจำนวนมากที่สามารถนำมาหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนที่สะอาด ไม่ก่อให้เกิดภาวะโลกร้อนได้.

2. ความต้องการของภาคชุมชน โดยเฉพาะโรงอาหาร, ภัตตาคาร, โรงแรม, เป็นต้น มีของเสียหรือขยะอินทรีย์จำนวนมาก เพื่อลดภาระในการนำไปกำจัดทิ้ง สามารถนำของเสียมาหมักผลิตก๊าซชีวภาพได้ เพื่อช่วยลดต้นทุนและค่าใช้จ่าย, พร้อมทั้งได้พลังงานสะอาดมาใช้ประโยชน์.

6.2 หน่วยงานที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ชุมชนระดับจังหวัดและระดับอำเภอ เพื่อเพิ่มมูลค่าของเสีย เช่น เศษอาหาร, วัสดุทางการเกษตร, ให้เป็นพลังงานทดแทนได้, โดยชุมชนสามารถพึ่งพาตนเองได้
2. ภาคอุตสาหกรรมการเกษตร โดยเฉพาะอุตสาหกรรมที่น้ำเสียมีค่าความสกปรกสูง เช่น อุตสาหกรรมอาหาร, อุตสาหกรรมเอทานอล ซึ่งสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนร่วมกับการผลิตก๊าซมีเทน เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนร่วมกันได้.
3. กรมพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาแหล่งผลิตก๊าซไฮโดรเจน สำหรับการใช้พลังงานไฮโดรเจนในอนาคต.

6.3 การนำไปใช้ประโยชน์

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นพัฒนาคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากของเสียประเภทต่างๆ ได้แก่ น้ำเสียเศษอาหาร, น้ำเสียอุตสาหกรรมที่มีค่าความสกปรกสูง, เพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนที่สะอาด, ไม่ก่อให้เกิดปัญหาภาวะโลกร้อนตามมา. งานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ 2 ลักษณะ คือ :

1. ถ่ายทอดกระบวนการคัดเลือกสายพันธุ์, กระบวนการเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์, ตลอดจนการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์สำเร็จรูปสู่เชิงพาณิชย์ได้.
2. ถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการเผยแพร่องค์ความรู้ที่ได้ในการพัฒนาพลังงานทดแทนต่อไป.

6.4 ผลลัพธ์ และผลกระทบที่คาดว่าจะเกิดขึ้นทั้งในทางเศรษฐกิจ และสังคม

ด้านเศรษฐกิจ

1. ประหยัดเงินตราต่างประเทศในการนำเข้าสายพันธุ์จุลินทรีย์.
2. พัฒนาแหล่งผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในประเทศ ไม่ต้องนำเข้าเทคโนโลยีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากต่างประเทศ.

ด้านสังคม

1. รักษาทัศนียภาพของบ้านเมืองให้สะอาด น่าอยู่.
2. ชุมชนสามารถพึ่งพาตนเองได้.

ด้านสิ่งแวดล้อมสังคม

1. ลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมในการเกิดภาวะเรือนกระจก.
2. ได้พลังงานสะอาดมาใช้ประโยชน์.

6.5 ผลประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากทั้งโครงการ (ระบุมูลค่าเป็นตัวเงิน)

1. ทดแทนการนำเข้าก๊าซไฮโดรเจน คิดเป็นเงิน 480 บาทต่อกิโลกรัมไฮโดรเจน.
2. ก๊าซไฮโดรเจนช่วยประหยัดพลังงานได้ คิดเป็นเงิน 32 บาทต่อกิโลกรัมไฮโดรเจน.

หมายเหตุ

- ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้สามารถนำไปใช้ผลิตกระแสไฟฟ้าได้อย่างน้อย 10 กิโลวัตต์/ชั่วโมง.
- ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยด้านเซลล์เชื้อเพลิงต่อไปได้.

7. เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ., 2550. รายงานสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย พ.ศ. 2550. รายงานฉบับสมบูรณ์ บทสรุปสำหรับผู้บริหาร กรุงเทพฯ.
- มูลนิธิชัยพัฒนา., 2543. โครงการศึกษาวิจัย และ พัฒนาสิ่งแวดล้อมหมักเบียร์อันเนื่องมาจากพระราชดำริ, รายงานศึกษาวิจัยวิทยาศาสตร์การกำจัดขยะ และการบำบัดน้ำเสียตามแนวพระราชดำริ.
- นาถพินิจ พัทธนันท์, พลอยภัทรภิญโญ ปรีชาและอนุวัฒนา เรวดี., 2552. การพัฒนาเทคโนโลยีและต้นแบบผลิตก๊าซไฮโดรเจนและมีเทนจากของเสีย และวัสดุเหลือใช้การเกษตรแบบครบวงจร, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, รายงานโครงการวิจัยที่ ภ. 49-00/ช.1/รายงานฉบับที่ 1.
- Andreasen, J. R., Bahl, H. and Gottschalk, G., 1989. Introduction to the physiology and biochemistry of genus *Clostridium*. In *Clostridia*, N. P. Minton and J. D. Clark (ed.), Plenum Press, New York, pp. 27-62.
- Aoyama, K., Uemura, I., Miyaki, J. and Asada, Y., 1997. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a Cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *J Ferment. Bioeng.* 83: pp. 17-20.
- APHA. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washiton DC., USA.
- Armor, J. N., 1999. The Multiple Roles for Catalysis in the Production of H₂. *Applied Catalysis A:General*, 176 (2): pp. 159-176.
- Bai, M. D., and Cheng, S. S., 2002. Inhibiting effect on hydrogen production caused by hydrogen partial pressure. *Proc. of 6th Biennial International Symposium on Environmental Biotechnology*. Veracruz. Mexico.
- Bai, M.D., Cheng, S. S., Chao, Y. C., Hsiao, C. J., Yang, Y. F., Liang, T. M. and Chen, S. D., 2003a. Inhibiting effect on hydrogen production caused by hydrogen partial pressure. *ACTA Biotechnologica*.
- Bai, M. D., Cheng, S. S. and Chao, Y. C. , 2003b. Effects of substrate component on hydrogen fermentation of multiple substrates. *Proc. of Asian Waterqual 2003, IWA-Asia Pacific Regional Conference*. Bangkok, Thailand.
- Bai, M.D., Cheng, S. S., Wang, Y. F., Hsiao, C. J., 2003c. Effects of hydraulic retention time on hydrogen fermentation of multiple substrates. *Proc. of Asian Waterqual 2003, IWA-Asia Pacific Regional Conference*. Bangkok, Thailand.
- Brosseau, J. D., Yan, J. Y. and Lo, K. V., 1986. The relationship between hydrogen gas and butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Biotech. and Bioeng.* 28: pp. 305-310.
- Buswell, A. W. and Mueller, H. F., 1952. Mechanism of methane fermentation. *Industrial and Enginerring chemistry*. 44: pp. 550-552.

- Chang, J. S., Lee, K. S. and Lin, P. J., 2002. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactor. *Int. J. Hydrogen Energy*. 27: pp. 1167-1174.
- Chang, F. Y., and Lin, C. Y., 2002. Start-up of an UASB reactor producing hydrogen. *Proc. of the Conference of 27th Wastewater Treatment Technology*. Taiwan, China.
- Chang, F. Y. and Lin, C. Y., 2003. Reactor configuration effect on biohydrogen in an upflow anaerobic sludge blanket system. *Proc. of Asian Waterqual 2003, IWA-Asia Pacific Regional Conference*. Bangkok, Thailand.
- Chen, C. C., Lin, C. Y. and Chang, J. S., 2001. Kinetic of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: pp. 56-64.
- Cheng S. S., Lin, C. Y., Tseng, I. C., Lee, C. M., Lin, H. I., Lin, M. R., Chen, S. T., Chen, S. D., 2003. Biohydrogen production mechanisms and processes application on multiple substrates. *Proc. of Asian Waterqual 2003, IWA-Asia Pacific Regional Conference*. Bangkok, Thailand.
- Cheng, S. S., Chang S. M. and Chen, S. T., 2002. Effects of volatile fatty acids on a thermophilic anaerobic hydrogen fermentation process degrading peptone. *Wat. Sci. Tech.* 46(4/5): pp. 209-214.
- Cheng, S. S., Tseng, I. C. and Bai, M. D., 1999. Behavior study of anaerobic hydrogenation from different organic substrates with selected hydrogen production bacteria. *Proc. of the 7th IAWQ Asia-Pacific Regional Conference*, Taipei, Taiwan. 1: pp. 759-764.
- Chin, H. L., Chen, Z. S. and Chou, C. P., 2003. Fed-batch operation using *Clostridium acetobutyricum* suspension cultures as biocatalyst for enhancing hydrogen production. *Biotechnol Prog.* 19: pp. 383-388.
- Claassen, P. A. M., Vrije, T. Budde, M. A. W., 2004. Biological hydrogen production from sweet sorghum by thermophilic bacteria. *2nd World Conference on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection*. Rome, Italy.
- Collet C., Adler N., Schwitzguebel J. P., and Peringer P., 2004. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *Int J Hydrogen Energy*. 29: pp. 1479-1485.
- Das, D. and Veziroglu, T. N., 2001. Hydrogen production by biological process: A survey of literature. *International J. of hydrogen energy*. 26: pp. 13-28.
- Doyle, E. M., 2002. *Clostridium perfringens* growth during cooling of thermal processed meat products. *FRI. Briefings in March 2002*, Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison, Winconsin.
- Duangmanee, T., Padmaseri, S., Simmons, J.J., Hubert, R., Bazylinski, D., Raskin, L. and Sung, S., 2003. Effect of sporulation and heat treatment on hydrogen production by anaerobic mixed microbial communities. *Proc. of Asian Waterqual 2003, IWA-Asia Pacific Regional Conference*. Bangkok, Thailand.
- Fabiano B. and Perego P., 2002. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Int. J. Hydrogen Energy*. 27: pp. 149-156.
- Fang, H.H.P., and Liu, H., 2002. Effect of pH on Hydrogen Production from Glucose by a Mixed Culture. *Bioresource Technology*. 82: pp. 87-93.
- Fang, H. H. P., Zhang, T. and Liu, H., 2002. Microbial diversity of a mesophilic hydrogen producing sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: pp. 112-128.

- Gavala, H. N., Skiadas, I. V. and Ahring, B. K., 2003. Biological hydrogen production in conventional and high-rate systems. *Proc. of Asian Waterqual 2003, IWA-Asia Pacific Regional Conference*. Bangkok, Thailand.
- Ginkel, S. V., Sung, S. and Lay, J. J., 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ. Sci. Technol.* 35(24): pp. 4726-4730.
- Guan, Y., Deng, M., Yu, X. and Zang, W., 2004. Two stage photo-production of hydrogen by marine green algae *Platymonas subcordiformis*. *J. Biochem Eng.* 19: pp. 69-73.
- Haandel van A. C., and Lettinga, G., 1994. Anaerobic sewage treatment. *London: John Wiley and Sons, Inc.*
- Han, S. and Shin, H., 2004. Biohydrogen Production by Anaerobic Fermentation of Food Waste. *International Journal of Hydrogen Energy.* 29: pp. 569-577.
- Hansel, A. and Lindblad, P., 1998. Towards optimization of Cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: pp. 153-160.
- Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L. and Hussy, I., 2002. Sustainable Fermentative Hydrogen Production : Challenges for Process Optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy.* 27: pp. 1339-1347.
- Horiuchi, J.I., Shimizu, T., Tada, K., Kanna, T. and Kobayashi, M., 2002. Selective Production of Organic Acids in Anaerobic Acid Reactor by pH Control. *Bioresource Technology*, 82: pp. 209-213.
- Hulshoff-Pol, L.W., 1994. Fundamentals of Anaerobic Digestion I. *Proc. of the 1st International Training course on Anaerobic and Low cost Treatment of Wastewater and Waste*. AIT, Thailand.
- Ilgi K. K. and Fikret K., 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology.* 38: pp. 569-582.
- Jones, D. T. and Woods, D. R., 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews.* 50(4): pp. 484-524.
- Kanai, T., Imanaka, H., Nakajima, A., Uwamori, K., Omori, Y., Fukui, T., 2005. Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Biotechnol.* 116: pp. 271-282.
- Karube, I., Urano, N., Matsunaga, T. and Suzuki, S., 1982. Hydrogen production from glucose by immobilized growing cells of *Clostridium butyricum*. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 16: pp. 5-9.
- Kataoka, N., Miya, A. and Kiriya, K., 1997. Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria. *Proc. of 8th International Conference on Anaerobic Digestion*. Sendai, Japan.
- Kim, S., Han, S. and Shin, H., 2004. Feasibility of Biohydrogen Production by Anaerobic Co-Digestion of Food Waste and Sewage Sludge. *International Journal of Hydrogen Energy.* 29: pp. 1607-1616.
- Kumar, A., Jain, S. R., Sharma, C. B. Joshi, A. P. and Kalia, V. C., 1995. Increased H₂ production by immobilized microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11: pp. 156-159.
- Kumar, N. and Das, D., 2000. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT08. *Process Biochem.* 35: pp. 589-293.

- Lay, J. J., 2001. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. *Biotechnol Bioeng.* 74: pp. 281-287.
- Lay, J. J., 2002. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotech. and Bioeng.* 38(3): pp. 269-278.
- Lay, J., Lee Y. and Noike, T., 1998. Feasibility of Biological Hydrogen Production from Organic Fraction of Municipal Solid Waste. *Water Research.* 33(11): pp. 2579-2586.
- Lee, Y. J., Miyahara, T. and Noike, T., 2001. Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresource Technol.* 80: pp. 227-231.
- Levin, D. B., Pitt, L. and Love, M., 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy.* 29: pp. 173-185.
- Liang, T. M., Cheng, S. M., Chang, S. M. and Hsiao, C. J., 2003. Using a microfiltration membrane to stabilize anaerobic bioreactors in producing hydrogen gas. *Proc. of Asian Waterqual 2003, IWA-Asia Pacific Regional Conference.* Bangkok, Thailand.
- Liang, T. M., Wu, K. L. and Cheng, S. S., 2001. Hydrogen production of chloroform inhibited granular sludge. *Proc. Of the 1st IAWQ Asia-Pacific Regional Conference,* Fukuoka, Japan.
- Lin, C. Y. and Chang, R. C., 2004. Fermentative hydrogen production at ambient temperature. *Int. J. Hydrogen Energy.* 29: pp. 715-720.
- Lin, M. R., Lu, C. S., Chen, J. J., Ji, Y. H., Lee, C. M., 2002. Hydrogen productivity comparison of three typical reactors of anaerobic photohydrogenesis. *Proc. of the Conference of 27th Wastewater Treatment Technology.* Taiwan, China.
- Liu G. and Shen J., 2004. Effects of culture medium and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *J. Biosci Bioeng* 98: pp. 251-256.
- Minnan, L., Jinli, H., Xiaobin, W., Huijuan, X., Jinzao, C., Chuannan, L., 2005. Isolation and characterization of a high H₂-producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring. *Res. Microbiol.* 156: pp. 76-81.
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., and Noike, T., 2000. Enhancement of Hydrogen Production from Glucose by Nitrogen Gas Sparging. *Bio resource Technology.* 73: pp. 59-65.
- Morimoto, M., Atsuko, M., Atif, A.A.Y., Ngan, M.A., Fakra'l-Razi, A., Iyuke, S.E. and Bukir, A.M., 2004. Biological Production of Hydrogen from Glucose by Natural Anaerobic Microflora. *International Journal of Hydrogen Energy.* 29: pp. 709-713 .
- Nandi, R., Dey, S. and Sengupta, S., 2001. Thiosulphate improves yield of hydrogen production from glucose by the immobilized formate hydrogenlyase system of *Escherichia coli*. *Biotech. and Bioeng.* 75(4): pp. 492-494.
- Oh, S. E., Iyer, P., Bruns, M. A. and Logan, B. E., 2004. Biological hydrogen production using membrane bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 1: pp. 119-127.
- Okamoto, M., Miyahara, O., Mizuno, O. and Noike, T., 2000. Biological hydrogen potential of material characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes. *Wat. Sci. Tech.* 41(3): pp. 25-32.
- Podesta J. J., Navarro A. M. G., Estrella C. N. and Estes M. A., 1997. Electrochemical measurements of trace concentrations of biological hydrogen produced by *Enterobacteriaceae*. *Inst Pasteur.* 148: pp. 87-93.

- Rachman, M. A., Nakashimada, Y., Kakizono, T. and Nishio, N., 1998. Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: pp. 450-454.
- Shin, H., Youn, J. and Kim, S., 2004. Hydrogen Production from Food Waste in Anaerobic Mesophilic and Thermophilic Acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy.* 29: pp. 1355-1363.
- Taguchi, F., Mizukami, N., Yamada, K., Hasegawa, K. and Saitotaki, T., 1995. Direct conversion of cellulosic materials to hydrogen by *Clostridium* spp. Strain NO-2. *Enzyme and Microbial Technology.* 17(2): pp. 147-150.
- Tanisho S. and Ishiwata Y., 1994. Continuous hydrogen production from molasses by bacterium *Enterobacter aerogenes*. *Int. J. Hydrogen Energy.* 19: pp. 807-812.
- Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M. and Igarashi, Y., 2001. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Appl. Microbiol. And Biotechnol.* 57: pp. 555-562.
- Vavilin, V.A. Rytov, S.V. and Lokshina, L.Y., 1995. Modelling Hydrogen Partial Pressure Change as a Result of Competition between the Butyric Acid and Propionic Groups of Acidogenic Bacteria. *Bioresource Technology.* 54: pp. 171-177.
- Winkler, M., Hemschemeier, A., Gotor, C., Melis, A. and Happer, T., 2002. [Fe]-hydrogenases in green algae: photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation. *Int. J. Hydrogen Energy.* 27: pp. 1431-1439.
- Yokoi, H., Maki, R., Hirose, J. and Hayashi, S., 2002. Microbial production of hydrogen from starch manufacturing wastes. *Biomass Bioenergy.* 22: pp. 389-395.
- Yokoi, H., Ohkawara, T., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y., 1995. Characteristics of hydrogen production by aciduric enterobacter aerogens Strain HO-39. *J. of Fermentation and Bioengineering.* 80(6): pp. 571-574.
- Yokoi H., Saitsu A. S., Uchida H., Hirose J., Hayashi S., and Takasaki Y., 2001. Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. *J. Biosci Bioeng.* 91: pp. 58-63.
- Yokoi H., Tokushige T., Hirose J., Hayashi S., and Takasaki Y., 1998. H₂ production from starch by mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol Lett.* 20: pp. 143-147.
- Yokoi H., Tokushige T., Hirose J., Hayashi S., and Takasaki Y., 1997. Hydrogen production by immobilized cells of aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *J. Ferment Bioeng.* 83: pp. 481-484.
- Yu, H. Q. and Fang, H. H. P., 2003. Acidogenesis of Gelatin – Rich Wastewater in an Upflow Anaerobic Reactor : Influence of pH and Temperature. *Water Research.* 37: pp. 55-66.
- Yu, H. Q. and Fang, H. H. P., 2001. Acidification of Mid- and high-strength Dairy Wastewaters. *Water Research.* 35(15): pp. 3657-3705.
- Yu, H., Zhu, Z., Hu, W. and Zhang, H., 2002. Hydrogen Production from Rice Winery Wastewater in an Upflow Anaerobic Reactor by Using Mixed Anaerobic Cultures. *International Journal of Hydrogen Energy.* 27: pp. 1359-1365.
- Zhang, T., Liu, H. and Fang, H. H. P., 2003. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic conditions. *J. Environ Manag.* 69: pp. 149-156.