บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

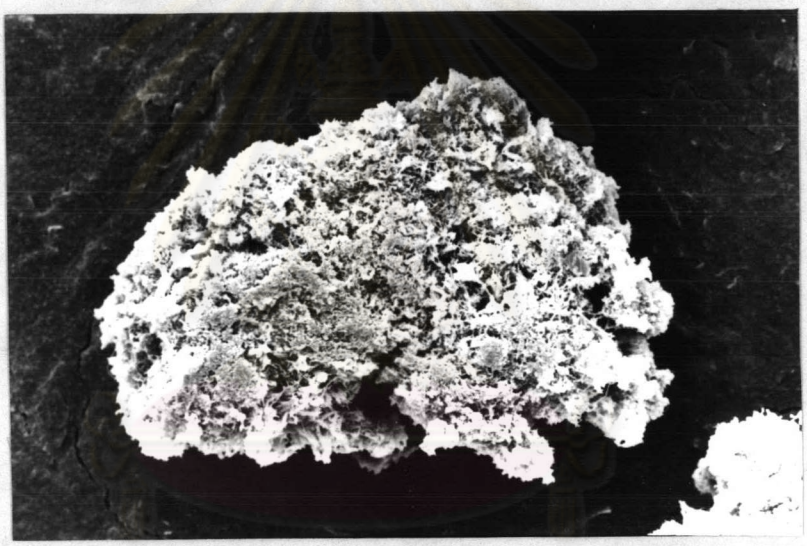
4.1 สมบัติทางกายภาพของกากตะกอน

กากตะกอนในการทำการวิจัยเป็นกากตะกอนที่ได้รับมาจากเครื่องปฏิกรณ์ในการบำบัดน้ำเสียแบบ Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) ของโรงงานอุตสาหกรรมนมในประเทศญี่ปุ่น มีลักษณะเป็นเม็ดกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3.5 มิลลิเมตร เปลือกภายนอกสีขาวครีม ภายในมีสีดำ

4.2 การตรวจลักษณะภายนอกของกากตะกอนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope)

นำกากตะกอนที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมนม ไปตรวจโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 กากตะกอนที่ได้มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (Self Immobilized) (Thiele, Wu, และ Jain, 1990) ของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ

จากรูปยังสังเกตุพบว่ากากตะกอนมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนซึ่งยึดกันโดยสารพวกโพลีแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดปล่อยออกมาใช้ในการเชื่อมระหว่างเซลล์ เพื่อประโยชน์ในการส่งเสริมความแข็งแรงของโครงสร้างกากตะกอน (Harada, 1990) โดยที่ส่วนนอกของกากตะกอนเป็นไฮโดรไลติคแบคทีเรีย ส่วนภายในเป็นเมธาโนเจนหรืออะซิโตเจน และมีรูเล็กๆมากมายบนผิวของกากตะกอนสำหรับนำซับสเทรตในรูปที่สามารถละลายได้ (dissolved substrate) หรือซับสเทรตที่อยู่ในรูปแก๊ส (gaseous substrate) เข้าสู่ส่วนในของกากตะกอนเพื่อลดการจำกัดการถ่ายทอดมวล (mass transfer limitation) (Thiele และคณะ, 1988)



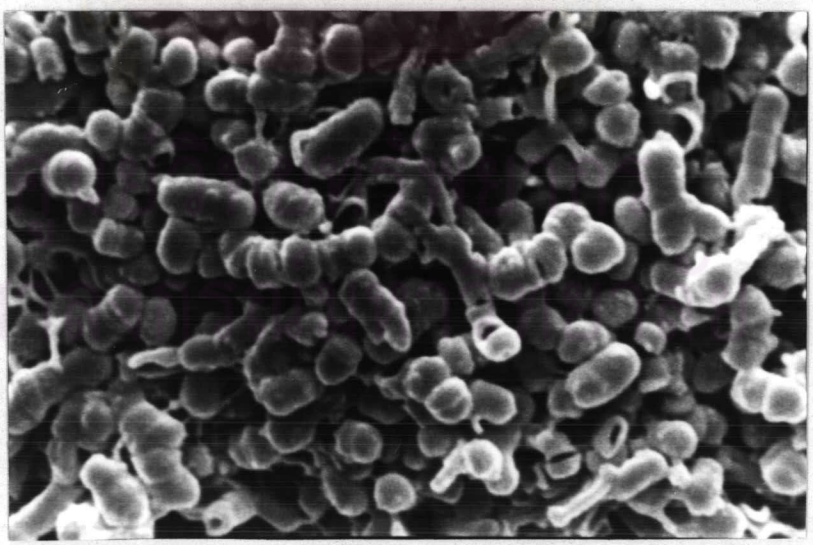
50μ

รูปที่ 4.1 ลักษณะภายนอกของกากตะกอนเมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน กำลังขยาย 350 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5μ

รูปที่ 4.2 แบคทีเรียลักษณะเป็นสายซึ่งคาดว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Methanothrix* ที่พบเมื่อศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนกำลังขยายเท่า 3,500 เท่า



1μ

รูปที่ 4.3 แบคทีเรียที่ผิวของกากตะกอนเมื่อศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนกำลังขยาย 10,000 เท่า

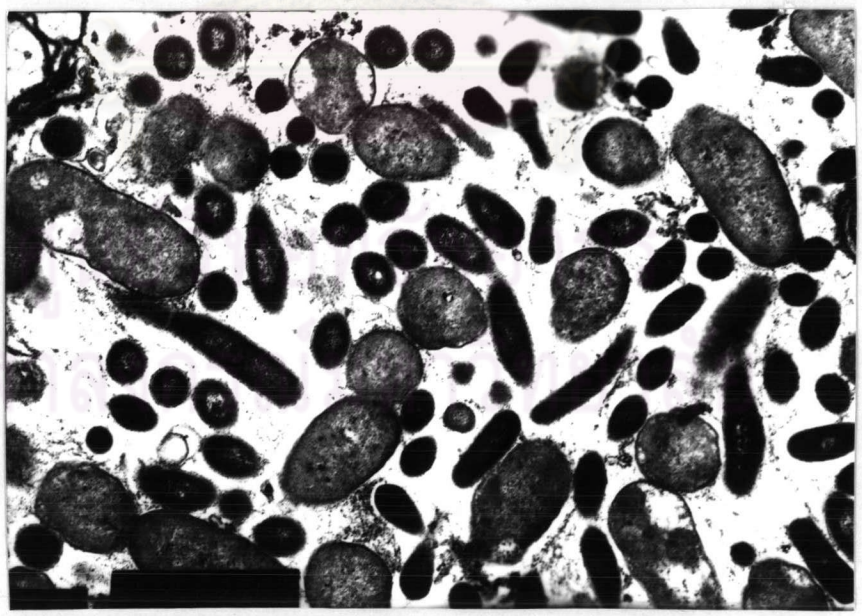
4.3 การตรวจลักษณะภายในของกากตะกอนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบผ่านตลอด(Transmission Electron Microscope)

นำกากตะกอนที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมนมไปศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบผ่านตลอด ผลแสดงดังรูปที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าภายในกากตะกอนประกอบด้วยแบคทีเรียที่มีรูปร่างแตกต่างกัน บางส่วนอยู่อย่างหนาแน่นมากบางส่วนหนาแน่นน้อย ซึ่งในการทดลองขั้นต่อไปจะแยกแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนและเมธาโนเจนออกมาโดยใช้ซับสเทรตเป็นตัวคัดเลือก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 µm

รูปที่ 4.4 ลักษณะของแบคทีเรียที่พบเมื่อศึกษากากตะกอนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบผ่านตลอดกำลังขยาย 7,000 เท่า



1 µm

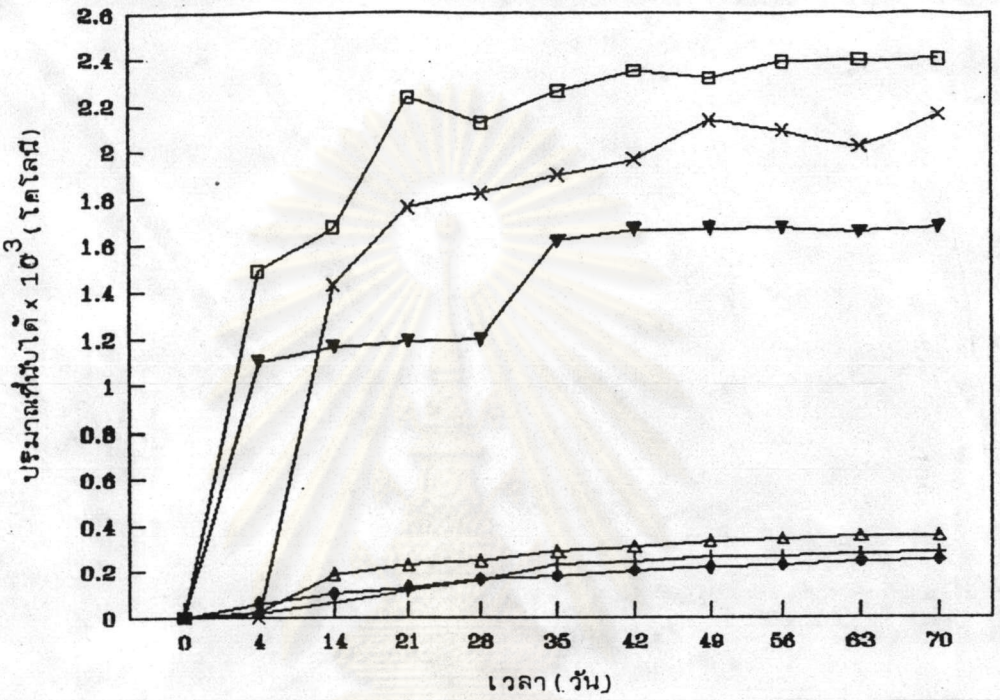
รูปที่ 4.5 ลักษณะของแบคทีเรียที่พบเมื่อศึกษากากตะกอนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบผ่านตลอดกำลังขยาย 14,000 เท่า

4.4 การนับปริมาณแบคทีเรียที่นับได้(TOTAL BACTERIAL COUNT)ของเชื้อผสมตามธรรมชาติจากกากตะกอนในซับสเทรตชนิดต่างๆ

ผลจากการนำเชื้อจากกากตะกอนไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพื้นฐานที่ความเจือจาง 10^{-2} โดยใช้ซับสเทรตชนิดต่างๆ ดังกราฟรูปที่ 4.6 (ตารางที่ 4.1) ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบปริมาณที่นับได้ของเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆและบ่มไว้ที่ 37°C

ตารางที่ 4.1 ปริมาณที่นับได้โดยเฉลี่ยของเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆและบ่มไว้ที่ 37°C

เวลา (วัน)	ปริมาณที่นับได้ (โคโลนี)					
	กรดแลคติค 20mM	เมธานอล 20mM	กรดฟอร์มิค 20mM	กรดอะซิติค 20mM	$H_2:CO_2$ (80:20)	โพรพิโอนิค 20mM
0	0	0	0	0	0	0
4	1489	25	18	60	0	1100
14	1675	186	62	101	1434	1165
21	2233	228	117	128	1762	1187
28	2127	247	164	166	1821	1196
35	2263	286	233	180	1898	1617
42	2349	307	244	201	1967	1668
49	2313	330	266	217	2132	1668
56	2388	341	266	227	2089	1672
63	2392	353	276	243	2021	1655
70	2398	355	2835	249	2158	1676



รูปที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณที่นับได้ของเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆและบ่มไว้ที่ 37°C

- □ กรดแลคติค
- × ไฮโดรเจน:คาร์บอนไดออกไซด์ (80:20)
- ▼ กรดโพรพิโอนิค
- △ เมธานอล
- \+ กรดฟอร์มิค
- ◆ กรดอะซิติค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณที่นับได้ของเชื้อแบคทีเรียจากกากตะกอน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐานที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆ เรียงจากมากไปหาน้อย คือ กรดแลคติค, $H_2:CO_2$ (80:20), กรดโพรพิโอนิค, เมธานอล, กรดฟอร์มิค และกรดอะซิติค ตามลำดับ

พบว่าในช่วง 14 วันแรก มีโคโลนีเกิดจำนวนมากและเมื่อพิจารณาซับสเทรตของเมธาโนเจน 4 ชนิด คือ $H_2:CO_2$ (80:20), เมธานอล, กรดฟอร์มิค และกรดอะซิติค พบว่าในอาหาร $H_2:CO_2$ (80:20) มีจำนวนโคโลนีมากที่สุดเป็นเพราะเมธาโนเจนที่ใช้ไฮโดรเจน (Hydrogenotrophic Methanogen) นั้นใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling Time) สั้นที่สุด จึงทำให้สามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วและมีการพบเมธาโนเจนกลุ่มนี้มากในสภาพไร้อากาศ (Zeikus, 1977) นอกจากนี้ยังพบว่ามีเมธาโนเจนที่ใช้กรดฟอร์มิคและเมธานอลอยู่บ้าง สำหรับในซับสเทรตอะซิติคนั้นพบว่ามีจำนวนโคโลนีของเมธาโนเจนน้อยที่สุดเพราะเมธาโนเจนที่ใช้กรดอะซิติค (Acetrotrophic Methanogen) เป็นเมธาโนเจนที่เจริญได้ช้ามาก (Khan และ Trottier, 1978) ดังนั้นเวลาของการบ่มอาจเป็นตัวจำกัดจำนวนโคโลนี

สำหรับในอาหารที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิคและกรดแลคติคนั้น พบว่าจำนวนโคโลนีมาก คาดว่าโคโลนีที่เกิดเป็นผลรวมของแบคทีเรียสองกลุ่มคือ อะซิโตเจนและเมธาโนเจน และพบว่าจำนวนโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้จำนวนโคโลนีมากกว่าการเติมกรดโพรพิโอนิค ซึ่งเป็นเพราะความยากง่ายในการดึงซับสเทรตไปใช้ กล่าวคือในการเริ่มเกิดการย่อยสลายกรดโพรพิโอนิคในสภาวะมาตรฐานต้องการพลังงานถึง 76 KJ/mol ซึ่งนับเป็นพลังงานที่สูงมาก (Lun และ Cheng, 1992) แต่จากผลการทดลองพบว่าการใช้วิธีนี้ค่อนข้างเป็นวิธีสุ่ม กล่าวคือในที่นี้ทำการทดลอง 6 ซ้ำ สามารถดึงค่าที่ใกล้กันออกมาได้ 3 ค่า 3 ค่าที่เหลือไม่สูงมากก็ต่ำมาก เป็นไปได้ว่าในการดึงเชื้อมาจากตัวอย่างในแต่ละครั้งได้ปริมาณเชื้อมามากน้อยแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแนวโน้มของกราฟคือการที่จำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่ม ซึ่งการใช้วิธีเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งนี้น่าจะใช้เพื่อเป็นการดูลักษณะโคโลนีและทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ มากกว่าที่จะนำมาพิจารณาอย่างจริงจังถึงปริมาณของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆจากกากตะกอนหรือปริมาณของมีเธนที่เกิด ทั้งนี้เมื่อดูผลการวิจัยของ Labat และGarcia (1986) แสดงให้เห็นว่าปริมาณที่นับได้ของแบคทีเรียบน

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนั้นไม่สัมพันธ์กับปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้น

4.5 การวัดค่าความขุ่น (OPTICAL DENSITY) ของเชื้อผสมตามธรรมชาติจากกากตะกอนในซับสเทรตชนิดต่างๆ

จากการวัดค่าความขุ่นของเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆเพื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อผสม พบว่าค่าความขุ่นที่ได้ให้ผลไม่แน่นอนจึงไม่สามารถแสดงข้อมูลได้ ทั้งนี้เป็นเพราะ

4.5.1 จากการวัดในระบบปิด ทำให้ต้องใช้หลอดเลี้ยงเชื้อในการวัด ดังนั้นความผิดพลาดจึงมาจาก การที่เนื้อแก้วของหลอดมีความหนาบางไม่สม่ำเสมอเท่ากันในทุกหลอด จึงไม่สามารถนำผลมาใช้ในการอ้างอิงได้

4.5.2 การเจริญของเมธาโนเจน จะเกิดแก๊สมีเธนเป็นหลักโดยจะเกิดเป็นเซลล์เพียง 5% ของซับสเทรตที่เป็นสารประกอบคาร์บอน จึงเห็นได้ว่าค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำมาก ทำให้การวัดค่าความขุ่นที่เปลี่ยนแปลงเห็นได้ไม่ชัดเจน

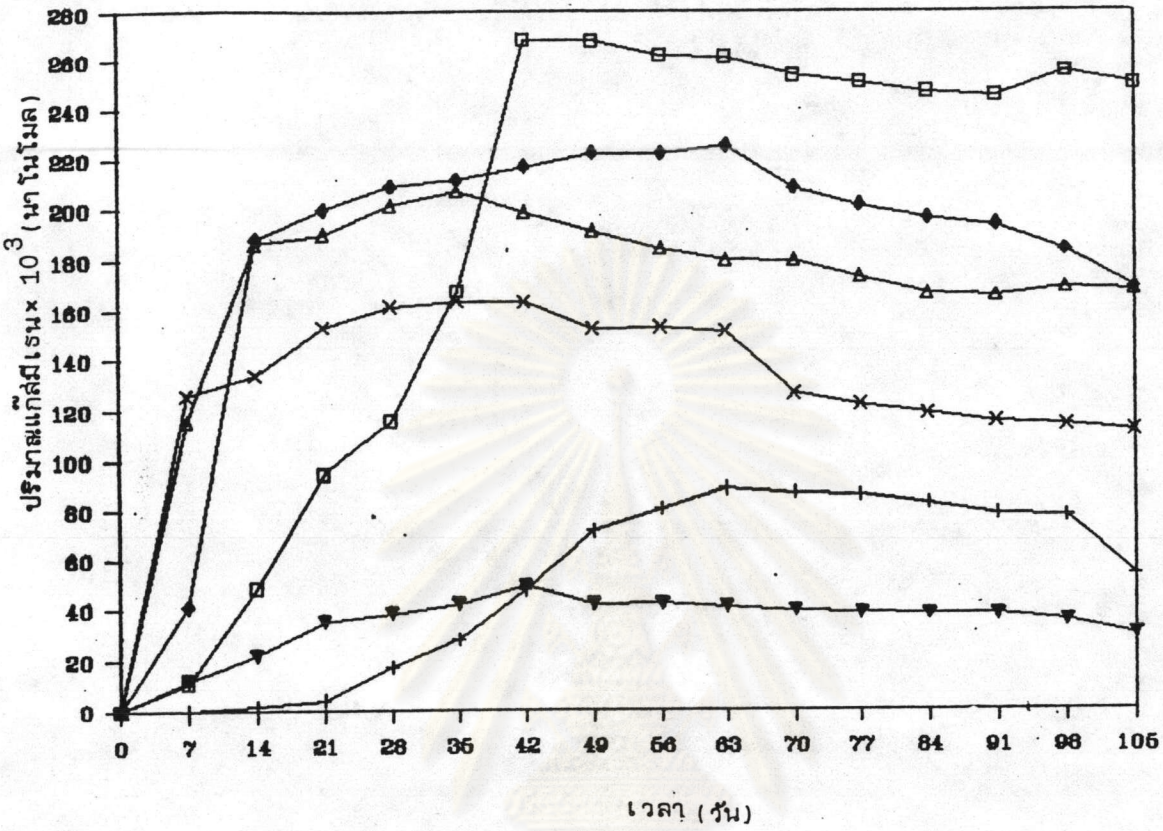
จากปัจจัยดังกล่าวเหล่านี้จึงไม่ควรนำการวัดความขุ่นของซับสเทรตมาใช้ในการอ้างอิงถึงการเจริญของเชื้อผสม

4.6 ผลของเชื้อผสมตามธรรมชาติจากกากตะกอนในการผลิตมีเธนจากซับสเทรตชนิดต่างๆ

ผลจากการหาปริมาณแก๊สมีเธนของเชื้อผสมตามธรรมชาติในซับสเทรตชนิดต่างๆดังกราฟรูปที่ 4.7 (ตารางที่ 4.2) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณมีเธนของเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตให้ได้ความเข้มข้น 20 mM และบ่มไว้ที่ 37°C

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแก๊สมีเธนที่ผลิตโดยเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมซับสเทรตในน้ำเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้น20mM และบ่มไว้ที่ 37°C (pH_b, pH_a = ค่าความเป็นกรดด่างก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ)

เวลา (วัน)	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)					
	กรดแลคติค 20mM	เมธานอล 20mM	กรดฟอร์มิค 20mM	กรดอะซิติค 20mM	$H_2:CO_2$ 80:20	โพรพิโอนิค 20mM
7	10.95	115.27	0	41.15	125.68	12.04
14	48.48	186.72	1.47	188.41	133.69	21.85
21	94.34	190.31	3.92	200.23	153.04	35.10
28	115.16	201.81	17.00	209.33	161.43	38.31
35	167.53	207.32	28.01	211.84	163.50	42.13
42	268.09	198.98	47.69	217.29	163.17	49.16
49	267.87	191.42	71.23	222.47	152.06	42.07
56	261.72	184.37	80.06	222.25	152.71	42.35
63	261.05	179.85	88.51	225.47	151.24	41.04
70	253.96	179.49	86.66	208.52	126.11	39.40
77	251.03	172.98	85.89	201.43	121.64	38.59
84	247.21	166.34	82.24	196.47	117.99	38.20
91	245.58	165.41	78.21	193.42	114.50	38.09
98	255.11	168.57	77.23	183.77	113.14	35.26
105	250.16	167.48	53.90	168.40	110.74	29.76
pH_b	6.82	7.20	6.94	6.97	7.40	6.58
pH_a	6.80	7.18	6.96	6.95	7.39	6.63



รูปที่ 4.7 ปริมาณมีเธนของเชื้อผสมตามธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตให้ได้ความเข้มข้น 20 mM และบ่มไว้ที่ 37°C

- □ กรดแลคติค
- × ไฮโดรเจน:คาร์บอนไดออกไซด์ (80:20)
- ▼ กรดโพรพิโอนิค
- △ เมธานอล
- \+ กรดฟอร์มิค
- ◆ กรดอะซิติค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พบว่ากระบวนการเกิดแก๊สมีเธนจะเกิดร่วมกับการย่อยสลายสารอินทรีย์ ดังนั้นจึงใช้ปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิด เป็นดรรชนีแสดงความสัมพันธ์กับการเจริญของเมธาโนเจนในซับสเทรตชนิดต่างๆ (Zeikus, 1977) ในที่นี้จะแยกพิจารณาเป็น 2 ส่วนจากกราฟในรูปที่ 4.7

5.1 <u>ความสามารถในการใช้ซับสเทรต</u>

เชื้อมีความสามารถในการใช้ซับสเทรตได้เร็วเพียงใด สามารถพิจารณาได้จากความชันของกราฟ โดยพบว่าอัตราของการใช้ซับสเทรตเรียงจากมากไปหาน้อยคือ $H_2:CO_2$ (80:20), เมธานอล, กรดอะซิติค, กรดแลคติค, กรดโพรพิโอนิค และกรดฟอร์มิคตามลำดับ ซึ่งการที่ใช้ $H_2:CO_2$ ได้เร็วที่สุดเนื่องมาจากว่าเมธาโนเจนทุกตัวสามารถใช้ซับสเทรตชนิดนี้ในการเกิดมีเธน และสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ได้ทันที (Zeikus, 1977) จึงเกิดมีเธนได้เร็วกว่าการใช้ซับสเทรตชนิดอื่น แต่เมื่อผ่านไประยะหนึ่งอัตราการเกิดแก๊สมีเธนจะน้อยมาก ซึ่งอาจเป็นเพราะการจำกัดซับสเทรต ถ้ามีการเติมซับสเทรตอาจทำให้ปริมาณแก๊สมีเธนสูงกว่าค่าที่ได้

ซับสเทรตชนิดต่อมาคือ เมธานอล เมธาโนเจนบางตัวสามารถใช้เมธานอลได้ทันที โดยเมธานอลบางโมเลกุลทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเลคตรอน (Electron Donor) บางตัวเป็นตัวรับอิเลคตรอน (Electron acceptor) (Brock, 1991) แต่เมธาโนเจนบางตัวต้องเปลี่ยนเมธานอลให้เป็น H_2+CO_2 ก่อนจึงนำไปใช้ได้ (Banat, Nedwell และ Balba, 1983) ดังนั้นการใช้เมธานอลจึงช้ากว่า $H_2:CO_2$

ซับสเทรตชนิดต่อมาคือ กรดอะซิติค เป็นซับสเทรตโดยตรงของเมธาโนเจนเช่นเดียวกับ $H_2:CO_2$ และเมธานอล (Bryant, 1979) แต่พบว่าอัตราการเกิดแก๊สมีเธนจากกรดอะซิติคนั้นช้ากว่า $H_2:CO_2$ หรือเมธานอล ทั้งนี้เนื่องมาจากเมื่อพิจารณาค่า Gibb's free energy ของซับสเทรตทั้งหมดจะเห็นได้ชัดขึ้น ดังนี้

$$CH_3COO^- + H_2O \longrightarrow CH_4 + HCO_3^- \qquad -31 \text{ KJ/mol}$$

(Khan และ Trottier, 1978)

$$4H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O \qquad -135 \text{ KJ/mol}$$

(Karhadkar และคณะ, 1987)

$$4CH_3OH \longrightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O \qquad -112.5 \text{ KJ/mol}$$

(Brock, 1991)

สำหรับกรดแลคติค และกรดโพรพิโอนิคนั้น เมธาโนเจนไม่สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงต้องอาศัยแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนทำการย่อยสลายเพื่อให้ได้ซับสเทรตของเมธาโนเจน จึงต้องใช้เวลาในการย่อยสลายทำให้การเกิดมีเธนช้าด้วย แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างซับสเทรตทั้งสองชนิดนี้ พบว่าอัตราในการใช้กรดแลคติคสูงกว่ากรดโพรพิโอนิค ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า Gibb's free energy ของซับสเทรตทั้งสองชนิดนี้จะเห็นได้ชัดว่า การย่อยสลายกรดแลคติคจะให้พลังงานสูงกว่าการย่อยสลายกรดโพรพิโอนิค นั่นเป็นเพราะอะซิโตเจนกลุ่มที่เลี้ยงในกรดโพรพิโอนิคมีความสามารถในการย่อยสลายซับสเทรตต่ำมากและยังโตได้ช้าอีกด้วย (Lun และ Cheng, 1992)

$$CH_3CHOHCOOH + 2H_2O \longrightarrow CH_3COOH + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$$

-4.2 KJ/mol

(Mc.Inerney และ Bryant, 1979)

$$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \longrightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$$

+76 KJ/mol

(McCartney และ Oleszkiewicz, 1991)

สำหรับการใช้กรดฟอร์มิคเป็นซับสเทรต ตามทฤษฎีน่าจะเกิดมีเธนได้เร็วกว่ากรดแลคติคหรือกรดโพรพิโอนิค เพราะเป็นซับสเทรตโดยตรงตัวหนึ่งของเมธาโนเจน แต่จากผลการทดลองพบว่า เกิดได้ช้าที่สุดและเป็นซับสเทรตชนิดเดียวที่มี lag phase ซึ่งเป็นไปได้ว่าในสิ่งแวดล้อมเดิมของกากตะกอนไม่มีกรดฟอร์มิคเป็นองค์ประกอบ จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้กรดฟอร์มิคมีจำนวนน้อยมากและอยู่อย่าง inactive ต่อเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐานที่มีกรดฟอร์มิคเป็นองค์ประกอบ เชื้อจึงต้องปรับตัวอยู่ระยะหนึ่งก่อนที่จะสามารถดึงซับสเทรตไปใช้ได้และเมื่อผ่านช่วงปรับตัวแล้ว จะสามารถใช้กรดฟอร์มิคและผลิตแก๊สมีเธนได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดโพรพิโอนิคเป็นซับสเทรต

5.2 อัตราการผลิตแก๊สมีเธน

พบการเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ในซับสเทรตต่างๆ คือกรดแลคติค, กรดอะซิติค, เมธานอล, $H_2:CO_2$ (80:20), กรดฟอร์มิค และกรดโพรพิโอนิค ตามลำดับ จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อใช้กรดแลคติคเป็นซับสเทรต จะเกิดมีเธนมากที่สุด ซึ่งจากรายงานของ Stafford และคณะ (1980) พบว่าความต้องการซับสเทรตของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับแหล่งที่คัดเลือกแบคทีเรียนั้นๆ ซึ่งในที่นี้กากตะกอนที่นำมาทำการทดลอง เป็นกากตะกอนที่ได้รับมาจากโรงงานอุตสาหกรรมนม จึงมีแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถย่อยสลายกรดแลคติคได้มาก จึงเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นซับสเทรตของเมธาโนเจนขึ้นมาก เช่น อะซิติค, ไฮโดรเจน จึงเกิดปริมาณมีเธนขึ้นมากที่สุดและยิ่งเมธาโนเจนดึงซับสเทรตที่เกิดไปใช้ได้มากเท่าไร ก็จะเกิดการย่อยสลายกรดแลคติคมากขึ้นเท่านั้น ดังปฏิกริยาควบคู่ที่เกิดขึ้นดังนี้

$$CH_3CHOHCOOH + 2H_2O \longrightarrow CH_3COOH + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$$

$$CH_3COOH \longrightarrow CH_4 + CO_2$$

$$4H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O$$

สำหรับกรดอะซิติคนั้น เป็นซับสเทรตที่สำคัญของกระบวนการเกิดมีเธนในอุณหภูมิช่วง 20-40 °C เพราะในอุณหภูมิดังกล่าวสารอินทรีย์ต่างๆจะถูกย่อยเป็นกรดอะซิติค หรือ H_2+CO_2 (Zinder, 1988) ทำให้ปริมาณเมธาโนเจนที่ใช้กรดอะซิติค (Acetoclastic Methanogens) มีปริมาณมาก และเมื่อนำไปเลี้ยงในกรดอะซิติคจึงเกิดแก๊สมีเธนในปริมาณสูง และพบว่ากรดอะซิติคจำนวนมากเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นมีเธนและคาร์บอนไดออกไซด์ในขณะที่เมธาโนเจนโตได้ช้ามาก (Bryant, 1979) นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในกรดอะซิติคจะเกิดแก๊สมีเธนในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเลี้ยงใน $H_2:CO_2$ เป็นเพราะข้อจำกัดของความสามารถในการละลายของแก๊สผสม ซึ่งในงานทดลองเป็นการเติม $H_2:CO_2$ ลงไปบริเวณ Headspace ของหลอดเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้การดึงไปใช้ยากกว่าสภาพในธรรมชาติที่ถ่ายทอดโดยตรงจากอะซิโตเจนสู่เมธาโนเจน (Conrad และคณะ, 1985)

จากรายงานของ Chartrain, Bhatnagar และ Zeikus ในปี 1987 แสดงให้เห็นว่าการเติมแลคโทสลงในถังหมักน้ำเวย์แบบต่อเนื่องจะทำให้ความเข้มข้นในสถานะคงตัวของแบคทีเรียที่ย่อยสลายแลคโทส แลคเทต และอะซิเทตมากขึ้น

ซึ่งเมื่อในสภาวะเดิมของกากตะกอนในแหล่งที่เก็บมาได้รับแลคโทสอยู่ตลอดจากน้ำเสียของโรงงาน จึงทำให้สภาวะดังกล่าวของกากตะกอนเป็นสภาวะที่มีแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายกรดแลคติค และกรดอะซิติคมากด้วย

สำหรับเมธานอลและ $H_2:CO_2$ นั้น พบว่าในเมธานอลให้มีเธนมากกว่าใน $H_2:CO_2$ (80:20) ซึ่งอาจเป็นเพราะความสามารถในการละลายของแก๊สผสม $H_2:CO_2$ ที่ใช้เป็นซับสเทรตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวน้อยกว่าความสามารถในการละลายของเมธานอล ดังนั้นจึงมีซับสเทรตเมธานอลสำหรับการดึงไปใช้มากกว่าจึงเกิดมีเธนมากกว่า

สำหรับฟอร์มิคมีปริมาณมีเธนน้อยเนื่องจากข้อจำกัดของเวลา คือในเวลาที่เท่ากัน เมธาโนเจนที่ใช้กรดฟอร์มิคต้องการเวลาสำหรับปรับตัวให้เข้ากับซับสเทรตและต้องการเวลาสำหรับการเพิ่มจำนวน ดังเช่นที่พบจากน้ำเสียของโรงงานผลิตแอลกอฮอล์จากแป้งมันสำปะหลัง (Cassava alcohol slops) ว่าแอคติวิตีของกากตะกอนเพิ่มจาก 0.017 Kg CH_4-COD/Kg.VSS/Day ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำมากในช่วงเริ่มต้นเป็น 0.45 Kg CH_4-COD/Kg.VSS/Day ใน194 วัน (Dararatana, Ploypatarapinyo และ Klinsukont, 1990)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณมีเธนระหว่างการใช้กรดโพรพิโอนิค และกรดฟอร์มิคเป็นซับสเทรตแล้ว พบว่าเมื่อใช้กรดฟอร์มิคเป็นซับสเทรตจะเกิดมีเธนมากกว่าทั้งที่ความสามารถเริ่มต้นในการใช้ซับสเทรตต่ำกว่า นั่นเป็นเพราะเมื่อเชื้อสามารถปรับตัวในการนำกรดฟอร์มิคไปใช้ได้แล้วเชื้อก็จะสามารถดึงมาใช้ได้เร็ว จึงเกิดมีเธนในปริมาณสูง และเชื้อกลุ่มนี้สามารถโตได้เร็วกว่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้กรดโพรพิโอนิคซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่โตช้าที่สุด (Thiele และคณะ, 1990)

4.7 <u>ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนและเมธาโนเจนที่แยกได้จากกากตะกอนโดยใช้ซับสเตรทต่างๆเป็นตัวคัดเลือก</u>

จากการใช้ซับสเทรตชนิดต่างๆ คือ กรดแลคติค, กรดโพรพิโอนิค, กรดอะซิติค, เมธานอล, $H_2:CO_2$(80:20) และ กรดฟอร์มิค เป็นตัวคัดเลือกจะทำให้ได้แบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนและเมธาโนเจนเป็นหลัก (Bhatnagar และคณะ, 1991) ซึ่งจะนำเชื้อสองกลุ่มนี้มาผสมกันเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสม พบว่าสามารถแยก

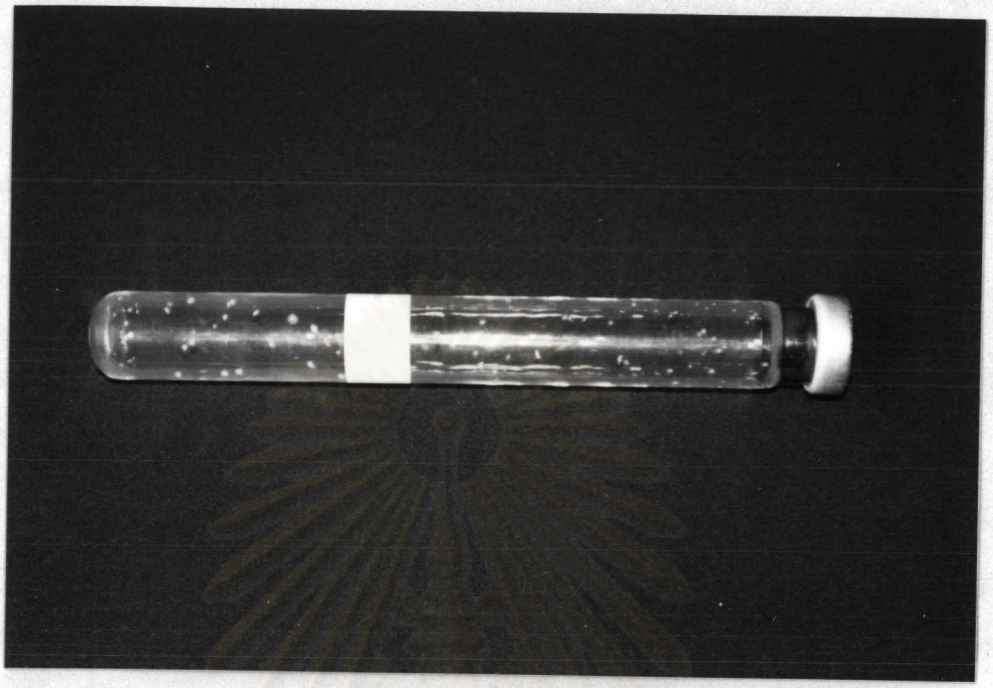
อะซิโตเจนได้สองกลุ่มจากการใช้ซับสเทรตสองชนิด คือกรดโพรพิโอนิค และกรดแลคติค และแยกเมธาโนเจนได้หนึ่งกลุ่มจากการใช้ซับสเทรตสองชนิดคือ เมธานอล หรือ $H_2:CO_2$ (80:20) ดังตาราง 4.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

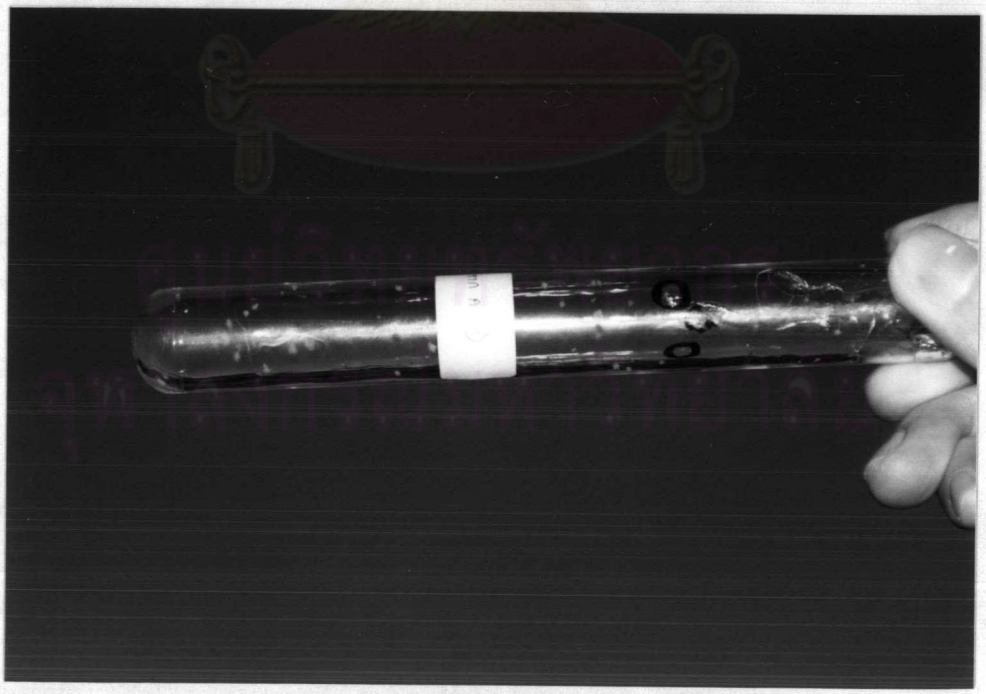
ตารางที่ 4.3 แสดงชนิดและลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้จากการใช้ซับสเทรตต่างๆ

ซับสเทรต	ชนิดของแบคทีเรีย	ลักษณะของเชื้อ
1.กรดโพรพิโอนิค	อะซิโตเจน	โคโลนีขาวใส, ยาวรี, หัวแหลมท้ายแหลม ยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร **ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์** แกรมลบ, รูปร่างกลม มีทั้งอยู่เป็นกลุ่มและอยู่เป็นสายสั้นๆ, ไม่มีสปอร์
2.กรดแลคติค	อะซิโตเจน	โคโลนีสีขาว ค่อนข้างใหญ่, ขอบไม่กลม ไม่เรียบ, เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 4.8 และ 4.9 **ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์** แกรมลบ, รูปร่างกลม มีทั้งอยู่เป็นคู่และเป็นสายสั้นๆ, ไม่มีสปอร์
3.เมธานอล 4.$H_2:CO_2$	เมธาโนเจน	โคโลนีใส ขนาดเล็กเห็นเป็นจุดกลม ขอบเรียบ ดังรูปที่ 4.10 **ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์** แกรมลบ, รูปร่างกลม อยู่เป็นกลุ่ม ไม่มีสปอร์ มีการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ดังรูปที่ 4.11

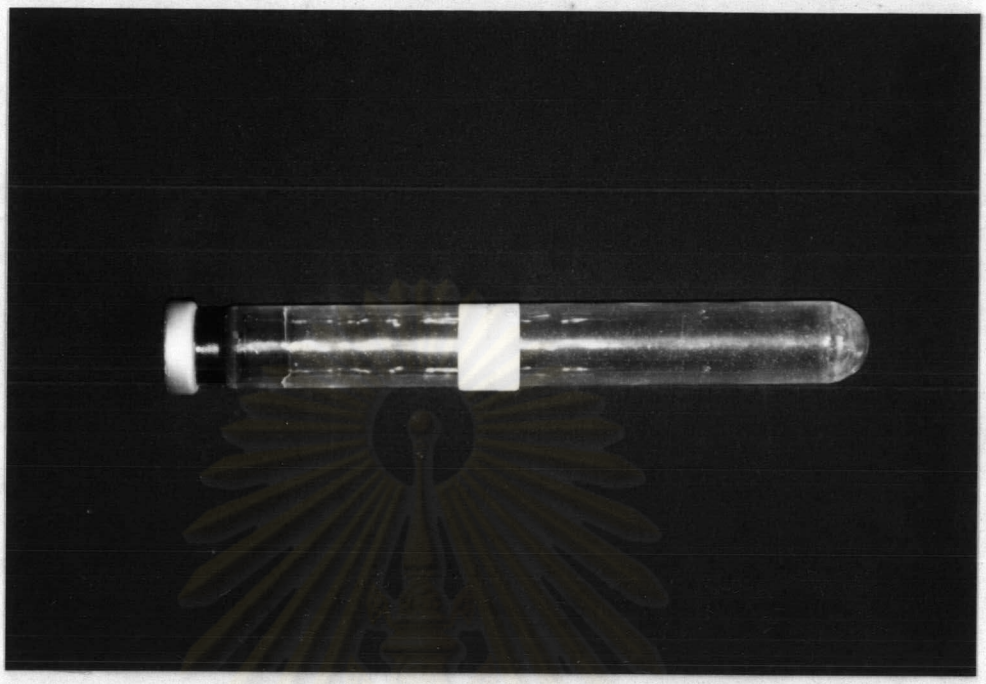
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



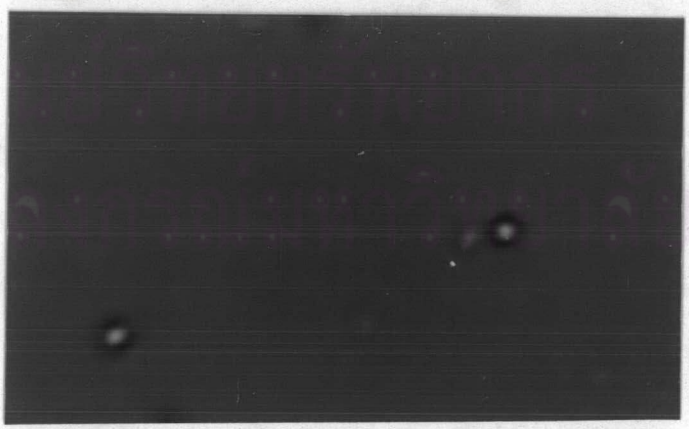
รูปที่ 4.8 ลักษณะโคโลนีของเชื้ออะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคความเข้มข้น 20mM



รูปที่ 4.9 ลักษณะโคโลนีของเชื้ออะซิโตเจนเมื่อสัมผัสอากาศ



รูปที่ 4.10 ลักษณะโคโลนีของเชื้อเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลหรือ$H_2:CO_2$ (80:20)



รูปที่ 4.11 ลักษณะการเรืองแสงของเชื้อเมธาโนเจนเมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงฟลูออเรสเซนต์ติดอยู่ กำลังขยาย 1000 เท่า

สำหรับในกรดฟอร์มิค และกรดอะซิติคนั้น ไม่พบโคโลนีใดๆ ซึ่งในกรณีของกรดฟอร์มิค เป็นเพราะในกากตะกอนมีเชื้อที่ใช้กรดฟอร์มิคอยู่น้อย และ inactive เมื่อ transfer หลายครั้งจึงหายไป หรืออาจเป็นเพราะเชื้อบางชนิดไม่สามารถขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Methanospirillum soehngenii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้โซเดียมฟอร์เมทเป็นซับสเทรต (Jain และคณะ, 1988) หรือในกรณีของกรดอะซิติคเป็นเพราะการเจริญของเมธาโนเจนที่ใช้กรดอะซิติคช้า ดังจะเห็นได้จากสมการ

$$CH_3COO^- + H_2O \longrightarrow CH_4 + HCO_3^- \qquad -31\ KJ/mol$$

ซึ่งเห็นได้ว่าพลังงานที่ปล่อยออกมาเมื่อเลี้ยงเมธาโนเจนในกรดอะซิติค มีค่าเกือบไม่พอในการเกิด 1 โมลของ ATP ดังนั้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงช้า (McInerney และ Bryant, 1979) ทำให้โตไม่ทันเพียงพอที่จะคงอยู่ในระบบ (Bryant, 1979) นอกจากโตช้าแล้วแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้กรดอะซิติคนี้ยังมีการเจริญที่เอาแน่นอนไม่ได้อีกด้วย (Zinder, 1988) ซึ่งในทั้งสองกรณี คือทั้งในกรดฟอร์มิคและกรดอะซิติค อาจเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียบางกลุ่มไม่สามารถเลี้ยงในลักษณะของเชื้อบริสุทธิ์ได้ เช่น *Methanococcus mazei, Methanosarcina methanica* (Zeikus, 1977)

การที่ไม่สามารถแยกจำนวนชนิดของเชื้อได้เท่ากับที่ดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบผ่านตลอดนั้น เป็นเพราะแบคทีเรียทุกกลุ่มไม่สามารถเลี้ยงได้ใน Artificial media (Zeikus, 1977) หรือเป็นเพราะการใช้ซับสเทรตเป็นตัวคัดเลือกทำให้เชื้อแบคทีเรียลดความหลากหลายลง ซึ่งในสภาวะเดิมของกากตะกอนมีเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาก เพราะองค์ประกอบของเชื้อขึ้นกับองค์ประกอบของน้ำเสีย (Bhatnagarและคณะ, 1991)

4.8 ผลของเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนและเมธาโนเจนที่แยกจากกากตะกอนในการผลิตแก๊สมีเธนจากซับสเทรตชนิดต่างๆ

จากการที่สามารถแยกแบคทีเรียสองกลุ่มใหญ่ คืออะซิโตเจนสองกลุ่มจากกรดแลคติค และกรดโพรพิโอนิค และเมธาโนเจนหนึ่งกลุ่มจากเมธานอล และ $H_2:CO_2$ (80:20) ได้จากกากตะกอน ในการทดลองนี้จะนำมาผสมกันเพื่อทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการอยู่ร่วมกันและเกิดแก๊สมีเธนในปริมาณสูง ดังนั้นจึงทำการทดลองในซับสเทรตสองชนิดขนานกันไป คือเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารของอะซิโตเจน (กรดแลคติคและกรดโพรพิโอนิค) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนไม่สามารถใช้ซับสเทรตของเมธาโนเจน เมื่อจะเลี้ยงด้วยกันจึงต้องเลี้ยงในอาหารของอะซิโตเจน จากนั้นมันจะทำการย่อยสลายซับสเทรตนั้นและส่งอาหารที่จำเป็นให้เมธาโนเจนใช้ต่อไป นั่นคือ

4.8.1 เลี้ยงเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้แลคติคเป็นตัวคัดเลือกและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลเป็นตัวคัดเลือกในอัตราส่วนต่างๆ

4.8.2 เลี้ยงเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคเป็นตัวคัดเลือกและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลเป็นตัวคัดเลือกในอัตราส่วนต่างๆ

ซึ่งในการทดลองจะใช้เมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอล เพราะจากการพิจารณาลักษณะโคโลนี การย้อมติดสีแกรม และความสามารถในการผลิตแก๊สมีเธนแล้วพบว่าเป็นชนิดเดียวกับที่แยกโดยใช้ $H_2:CO_2$ (80:20) และการใช้เมธาโนเจนตัวดังกล่าวนี้พบว่ามีภาวะของการเพาะเลี้ยงที่สะดวกกว่า

สำหรับวันที่ควรนำไปวัดปริมาณมีเธนที่เกิดมากที่สุด ให้พิจารณาโดยอ้างอิงจากเชื้อผสมของกากตะกอนในธรรมชาติ (ตารางที่ 4.2) นั่นคือในอาหารเลี้ยงเชื้อกรดแลคติคและกรดโพรพิโอนิคจะให้มีเธนมากที่สุดในวันที่ 42 ของการเลี้ยงเชื้อ

เมื่อได้ซับสเทรต และวันทำการทดลองที่เหมาะสมแล้ว จึงผสมเชื้อทั้งสองกลุ่ม และบ่มไว้ในอุณหภูมิต่างกันคือ 37°C, 55°C และ ที่อุณหภูมิห้องเนื่องพิจารณาผลของอุณหภูมิเพราะโดยทั่วไปแล้ว อุณหภูมิมีผลต่อแอคติวิตีและการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และบ่มไว้ในความเข้มข้นของซับสเทรตต่างกันคือ10mM, 20mM, และ 30mM พบว่าจากผลการทดลอง ทุกหลอด ทุกสภาวะเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิคเป็นซับสเทรตไม่พบแก๊สมีเธน และพบปริมาณน้อยมากเมื่อใช้กรดแลคติคเป็นซับสเทรตและ

เมื่อวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการเลี้ยงเชื้อแล้ว ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละอุณหภูมิที่ความเข้มข้นซับสเทรตเดียวกัน แต่จะพบความแตกต่างของค่าความเป็นกรดด่างอย่างเห็นได้ชัด ที่ความเข้มข้นของซับสเทรตต่างกัน กล่าวคือค่าความเป็นกรดด่างภายหลังการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของซับสเทรตเริ่มต้น 10mM มีค่าประมาณ 6.4 ค่าความเป็นกรดด่างที่ความเข้มข้นของซับสเทรต 20mM มีค่าประมาณ 5.8 และค่าความเป็นกรดด่างที่ความเข้มข้นของซับสเทรต 30mM มีค่าประมาณ 4.9 แสดงว่าในที่นี้ความแตกต่างของอุณหภูมิไม่มีผลมากนัก ผลแสดงดังตาราง 4.4 และ 4.5 (ข้อมูลดังตาราง 1-6 ภาคผนวก ง หน้า 104-106)

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายโดยเฉลี่ย(3ซ้ำ)ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่างๆและบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา42วัน

ความเข้มข้นของซับสเทรต(mM)	ค่าความเป็นกรดด่างเฉลี่ยเมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ		
	37°C	55°C	อุณหภูมิห้อง
10	6.50	6.37	6.34
20	5.73	5.95	5.89
30	4.95	4.99	4.97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายโดยเฉลี่ย(3ซ้ำ)ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมโพรพิโอนิคให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่างๆและบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 42วัน

ความเข้มข้นของซับสเทรต(mM)	ค่าความเป็นกรดด่างเฉลี่ยเมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ		
	37°C	55°C	อุณหภูมิห้อง
10	6.47	6.46	6.41
20	5.62	5.71	5.84
30	4.92	4.97	4.87

สาเหตุที่ไม่พบแก๊สมีเธนอาจเป็นดังต่อไปนี้

1. ความเข้มข้นซับสเทรตที่ใช้เป็นค่าความเข้มข้นที่มากเกินไป ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างมีค่าต่ำ โดยเฉพาะที่ 30 mM มีการพบว่าค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ต่ำกว่า 6 เกิดจากการเติมซับสเทรตที่ความเข้มข้นสูงและเร็วเกินไป (Merrill, 1973)

2. อัตราส่วนของอะซิโตเจนต่อเมธาโนเจนไม่เหมาะสม พบว่าค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อภายหลังการเลี้ยงเชื้อโดยส่วนมาก จะมีค่าต่ำกว่าค่าที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเมธาโนเจน คือ 6.5-7.8 แม้แต่ที่ 10 mM ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่าเมื่อใช้เลี้ยงเชื้อผสมจากธรรมชาติ (20mM) ก็ยังคงให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ต่ำ แสดงว่าค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำนี้ไม่ได้มาจากความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเทรตอย่างเดียว แต่เป็นเพราะผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายซับสเทรตของอะซิโตเจนด้วย จึงทำให้เกิดกรดที่มากเกินไปซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลง (Stafford และคณะ, 1980) จนถึงจุดที่บัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สามารถรักษาสภาวะให้เหมาะสมได้ (Archer, และคณะ, 1986)

จึงเกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเมธาโนเจน การสร้างแก๊สมีเธนหยุดลง (มรกต ตันติเจริญ และคณะ, 2527) เมื่อเมธาโนเจนตายลงจากภาวะไม่เหมาะสมดังกล่าว จึงไม่มีตัวที่ดึงไฮโดรเจนไปใช้ ดังนั้นไฮโดรเจนที่เกิดจึงเป็นอันตรายต่ออะซิโตเจนเองทำให้ระบบไม่สามารถทำงานได้ ทั้งนี้เกิดเนื่องจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมทาง Thermodynamics (Phelps, Conrad และ Zeikus, 1985)

3. การที่เลี้ยงเชื้อทั้งสองกลุ่มในลักษณะของเชื้อบริสุทธิ์แล้ว จึงนำมาผสมกันจะทำให้ประสิทธิภาพของการอยู่ร่วมกันลดลง และมีผลต่อการถ่ายทอดแก๊สไฮโดรเจนระหว่างกัน (Thiele และคณะ , 1988) นั่นคือ แทนที่ไฮโดรเจนซึ่งอะซิโตเจนสร้างจะถ่ายทอดโดยตรงสู่เมธาโนเจน ก็ออกสู่ headspace มากขึ้นทำให้อัตราส่วนการถ่ายทอดแก๊สไฮโดรเจนระหว่างแบคทีเรียสองกลุ่ม (Interspecies Hydrogen Transfer Ratio) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงอัตรา ส่วนของแก๊สไฮโดรเจนที่ถ่ายทอดไปสู่เมธาโนเจน ต่อแก๊สไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นทั้งหมดมีค่าลดลง ทำให้การสร้างมีเธนลดลงจนอาจไม่เกิดขึ้นเลย เพราะจากรายงานของ Conrad และคณะในปี 1985 แสดงให้เห็นว่า การเกิดมีเธนขึ้นอยู่กับการถ่ายทอดไฮโดรเจนระหว่างอะซิโตเจนและเมธาโนเจนที่อยู่ชิดกันในกากตะกอนมากกว่าไฮโดรเจนที่อยู่ในบริเวณรอบนอกของกากตะกอน กล่าวคือเพียง 5-6% ของแก๊สมีเธนจาก $H_2:CO_2$ มาจากบริเวณรอบนอกนั้น และ 94-95% มาจาก Interspecies Hydrogen Transfer ดังนั้นการถ่ายทอดไฮโดรเจนเป็นกระบวนการสำคัญที่เกิดระหว่างอะซิโตเจนและเมธาโนเจน เพราะฉนั้นการที่แบคทีเรียสองกลุ่มดังกล่าวอยู่ชิดกันในกากตะกอน จะทำให้การเกิดแก๊สมีเธนเกิดได้สูงสุดและเป็นการหลีกเลี่ยง mass transfer limitation ระหว่างทั้งคู่ จากรายงานของ Thiele และคณะ (1988) แสดงให้เห็นถึงอัตราส่วนของไฮโดรเจนต่อมีเธนที่เกิดใน floc และ free flora ว่ามีค่าประมาณ 1.5 และ 10 ตามลำดับ แสดงว่าไฮโดรเจนที่เกิดใน floc เปลี่ยนเป็นมีเธนได้มากกว่าใน free flora ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่าการเกิดมีเธนโดย flora น้อยกว่าใน floc เพราะฉนั้นจึงมีการเติมทรายเพื่อเป็นตัวค้ำจุน เพราะเมธาโนเจนมีคุณสมบัติพิเศษคือผลิตโพลีเมอร์ที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ (exopolymer) มาช่วยในการเกาะติดกับตัวค้ำจุนเฉพาะเมื่ออยู่ร่วมกับอะซิโตเจน (Bhatnagar และคณะ, 1991) ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการเริ่มและกระตุ้นให้เกิดการรวมกลุ่มของแบคทีเรีย และถ้าเกิดเร็วเท่าไรก็สามารถย่อยสลายซับสเทรต

ได้เร็ว และเกิดมีเธนมากขึ้นเท่านั้น (Zeikus และ Thiele, 1988)

4. กระบวนการเกิดมีเธนเกิดได้ไม่ดี เพราะมีการพบว่าค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำกว่าค่าเริ่มต้น แสดงว่ามีการทำงานของอะซิโตเจนเกิดการย่อยสลายซับสเทรตแล้วเกิดกรด แต่การที่ไม่พบมีเธนอาจเป็นเพราะกระบวนการเกิดมีเธนเกิดได้ไม่ดี จึงมีการเติม H_2:CO_2 หรือเมธานอลลงไปในหลอดเลี้ยงเชื้อในสัปดาห์ที่สองของการเลี้ยง เพราะพบว่าไฮโดรเจนสามารถช่วยในการกระตุ้นกระบวนการเกิดมีเธน (Zeikus, 1977) และเมธานอลก็เช่นกัน (Oremland และ Polcin, 1982)

5. การใช้ซับสเทรตโพรพิโอนิคนั้นให้มีเธนน้อย เพราะการย่อยสลายกรดโพรพิโอนิคให้เป็น H_2+CO_2 หรือกรดอะซิติค นั่นเป็นขั้นตอนที่เกิดได้ช้า (Brock,1991) ทำให้ประสิทธิภาพในการเกิดมีเธนต่ำ จึงเปลี่ยนมาใช้ซับสเทรตชนิดเดียวคือกรดแลคติค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อทดลองเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ในการทดลองครั้งต่อไปแล้ว คือ ลดความเข้มข้นของซับสเทรตที่ใช้ ลดอัตราส่วนของอะซิโตเจน ใช้ซับสเทรตแลคติค มีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน และใส่เมธานอลหรือ $H_2:CO_2$ ลงไปกระตุ้นกระบวนการเกิดมีเธนแล้ว พบว่าที่ความเข้มข้นซับสเทรต 20 mM ก็ยังคงให้แก๊สมีเธนน้อยมาก จนไม่สามารถรายงานได้ และเมื่อวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายหลังการเลี้ยงเชื้อพบว่าเป็นค่าที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเมธาโนเจน คืออยู่ในช่วง 4.59-5.60 ดังตารางที่ 4.6 (ข้อมูลดังตาราง 7 และ 8 ภาคผนวก ง หน้า 107-108)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าความเป็นกรดด่างโดยเฉลี่ย(3ซ้ำ)ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคหรือกรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลโดยมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน

ชนิดของเชื้อผสม	ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเชื้อ20mMจากนั้นจึง		
	ไม่เติมตัวกระตุ้นในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ	เติมเมธานอลเป็นตัวกระตุ้นในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ	เติม$H_2:CO_2$เป็นตัวกระตุ้นในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ
-อะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอล	5.38	5.41	5.40
-อะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอล	5.17	5.29	5.49

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับที่ความเข้มข้นกรดแลคติค 5mM และ 10mM ไม่ว่าจะในสภาวะใดก็ให้แก๊สมีเธนในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้น 20mM และมีการพบว่าเมื่อมีการใช้ $H_2:CO_2$ (80:20) เป็นตัวกระตุ้นกระบวนการเกิดมีเธน จะพบในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อใช้เมธานอลเป็นตัวกระตุ้นหรือเมื่อไม่มีการเติมตัวกระตุ้น ดังรูปที่ 4.12-4.15 (ตารางที่ 4.7-4.18)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	98.89	6.76
1:1	110.09	6.58
1:2	114.75	6.77
1:3	133.61	6.70
1:11	145.90	6.71

ตารางที่ 4.8 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติมเมธานอล5mMในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่37°Cเป็นเวลา42วัน

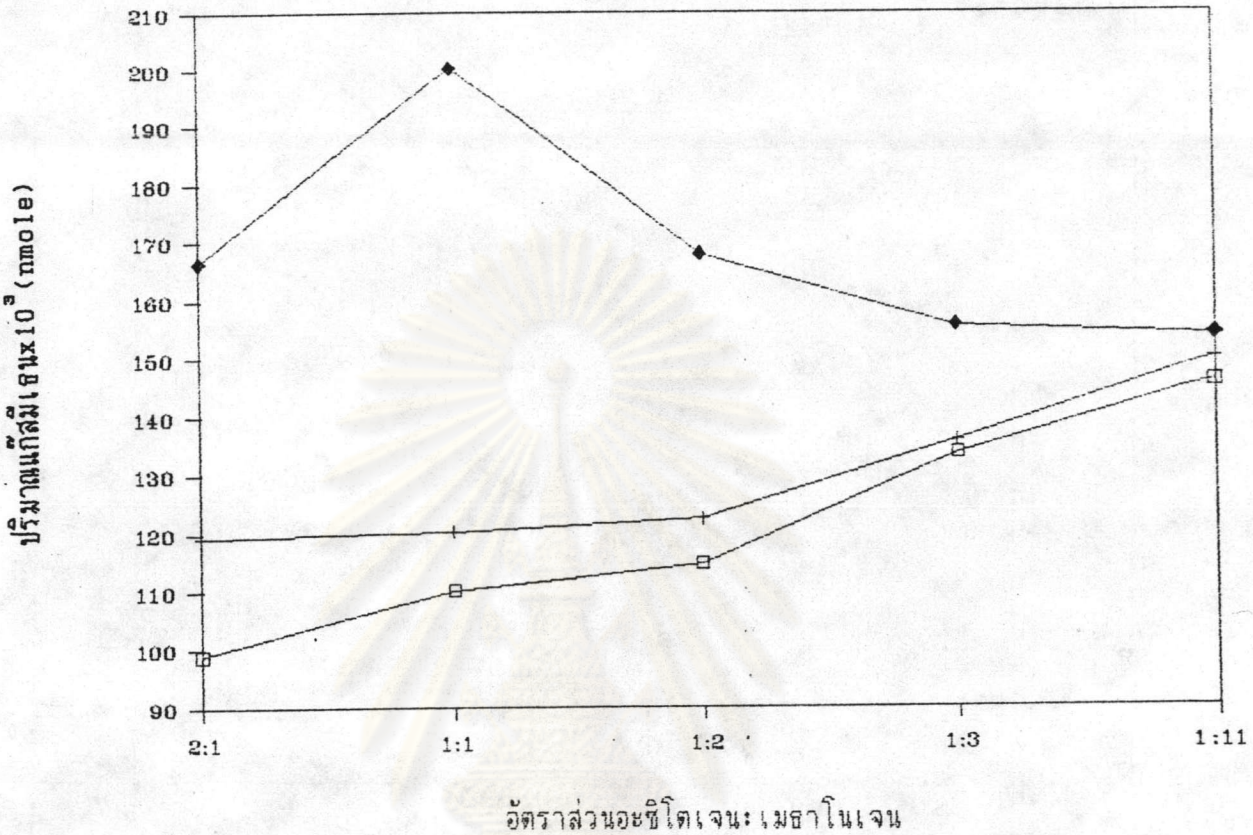
อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3 (nmole)	pH
2:1	119.34	6.68
1:1	120.23	6.56
1:2	122.35	6.71
1:3	135.74	6.71
1:11	149.81	6.71

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.9 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติม $H_2:CO_2$ (80:20)ในวันที่ 14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37 °Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	166.37	6.72
1:1	200.17	6.65
1:2	167.87	6.74
1:3	155.45	6.72
1:11	153.85	6.75

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆโดยที่

□ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

\+ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5mM และเติมเมธานอล **5 mM** ในวันที่ 14ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

♦ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5mM และเติม $H_2:CO_2$ (80:20) และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

ตารางที่ 4.10 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโดเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	102.19	6.52
1:1	123.41	6.65
1:2	151.55	6.51
1:3	148.82	6.62
1:11	148.10	6.66

ตารางที่ 4.11 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโดเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติมเมธานอล 5mMในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

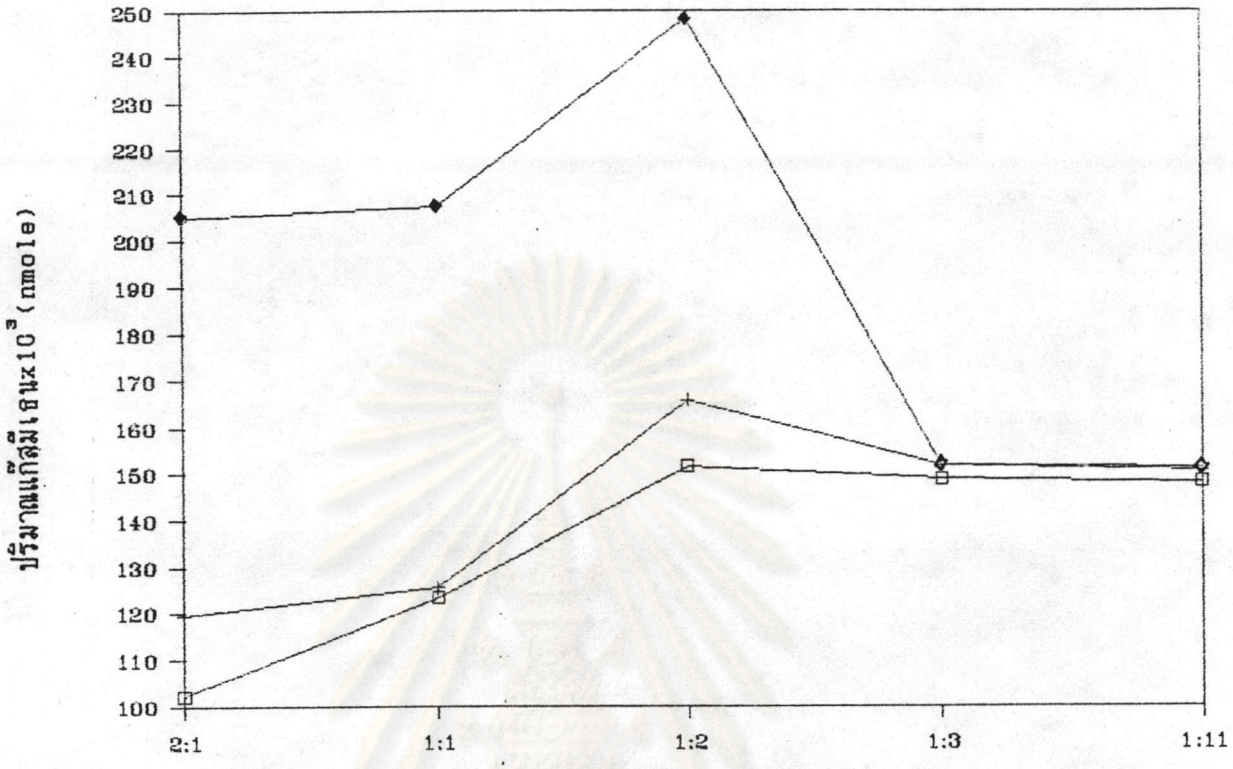
อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	119.68	6.70
1:1	125.57	6.62
1:2	165.69	6.79
1:3	151.72	6.59
1:11	150.53	6.67

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.12 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย5mMและมีการเติม$H_2:CO_2$ (80:20)ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	205.02	6.67
1:1	207.39	6.75
1:2	248.19	6.74
1:3	151.83	6.75
1:11	151.27	6.76

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆโดยที่

□ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

\+ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5mM และเติมเมธานอล 5 mM ในวันที่ 14ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

◆ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5mM และเติม $H_2:CO_2$ (80:20) และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

ตารางที่ 4.13 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	4.76	6.54
1:1	34.71	6.56
1:2	34.85	6.50
1:3	39.54	6.57
1:11	41.56	6.51

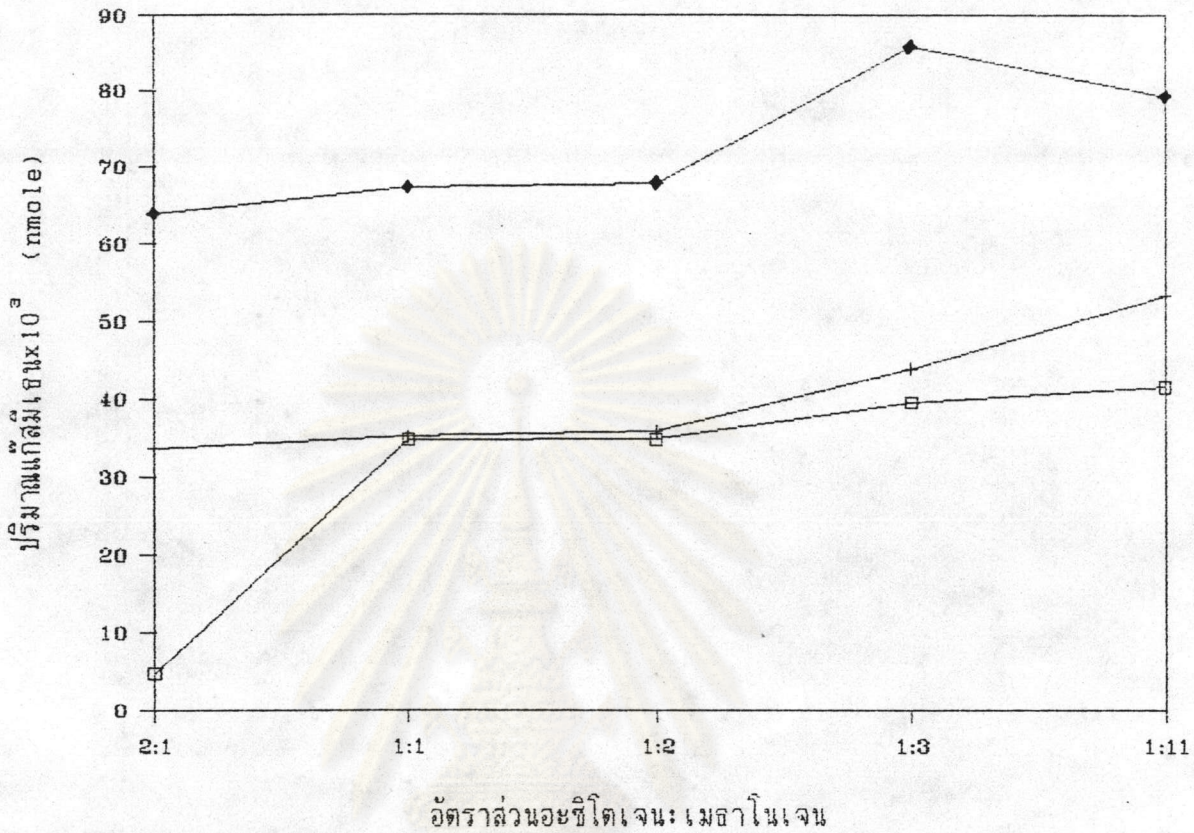
ตารางที่ 4.14 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติมเมธานอล 5 mMในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	33.68	6.51
1:1	35.19	6.52
1:2	35.84	6.56
1:3	43.95	6.59
1:11	53.30	6.55

ตารางที่ 4.15 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติม$H_2:CO_2$ (80:20)ในวันที่ 14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	63.85	6.52
1:1	67.30	6.52
1:2	67.89	6.60
1:3	85.82	6.50
1:11	79.22	6.53

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.14 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆโดยที่

□ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

\+ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10mM และเติมเมธานอล 5 mM ในวันที่ 14ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

◆ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10mM และเติม $H_2:CO_2$ (80:20) และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

ตารางที่ 4.16 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	103.14	6.54
1:1	124.98	6.55
1:2	157.51	6.62
1:3	150.11	6.66
1:11	150.47	6.55

ตารางที่ 4.17 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติมเมธานอล5mMในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

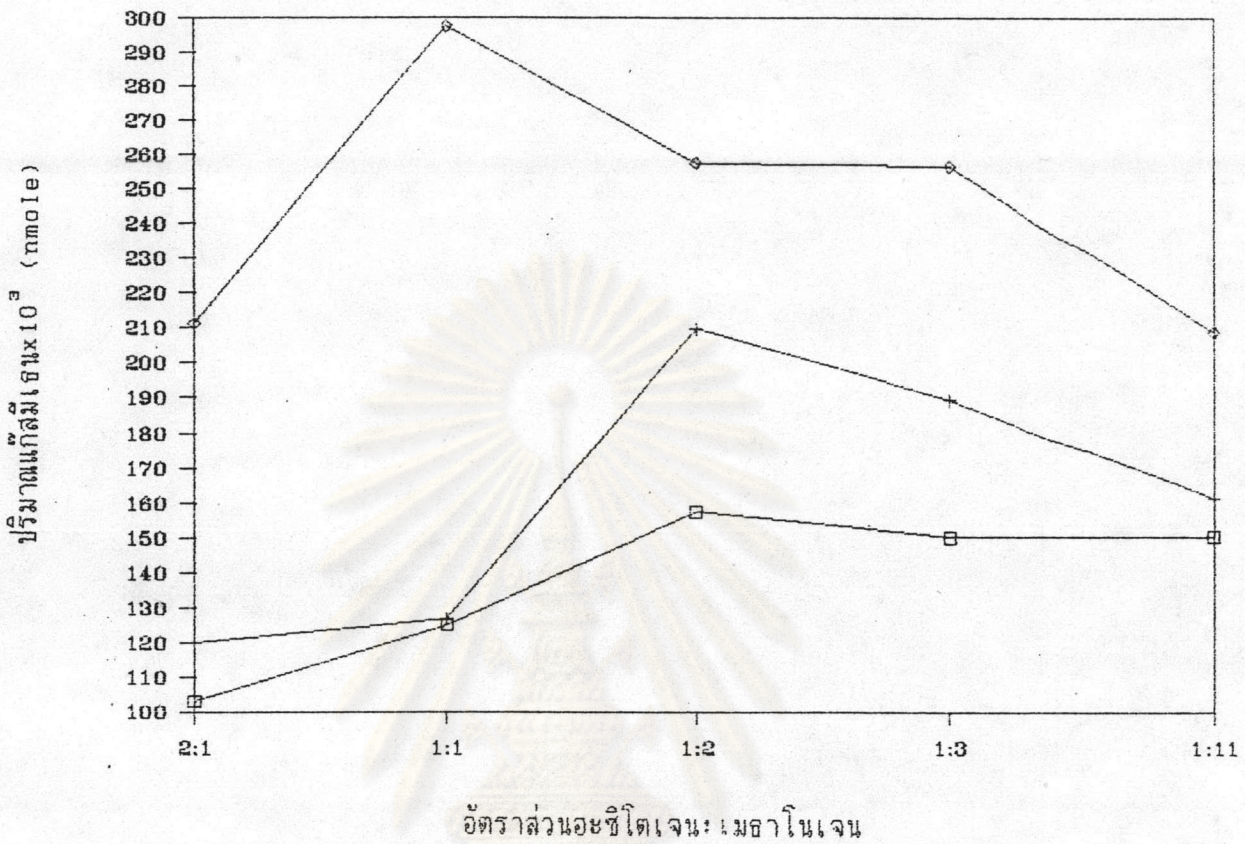
อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	120.01	6.66
1:1	126.78	6.52
1:2	209.68	6.61
1:3	189.28	6.73
1:11	161.23	6.57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.18 ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย10mMและมีการเติม$H_2:CO_2$ (80:20)ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°Cเป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ปริมาณแก๊สมีเธนx10^3(nmole)	pH
2:1	211.19	6.54
1:1	297.46	6.74
1:2	257.40	6.57
1:3	256.38	6.59
1:11	208.65	6.66

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.15 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดจากเชื้อผสมระหว่างอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆโดยที่

□ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10mMและมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

+ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10mM และเติมเมธานอล 5 mM ในวันที่ 14ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

♦ มีการเติมกรดแลคติคให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10mM และเติม $H_2:CO_2$ (80:20) และมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

ซึ่งเมื่อพิจารณาผลการทดลองในระดับหลอดทดลองแล้ว พบว่าปัจจัยสำคัญที่เป็นไปได้ในการทำให้เกิดมีเธนมากขึ้น คือการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของซับสเทรต การเติมเมธานอลหรือ $H_2:CO_2$ ลงไปกระตุ้นกระบวนการเกิดมีเธน และการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุน

สำหรับอัตราส่วนของอะซิโตเจนต่อเมธาโนเจนนั้น เมื่อใช้อัตราส่วนเดิม คือ 2:1, 1:1, 1:2 และ1:3 ก็ปรากฏว่ามีการผลิตแก๊สมีเธนโดยจะให้มีเธนมากที่สุดที่อัตราส่วนหนึ่งของอะซิโตเจนต่อเมธาโนเจน ซึ่งกรณีนี้อาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ต้องพิจารณาร่วมกับการมีตัวค้ำจุน เพื่อประโยชน์ในการส่งถ่ายสารอาหารที่จำเป็นให้แก่กัน

จากผลการทดลอง พบว่าไม่ว่าจะเป็น อะซิโตเจน จากกรดแลคติค หรือกรดโพรพิโอนิคก็ตาม เมื่อนำมาผสมกับเมธาโนเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการใช้ซับสเทรตแลคติค ใช้ทรายเป็นตัวค้ำจุนและมีการเติม $H_2:CO_2$ (80:20) ลงในสัปดาห์ที่สองของการเลี้ยงเชื้อนั้น จะเกิดแก๊สมีเธนมากที่สุดเมื่อเทียบในสภาวะเดียวกัน นั้นเป็นเพราะว่าไฮโดรเจนเป็นตัวกระตุ้นกระบวนการเกิดมีเธนได้ดีกว่า และเมธาโนเจนสามารถดึง $H_2:CO_2$ ไปใช้ได้ดีกว่าเมธานอล

เมื่อพิจารณาความเป็นกรดด่างภายหลังการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นซับสเทรต 5mM พบว่าค่าอยู่ระหว่าง 6.51-6.79 (ตารางที่ 4.7-4.18) และสำหรับค่าความเป็นกรดด่างภายหลังการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเข้มข้นซับสเทรต 10mM นั้นอยู่ระหว่าง 6.50-6.74 ซึ่งทั้งสองสภาวะเป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเมธาโนเจน จึงทำให้กระบวนการเกิดมีเธนเกิดขึ้นได้ดี เพราะฉะนั้นถ้าสามารถควบคุมความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก็จะเป็นผลดีต่อระบบ (McFarland และ Jewell, 1989)

เมื่อเปรียบเทียบ ในสภาวะของความเข้มข้นที่ต่างกัน คือ 5mM และ 10mM พบว่าที่ความเข้มข้นซับสเทรต 5mM นั้น เมื่อใช้อะซิโตเจนจากกรดโพรพิโอนิคผสมกับเมธาโนเจนจะให้ปริมาณแก๊สมีเธนมากกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้น 10 mM และในทางกลับกันที่ความเข้มข้น 10 mM เมื่อใช้อะซิโตเจนจากกรดแลคติคผสมกับเมธาโนเจนจะให้ปริมาณแก๊สมีเธนมากกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้น 5 mM แสดงว่าความเข้มข้นของซับสเทรตที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของอะซิโตเจน ที่เป็นดังนี้เพราะว่า อะซิโตเจนที่ได้จาก

กรดโพรพิโอนิค มีความสามารถในการย่อยสลายกรดแลคติคได้น้อยกว่าอะซิโตเจนจากกรดแลคติค ทั้งนี้เนื่องจากอะซิโตเจนจากกรดโพรพิโอนิคต้องใช้เวลาในการปรับตัวให้เข้ากับซับสเทรต ดังนั้นเมื่อใช้ซับสเทรตความเข้มข้นสูงจึงเกิดภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของอะซิโตเจนที่แยกจากกรดโพรพิโอนิค ทำให้ปริมาณแก๊สมีเธนที่เกิดมีค่าน้อยกว่า ส่วนอะซิโตเจนที่ได้จากกรดแลคติคมีความสามารถในการย่อยสลายกรดแลคติคได้มาก ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นซับสเทรตสูงกว่าก็สามารถเกิดซับสเทรตของเมธาโนเจนได้มากกว่า จึงเกิดมีเธนมากกว่า

เมื่อเปรียบเทียบในสภาวะของความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าเมื่อใช้อะซิโตเจนจากกรดแลคติคจะเกิดมีเธนมากกว่าเมื่อใช้อะซิโตเจนจากกรดโพรพิโอนิค ที่เป็นดังนี้เพราะอะซิโตเจนจากกรดแลคติคสามารถย่อยสลายกรดแลคติคได้ดีกว่า จึงเกิดซับสเทรตสำหรับเมธาโนเจนดีกว่าอะซิโตเจนจากกรดโพรพิโอนิค

จากผลการทดลองสามารถบอกได้ว่า ความเข้มข้นและชนิดของซับสเทรตที่ใช้การเติมตัวกระตุ้นกระบวนการเกิดแก๊สมีเธนในสัปดาห์ที่สองของการเลี้ยงเชื้อ และการใช้ตัวค้ำจุนนั้นมีผลต่อปริมาณแก๊สมีเธน

นอกจากนี้มีการพบว่า ตัวค้ำจุนที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมความสามารถในการรวมกลุ่มและเกาะติดของแบคทีเรียกับมัน ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในระบบบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ (Isa, Grusenmeyer และ Verstraete, 1986) เพราะนอกจากประโยชน์ในการอยู่ชิดกันของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มในกากตะกอนแล้ว ยังมีประโยชน์ในการกำจัดซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรีย ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยในสภาวะแวดล้อมเดียวกับเมธาโนเจน (Parkin, Sneve และ Loos, 1991) และแย่งเมธาโนเจนในการใช้ซับสเทรตเดียวกัน เช่นการใช้แก๊สไฮโดรเจน (Banat และคณะ, 1983) การใช้เมธานอล (Nanninga และ Gottschal, 1987) และมักจะมีความสามารถในการใช้ซับสเทรตดีกว่าด้วย (Lovley, Dwyer และ Klug, 1982) นอกจากนี้ระบบที่มีซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรียอยู่จะสร้างซัลไฟด์ซึ่งเป็นพิษต่อเมธาโนเจน (Pichon, Rouger และ Junet, 1988) เพราะฉนั้นถ้าตัวค้ำจุนดีเมธาโนเจนก็สามารถเกาะตัวค้ำจุนได้ดีกว่าซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรีย ทำให้สามารถเจริญเติบโตได้มากกว่าและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์และเกิดเป็นมีเธนได้ดี (Isa และคณะ, 1986)

เมื่อได้กากตะกอนหลักซึ่งเกิดจากแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มแล้ว ก็สามารถเพิ่มประโยชน์ใช้งาน โดยการเพิ่มแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถย่อยสลายหรือลดความเป็นพิษของสารในน้ำเสียได้ เช่นเพิ่มแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้เพนตาคลอโรฟีนอลเข้าไปในกากตะกอน จะได้กากตะกอนเร่งชนิดใหม่ที่สามารถเกิด Anaerobic Dechlorination ของเพนตาคลอโรฟีนอล หรือเปอร์คลอโรเอทธิลีน (Bhatnagar และคณะ, 1991)

การที่สร้างกากตะกอนจากแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้ยังมีประโยชน์ เพราะการออกแบบในลักษณะดังกล่าวเป็นการแยกแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มออกจากไฮโดรไลติคแบคทีเรีย ซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 5-6 และก็ยังสามารถทำงานต่อไปได้จนค่าความเป็นกรดด่างลดลงถึง 4.5-5.0 ซึ่งเป็นค่าที่จำกัดการเจริญของเมธาโนเจน

เมื่อศึกษาจนได้อัตราส่วนของอะซิโตเจนและเมธาโนเจนที่เหมาะสมแล้วยังต้องศึกษาต่อถึงสมบัติในการทนต่อการแกว่ง (Fluctuation) ของอัตราการเติมซับสเทรต ความสามารถในการทนต่อออกซิเจน ความสามารถในการเกาะติดกับตัวค้ำจุนต่างๆ ทั้งนี้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการบำบัด (Chartrain และคณะ, 1987) และเมื่อนำไปใช้จริงในบ่อบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศ จะต้องมีการตักกากตะกอนจากบ่อเดิมทิ้ง เพราะในระบบดังกล่าวมักมีซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรียอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวจะมีความสามารถในการใช้ซับสเทรตดีกว่าเมธาโนเจน ทำให้กากตะกอนที่ปรับปรุงแล้ว (Design granule) ทำงานไม่ดี ดังจะเห็นจากรายงานของ Sorensen, Christensen และ Jorgensen ในปี 1981 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าถ้าไม่มีกระบวนการซัลเฟตรีดักชัน (Sulfate Reduction)ที่เกิดโดยการทำงานของซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรียแล้ว แอคติวิตีของกระบวนการเกิดมีเธนจะเพิ่มจาก 2 $nmol\,g^{-1}\,hr^{-1}$ เป็น 3 $nmol\,g^{-1}\,hr^{-1}$ แต่ถ้าพบการเจริญเติบโตของซัลเฟตรีดิวซิงแบคทีเรียจะทำให้ปริมาณมีเธนที่เกิดลดลง (Yadav และ Archer, 1989)