บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อผลิตแก๊สชีวภาพจากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยอาศัยจุลินทรีย์ช่วยในกระบวนการย่อยสลายโมเลกุลของสารอินทรีย์ จากโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นโมเลกุลเล็กในสภาวะที่ไร้อากาศและได้ผลผลิตของแก๊สที่สำคัญได้แก่ มีเทน และไฮโดรเจน ซึ่งมีประโยชน์ในการนำมาใช้เพื่อเป็นพลังงานได้ โดยกระบวนการหมักนี้จะหมักเป็นสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกใช้อุณหภูมิเทอร์โมฟิลิกที่ 55°C เป็นกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศเพื่อผลิตไฮโดรเจนด้วยถังปฏิกรณ์ถังกวนแบบต่อเนื่อง (Continuous Stirred Tank Reactor: CSTR) และขั้นที่สองทดลองที่อุณหภูมิเมโซฟิลิกที่ 35°C เป็นกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศเพื่อผลิตมีเทนด้วยถังปฏิกรณ์แบบท่อไหล (Plug Flow Reactor: PFR) ซึ่งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จำเป็นจะต้องใช้สารอาหารที่เหมาะสมในการเจริญ โดยในกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศในงานวิจัยนี้ใช้การย่อยสลายร่วมของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและสาหร่ายพุงชะโด เพื่อปรับธาตุอาหารให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ และมีการใช้สารละลายด่างในกระบวนการหมักเพื่อปรับบัฟเฟอร์ในระบบ โดยแสดงผังการทดลองดังนี้

ภาพที่ 3.1 แผนผังลำดับการทดลอง

3.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและทางกายภาพของ POME และสาหร่ายพุงชะโด

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและทางกายภาพของ POME และสาหร่ายพุงชะโดเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นก่อนนำไปใช้เป็นซับสเตรตในกระบวนการย่อยสลายไร้อากาศต่อไป โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.1.1 ศึกษาสมบัติน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ตัวอย่างน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากบริษัทปาล์มพัฒนาชายแดนใต้จำกัด อ.หนองจิก จ.ปัตตานี ซึ่งเก็บจากท่อปล่อยน้ำเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์มลงสู่บ่อพักน้ำเสีย น้ำเสียที่ถูกปล่อยออกมาจากท่อจะมีอุณหภูมิสูงประมาณ 80°C ที่เกิดมาจากกระบวนการนึ่ง ลักษณะของน้ำเสียที่สังเกตมีสีน้ำตาลเข้มและข้น ดังแสดงภาพที่ 3.2 จากนั้นเข้าสู่กระบวนการเก็บรักษาโดยเก็บตัวอย่างน้ำเสียไว้ที่ห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการนำมาใช้และตรวจวิเคราะห์ต่อไป POME จะถูกนำมาตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และทางเคมีต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ผลผลิตต่อไป (ตารางที่ 3.1) ได้แก่ pH, Total Solid Content (TSC), Volatile Solid Content (VSC), Ash, Chemical Oxygen Demand (COD), Sulfate content, Total Kjeldahl Nitrogen (TKN), NH_3-N, Alkalinity, Total Phenolic Content, Total Carbohydrate Content, oil and gress และ CHNOS โดยวิธีการวิเคราะห์แสดงรายละเอียดดังภาคผนวก ก

ภาพที่ 3.2 น้ำทิ้งที่เก็บจากท่อปล่อยน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มจากบริษัทปาล์มพัฒนาชายแดนใต้ จำกัด ลงสู่บ่อพักน้ำเสีย

3.1.2 ศึกษาสมบัติสาหร่ายพุงชะโด

นำตัวอย่างสาหร่ายพุงชะโดที่เก็บจากคูน้ำ บริเวณสวนสาธารณะ เทศบาลเมือง จ.ปัตตานี ดังภาพที่ 3.3 ตัวอย่างสาหร่ายถูกนำไปตรวจสอบลักษณะทางสันฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทัศน์สเตอริโอไมโครสโคป (Stereo Microscope) เพื่อยืนยันชนิดของสาหร่ายพุงชะโด โดยวิธีการและผลการตรวจสอบแสดงในภากผนวก ก และ ข ตามลำดับ บริเวณที่เก็บตัวอย่างสาหร่ายพุงชะโดจะพบว่ามีการเจริญของสาหรายพุงชะโดจะลอยตัวกระจายอยู่ ซึ่งสามารถมองเห็นได้บริเวณผิวน้ำในปริมาณมาก ถึงแม้จะมีการจัดการกำจัดโดยการตักออกแต่ก็ยังมีการเจริญเติบโตเป็นจำนวนมากและสามารถมองเห็นได้ทั่วไปบริเวณรอบสวน

การทดลองจะมีการเก็บตัวอย่างสองแบบคือแบบแห้ง และแบบสด การเก็บรักษาแบบแห้งสาหร่ายพุงชะโดจะถูกนำไปตากแดดจนแห้ง บดละเอียด แล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 25 mesh และเก็บลงในกระปุกพลาสติกที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้นและเชื้อรา ส่วนการเก็บรักษาแบบสดตัวอย่างสาหร่ายพุงชะโดที่เก็บมาจะถูกปั่นให้ละเอียดเพื่อให้มีขนาดเล็กลงดังภาพที่ 3.4 แล้วนำมาเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง -20°C สาหร่ายพุงชะโดที่เก็บทั้งแบบแห้งและสดจะถูกนำมาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมี โดยถูกบันทึกข้อมูลในฐานของของแข็งทั้งหมด ของดังตารางที่ 3.1 pH, Total Solid Content (TSC), Volatile Solid Content (VSC), Ash, Chemical Oxygen Demand (COD), Sulfate content, Total Kjeldahl Nitrogen (TKN), NH_3-N, Total Phenolic Content, Total Carbohydrate Content, oil and gress และ CHNOS โดยวิธีการวิเคราะห์แสดงรายละเอียดดังภาคผนวก ก

ภาพที่ 3.3 สาหรายพุงชะโดบริเวณสวนสาธารณะ เทศบาลเมือง จ.ปัตตานี

Prince of Songkla University Pattani Campus

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 3.4 สาหร่ายพุงชะโด (*Ceratophyllum demersum*)

ก สาหร่ายพุงชะโด ข สาหร่ายพุงชะโดสดปั่นละเอียด ข สาหร่ายพุงชะโดแห้งบดละเอียด

ตารางที่ 3.1 สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของน้ำเสียขาออกโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และสาหร่ายพุงชะโด

ปัจจัยทางเคมีและกายภาพ	POME	*C.demersum*	วิธีการวิเคราะห์
pH	√	√	APHA, AWWA and WEF (1998)
Total solid content (TSC)	√	√	APHA, AWWA and WEF (1998)
Volatile solid content (VSC)	√	√	APHA, AWWA and WEF (1998)
Ash			APHA, AWWA and WEF (1998)
Chemical oxygen demand (COD)	√	√	APHA, AWWA and WEF (1999)
Volatile fatty acid (VFA)	√	√	HPLC (Agilent 1100)
Oil and grease	√	√	Soxhlet extraction method
Total Kjeldahl Nitrogen (TKN)	√	√	APHA, AWWA and WEF (1999)
NH_3-N	√	√	APHA, AWWA and WEF (1999)
Total Carbohydrate content	√	√	Calculate by differance
Total phenolic content	√	√	Watermam and mole (1994) Folin-Ciocalteu reagent
Sulfate content	√	√	Turbidimetric method
Alkalinity	√	-	AOAC Official Method 973.43 (1990)
C/N ratio	√	√	C H N S O analyzer

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.2 ศึกษาศักยภาพการผลิตแก๊สไฮโดรเจนและมีเทนจากการย่อยสลายร่วมแบบไร้อากาศ

กระบวนการหมักมีความจำเป็นต้องศึกษาศักยภาพในการผลิตแก๊สของจุลินทรีย์กับซับสเตรตที่ใช้เพื่อดูแนวโน้มในการผลิตแก๊สจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ จากซับสเตรตที่ใช้ในการศึกษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักมีความสำคัญ และเป็นตัวหลักที่ถูกนำมาใช้ระบบการผลิตแก๊สชีวภาพซึ่งจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในกระบวนการหมักมีสองกลุ่มหลักคือ กลุ่มที่ผลิตกรด และกลุ่มที่ผลิตมีเทน ซึ่งโดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อมเชื้อทั้งสองกลุ่มทำหน้าที่ร่วมกันในระบบเดียวกัน แต่สำหรับในการทดลองนี้จะมีการแยกใช้กลุ่มจุลินทรีย์โดยแบ่งออกเป็นสองช่วงคือช่วงแรกเป็นกลุ่มผลิตกรดเป็นช่วงที่มีการผลิตกรดและได้ผลผลิตแก๊สไฮโดรเจนเกิดขึ้นมาอีกด้วย และช่วงที่สองเป็นการใช้เชื้อในกลุ่มที่ผลิตมีเทน โดยทั้งสองกลุ่มจะมีสภาวะสำหรับการเจริญเติบโตแตกต่างกัน

3.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับหมัก

3.2.1.1 กล้าเชื้อเริ่มต้นสำหรับการหมักขั้นตอนแรกเพื่อผลิตไฮโดรเจน

ที่สภาวะเทอร์โมฟิลิก (55°C) เป็นกล้าเชื้อที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน ถูกนำมาจากถังปฏิกรณ์ CSTR ในระดับห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยหน่วยวิจัยการแปรรูปชีวมวลเพื่อพลังงานและเคมีภัณฑ์ (Bio-Mass Conversion to Energy and Chemicals: Bio-MEC Research Unit) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี ถังปฏิกรณ์ CSTR ดังกล่าวได้ถูกใช้สำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากการหมักร่วมระหว่าง POME และซีรัมน้ำยางสกิมที่สภาวะเทอร์โมฟิลิกและควบคุมระยะเวลากักเก็บของของเหลว (HRT) 4.5 วัน ของงานวิจัยก่อนหน้านี้ และมีความจำเป็นที่จะต้องทำให้เชื้อที่ได้มีความคุ้นชิน (Acclimate) กับซับสเตรตที่จะนำมาใช้ในการทดลอง เป็นขั้นตอนสำหรับการทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะและชนิดของซับสเตรตมากขึ้นและมีความสามารถในการย่อยสลายซับสเตรตได้ดียิ่งขึ้น

ขั้นตอนการทำความคุ้นชินของกล้าเชื้อกับซับสเตรต

(1) เติมกล้าเชื้อสำหรับผลิตแก๊สไฮโดรเจนที่ได้จากข้างต้นปริมาตร 18 mL

(2) เติมน้ำเสียขาออกโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อซับสเตรตที่ต้องการให้เชื้อมีการปรับตัวที่ความเข้มข้น 10 g-VS/L

(3) ปรับปริมาตรด้วย BA medium (Angelidaki and Sanders, 2004) ให้ได้ปริมาตรการทำงาน 60 mL วิธีการเตรียม BA medium แสดงในตารางที่ 3.2

(4) นำขวดซีรัมปิดฝาขวดให้สนิท และพ่นแก๊สไนโตรเจนเพื่อแทนที่อากาศที่มีอยู่บริเวณช่องว่างในขวดหมักนาน 3-5 นาที (Kaparaju *et al*., 2009)

(5) ตัวอย่างที่เตรียมได้นำไปบ่มที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 55 ± 3°C ในตู้บ่ม (incubator) ทำการบ่มและเก็บตัวอย่างแก๊สทุกวัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณและความเข้มข้นของแก๊สไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง GC-TCD ซึ่งเมื่อมีการเกิดแก๊สที่เพิ่มขึ้นจนถึงระยะ log phase เป็นช่วงที่แสดงได้ว่าเชื้อสามารถย่อยสลายซับสเตรตได้และจนกระทั่งเริ่ม steady state ที่แสดงถึงการลดลงและหมดไปของซับสเตรตที่ใช้ให้หยุดกระบวนการหมักและสามารถนำเชื้อที่หมักไปเป็นกล้าเชื้อสำหรับการหาศักยภาพของไฮโดรเจนต่อไป

(6) เก็บของเหลวหลังการหมักเพื่อผลิตแก๊สไฮโดรเจนที่อุณหภูมิ -20˚C ก่อนการนำไปใช้เป็นซับสเตรตสำหรับหาศักยภาพการผลิตแก๊สมีเทนต่อไป

ภาพที่ 3.5 ขวดซีรัมบรรจุเชื้อจุลินทรีย์สำหรับผลิตกรด

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบสำหรับเตรียม BA medium ที่ปริมาตรการทำงานรวมรวม 1 L

ที่มา: Angelidaki and Sanders (2004)

Solution	Volume (mL)	Compound and concentatin (g/L)
A	10	NH_4Cl, 100; NaCl, 10; $MgCl_2.6H_2O$, 10; $CaCl_2.2H_2O$, 5
B	2	$K_2HPO_4.3H_2O$, 200
C	1	$C_{12}H_6NO_4Na$, 0.5
D	1	H_3BO_3, 0.05; $ZnCl_2$, 0.05; $CuCl_2.2H_2O$, 0.038; $MnCl_2.4H_2O$, 0.05; $(NH4)_6Mo_7O_{24}.4H2O$, 0.05; $AlCl_3$, 0.05; $CoCl_2.6H_2O$, 0.05; $NiCl_2.6H_2O$, 0.092; EDTA, 0.5; $Na_2SeO_3.5H_2O$, 0.066
$NaHCO_3$	50	$NaHCO_3$, 52
Vitamin	936	Yeast extract, 1.07

3.2.1.2 กล้าเชื้อสำหรับขั้นตอนที่สองเพื่อผลิตมีเทน

จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามาถผลิตมีเทนและเป็นกล้าเชื้อเจริญเติบโตที่สภาวะเมโซฟิลิกที่ช่วงอุณหภูมิห้อง (28-30°C) กล้าเชื้อที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากถังปฏิกรณ์ท่อไหล (Chanel plug flow reactor) ขนาด 2000 m^3 และมี HRT 40-50 วัน ของบริษัท ปาล์มพัฒนาไบโอแก๊ส จำกัด อ.หนองจิก จ.ปัตตานี โดยกล้าเชื้อจะถูกเก็บจากบริเวณจุดดึงตะกอนข้างถังปฏิกรณ์ ลักษณะของเชื้อที่ถูกดึงออกจากบ่อหมักมีลักษณะเป็นสารละลายตะกอนสีดำและมีฟองแก๊สเกิดขึ้น

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตลอด ดังนั้นก่อนนำมาใช้จึงควรนำกล้าเชื้อที่ได้ถูกบ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 วันเพื่อให้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ยังคงเหลืออยู่ในกล้าเชื้อหมดก่อน

ภาพที่ 3.6 จุดดึงตะกอนของถังปฏิกรณ์ Chanel plug flow reactor
บริษัท ปาล์มพัฒนาไบโอแก๊ส จำกัด

3.2.2 ศึกษาศักยภาพการผลิตไฮโดรเจน (BHP) จากการหมักร่วม

(1) นำของผสม POME กับสาหร่ายพุงชะโดโดยแปรผันอัตราส่วน (VS Basis) 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 และ 0:10 เติมในขวดซีรัมขนาด 120 mL (ปริมาตรใช้งาน 60 mL) ให้ได้ความเข้มข้น 10 g-VS/L เติมกล้าเชื้อผลิตไฮโดรเจนเริ่มต้น 18 mL ใช้สารละลายด่างจากเถ้าปาล์มปรับปริมาตรให้ได้ 60 mL ปิดด้วยฝาจุกซิลิโคน และฝาจุกอะลูมิเนียมโดยใช้ Hand crimper เปลี่ยนบรรยากาศภายใน Head space ให้เป็นแก๊สไนโตรเจน โดยพ่นไนโตรเจนผ่านเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 55°C โดยมี Blank และชุด Control ซึ่งใช้สารละลายด่างจากเถ้าปาล์มและกลูโคสแทนซับสเตรตตามลำดับ ในแต่ละชุดการทดลองจะเตรียม 3 ซ้ำ

(2) วิเคราะห์พารามิเตอร์ระหว่างการทดลอง ได้แก่ ปริมาตรแก๊สโดยใช้วิธีการแทนที่น้ำ ส่วนการแยกชนิดและความเข้มข้นของแก๊สที่เกิดขึ้น โดยใช้ GC-TCD

(3) หลังจากการผลิตแก๊สไฮโดรเจนคงที่เก็บตัวอย่างสารละลายไปวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ด้วย HPLC

3.2.3 ศึกษาศักยภาพในการผลิตแก๊สมีเทน (BMP) จากน้ำทิ้งขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจน

(1) ทำการทดลองการผลิตมีเทนจากสารละลายของขั้นตอนการสร้างกรด (ขั้นที่ 3.2.2) ในขวดซีรัมขนาด 120 mL (ปริมาตรใช้งาน 60 mL) โดยเติมน้ำหมักจากขั้นตอนแรก ที่ได้จากการผลิตไฮโดรเจนนำมาใช้เป็นซับสเตรต ของแต่ละชุดการทดลองชุดการหมักเพื่อผลิตมีเทน ใส่ปริมาตร 18 mL ลงในขวดซีรัม จากนั้นเติมกล้าเชื้อสำหรับผลิตมีเทนที่เตรียมไว้ 42 mL เพื่อให้ครบปริมาตรการทำงาน ของแต่ละชุดการทดลอง จากนั้นปิดด้วยฝาจุกซิลิโคน และฝาจุกอะลูมิเนียมโดยใช้ Hand crimper เปลี่ยนบรรยากาศภายใน Head space ให้เป็นสภาวะไร้อากาศ โดยการเติมไนโตรเจนผ่าน

เข้าไปในขวดหมักบริเวณที่มีอากาศอยู่เพื่อไล่อากาศออกเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (35°C) โดยมี Blank และ Control ใช้น้ำหมักจากขั้นตอนแรกที่ผลิตไฮโดรเจน แทนซับสเตรตในแต่ละชุดการทดลองจะเตรียม 3 ซ้ำ

(2) ทำการวิเคราะห์ปริมาตรแก๊สโดยใช้วิธีการแทนที่น้ำชนิดและความเข้มข้นของแก๊สที่เกิดขึ้นโดยใช้ GC-TCD

(3) หลังจากการผลิตแก๊สมีเทนคงที่เก็บตัวอย่างสารละลายไปวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ด้วย HPLC

ภาพที่ 3.7 ขวดซีรัมบรรจุเชื้อจุลินทรีย์สำหรับผลิตมีเทน

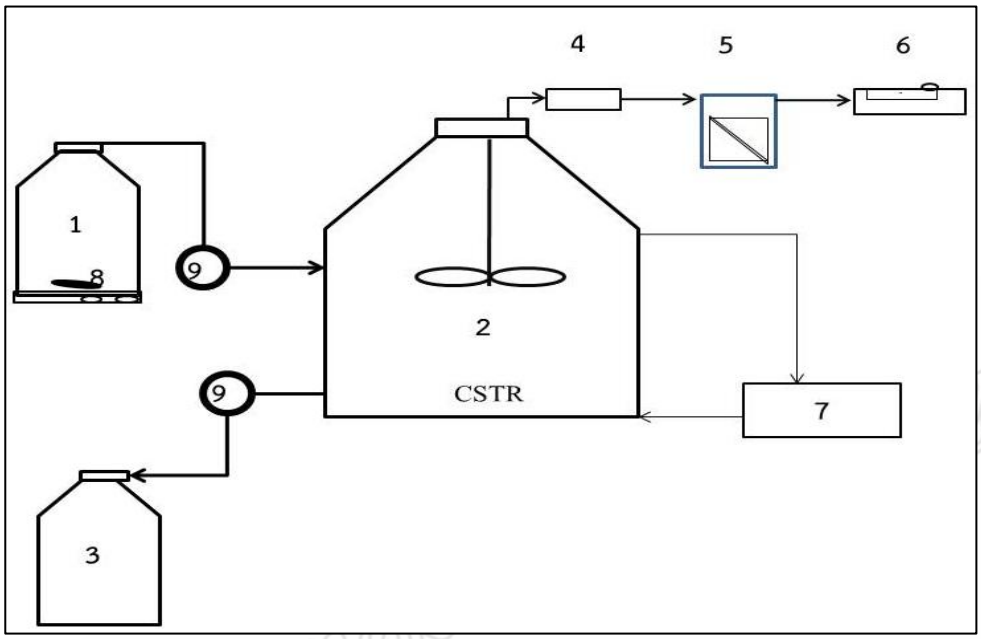
3.3 การศึกษาการย่อยสลายแบบป้อนต่อเนื่องสองขั้นตอนด้วยถังปฏิกรณ์ CSTR และ PFR

เป็นกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศที่มีการป้อนซับสเตรตอย่างต่อเนื่องเข้าสู่ระบบซึ่งประกอบด้วยสองขั้นตอน ด้วยถังปฏิกรณ์ CSTR และ PFR โดยขั้นตอนแรกทำการป้อนซับสเตรตอย่างต่อเนื่องเข้าสู่ระบบของถังปฏิกรณ์ CSTR ด้วยเป็นกระบวนการสำหรับผลิตไฮโดรเจน จากนั้นจึงนำน้ำเสียขาออกของระบบถังปฏิกรณ์ CSTR มาใช้เป็นซับสเตรตในขั้นตอนที่สองโดยป้อนเข้าสู่ระบบถังปฏิกรณ์ PFR เพื่อผลิตมีเทนต่อไป และศึกษาการผลิตแก๊สที่มีระยะเวลาการกักเก็บของเหลวต่าง ๆ กันในระบบของกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศสองขั้นตอนทั้งสำหรับการผลิตไฮโดรเจนและมีเทน

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.1 ศึกษาการผลิตแก๊สไฮโดรเจนแบบป้อนต่อเนื่องด้วย POME และสาหร่ายพุงชะโด

3.3.1.1 การออกแบบระบบถังปฏิกรณ์ CSTR แบบต่อเนื่อง



ภาพที่ 3.8 ระบบสำหรับกระบวนการย่อยสลายขั้นตอนแรกเพื่อผลิตไฮโดรเจนด้วยถังปฏิกรณ์ CSTR

อุปกรณ์ในการใช้ประกอบระบบหมักสำหรับผลิตไฮโดรเจน

ลำดับ	อุปกรณ์	ลำดับ	อุปกรณ์
1	POME Feed tank	6	Gas meter
2	CSTR	7	Hot water circulation bath
3	Effluent tank	8	Magnetic Bar
4	Gas sampling port	9	Peristaltic pump
5	Gas counter		

3.3.1.2 การทดลอง

(1) นำกล้าเชื้อซึ่งได้จากถังปฏิกรณ์ CSTR (ปริมาตรการใช้งาน 1.35 L) สำหรับการผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมักร่วมระหว่าง POME และซีรัมน้ำยางสกิมที่สภาวะเทอร์โมฟิลิกและควบคุมระยะเวลากักเก็บน้ำ (HRT) 4.5 วัน ปริมาตร 2 L เติมในถังปฏิกรณ์ CSTR ขนาด 10 L (ปริมาตรใช้งาน 7 L) เทียบเป็นร้อยละ 30 ของปริมาตรใช้งานทั้งหมด ควบคุมอุณหภูมิภายในถังปฏิกรณ์ที่ 55°C โดยใช้น้ำร้อนจาก Water Bath ไหลผ่านระบบ Jacket ของถังปฏิกรณ์จากนั้นจึงเติม POME ไปในวันถัดไปวันละ 1 L จนครบปริมาตรการทำงานโดยไม่มีการวัดแก๊ส เมื่อครบปริมาตรการทำงานโดยจะป้อนด้วย POME ผสมกับสารละลาย Basic Anaerobic (BA) ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ผลิตไฮโดรเจนโดยใช้สารละลาย $NaHCO_3$ (2.5-5 $g/L_{substrate}$) เพื่อเป็น

บัพเฟอร์ให้กับน้ำหมักในเครื่องปฏิกรณ์ CSTR ที่อัตราการไหลเริ่มต้นเทียบเท่าระยะเวลาเก็บกักน้ำ (HRT) 7 วันติดตามอัตราการผลิตแก๊สโดยใช้เครื่องวัดปริมาตรแก๊สแบบแทนที่น้ำและความเข้มข้นของแก๊สไฮโดรเจนทุก ๆ 1-3 วัน โดยใช้ GC-TCD

(2) เมื่ออัตราการการผลิตแก๊สคงที่ เปลี่ยนสารป้อนเป็น POME ผสมเถ้าปาล์ม (50 g/L-POME) โดยยังควบคุมอัตราการไหลเริ่มต้นเทียบเท่า (HRT) 7 วัน เมื่อถังปฏิกรณ์เข้าสู่สภาวะคงตัวซึ่งสามารถตรวจสอบจากการเบี่ยงเบนของอัตราการผลิตแก๊สไฮโดรเจนควบคู่กับค่า VS ขาออกไม่เกินร้อยละ 10 (Chang and Lin, 2004; Reungsang *et al*, 2013) ให้คงอัตราการการป้อนไว้เป็นเวลาประมาณ 10 วัน

(3) เริ่มการหมักร่วมโดยการผสมสาหร่ายพุงชะโดประมาณร้อยละ 5 (VS Basis) กับ POME ที่มีเถ้าปาล์มละลาย (50 g/L-POME) โดยยังควบคุมอัตราการไหลเข้าเทียบเท่า (HRT) 7 วัน

(4) เมื่อระบบเข้าสู่สภาวะคงตัวจึงเริ่มเปลี่ยนอัตราการไหลเข้าของซับสเตรตเทียบเท่า HRT เป็น 5 วัน โดยที่ความเข้มข้นของสาหร่ายยังคงเท่าเดิมที่ร้อยละ 5 (VS Basis)

(5) เมื่อถังปฏิกรณ์เข้าสู่สภาวะคงตัวเพิ่มความเข้มข้นของสาหร่ายพุงชะโดเป็นร้อยละ 30 (VS Basis) โดยยังคงอัตราการไหลเข้าของซับสเตรตเทียบเท่า HRT เป็น 5 วันเพื่อทดสอบสมรรถนะของถังปฏิกรณ์เมื่อความเข้มข้นของสาหร่ายเพิ่มสูงขึ้นฉับพลัน

(6) ปรับลดความเข้มข้นของสาหร่ายพุงชะเป็นร้อยละ 10 (VS Basis) และ คงอัตราการไหลเข้าของซับสเตรตเทียบเท่า HRT เป็น 5 วัน

(7) เพิ่มอัตราการไหลเข้าของซับสเตรตเทียบเท่า HRT 4 วันและคงความเข้มข้นของสาหร่ายพุงชะเป็นร้อยละ 10 (VS Basis)

3.3.1.3 การวิเคราะห์

(1) วิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สโดยใช้เครื่อง GC-TCD

(2) วิเคราะห์สมบัติสมบัติทางกายภาพและทางเคมี (COD, SO_4^{2-}, TKN, TS, VS, pH, และ Alkalinity) ของน้ำหมักขาออกที่สภาวะคงตัวซึ่งสามารถตรวจสอบจากการเบี่ยงเบนของอัตราการผลิตแก๊สควบคู่กับค่า VS ขาออกไม่เกินร้อยละ 10 (Chang and Lin, 2004; Reungsang *et al*, 2013)

(3) วิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยวิธี denaturing gradient gel electrophoresis (PCR- DGGE) ในสลัดจ์ โดยตัวอย่างจะถูกส่งตรวจวิเคราะห์ที่มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 3.3 การเตรียมซับสเตรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ POME กับ สาหร่าย และการใช้สารละลาย BA โซเดียมไบคาร์บอเนต และเถ้า ปรับความเป็นบัฟเฟอร์ในระบบของถังปฏิกรณ์ CSTR ที่ HRT 7, 5, 4, 3, 2 และ 1 วัน

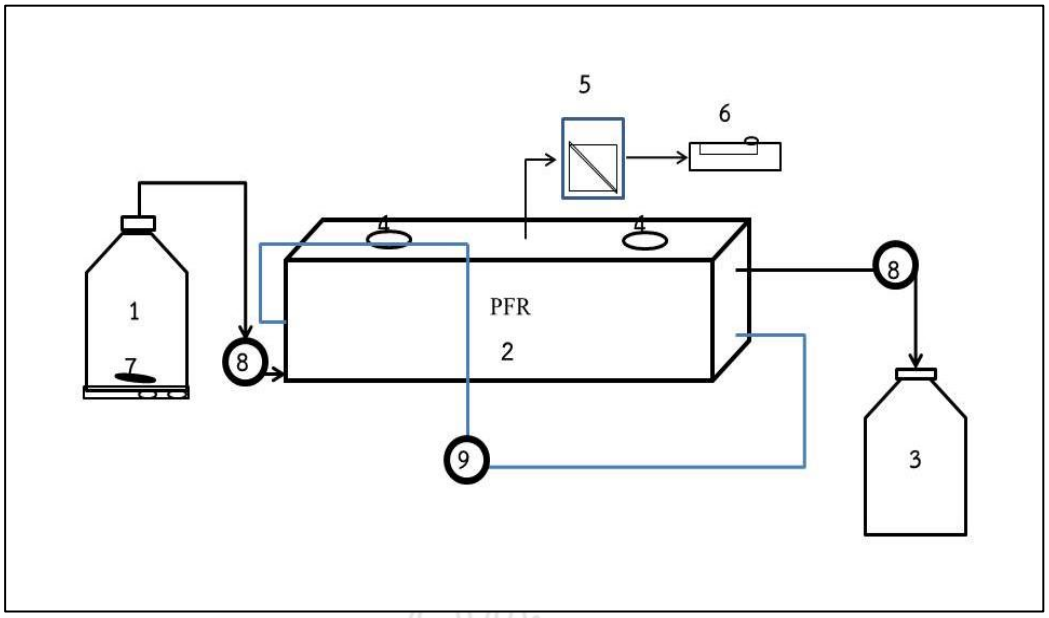
HRT (Day)	Ratio of substrate	buffer
7	50%POME+50%BA	$NaHCO_3$
	POME	$NaHCO_3$
	POME	Ash
	POME+ *C.demersum* 5%	Ash
5	POME+ *C.demersum* 5%	Ash
	POME+ *C.demersum* 30%	Ash
	POME+ *C.demersum* 10%	Ash
4	POME+ *C.demersum* 10%	Ash
3	POME+ *C.demersum* 10%	Ash
2	POME+ *C.demersum* 10%	Ash
1	POME+ *C.demersum* 10%	Ash

ภาพที่ 3.9 ระบบถังปฏิกรณ์ CSTR สำหรับผลิตไฮโดรเจน

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.2 ศึกษาการผลิตแก๊สมีเทนแบบป้อนต่อเนื่องด้วยน้ำทิ้งจากขั้นตอนผลิตไฮโดรเจน

3.3.2.1 การออกแบบระบบถังปฏิกรณ์ PFR แบบต่อเนื่อง



ภาพที่ 3.10 ระบบสำหรับกระบวนการย่อยสลายขั้นที่สองเพื่อผลิตมีเทนด้วยถังปฏิกรณ์ PFR

อุปกรณ์ในการใช้ประกอบระบบหมักสำหรับผลิตมีเทน

ลำดับ	อุปกรณ์	ลำดับ	อุปกรณ์
1	Substrate feed tank	6	Gas meter
2	PFR	7	Magnetic Bar
3	Effluent tank	8	Peristaltic pump
4	Gas sampling port	9	Circulation
5	Gas counter		

3.3.2.2 การทดลอง

(1) ทดลองด้วยถังปฏิกรณ์ Plug flow Reactor (PFR) ขนาดประมาณ 43 ลิตร (60 cm (ยาว) x 30 (กว้าง) cm x 24 (สูง) cm) (ปริมาตรใช้งาน 29 ลิตร) เริ่มต้นระบบโดยการเติมกล้าเชื้อที่ได้จากระบบผลิตแก๊สชีวภาพชนิด H-CSTR บริษัท ปาล์มพัฒนาชายแดนใต้ อ.หนองจิก จ.ปัตตานี เทียบเป็นร้อยละ 75 ของปริมาตรใช้งานทั้งหมด และเติมน้ำหมักจากขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจนที่สภาวะ HRT 7 วันจนถึงปริมาตรการทำงาน

(2) ปล่อยให้กล้าเชื้อปรับสภาพในช่วง 22 วันแรก โดยไม่มีการเติมซับสเตรต การทดลองพบว่า 7 วันหลังของการทดลองนี้เชื้อเริ่มมีการผลิตแก๊สเกิดขึ้นและ pH ที่เข้าสู่สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ ในวันถัดมาเติม POME ให้ได้ปริมาตร 29 ลิตร ติดตามอัตรา

Prince of Songkla Pattani Campus

การผลิตแก๊สโดยใช้เครื่องวัดปริมาตรแก๊สแบบแทนที่น้ำและความเข้มข้นของแก๊สมีเทนทุกวันโดยใช้ GC-TCD

(3) เมื่ออัตราการการผลิตแก๊สคงที่ เริ่มป้อนน้ำหมักจากขั้นตอนผลิตไฮโดรเจนที่สภาวะ HRT 7 วัน และ 5 วัน ตามลำดับเข้าถังปฏิกรณ์ที่อัตราการไหลเทียบเท่า HRT 52.5, 40 และ 30 วัน

3.3.2.3 การวิเคราะห์

(1) ตรวจสอบสมรรถนะของถังปฏิกรณ์โดยวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สโดยใช้เครื่อง GC-TCD และวัดปริมาตรแก๊สโดยวิธีแทนที่น้ำ

(2) วิเคราะห์สมบัติ (ความเข้มข้นและชนิดของกรดอินทรีย์ระเหยได้ด้วย HPLC, COD, SO_4^{2-}, TKN, TS, VS, pH, และ Alkalinity) ของน้ำหมักขาออกที่สภาวะคงตัวซึ่งสามารถตรวจสอบจากการเบี่ยงเบนของอัตราการผลิตแก๊สควบคู่กับค่า VS ขาออกไม่เกินร้อยละ 10 (Chang and Lin, 2004; Reungsang *et al.*, 2013)

(3) วิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยวิธี denaturing gradient gel electrophoresis (PCR- DGGE) ในสลัดจ์

ภาพที่ 3.11 ระบบถังปฏิกรณ์ PFR สำหรับผลิตมีเทน

ตารางที่ 3.4 สภาวะและปัจจัยที่ควบคุมของกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องด้วยถังปฏิกรณ์ CSTR และ PFR

Parameter	CSTR	PFR
Total volume (L)	10	43
Working volume (L)	7	29
Inocculume volume (L)	2.1	20.3
Temperature (^{o}C)	55±1	31±4
HRT (day)	7, 5, 4, 3, 2 and 1	52.5, 40 and 30

3.3.3 สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

ตารางที่ 3.5 สารเคมี ที่ใช้ในการทดลอง

Chemical		
$K_2Cr_2O_7$	Acetic	Propionic
H_2SO_4	Lactic	Phenol
$HgSO_4$	Butyric	Na_2CO_3
$(NH_4)_2SO_4$	H_3BO_3	$CuSO_4.5H_20$
$FeSO_4.6H_2O$	NaOH	K_2SO_4
$AgSO_4$	Methyl red	Bromoglyceral

ตารางที่ 3.6 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

Equipment		
Buret	Soxhlet extraction	pH meter
Beaker	Volumetric flask	Balance
Desiccators	Rotary evaporator	Oven
Pipette	Stirring rod	Muffle Furnace
Crucible	Filter paper	Gas Chromatography (GC)
Test tube	Glass funnel	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
Ground glass, Erlenmayer flask Round bottom flask	Syringe filter Vail Cellulose thimble	Spectrophotometer Hot plate Kjeldahl Distillation and Digestion

Prince of Songkla University Pattani Campus