รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จันทรา ทองคำเภา และ วรรณี พฤฒิถาวร. 2526. การกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม. จดหมายข่าวสภาวะแวดล้อม. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ปีที่ 2. เล่มที่ 3. หน้าที่ 1-16

มรกต ตันติเจริญ, ศักรินทร์ ภูมิรัตน์ และธเนศ อุทิศธรรม. 2527. การผลิตพลังงานจากของเสียของโรงงานสัปปะรดกระป๋อง. จดหมายข่าวสภาวะแวดล้อม. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ปีที่ 3. เล่มที่ 4. หน้าที่ 7-15

สุจินต์ พนาปวุฒิกุล. 2528. การใช้น้ำกากส่าจากโรงงานสุราในการผลิตแก๊สชีวภาพและทำปุ๋ยอินทรีย์ชนบท. จดหมายข่าวสภาวะแวดล้อม. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ปีที่ 3. เล่มที่ 2. หน้าที่ 1-4 อ้างถึงในสันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2528. การคัดเลือกเชื้อราเพื่อใช้ในการฟอกสีน้ำกากส่า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2528.

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2528. การคัดเลือกเชื้อราเพื่อใช้ในการฟอกสีน้ำกากส่า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2528.

ภาษาอังกฤษ

Archer, D., B., Hilton, M., G., Adams, P., and Wiecko, H., 1986. Hydrogen as a Process Control Index in a Pilot Scale Anaerobic Digestion. Biotechnology Letters. 8(3):197-202

Banat, I., M., Nedwell, D., B., Balba, M., T., 1983. Stimulation of Methanogenesis by Slurries of Saltmarsh Sediment after the addition of Molybdate to inhibit Sulfate Reducing Bacteria. Journal of Microbiology. 129: 123-129.

Bhatnagar, L., Wu, W-M., Jain, M., K., and Zeikus, J., G., 1991. Design and Function of Biomethanation granules for Harzadous Waste Treatment. Proceedings International Symposium on Environmental Biotechnology. 1-10.

Brock, T., D., and Madigan, M., T., 1991. Biology of Microorganism. 16th.ed., Prentice Hall, New Jersey, USA.

Bryant, M.,P., 1979. Microbial Methane Production-Theoretical Aspects. Journal of Animal Science. 48(1).

Chartrain, M., Bhatnagar, L., and Zeikus, J., G., 1987. Microbial Ecophysiology of Whey Biomethanation: Comparison of Carbon Transformation Parameters, Species composition, and Starter Culture performance in Continuous Culture. Appl. and Env. Microbiol. 53(5): 1147-1156.

Chavadej, S., 1990. Application of Anaerobic Treatment for Agro-industrial Wastes in Thailand. Paper presented at regional Workshop on Anaerobic Treatment Technique of Wastewaters from Agro-industry., Thailand. 22-23 May, 1990.

Conrad, R., Phelps, T., J., and Zeikus, J., G., 1985. Gas Metabolism Evidence in support of the juxtaposition of Hydrogen-porducing and Methanogenic Bacteria in Sewage sludge and Lake sediments. Appl. and Env. Microbiol. 50(3): 595-601.

Dararatana, S., Ploypatarapinyo, P., and Klintsukont, C., 1990. Treatabilities Studies of Wastewater from Cassava Alcohol Production Plant By UASB. Paper presented at Regional Workshop on Anaerobic Treatment Techniques of Wastewaters from Agro-industry. 22-23 May, 1990

Gottschalk, G., 1986. Bacterial Metabolism. 2nd.ed. Springer-Verlag. New York Inc.

Harada, H., 1990. High Rate Performance of UASB Process for Treatment of High-strength Wastewaters. Paper presented at Regional Workshop on Anaerobic Treatment Techniques of Wastewaters from Agro-industry. 22-23 May, 1990

Hungate, R., E., 1969. Method in Microbiology. Academic Press Inc, New York.

Isa, Z., Grusenmeyer, S., and Verstraete, W., 1986. Sulfate Reduction Relative to Methane Production in High-Rate Anaerobic Digestion: Microbial Aspects. Appl. and Env. Microbiol. 51(3): 580-587.

Jain, M., K., Bhatnagar, L., and Zeikus, J., G., 1988. A Taxonomic Overview of Methanogens. Indian J. Microbiol. 28(3): 143-147.

————Bhatnagar, L., and Zeikus, J., G., 1990. Biochemical pathways for Methane Fermentation and use of Granulated Biomass for High-Rate Anaerobic Digestion. Report at the International Conference on Biogas, India.

————Bhatnagar, L., and Zeikus, J., G., 1991. Anaerobic Microbiology A Practical Approach. Oxford: JRL Press.

Khan, A., W., and Trottier, T., M., 1978. Effect of S-Containing compounds on Anaerobic Degradation of Cellulose to Methane by Mixed cultures obtain from Sewage Sludge, Appl. and Env. Microbiol. 35(6): 1027-1034

Karhadkar, P., P., Audic, J-M., Faup, G., M., and Khanna, P., 1987. Sulfide and Sulfate Inhibition of Methanogenesis. Wat. Res. 21(9): 1061-1066.

Labat, M., and Garcia, J., L., 1986. Study on the development of Methanogenic Microflora during Anaerobic Digestion of Sugar beet Pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 163-168.

Lovley, D., R., Dwyer, D., F., and Klug, M., J., 1982. Kinetic Analysis of Competition between Sulfate Reducers and Methanogens for Hydrogen in Sediments, Appl. and Env. Microbiol. 43(6): 1373-1379.

Lun, S-Y., and Chen, J., 1992. The Contribution of IHT to the Substrate Removal in Methanogenesis. Process Biochem. 27: 285-289

McCartney, D., M., and Oleszkiewicz, 1991. Sulfide Inhibition of Anaerobic Degradation of Lactate and Acetate. Wat. Res. 25(2): 203-209.

Mc.Inerney, M., J., and Bryant, M., P., 1979. Metabolic stages and Energetics of Microbial Anaerobic Digestion. Paper presented at The First Symposium of Anaerobic Digestion hald at Cardiff University.

Mc.Farland, M., J., and Jewell, W., J., 1989. *In Situ* Control of Sulfide Emissions during the Thermophillic (55°C) Anaerobic Digestion Process. Wat. Res., 23(12):1571-1577

Merrill, R., and Merrill, Y., 1973. Methane Digestors for Fuel gas and Fertilizer. 12nd.ed., Santa Barbara.

Nanninga, H., J., and Gottschal, J., C., 1987. Properties of *Desulfovibrio carbinolicus* sp. NOV and other Sulfate Reducing Bacteria Isolated from an Anaerobic-Purification Plant. Appl. and Env. Microbiol. 53: 802-809

Oremland, R., S., and Polcin, S., 1982. Methanogenesis and Sulfate Reduction: Competitive and Non-competitive Substrates in Estuarine Sediments. Appl. and Env. Microbiol. 44(6): 1270-1276.

Parkin, G., F., Sneve, M., A., and Loos, H., 1991. Anaerobic Filter Treatment of Sulfate-Containing Wastewaters. Wat. Sci.Tech., 23:1283-1291.

Pichon, M., Rouger, J., and Junet, E., 1988. Anaertobic Treatment of Sulfur-Containing Effluent. Wat.Sci. Tech., 20(1): 133-141.

Phelps, T., J., Conrad, R., and Zeikus, J., G., 1985. Sulfate dependent IHT between *M. barkeri* and *D. vulgaris* during Coculture Metabolism af Acetate or Methanol. Appl. and Env. microbiol. 50(3): 589-594.

Sorensen, J., Christensen, D., and Jorgensen, B., B., 1981. Volatile Fatty Acids and Hydrogen as Substrates for Sulfate Reducing Bacteria in Anaerobic Marine Sediments. Appl. and Env. Microbiol. 42(1): 5-11.

Stafford, D., A, Hawkes, D., L., and Horton, R., 1980. Methane Production from Waste Organic Matter. np: CRC Press.

Thiele, J., H., Chartrain, M., and Zeikus, J., G., 1988. Control of Interspecies Electron flow during Anaerobic Digestion: Role of floc formation in Syntrophic Methanogenesis. Appl. and Env. Microbiol. 54(1), 10-19.

Thiele, J., H., Wu, W-M., and Jain, M., K., 1990. Ecoengineering High Rate Anaerobic Digestion Systems: Analysis of Improved Syntrophic Biomethanation Catalysts. Biotechology and Bioeengineering. 35: 990-999

Yadav, V., K., and Archer, D., B., 1989. Sodium Molybdate Inhibits Sulfate Reduction in the Anaerobic Treatment of High-Sulfate Molasses Wastewater. Appl. Microbiol. Biotechnol., 31: 103-106.

Yang, S-T., and Guo, M., 1991. A Kinetic Model for Methanogenesis from Whey Permeate in A Packed Bed Immobilized cell Bioreactor. Biotechnology and Bioengineering. 37: 375-382.

Zeikus, J., G., 1977. The Biology of Methanogenic Bacteria. Bacteriological Reviews. 41(2): 514-541.

Zeikus, J., G., and Thiele, J., H., 1988. Control of Interspecies Electron Flow during Anaerobic Digestion: Significance of Formate Transfer versus Hydrogen Transfer during Syntrophic Methanogenesis in Flocs. Appl. and Env. Microbiol. 54(1): 20-29.

Zinder, S., H., 1988. Conversion of Acetic acid to Methane by Thermophiles. 5th. International Symposium on Anaerobic Digestion.

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐาน (Liquid Phosphate-Buffered Basal Medium)

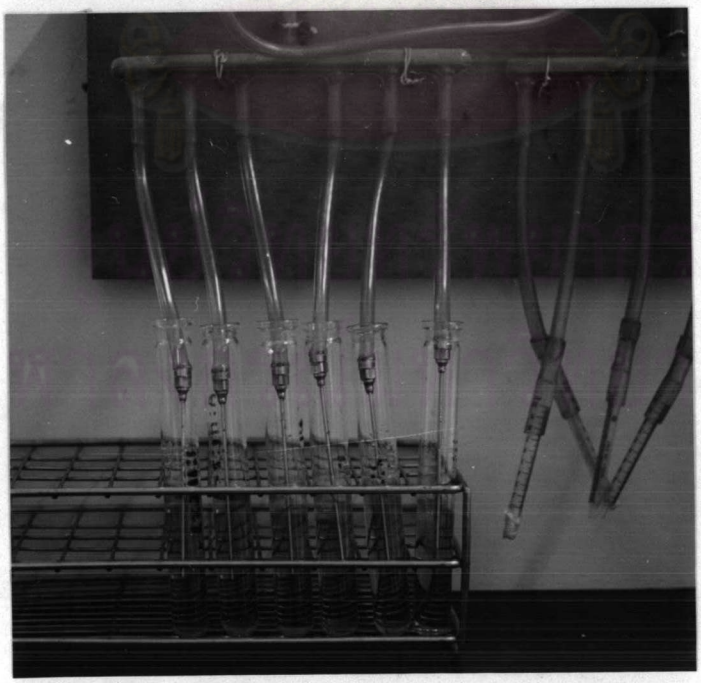
น้ำกลั่น	945	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์	0.9	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	1	กรัม
TRACE MINERAL	10	มิลลิลิตร
สารละลายรีซาซูลิน	1	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.4 ต้มภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน บรรจุลงหลอดทนความดัน หลอดละ 9.5 มิลลิลิตร (รูปที่ 1) ไล่อากาศโดยใช้แก๊สไนโตรเจน (OFN) (รูปที่ 2) ปิดด้วยจุกยาง (รูปที่ 3) และผนึกด้วยฝาอลูมิเนียม (รูปที่ 4) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที หลังจากนั้น นำมาเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 มิลลิลิตร, สารรีดิวซ์ 0.1 มิลลิลิตร, สารละลายวิตามิน 0.1 มิลลิลิตร และซับสเทรตต่างๆ ความเข้มข้น 1000 มิลลิโมลาร์ 0.2 มิลลิลิตร โดยการเติมสารทั้งหมดนี้ ใช้เข็มเบอร์ 23 โดยเทคนิคปลอดเชื้อ แสดงดังรูปที่ 5 และ 6 จะได้หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร (รูปที่ 7)

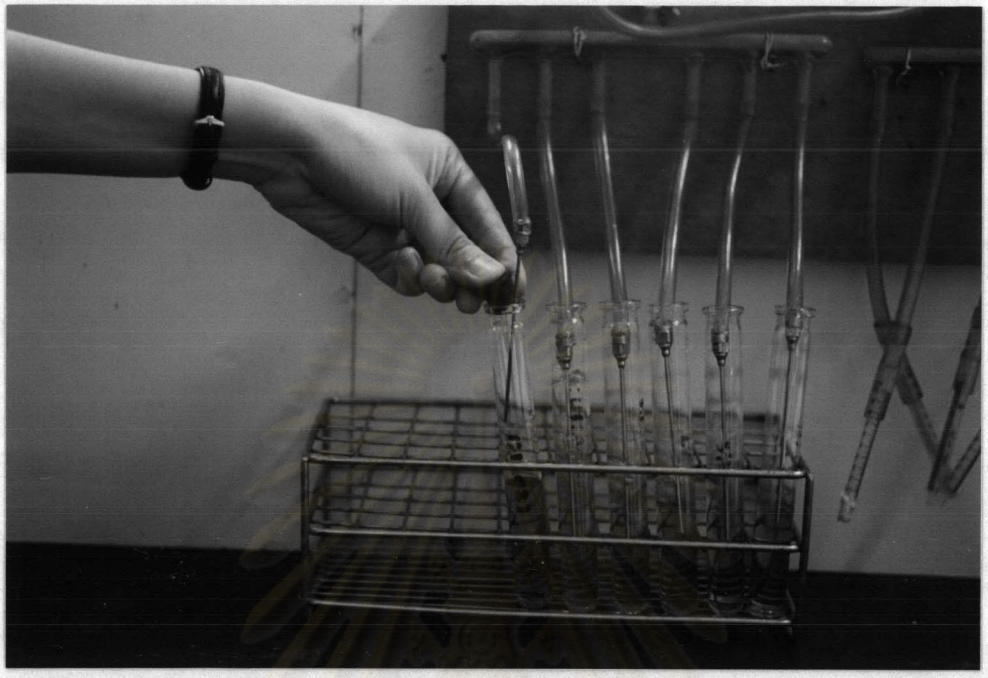
2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพื้นฐาน

สูตรอาหารเหมือนข้อ 1 แต่มีการเติมวุ้น 1.5 % ในแต่ละหลอด โดยบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2.85 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีผงวุ้น จากนั้นผ่านกรรมวิธีเช่นเดียวกับข้อ 1 จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แสดงดังรูปที่ 8

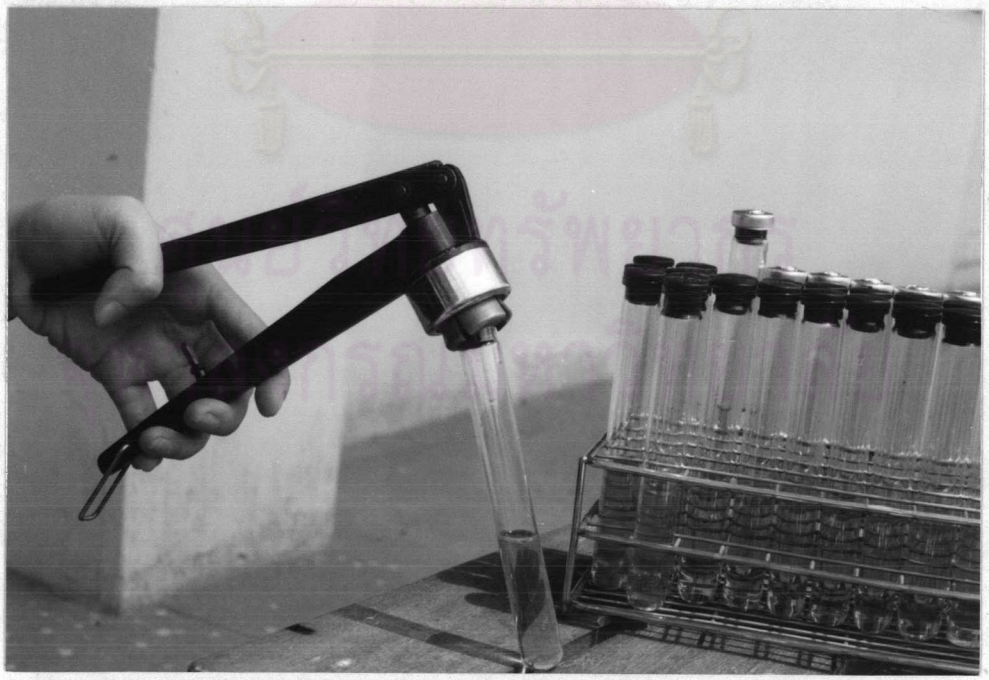
รูปที่ 1 การบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวลงหลอดทนความดัน



รูปที่ 2 การไล่อากาศจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยใช้แก๊สไนโตรเจน (OFN)



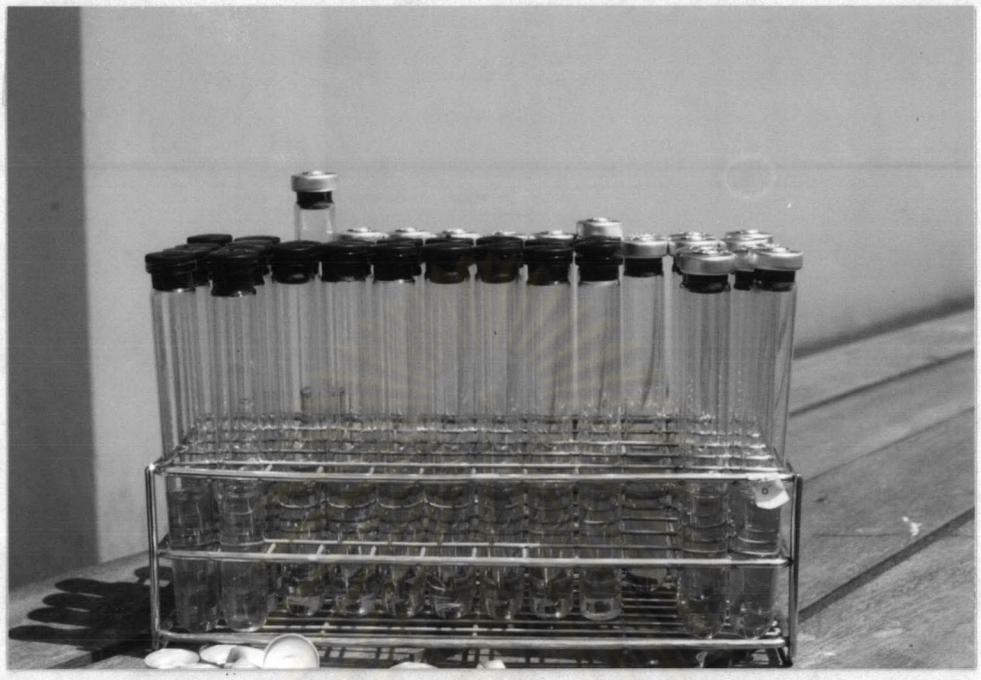
รูปที่ 3 การปิดหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยจุกยาง



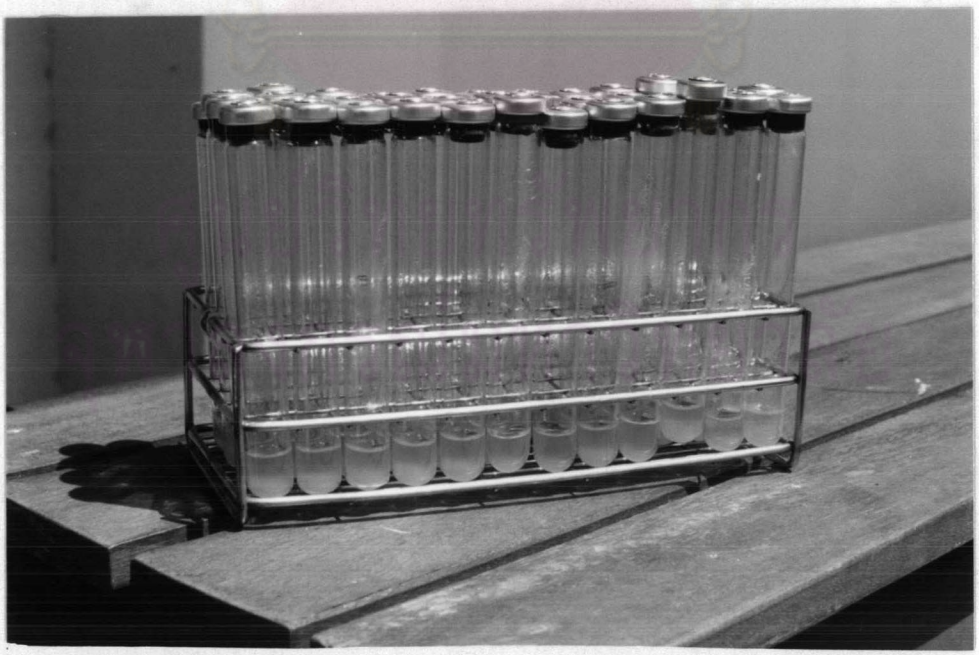
รูปที่ 4 การปิดหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยฝาอลูมิเนียม

รูปที่ 5 วิธีการนำซับสเทรตออกจากขวด

รูปที่ 6 การเติมซับสเทรตลงหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 7 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว



รูปที่ 8 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	75	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	145	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ประมาณ 6.8-7.2 จากนั้นบรรจุลงขวดทนความดัน ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน ปิดด้วยจุกยาง และผนึกด้วยฝาอลูมิเนียม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที

2. สารละลายรีซาซูลินอินดิเคเตอร์

ละลายสีย้อมรีซาซูลิน 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายรีดิวซ์ซิสเตอิน-ซัลไฟด์

ซิสเตอิน-ไฮโดรคลอไรด์	12.5	กรัม
โซเดียมซัลไฟด์	12.5	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์		
น้ำกลั่นที่ไล่แก๊สออก	1	ลิตร

ละลายซิสเตอิน-ไฮโดรคลอไรด์ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 9.5 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นเติมโซเดียมซัลไฟด์และเติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร บรรจุลงขวดทนความดัน ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน ปิดด้วยจุกยาง และผนึกด้วยฝาอลูมิเนียม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว 14 นาที

4. สารละลายเทรชมิเนอรัล

ไนไตรโลไตรอาซิติค	6.4	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต	0.05	กรัม
แมงกานิสคลอไรด์	0.05	กรัม

โคบอลท์คลอไรด์	0.085	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.05	กรัม
ซิงค์คลอไรด์	0.05	กรัม
คอปเปอร์คลอไรด์	0.01	กรัม
H_3BO_3	0.005	กรัม
โซเดียมโมลิบเดท	0.005	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5	กรัม
Na_2SeO_3	0.085	
นิกเกิลซัลเฟต	0.0013	กรัม
โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์		
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ละลายไนไตรโลไตรอาซิติคในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.5 โดยใช้โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ แล้วจึงเติมสารตัวอื่นๆ ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วบรรจุลงขวด ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

5. <u>สารละลายวิตามิน</u>

ไบโอติน	0.001	กรัม
กรดโฟลิค	0.001	กรัม
บี6(ไพริดอกซิน)ไฮโดรคลอไรด์	0.005	กรัม
บี1(ไทอามิน)ไฮโดรคลอไรด์	0.0025	กรัม
บี2(ไรโบฟลาวิน)	0.0025	กรัม
นิโคตินิค(ไนอาซิน)	0.0025	กรัม
แพนโทเทนิค	0.0025	กรัม
บี12(ไซยาโนโคบาลามิน)	0.00005	กรัม
พาราอมิโนเบนโซอิค	0.0025	กรัม
กรดลิโปอิค	0.0025	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายน้ำ และบรรจุลงขวด ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนนำมาใช้ต้องกรองผ่านเยื่อกรองที่มี Pore size ขนาด 0.2 ไมครอน

6. ซับสเทรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

6.1 กรดโพรพิโอนิค

6.2 กรดแลคติค

6.3 กรดอะซิติค

6.4 เมธานอล

6.5 กรดฟอร์มิค

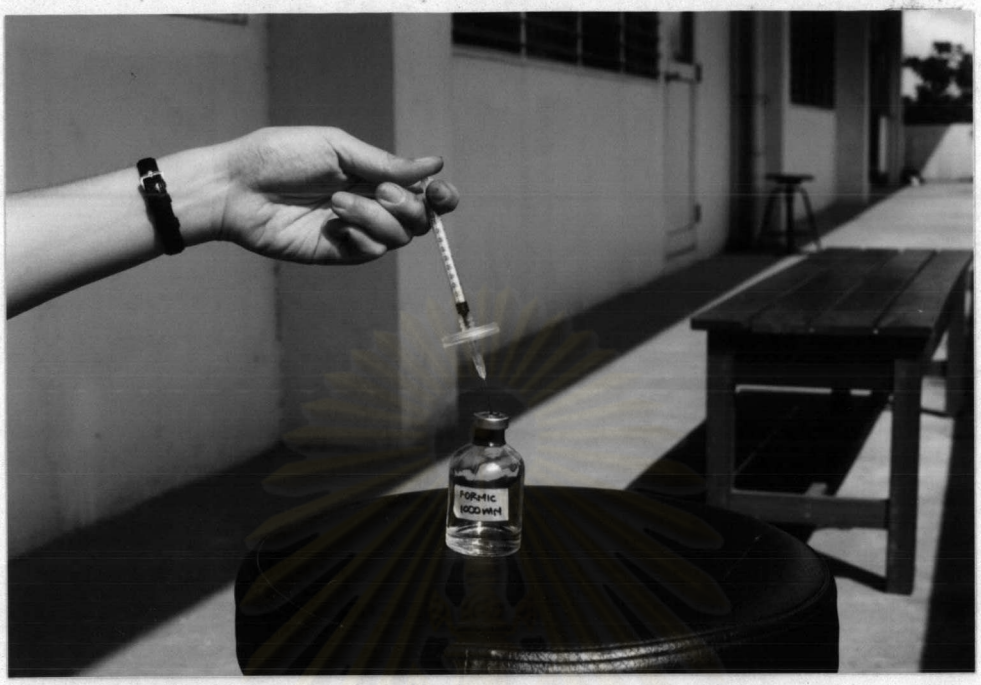
6.6 แก๊สไฮโดรเจน:คาร์บอนไดออกไซด์ (80:20)

ซับสเทรตในข้อ 6.1-6.5 บรรจุลงขวดปลอดเชื้อโดยผ่านเยื่อกรองที่มี Pore size ขนาด 0.2 ไมครอน แสดงดังรูปที่ 9 และ 10

เวลาเติมซับสเทรตลงอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมโดยใช้เข็มเบอร์ 23 โดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยถ้าซับสเทรตเป็น (80:20)แก๊สไฮโดรเจน:คาร์บอนไดออกไซด์ ให้ใช้ความดัน 1 atm เป็นเวลา 5 นาที

7. คิวปริกออกไซด์ที่ใช้บรรจุในหลอดแก้วภายในท่อทองแดง

บรรจุใยแก้วลงหลอดแก้วพอประมาณ แล้วจึงเติม Cu_2O ลงไป กะระยะให้ตำแหน่งของ Cu_2O ภายในอยู่บริเวณท่อทองแดงเมื่อเปิดฝา จากนั้นจึงบรรจุใยแก้วด้านบนอีกครั้ง Cu_2O ตัวนี้จะเป็นตัวจับแก๊สออกซิเจนที่อาจมีปนอยู่ในแก๊สไนโตรเจนแล้วเปลี่ยนเป็น CuO เมื่อใช้สักระยะหนึ่งประสิทธิภาพของการจับออกซิเจนจะลดลง ให้นำไปทำการ Regenerate โดยการผ่านแก๊ส $H_2:CO_2$ (80:20) ไปในท่อแก้วที่บรรจุ CuO สักระยะ



รูปที่ 9 แสดงการบรรจุซับสเทรตลงขวดปลอดเชื้อโดยผ่านเยื่อกรอง

รูปที่ 10 ขวดเก็บซับสเทรต

ภาคผนวก ค

1. การทำเส้นกราฟมาตรฐานของแก๊สมีเธน

1.1 วิธีเตรียมแก๊สมีเธนมาตรฐาน

ไล่อากาศออกจากขวดทนความดันขนาด 60 มิลลิลิตร โดยใช้แก๊สไนโตรเจน OFN จากนั้นจึงปิดจุกยาง และผนึกด้วยฝาอลูมิเนียม แล้วจึงบรรจุแก๊สไนโตรเจนลงขวด โดยผ่านเข็มเบอร์ 23 ขณะเดียวกับใช้เข็มเบอร์23 ปล่อยแก๊สภายในออก เป็นเวลา 10 นาที นำมาเตรียมแก๊สมีเธนที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 30, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 11)

1.2 วิธีเตรียมการวิเคราะห์

ใช้หลอดฉีดยาเก็บความดันขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดแก๊สมีเทนที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ซึ่งมีสภาวะในการทำงานดังนี้

อุณหภูมิคอลัมน์	70°C
อุณหภูมิบริเวณฉีดตัวอย่างและเครื่องตรวจวัด	120°C
แก๊สอีเลียมซึ่งใช้เป็นแก๊สพา มีอัตราการไหล	30 มิลลิลิตรต่อนาที
กระแสไฟฟ้า	80 มิลลิแอมแปร์

สารที่บรรจุในคอลัมน์ สำหรับเป็นเฟสที่หยุดนิ่ง : พอราพัค คิว

จากเวลาที่ได้ในการฉีดแก๊สมีเธนบริสุทธิ์ (ภาพที่ 12)ทำให้สามารถทราบความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของแก๊สมีเธน นำไปพลอตกราฟ กราฟที่ได้จะเป็นกราฟมาตรฐานของแก๊สมีเธนที่ใช้สำหรับหาความเข้มข้นของแก๊สมีเธนจากหลอดเลี้ยงเชื้อ แสดงดังภาพที่ 13

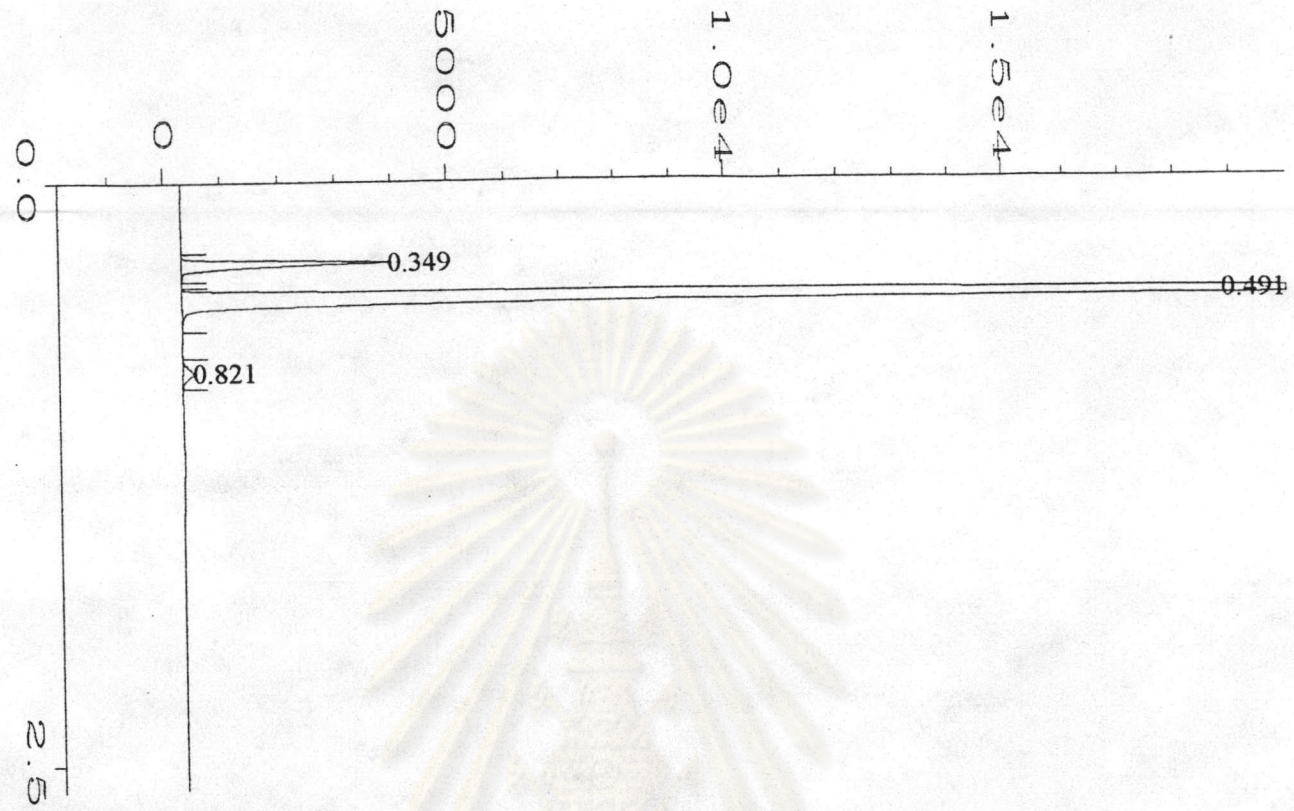
หมายเหตุ ปกติค่าความเข้มข้นเป็นเปอร์เซนต์ของมีเธน จะต้องนำไปคูณกับค่า Relationship Standard Gas (1% ของแก๊ส มีค่าเท่ากับ 163.5 นาโนโมล) และนำค่าดังกล่าวไปใช้ในการคำนวณ Linear Regression ของกราฟมาตรฐาน แต่ในที่นี้จะถอด Factor ดังกล่าวออก เพื่อให้ง่ายต่อการคำนวณ และให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ

ดังนั้นค่าในแกนX ซึ่งเป็นค่าที่ต้องการทราบ จะต้องนำไปคูณกับ 163.5 ก่อน จึงได้ค่าที่ต้องการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 แก๊สมีเธนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



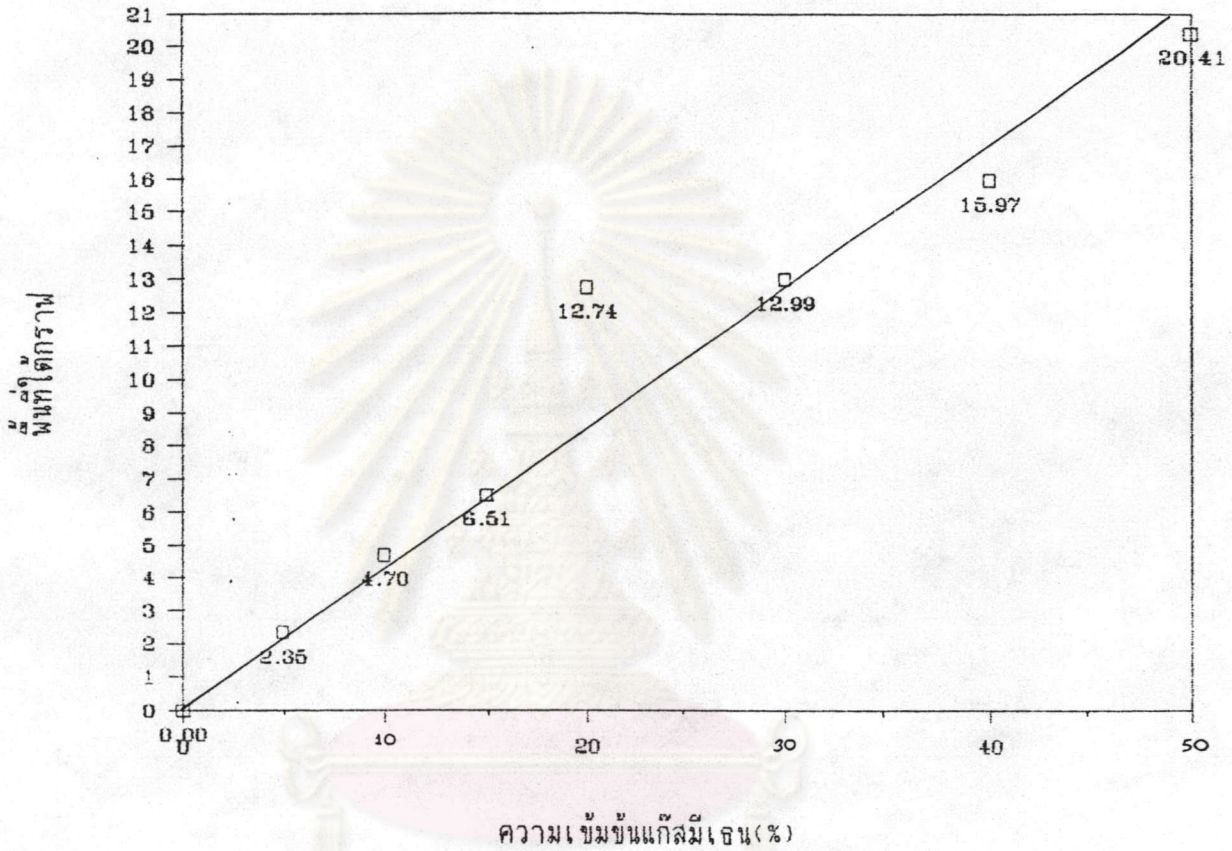
Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\STEROL\NV-F0133.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	0.349	5585	3731	BB	0.037	6.2770
2	0.491	82836	41900	BB	0.030	93.0936
3	0.821	560	177	BB	0.050	0.6294

Total area = 88981

รูปที่ 12 แสดงเวลาที่แก๊สมีเธนออกจากคอลัมน์ (0.491 นาที)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานของแก๊สมีเธนความเข้มข้นต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ข้อมูลตาราง

ตารางที่ 1 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่างๆ และบ่มไว้ที่37°C เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	pHที่ 10mM	pHที่ 20 mM	pHที่ 30 mM
3:1	6.44	5.44	4.85
2:1	6.47	5.57	4.93
1:1	6.50	5.81	4.94
1:2	6.57	5.98	4.93
1:3	6.53	5.86	5.09
pH เฉลี่ย	6.50	5.73	4.95

ตารางที่ 2 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่างๆ และบ่มไว้ที่55°C เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	pHที่ 10mM	pHที่ 20 mM	pHที่ 30 mM
3:1	6.27	5.89	4.96
2:1	6.50	6.05	4.94
1:1	6.37	6.06	4.96
1:2	6.33	5.97	5.11
1:3	6.36	5.79	5.00
pH เฉลี่ย	6.37	5.95	4.99

ตารางที่ 3 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดแลคติคให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่างๆ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	pHที่ 10mM	pHที่ 20 mM	pHที่ 30 mM
3:1	6.30	5.79	5.02
2:1	6.22	5.84	4.95
1:1	6.36	5.91	4.89
1:2	6.37	5.93	4.89
1:3	6.47	5.96	5.18
pH เฉลี่ย	6.34	5.89	4.97

ตารางที่ 4 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิคให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่างๆ และบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	pHที่ 10mM	pHที่ 20 mM	pHที่ 30 mM
3:1	6.41	5.71	4.88
2:1	6.50	5.73	4.94
1:1	6.49	5.58	4.88
1:2	6.43	5.55	4.94
1:3	6.52	5.56	4.94
pH เฉลี่ย	6.47	5.62	4.92

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิคให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ และบ่มไว้ที่ 55°C เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	pHที่ 10mM	pHที่ 20 mM	pHที่ 30 mM
3:1	6.44	5.44	4.98
2:1	6.47	5.60	4.98
1:1	6.43	5.76	4.95
1:2	6.42	5.88	4.92
1:3	6.54	5.86	5.01
pH เฉลี่ย	6.46	5.71	4.97

ตารางที่ 6 แสดงค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เลี้ยงอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิคให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	pHที่ 10mM	pHที่ 20 mM	pHที่ 30 mM
3:1	6.24	5.97	4.81
2:1	6.33	5.92	4.81
1:1	6.49	5.78	4.95
1:2	6.47	5.81	4.88
1:3	6.53	5.74	4.91
pH เฉลี่ย	6.41	5.84	4.87

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดโพรพิโอนิคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลโดยมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมแลคติคให้ได้ความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเชื้อ 20 mM จากนั้นจึง		
	ไม่เติมซับสเทรตใดๆ ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ	เติมเมธานอล 5mM ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ	เติม$H_2:CO_2$ (80:20) ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ
2:1	5.31	5.12	5.60
1:1	4.98	5.35	5.41
1:2	4.59	5.16	5.68
1:3	5.92	5.29	5.53
1:11	5.03	5.52	5.22
pH เฉลี่ย	5.17	5.29	5.49

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซับสเทรตชนิดต่างๆเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมของอะซิโตเจนที่แยกโดยใช้กรดแลคติคและเมธาโนเจนที่แยกโดยใช้เมธานอลโดยมีการเติมทรายเป็นตัวค้ำจุนและบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา42วัน

อัตราส่วน A:M	ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมแลคติคให้ได้ความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเชื้อ 20 mM จากนั้นจึง		
	ไม่เติมซับสเทรตใดๆ ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ	เติมเมธานอล 5mM ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ	เติม$H_2:CO_2$ (80:20) ในวันที่14ของการเลี้ยงเชื้อ
2:1	5.42	5.56	5.45
1:1	5.19	5.34	5.47
1:2	5.37	5.37	5.40
1:3	5.36	5.38	5.33
1:11	5.58	5.42	5.33
pH เฉลี่ย	5.38	5.41	5.40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

1. <u>การศึกษาโครงสร้างภายในของกากตะกอนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่านตัวอย่าง (Transmission electron microscope)</u>

ทำการศึกษาโครงสร้างภายในของกากตะกอน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่านตัวอย่าง ดังนี้

เตรียมตัวอย่างกากตะกอน เพื่อศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่านตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างกากตะกอนมาทำการทดลอง ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1.1 นำกากตะกอนแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.3 เป็นเวลา 15 นาที และเปลี่ยนสารละลาย 2 ครั้ง

1.2 นำกากตะกอนแช่ใน 2.5% กลูตาราลดีไฮด์ ใน 0.1โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.2 เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C

1.3 เมื่อครบเวลา นำกากตะกอนไปล้างด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

1.4 นำกากตะกอนแช่ใน 1% ออสเมียมเททราออกไซด์ ใน 0.1โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.5 ล้างกากตะกอน ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.2

1.6 ทำตัวอย่างกากตะกอนให้แห้งโดยใช้ลำดับของเอทธิลแอลกอฮอล์ ดังนี้ 35%, 70%, 95%, 100% และ 100% ครั้งละ 15 นาที

1.7 แช่กากตะกอนในโพรพิลินออกไซด์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ซึ่งสารตัวนี้เป็นตัวกลางระหว่าง แอลกอฮอล์และเรซิน

1.8 แช่กากตะกอนในสารละลายโพรพิลินออกไซด์: เรซิน (1:1) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.9 แช่กากตะกอนในเรซิน 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาทีโดยแต่ละครั้งใช้ Vacumm pump ดูดไอของโพรพิลินออกไซด์ออกเพื่อให้เรซินเข้าเซลล์อย่างสมบูรณ์

1.10 หยดเรซินลงแม่พิมพ์ ประมาณครึ่งหนึ่งของความสูงแม่พิมพ์ แล้วแตะตัวอย่างลงไป เขี่ยให้ลงก้นหลุม จากนั้นจึงเติมเรซินจนเต็ม

1.11 อบที่ 60°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้ block แข็งตัว

1.12 นำพลาสติคที่ได้ไปเจียนโดยใช้มีดแก้ว ให้หน้าตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมูที่ด้านยาวที่สุดน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร หน้าตัดเรียบ

1.13 ตัดตัวอย่างให้บางเป็นพิเศษ ด้วยเครื่องตัดแบบบาง ultrotone, LKB ของประเทศสวีเดน โดยให้ได้ชิ้นตัวอย่างที่มีความหนาประมาณ 60-100 นาโนเมตร โดยสังเกตุจากชิ้นตัวอย่างที่ตัดจะมีสีเทาเงิน (ความหนาของตัวอย่างบอกโดยดูสีของ section ซึ่งลอยอยู่ในน้ำร่วมกับ การสะท้อนแสงที่ได้รับจากไฟนีออน ซึ่งติดกับเครื่องมือ

1.14 เมื่อได้ section ที่พอใจ แตะกลุ่มของ section ในแหล่งน้ำด้วยแผ่นตาข่าย (GRID) เพื่อนำมาทำการย้อมในสารละลายสำหรับย้อม โดยหยด 5% ยูเรนิลอาซิเตท ลงบนแผ่นพาราฟิล์ม จากนั้นนำ GRID ที่มี section มาลอยบนผิวของหยดยูเรนิลอาซิเตท โดยให้ด้านที่มี section คว่ำลง แล้วใช้ภาชนะทึบแสงปิดบริเวณแผ่นพาราฟิล์มที่มีสารละลายยูเรนิลอาซิเตท และ GRID ลอยอยู่ ทิ้งไว้ 20 นาที

1.15 ใช้คีมนกแก้ว คีบ GRID จุ่มขึ้นลงในน้ำกลั่นที่ต้มและกรอง 10-15 จุ่ม แล้วจึงย้อม GRID ในหยดของเลดซิเตรท ซึ่งมีเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์วางใกล้ๆหยดของเลดซิเตรท เพื่อดูดคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศบริเวณนั้น ปิดบริเวณนั้นด้วยฝาของจานเลี้ยงเชื้อ 10 นาที

1.16 ล้าง GRID ด้วย 0.02 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลา 30 วินาที

1.17 ล้าง GRID ด้วยน้ำกลั่นที่ต้มและกรอง 2-3 ครั้ง ครั้งละ 10 จุ่ม ซับ GRID ให้แห้ง

1.18 นำตัวอย่างดังกล่าว ไปทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดผ่านตลอด แบบ JEM-100SX ของบริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น

2. การศึกษาลักษณะภายนอกของกากตะกอนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน (Scanning electron microscope)

2.1 แช่กากตะกอนด้วย 2.5% กลูตาราลดีไฮด์ ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.2 นำกากตะกอน ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

2.3 แช่กากตะกอน ในสารละลายออสเมียมเททราออกไซด์ 1% ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปล้างน้ำ

2.4 ดึงน้ำออกจากตัวอย่างโดยใช้ เอทธิลอัลกอฮอล์เข้มข้น 35%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100% และ 100% ครั้งละ 15 นาที

2.5 ทำให้ตัวอย่างแห้ง โดยใช้ Critical Point Dryer แบบ CPD 20 BALZERS UNION

2.6 Mount ตัวอย่างด้วย Carbon paint

2.7 เคลือบตัวอย่างด้วยผงทอง

2.8 นำตัวอย่างดังกล่าว ไปทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิด SCAN ผ่านตัวอย่างแบบ JSM-T 220 A ของบริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาว พัสตรา เขมาวุฒานนท์ เกิดวันที่ 5 พฤษภาคม พ.ศ. 2511 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2533 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อพ.ศ. 2534

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย