บทที่ 2

ทฤษฎีของกระบวนการไร้อากาศ

2.1 กล่าวนำ

กระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศ (anaerobic treatment) เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยา ซึ่งไม่ได้ใช้ออกซิเจนอิสระในการย่อยสารอินทรีย์ ผลที่ได้จะเป็นก๊าซมีเทน และสารอนินทรีย์ต่างๆ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แอมโมเนีย เป็นต้น

กระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศ มีประสิทธิภาพในการบำบัดใกล้เคียงกับกระบวนการบำบัดแบบใช้อากาศ (aerobic treatment) แต่มีข้อที่ได้เปรียบที่เหนือกว่ากระบวนการบำบัดแบบใช้อากาศดังนี้คือ

ก. ไม่สิ้นเปลืองพลังงานในการเติมอากาศให้แก่ระบบบำบัด เพราะการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไร้อากาศในน้ำเสียไม่มีการใช้ออกซิเจนอิสระ ซึ่งจะส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการและการดูแลรักษาลดน้อยลงไป ดังนั้นในปัจจุบันกระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศจึงได้รับความสนใจกันมากขึ้น

ข. สามารถทำงานได้ดีหลังจากที่มีการหยุดการทำงานไปชั่วเวลาหนึ่งโดยไม่ต้องมีการเลี้ยงแบกทีเรียใหม่

ต. ต้องการอาหารเสริมน้อยกว่ากระบวนการบำบัดแบบใช้อากาศ

ง. ให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นก๊าซมีเทนซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงได้

ส่วนข้อเสียที่สำคัญคือไม่สามารถกำจัดไนโตรเจนได้ เมื่อน้ำทิ้งถูกระบายลงสู่แหล่งน้ำจะทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชั่นซึ่งเป็นผลให้ออกซิเจนละลายในแหล่งน้ำลดลง นอกจากนี้ยังเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาเรื่องกลิ่น

จากข้อได้เปรียบดังกล่าวจึงทำให้กระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบัน ซึ่งเป็นผลทำให้กระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศได้รับการพัฒนาวิธีการใหม่ๆ มากขึ้น

2.2 จุลวิทยาและชีวเคมีของกระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศ

การย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ในกระบวนการแบบไร้อากาศเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้ออกซิเจนอิสระเป็นสารรับอิเลคตรอน หรือไม่มีการสร้างออกซิเจนขึ้นในการย่อยสลาย[8,9] ปฏิกิริยาชีวเคมีที่เกิดจะเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้เป็นก๊าซมีเทน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซอื่นๆ

อีกเล็กน้อย โดยมีขั้นตอนการย่อยสลายที่ค่อนข้างซับซ้อน อาจแบ่งขั้นตอนของกลไกที่เกิดขึ้นได้เป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ ได้แก่

1. ขั้นตอนการย่อยสลายที่ทำให้เกิดกรด (acid formation หรือ non-methanogenic phase)

2. ขั้นตอนการย่อยสลายที่ทำให้เกิดก๊าซมีเทน (methane formation หรือ methanogenic phase)

โดยในการย่อยทั้งสองขั้นตอนนี้สามารถจำแนกแบกทีเรียที่สำคัญในการทำงานออกได้เป็น 4 ประเภทด้วยกัน คือ

1. acid forming bacteria
2. acetogenic bacteria
3. acetoclastic methane bacteria
4. H_2-utilizing methane bacteria

ซึ่งสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 2.1

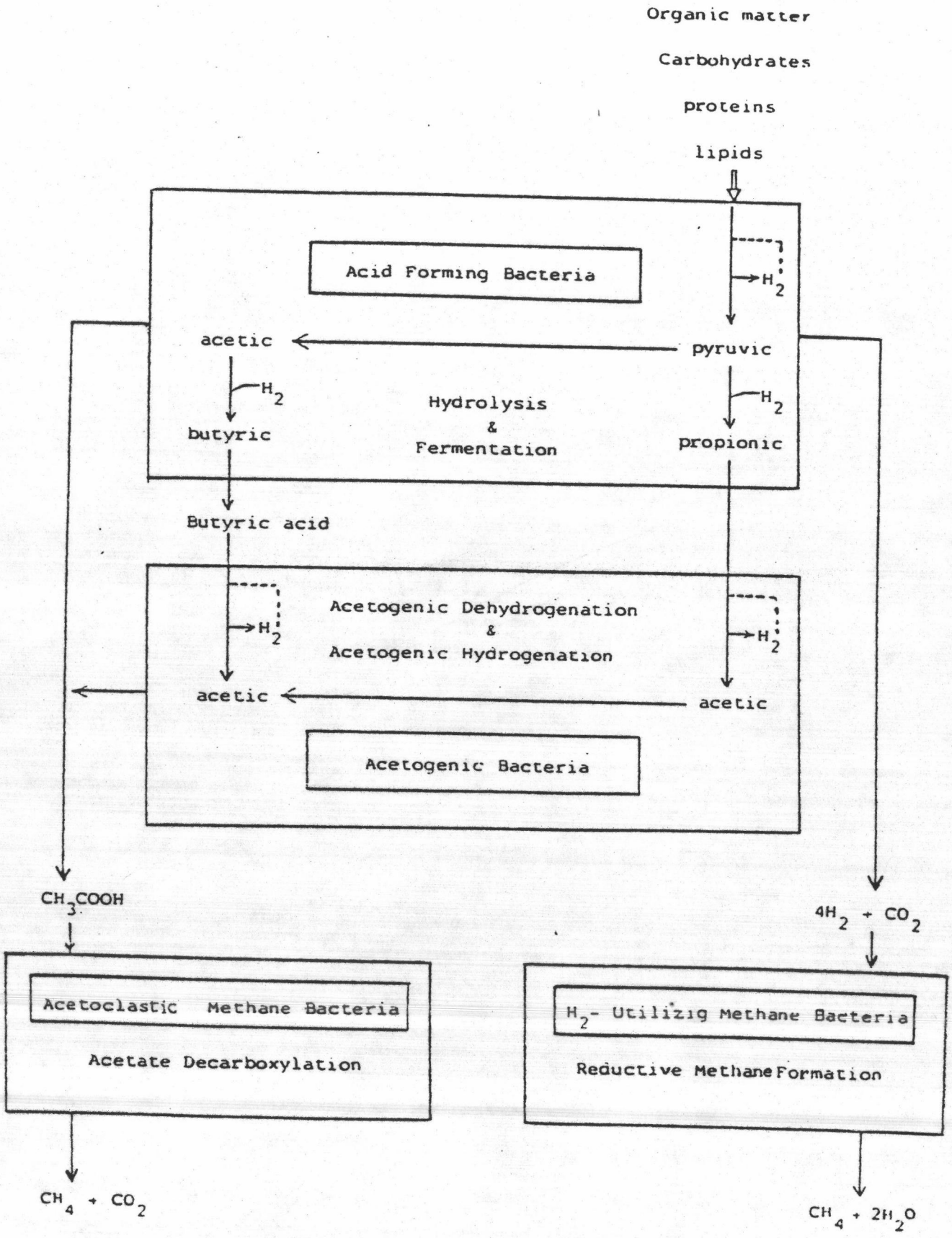
2.2.1 ขั้นตอนการย่อยสลายที่ทำให้เกิดกรด

ในขั้นตอนการย่อยสลายที่ทำให้เกิดกรดนี้ เป็นการย่อยสลายของจุลินทรีย์หลายประเภท แต่ที่สำคัญเป็นแบกทีเรีย 2 ประเภทคือ

1) Acid Forming Bacteria
2) Acetogenic Bacteria

โดยทั่วไปพบว่า แบกทีเรียทั้ง 2 ประเภทส่วนใหญ่เป็นแบกทีเรียที่ดำรงชีวิตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเลย(obligate anaerobic bacteria) มีส่วนน้อยมากที่เป็นแบกทีเรียที่ดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic bacteria)[10,11,12] ตารางที่ 2.1 แสดงถึงสายพันธุ์และชนิดของแบกทีเรียที่พบในขั้นตอนนี้ ส่วนตารางที่ 2.2 แสดงถึงแบกทีเรียบางส่วนที่พบในขั้นตอนของการย่อยสลายที่ทำให้เกิดกรดในแหล่งอาหารประเภทต่างๆ

ขั้นตอนการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ทำให้เกิดกรด อาจแบ่งตามกลไกของการย่อยสลายได้เป็น 2 ส่วนคือ



รูปที่ 2.1 กระบวนการเมตะบอลิซึมของกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ[13]

ตารางที่ 2.1 ชนิดของแบกทีเรียในขั้นตอนการย่อยสลายที่ทำให้เกิดกรด[14]

Genus	Bacterial species	Reference
Aerobacter	*A. aerogenes*	Toerien (1967a)
Aeromonas	*Aeromonas sp.*	Kotze *et al.* (1964)
Alcaligenes	*A. bookeri*	Toerien (1967b)
	A. faecalis	McCarty *et al.* (1962), Toerien (1967b)
	A. viscolactis	McCarty *et al.* (1962)
	Alcaligenes sp.	Kotze *et al.* (1964)
Bacillus	*B. cereus*	Hattingh *et al.* (1967), Toerien (1967a,b)
	B. cereus var. mycoides	Hattingh *et al.* (1967), Toerien (1967a,b)
	B. circulans	Toerien (1967a,b)
	B. colorhythmos	Buck *et al.* (1954)
	B. firmus	Toerien (1967b)
	B. kurstaki	Cookson and Burbank (1965), Burbank *et al.* (1966)
	B. mycoides	Hattingh *et al.* (1967), Toerien (1967a, b)
	B. pantothenticus	Hattingh *et al.* (1967)
	B. pumilis	Hattingh *et al.* (1967), Toerien (1967b)
	B. sphaericus	Toerien (1967b)
	B. subtilis	Toerien (1967a)
	Bacillus sp.	Toerien (1967a)
Bacteroides	*Bacteroides sp.*	Post *et al.* (1967)
Clostridium	*C. aminovalericum*	Hardman and Stadtman (1960)
	C. carnofaetidum	Cookson and Burbank (1965), Burbank *et al.* (1966)
Escherichia	*E. coli*	McCarty *et al.* (1962), Cookson and Burbank (1965)
	E. intermedia	Burbank *et al.* (1966), Toerien (1967b)
	Escherichia sp.	Toerien (1967a)
Klebsiella	*Klebsiella sp.*	Kotze *et al.* (1964)
Leptospira	*L. biflexa*	Burbank *et al.* (1966)
	Leptospira sp.	Toerien (1967b)
Micrococcus	*M. candidus*	Maki (1954)
	M. luteus	Toerien (1967a, b)
	M. roseus	Toerien (1967b)
	M. varians	McCarty *et al.* (1962), Toerien (1967a, b)
	Micrococcus sp.	Toerien (1967a, b)
Neisseria	*N. catarrhalis*	Kotze *et al.* (1964)
Paracolobactrum	*P. intermedium*	McCarty *et al.* (1962)
	P. coliforme	Toerien (1967b)
Proteus	*P. vulgaris*	Toerien (1967b)
Pseudomonas	*P. aeruginosa*	Toerien (1967b)
	P. ambigua	Toerien (1967a)
	P. denitrificans	Toerien (1967a)
	P. alcaligenes	Burbank *et al.* (1966)
	P. pestis	Toerien (1967a)
	P. pseudomallei	Toerien (1967b)
	P. reptilivora	Toerien (1967a)
	P. riboflavina	McCarty *et al.* (1962), Toerien (1967b)
	Pseudomonas sp.	Toerien (1967b)
		Burbank *et al.* (1966), Hattingh *et al.* (1967)
		Kotze *et al.* (1964) Toerien (1967a, b)
Rhodopseudomonas	*R. palustris*	Toerien (1967b)
Sarcina	*S. cookeni*	Cookson and Burbank (1965), Burbank *et al.* (1966)
	S. lutea	McCarty *et al.* (1962)
Serratia	*S. indicans*	Burbank *et al.* (1966)
Streptococcus	*S. diplococcus*	Buck *et al.* (1953)
Streptomyces	*S. bikiniensis*	Toerien (1967b)

ตารางที่ 2.2 แบกทีเรียบางส่วนที่พบในขั้นตอนการย่อยสลายที่ทำให้เกิดกรดในแหล่งอาหารประเภทต่างๆ[15]

Bacterium \ Isolated on	Cellulose	Starch	Protein		Lipid
			Peptone	Casein	
Aerobacter aerogenes					
Alcaligenes bookerii					X
A. faecalis	X				
Bacillus sp					
B. cereus var. *mycoides*		X		X	
B. cereus	X	X	X	X	
B. circulans			X		
B. firmus			X		
B. knelfelhampi					
B. megaterium	X	X		X	X
B. pumilis			X	X	
B. sphuericus			X	X	X
B. subtilis			X	X	X
Clostriduim carnofoetidum	X				
Escherichia coli			X	X	
E. intermedia					
Micrococcus candidus		X			
M. luteus					X
M. varians		X	X	X	
M. ureae		X			
Puracolobacterium intermedium			X		
P. coliforme			X		
Proteus vulgaris	X				
Pseudomonas aeruginosa	X				
P. ambigua					
P. oleovorans					X
P. perolens					X
P. pseudomallei					
P. reptilivora	X				
P. riboflavina	X				X
P. spp.	X	X	X	X	X
Sarcina cooksonii					
Streptomyces bikiniensis					X

1.การย่อยสลายภายนอกเซลล์ เป็นการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยกระบวนการฮัยโดลัยสิส(hydrolysis) หรืออาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า กระบวนการแตกสลายโพลีเมอร์ (polymer breakdown) ในขั้นนี้สารอินทรีย์ประเภทซับซ้อนทั้งที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน จะถูกทำให้ละลายน้ำโดยปฏิกิริยาฮัยโดลัยสิส ซึ่งใช้เอนไซม์ที่ขับออกมาสู่ภายนอกเซลล์ของแบกทีเรีย(extracellular enzyme)เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลของปฏิกิริยาที่ได้เป็นสารอินทรีย์ที่ไม่ซับซ้อนและละลายน้ำได้ เช่น กลูโคส กรดอะมิโน และกลีเซอรอล ซึ่งมีขนาดของโมเลกุลเล็กพอที่จะสามารถดูดซึมเข้าไปภายในเซลล์ได้

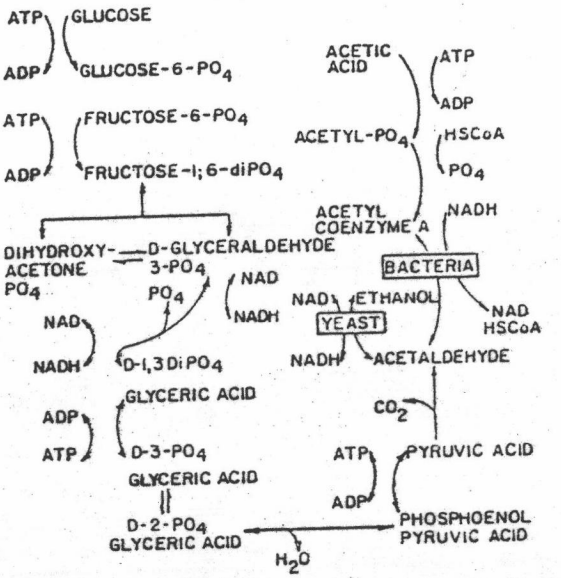
2.การย่อยสลายภายในเซลล์ สารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กๆที่เป็นผลมาจากกระบวนการฮัยโดลัยสิสจะถูกดูดซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ และถูกย่อยสลายโดยกลไกการย่อยสลายภายในเซลล์ตามแต่ชนิดของสารอินทรีย์นั้นๆ[8] ผลที่ได้รับเป็นกรดอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และมีคาร์บอนอะตอมไม่เกิน 5 ตัว เรียกว่า กรดโวลาไทล์ (volatile acid) แอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซอื่นๆอีกเล็กน้อย พร้อมกับมีการสร้างเซลล์ใหม่ด้วย

การย่อยสลายกลูโคส กรดอะมิโนและกลีเซอรอลของแบกทีเรีย ส่วนใหญ่จะได้กรดไพรูวิค(pyruvic acid)ก่อนเสมอ[16] แล้วกรดไพรูวิคจึงถูกย่อยสลายต่อให้เป็นกรดอะซิติค(acitic acid) และกรดอินทรีย์อื่นๆที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ นอกนั้นเป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ตังอย่างเช่น กลูโคสจะถูกย่อยสลายผ่านวิธีทางไกลคอลิซีส (pathway of glycolysis) (ดูรูปที่ 2.2) ซึ่งให้ intermediate product เป็นกรดไพรูวิค และให้ผลสุดท้ายเป็นแอททานอล(เมื่อเป็นกระบวนการไกลคอลิซีสที่เกิดจากยีสต์)และ/หรือกรดอะซีติค(เมื่อเป็นกระบวนการไกลคอลิซีสที่เกิดจากแบกทีเรีย)

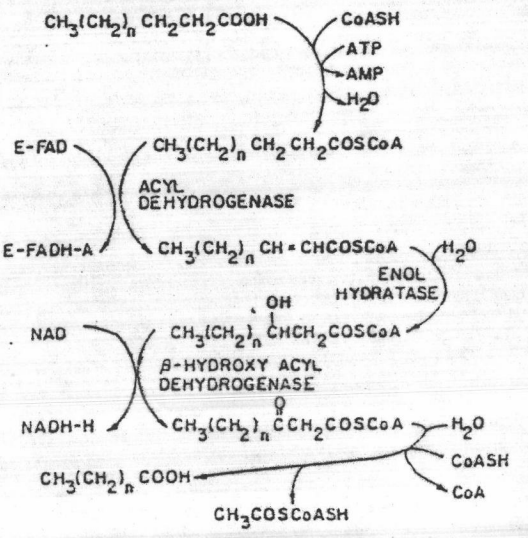
การย่อยสลายที่ไม่ผ่านกรดไพรูวิคสามารถเกิดขึ้นได้บ้างในบางกรณี เช่น หนึ่งโมเลกุลของกลูโคสแตกตัว(splitting)ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ได้ 2 โมเลกุลของกรดอะซิติค[17] หรือกรดไขมันที่มีขนาดใหญ่(long chain fatty acid) จะมีการย่อยสลายแบบเบต้าออกซิเดชั่น (B-oxidation) ดังรูปที่ 2.3 หรือกรดกลูตามิค(glutamic acid) ที่มีการย่อยสลายโดยปฏิกิริยาดีอะมิเนชั่น(deamination reaction) ดังรูปที่ 2.4 Thimann[14] ได้แสดงให้เห็นว่ากรดอะซิติคบางส่วนอาจเกิดได้จากการรวมตัวของคาร์บอนไดออกไซด์กับไฮโดรเจน โดยแบกทีเรียชื่อClostridum aceticum ดังสมการ

$$2CO_2 + 4H_2 \longrightarrow CH_3COOH + 2H_2O \qquad (1)$$

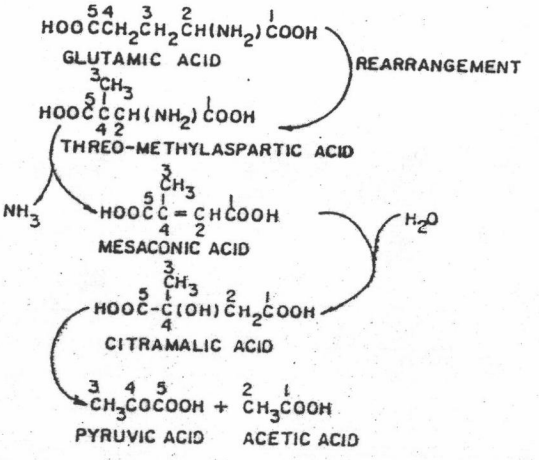
แบกทีเรียที่ย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลเล็กให้เป็นกรดไพรูวิคคือแบกทีเรีย



รูปที่ 2.2 การย่อยสลายกลูโคสโดยผ่านกระบวนการไกลคอลิซิส[18]



รูปที่ 2.3 การย่อยสลายไขมันโดยผ่านกระบวนการเบต้าออกซิเดชั่น[19]



รูปที่ 2.4 การย่อยสลายกรดกลูตามิคโดยปฏิกิริยาดีอะมิเนชั่น[20]

ที่สร้างกรด ซึ่งต่อจากนั้นกรดไพรูวิคก็จะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นกรดอินทรีย์ที่มีโมเลกุลใหญ่กว่ากรดอะซิติค เช่นกรดโพรพิโอนิค(propionic acid) หรือกรดบิวทิริค(butyric acid) หรืออาจเป็นกรดอะซิติคเลยก็ได้ กรดอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่ากรดอะซิติคดังกล่าว จะถูกย่อยสลายต่อด้วยแบกทีเรียที่สร้างไฮโดรเจน(hydrogen producing acetogenic bacteria) ให้เป็นกรดอะซิติคและก๊าซไฮโดรเจน

McCarty[12,21] สรุปว่าผลจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ในขั้นตอนนี้จะได้กรดอะซิติค กรดโพรพิโอนิค และกรดบิวทิริคเป็นส่วนใหญ่ตามลำดับ และเชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของกรดโวลาไทล์เหล่านี้จะมีผลกระทบโดยตรงต่อการสร้างมีเทนในขั้นต่อไป

ขั้นตอนการย่อยสลายที่ทำให้เกิดกรดนี้จะมีผลต่อการลดค่าซีโอดีของน้ำเสียน้อยมาก หรืออาจกล่าวได้ว่าไม่มีการลดลงเลยในกรณีที่ไม่เกิดก๊าซไฮโดรเจน กล่าวคืออิเลคตรอนที่อยู่ในสารอาหาร(substrate) เดิมจะถูกส่งต่อไปให้สารอินทรีย์ที่ยังคงอยู่ในน้ำเสีย ส่วนของสารอาหารที่ลดน้อยไปบ้างนั้นเป็นผลมาจากการสูญเสียประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในระหว่างที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปของสารอินทรีย์เท่านั้น ส่วนในกรณีที่มีการสร้างก๊าซไฮโดรเจน โดยอิเลคตรอนถูกส่งให้กับไฮโดรเจนอิออน ก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจะหนีไปจากระบบจึงเป็นการลดอิเลคตรอนของสารอาหารทำให้สภาวะออกซิเดชั่นลดลง เป็นผลให้ค่าซีโอดีลดลง

2.2.2 ขั้นตอนการย่อยสลายที่ทำให้เกิดก๊าซมีเทน

ในขั้นตอนนี้มีแบกทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ในขั้นตอนแรก อันได้แก่ กรดโวลาไทล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจน และอื่นๆ โดยนำสารเหล่านี้ไปใช้เป็นสารอาหารและแหล่งพลังงาน การย่อยสลายกรดโวลาไทล์ในขั้นตอนนี้จะเป็นการลดค่าซีโอดีหรือค่าบีโอดีในน้ำเสีย และเกิดก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้น ซึ่งถือว่าเป็นการสิ้นสุดของกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไร้อากาศ ประมาณว่าพลังงานเคมีที่อยู่ในรูปซีโอดีกว่าร้อยละ 90 จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของก๊าซมีเทน[22]

แบกทีเรียในขั้นตอนนี้อาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามชนิดของสารที่ถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทน คือ

1) แบกทีเรียที่สร้างมีเทนจากอะซิติด (acetoclastic methane bacteria)

2) แบกทีเรียที่สร้างมีเทนจากคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน (H_2 - utilizing methane bacteria)

Balch et.al.[23] ได้สรุปเชื้อบริสุทธิ์ของแบกทีเรียชนิดต่างๆที่สร้างมีเทนไว้ดังตารางที่ 2.3

แม้ว่าความรู้และความเข้าใจในกระบวนการแบบไร้อากาศจะถูกพัฒนาทั้งทางด้านจุลชีววิทยาและชีวเคมีรวมทั้งรูปแบบต่างๆของกระบวนการเป็นเวลาติดต่อกันมากกว่า 100 ปีก็ตาม แต่กลไกการสร้างก๊าซมีเทนและเมตะบอลิซึมของแบกทีเรียเหล่านี้ยังคงไม่แจ่มชัด ผลการศึกษาและผลงานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่สามารถอธิบายถึงพฤติกรรมต่างๆที่เกิดขึ้นเพียงสภาวะหนึ่งๆเท่านั้น แต่ก็เป็นส่วนที่ทำให้เกิดความเข้าใจต่อกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศมากขึ้น การศึกษาและงานวิจัยที่ควรกล่าวถึงพอเป็นสังเขป มีดังนี้

Van Senus[24] ได้ให้เหตุผลเป็นคนแรกว่าการย่อยสลายแบบไร้อากาศของวัสดุพวกเซลลูโลสเกิดจากการทำงานรวมกันของจุลินทรีย์หลายชนิด

Castellani et.at.[24] ได้รายงานการศึกษาอย่างละเอียดของการเกิดก๊าซมีเทนว่าเป็นผลมาจากการอยู่ร่วมกันและพึ่งพาอาศัยของจุลินทรีย์

Omelianski[25] ได้ศึกษาการเกิดก๊าซมีเทนจากเซลลูโลสและได้เขียนสมการการเกิดก๊าซมีเทนจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจนดังนี้

016923

	Type strain	Former designation	Substrates for growth and CH_4 production
Order I. *Methanobacteriales* (type order)			
Family I. *Methanobacteriaceae*			
Genus I. *Methanobacterium* (type genus)			
1. *Methanobacterium formicicum* (neotype species)	MF	*Methanobacterium formicicum*	H_2, formate
2. *Methanobacterium bryantii*	M.o.H.	*Methanobacterium* sp. strain M.o.H.	H_2
Methanobacterium bryantii strain M.o.H.G.		*Methanobacterium* sp. strain M.o.H.G.	H_2
3. *Methanobacterium thermoautotrophicum*	ΔH	*Methanobacterium thermoautotrophicum*	H_2
Genus II. *Methanobrevibacter*			
1. *Methanobrevibacter ruminantium* (type species)	MI	*Methanobacterium ruminantium* strain MI	H_2, formate
2. *Methanobrevibacter arboriphilus*	DH1	*Methanobacterium arbophilicum*	H_2
Methanobrevibacter arboriphilus strain AZ		*Methanobacterium* sp. strain AZ	H_2
Methanobrevibacter arboriphilus strain DC		*Methanobacterium* strain DC	H_2
3. *Methanobrevibacter smithii*	PS	*Methanobacterium ruminantium* strain PS	H_2, formate
Order II. *Methanococcales*			
Family I. *Methanococcaceae*			
Genus I. *Methanococcus*			
1. *Methanococcus vannielii* (neotype species)	SB	*Methanococcus vannielii*	H_2, formate
2. *Methanococcus voltae*	PS	*Methanococcus* sp. strain PS	H_2, formate
Order III. *Methanomicrobiales*			
Family I. *Methanomicrobiaceae* (type family)			
Genus I. *Methanomicrobium* (type genus)			
1. *Methanomicrobium mobile* (type species)	BP	*Methanobacterium mobile*	H_2, formate
Genus II. *Methanogenium*			
1. *Methanogenium cariaci* (type species)	JR1	Cariaco isolate JR1	H_2, formate
2. *Methanogenium marisnigri*	JR1	Black Sea isolate JR1	H_2, formate
Genus III. *Methanospirillum*			
1. *Methanospirillum hungatii*	JF1	*Methanospirillum hungatii*	H_2, formate
Family II. *Methanosarcinaceae*			
Genus II. *Methanosarcina* (type genus)			
1. *Methanosarcina barkeri* (type species)	MS	*Methanosarcina barkeri*	H_2, CH_3OH, CH_3NH_2, acetate
Methanosarcina barkeri strain 227		*Methanosarcina barkeri* strain 227	H_2, CH_3OH, CH_3NH_2, acetate
Methanosarcina barkeri strain W		*Methanosarcina barkeri* strain W	H_2, CH_3OH, CH_3NH_2, acetate

ตารางที่ 2.3 เชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียที่สร้างมีเทน[23]

$$4H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O \qquad (2)$$

Van Mel[24] ในปี คศ.1934 ได้ตั้งทฤษฎี "Carbondioxide Reaction" ซึ่งกล่าวว่าอะซิเตทออกซิเดชั่น(acetate oxidation) จะทำให้เกิดการลดอะตอมของไฮโดรเจนและมีเทน ทั้งนี้เนื่องจากการรวมตัวกันระหว่างไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการ

$$\text{Oxidation: } CH_3COOH + 2H_2O \longrightarrow 2CO_2 + 8H \qquad (3)$$

$$\text{Reduction: } 8H + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O \qquad (4)$$

$$\text{Net : } CH_3COOH \longrightarrow CH_4 + CO_2 \qquad (4)$$

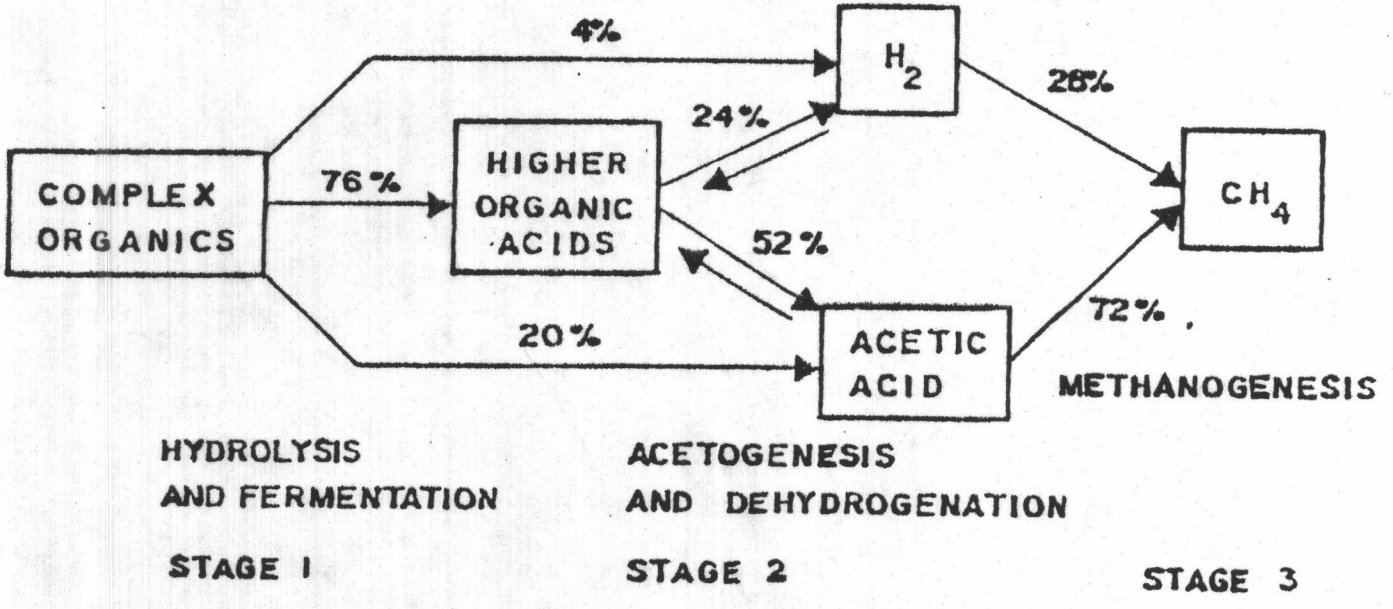
A.M.Buswell et.al.[24] ได้ทำการศึกษากระบวนการแบบไร้อากาศอย่างกว้างขวาง และในปี คศ.1952 ได้เสนอสมการการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไร้อากาศโดยทั่วไปคือ

$$C_nH_aO_b + (n-a-b)H_2O \longrightarrow (n-a+b)CO_2 + (n+a-b)CH_4 \qquad (6)$$

Jeris และ McCarty[17] ได้ใช้ธาตุกัมมันตรังสี C_{14} ทดสอบการย่อยสลายของสารอินทรีย์ แสดงให้เห็นว่าประมาณร้อยละ 70 ของก๊าซมีเทนที่เกิดมาจากการสลายตัวของกรดอะซิติคซึ่งเป็นที่ยอมรับกันในปัจจุบัน และได้สรุปการเกิดของก๊าซมีเทนจากการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไร้อากาศ โดยเปรียบเทียบกับซีโอดีได้ดังรูปที่ 2.5

Zeikus[26] ในปี คศ.1980 ได้แสดงให้เห็นว่าแบกทีเรียที่สร้างมีเทนสามารถใช้สารอาหารโดยตรงน้อยกว่าที่เคยสรุปในอดีตมาก กล่าวคือสามารถใช้ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนนอกไซด์ แมททานอล ฟอร์แมท เมทธีลามีน และอะซิเตท เป็นสารอาหารและแหล่งพลังงานได้

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่า แบกทีเรียที่สร้างมีเทนเป็นแบกทีเรียที่ดำรงชีวิตอยู่ได้เฉพาะในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น(obligate anaerobic bacteria) สามารถเจริญเติบโตในช่วงพีเอชแคบๆ และปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมจะมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตซึ่งจะกล่าวในหัวข้อต่อไป



รูปที่ 2.5 การเกิดก๊าซมีเทนจากการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไร้อากาศโดยเปรียบเทียบกับซีโอดี[17]

2.3 สภาวะแวดล้อมต่างๆที่มีผลต่อการย่อยสลายแบบไร้อากาศ

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดจะเจริญเติบโตและดำรงชีวิตอยู่ได้นั้น นอกจากจะต้องการอาหารแล้วยังต้องอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมอีกด้วยแบกทีเรียในระบบบำบัดสารอินทรีย์ในน้ำเสียก็เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และเนื่องจากความสามารถในการบำบัดน้ำเสียของระบบบำบัดขึ้นอยู่กับปริมาณของแบกทีเรียในระบบ ดังนั้นเพื่อให้ระบบบำบัดทำงานได้ผลดี จึงจำเป็นต้องรักษาสภาวะแวดล้อมของระบบบำบัดให้เหมาะสมกับแบกทีเรียในระบบ เพื่อให้แบกทีเรียในระบบเจริญเติบโตได้ดีที่สุด สำหรับระบบบำบัดสารอินทรีย์ในน้ำเสียแบบไร้อากาศนั้นมีแบกทีเรีย 2 ประเภททำงานต่อเนื่องกันดังที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องรักษาสภาวะแวดล้อมไว้ให้มีสภาพที่เหมาะสมที่จะให้แบกทีเรีย 2 ประเภทอยู่ด้วยกันได้เป็นอย่างดี ซึ่งนอกจากจะต้องรักษาระบบให้อยู่ในสภาพไร้ออกซิเจนอิสระแล้วยังต้องคำนึงถึงสิ่งเหล่านี้ด้วย คือ

2.3.1 อุณหภูมิ

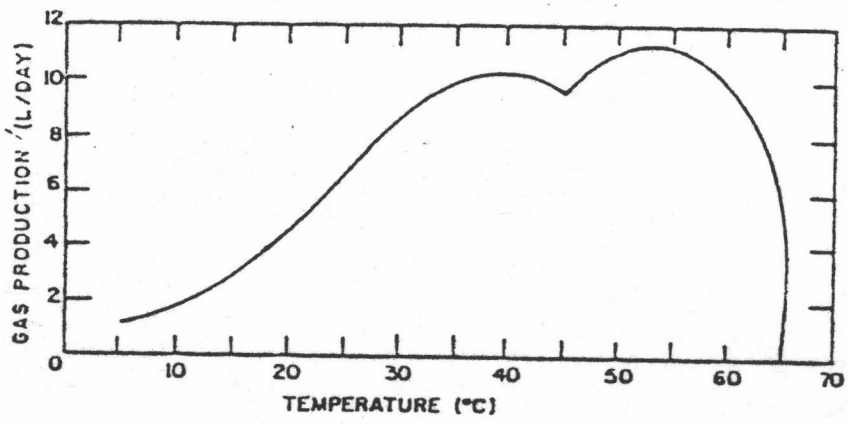
ภายในเซลล์ของแบกทีเรียมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นแบกทีเรียส่วนใหญ่จึงดำรงชีวิตได้ในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 99 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อชนิดและการเจริญเติบโตของแบกทีเรีย และยังมีผลต่อการผลิตก๊าซมีเทนดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.6 นอกจากนี้แบกทีเรียแต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ซึ่งความสามารถในการผลิตก๊าซมีเทนของแบกทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทนบางชนิดที่อุณหภูมิต่างๆได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.7

ในปีคศ.1931 Rudolf และ Heukielekian[27] สามารถที่จะลดเวลาการหมักลงได้โดยเพิ่มอุณหภูมิให้ระบบ ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Fair และ Movre[29]

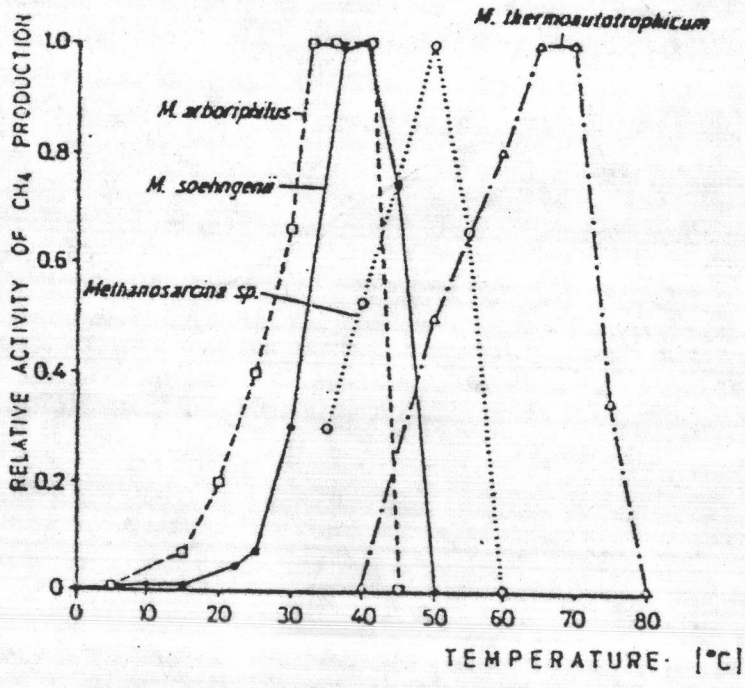
Sherman และ Camevon(1934)[28] ได้แสดงให้เห็นถึงผลของการเพิ่มอุณหภูมิให้กับระบบ และแสดงให้เห็นว่าถ้าเพิ่มหรือลดอุณหภูมิอย่างกระทันหันจะเป็นการฆ่าแบกทีเรียโดยตรง

อย่างไรก็ตาม Stander และ Elzworth[28] ได้ค้นพบว่าการบำบัดแบบไร้อากาศที่อุณหภูมิสูงๆมีข้อจำกัดเพิ่มขึ้น เนื่องจากสารอินทรีย์บางชนิดจะเป็นพิษมากขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ

ในช่วงทศวรรษที่ 1950 งานวิจัยส่วนใหญ่พยายามที่จะหาช่วงของอุณหภูมิที่



รูปที่ 2.6 ผลของอุณหภูมิที่มีต่ออัตราการผลิตก๊าซชีวภาพ[15]



รูปที่ 2.7 ความสามารถในการผลิตก๊าซมีเทนของแบกทีเรียที่สร้างมีเทนบางชนิดที่อุณหภูมิต่างๆ[25]

เหมาะสมสำหรับการหมักแบบไร้อากาศ A.M.Buswell[30] แสดงให้ว่าการบำบัดแบบไร้อากาศสามารถทำได้ในช่วงอุณหภูมิ 0-55 องศาเซลเซียส แต่ช่วงที่มีการย่อยสลายดีนั้นจะอยู่ในช่วง 26-37 องศาเซลเซียสและ 50-55 องศาเซลเซียส Babbitt และ Bauman[30] ได้ลงความเห็นว่า ถังหมักโดยทั่วไปถ้าลดอุณหภูมิลงต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ระบบจะหยุดทำงานโดยสิ้นเชิง

Schleng[28] พบว่าอุณหภูมิระหว่าง 32-35 องศาเซลเซียส จะสามารถบำบัดน้ำเสียได้ดีและมีความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์ด้วย แต่งานวิจัยอื่นสนับสนุนช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่า กล่าวคือ 30-38 องศาเซลเซียส (McCarty)[31] และ 29-40 องศาเซลเซียส (Eckenfelder และ O'connor)[30]

Lawrence และ McCarty[28,30] ได้แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิจะส่งผลกระทบในทางอ้อมต่อกลไกการย่อยสลาย และสรุปว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะเป็นการคัดเลือกพันธุ์ภายในระบบไปด้วย

Pfeffer และ Leiter[30] พบว่าเมื่ออายุตะกอน(SRT)สูงๆแล้วการเพิ่มอุณหภูมิจะไม่มีผลต่อประสิทธิภาพและเสถียรภาพของระบบเลย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lawrance[30] ที่ทำการวิจัยต่อมา

ในปีคศ.1974 Pfeffer และ Liebman[32] ค้นพบว่าประสิทธิภาพของระบบจะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส และสรุปเช่นเดียวกับ Gavber et.al.[33] ว่าการเพิ่มอุณหภูมิให้กระบวนการหมักแบบไร้อากาศ ไม่ได้ช่วยให้ระบบมีเสถียรภาพมากขึ้นแต่ประการใด แต่ช่วยลดเวลาการบำบัดลงเท่านั้น

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไร้อากาศมีอยู่ 2 ช่วงคือ ระหว่าง 30-38 องศาเซลเซียสช่วงหนึ่ง แบกทีเรียที่ทำงานในช่วงนี้เรียกว่า "เมโสฟิลิก แบกทีเรีย" และอุณหภูมิระหว่าง 49-57 องศาเซลเซียสอีกช่วงหนึ่ง ช่วงนี้เรียกว่า "เทอร์โมฟิลิก แบกทีเรีย" และการทำงานของแบกทีเรียในช่วงเทอร์โมฟิลิกจะดีกว่าช่วงเมโสฟิลิก

2.3.2 ค่าพีเอช

พีเอชของแบกทีเรียโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 5-9 แต่สำหรับแบกทีเรียที่สร้าง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มีเทนจะมีช่วงแคบกว่าคือ 6.8-7.2[25,34] แต่งานวิจัยบางชิ้นเสนอว่าควรเป็น 6.6-7.4[35] ความสัมพันธ์ระหว่างก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นในถังกรองไร้อากาศที่พีเอชต่างๆกันได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.8 และความสามารถในการผลิตก๊าซมีเทนของแบกทีเรียบางชนิดที่ค่าพีเอชต่างๆได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเจริญเติบโตของแบกทีเรียกับค่าพีเอชแม้ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างสมบูรณ์ โดยมีอยู่สองสมมุติฐานที่ใช้ในการอธิบายกล่าวคือสมมุติฐานแรกจะเน้นที่ผลของพีเอชที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ส่วนอีกสมมุติฐานหนึ่งค่อนข้างเป็นที่ยอมรับกันมากกว่า โดยเน้นที่ปริมาณไฮโดรเจนอิออนซึ่งมีความแตกต่างกัน ณ.ที่ค่าพีเอชหนึ่ง จะเป็นผลให้ค่าความต่างศักย์ทางเคมีไฟฟ้า(electrochemical gradient) ของการขนส่งสารอาหารและกำจัดของเสียเปลี่ยนแปลงไป[8] โดยที่เมื่อพีเอชมีค่าต่ำทำให้ไฮโดรเจนอิออนมีอยู่มากซึ่งยากแก่การซึมเข้าและออกจากเซลล์ได้ เป็นสาเหตุให้แบกทีเรียตาย

ในปีคศ.1956 Barker[25] สรุปว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมคือ 6.8-7.2 และที่พีเอชมากกว่า 6 หรือ พีเอชมากกว่า 8 การผลิตก๊าซมีเทนจะลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ McCarty[35] เสนอว่า พีเอชที่เหมาะสมควรเป็น 6.6-7.4

Keefer และ Urtes[12] พบว่าไฮโดรเจนอิออนเป็นพิษโดยตรงกับแบกทีเรียในถังหมักแบบไร้ออกซิเจน

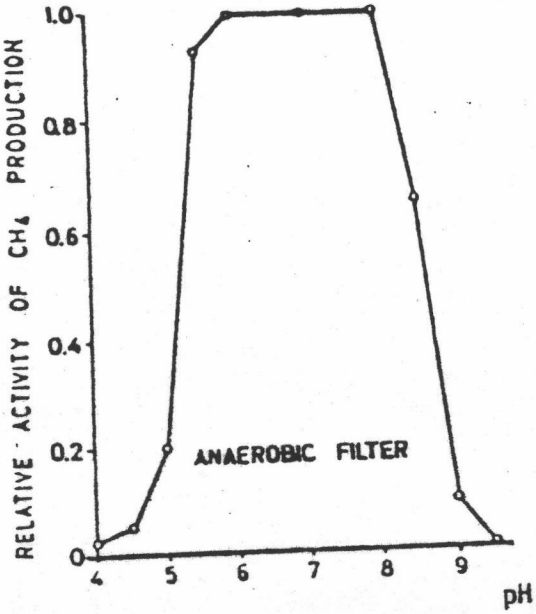
การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ เกิดจากสาเหตุหลักสองประการ คือ จากน้ำเข้าโดยตรง และจากการสร้างกรดโวลาไทล์ในขั้นตอนNon-methanogenic การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเนื่องจากสาเหตุแรกนั้นแก้ไขได้ง่าย แต่ถ้าเกิดจากสาเหตุที่สองซึ่งเป็นผลของกลไกการย่อยสลายของแบกทีเรีย โดยมีปัจจัยอื่นๆเกี่ยวข้องอยู่มากทำให้ยากแก่การควบคุม จนกระทั่งในปี คศ.1969 Pohland[36] ได้เสนอวิธีการควบคุมพีเอช โดยอาศัยความเป็นด่าง เรียกวิธีนี้ว่า การควบคุมโดยสมดุลย์ระหว่างกรดและด่าง (Acid - Base Equilibrium Control) ดังสมการ

$$BA = TA - 0.833(0.85)\ TVA \qquad (7)$$

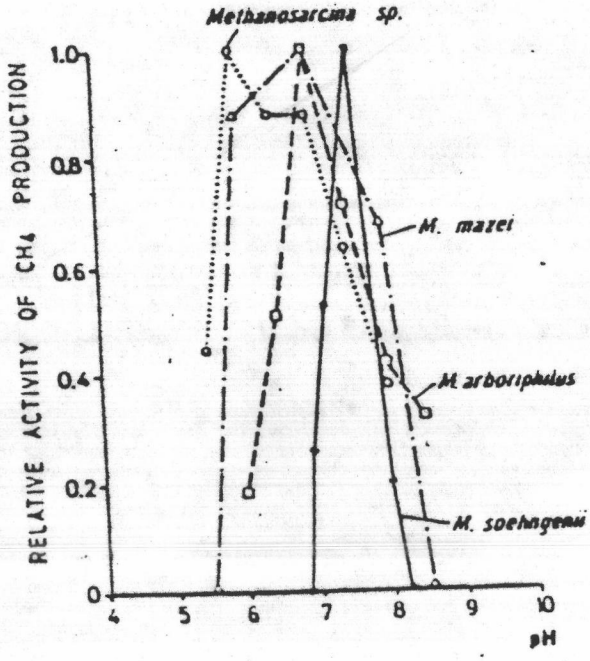
โดย BA = ปริมาณความเป็นด่างไบคาร์บอเนตที่มากเกินพอหรือขาดไป (มก./ล. ของ $CaCO_3$)

TA = ปริมาณความเป็นด่างรวม (Total Alkalinity) วัดโดยการติเตรตถึงพีเอช 4.0 (มก./ล. ของ $CaCO_3$)

TVA = ปริมาณกรดโวลาไทล์รวม (Total Volatile Acid)



รูปที่ 2.8 ความสัมพันธ์ระหว่างก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นในถังกรองไร้อากาศที่ค่าพีเอชต่างๆ[35]



รูปที่ 2.9 ความสามารถในการผลิตก๊าซมีเทนของแบกทีเรียบางชนิดที่ค่าพีเอชต่างๆ[35]

ที่มีอยู่ (มก./ล. ของ CH_3COOH)

0.833 = น้ำหนักสมดุลย์ของ $CaCO_3$ / น้ำหนักสมดุลย์ CH_3COOH

0.85 = มีอะซิติค 85 % จากกรดโวลาไทล์ เมื่อใช้วิธีติเตรทจนถึงพีเอช 4.0

ความจำเป็นในการปรับพีเอชนี้เนื่องจากขั้นตอนแรกคือNon-Methanogenic Phase นั้น จะสร้างกรดขึ้นมาก่อน เป็นเหตุที่อาจทำให้พีเอชมีค่าต่ำจนไม่เหมาะสมกับแบกทีเรียที่สร้างมีเทน การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชขึ้นอยู่กับหลายสาเหตุ แต่ที่สำคัญได้แก่ปริมาณบัฟเฟอร์ (buffering capacity) ถ้ามีบัฟเฟอร์ไม่เพียงพอจะทำให้พีเอชลดต่ำลงจนไม่เกิดการสร้างมีเทน ซึ่งเรียกว่า "Stuck Digestion"

โดยปกติในน้ำเสียทั่วไปจะมีปริมาณบัฟเฟอร์ผสมอยู่ และในสารอินทรีย์พวกโปรตีน เมื่อย่อยสลายก็ให้ด่างซึ่งจัดว่าเป็นบัฟเฟอร์ทางธรรมชาติ กลไกการทำลายบัฟเฟอร์และสร้างบัฟเฟอร์นี้ อาจเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 3CH_3COOH \qquad (8)$$

$$3CH_3COOH + 3NH_4HCO_3 \xrightarrow[\text{acid former}]{} 3CH_3COONH_4 + 3H_2O + 3CO_2 \qquad (9)$$

$$3CH_3COOH + 3H_2O \xrightarrow[\text{methane former}]{} 3CH_4 + 3NH_4HCO_3 \qquad (10)$$

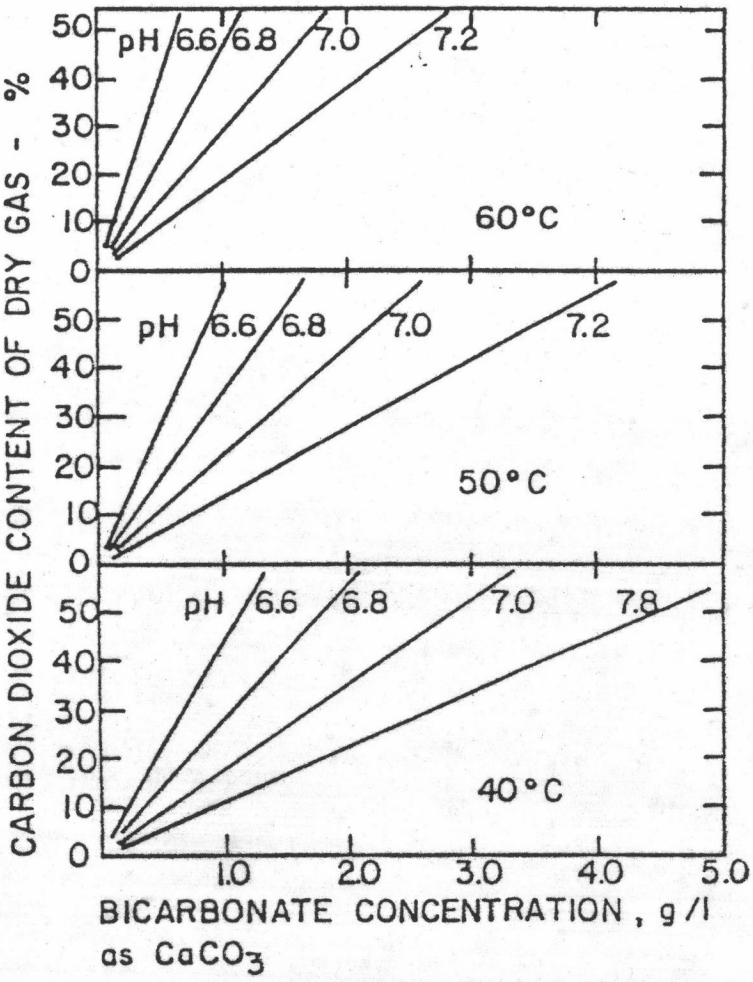
นอกจากปริมาณค่าความเป็นด่างแล้ว Bonta และ Pomeroy[37] ได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่าง พีเอชกับคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น ดังสมการ

$$pH = 5.14 - \log(\%CO_2) + \log(HCO_3 \text{ as mg/L } CaCO_3) \qquad (11)$$

และความสัมพันธ์ระหว่างไบคาร์บอเนตกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆกันได้แสดงไว้ในรูปที่ 12.10

2.3.3 กรดโวลาไทล์และสภาพความเป็นด่าง

กรดโวลาไทล์เป็นผลมาจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ในขั้นตอน Non - Methanogenic ดังได้กล่าวมาแล้ว ซึ่งจะถูกใช้เป็นสารอาหารและแหล่งพลังงานสำหรับแบกที



รูปที่ 2.10 ความสัมพันธ์ระหว่างไบคาร์บอเนตกับคาร์บอนไดออกไซด์ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ [15]

เรียที่สร้างมีเทน สำหรับระบบที่มีประสิทธิภาพกรดโวลาไทล์จะมีเหลืออยู่ในระบบไม่มากนัก เนื่องจากจะถูกผลิตขึ้นและถูกทำลายลงในอัตราที่ใกล้เคียงกัน ทำให้ไม่เกิดการสะสมขึ้นในระบบ ดังนั้น สามารถใช้ค่าของกรดโวลาไทล์ที่มีอยู่ในระบบมาเป็นตัวชี้สถานภาพของการทำงานได้

ในปีคศ.1947 Buswell และ Schlenz[12,38,39] พบว่า ความเข้มข้นของกรดโวลาไทล์ในระบบที่สูงกว่า 2,000 มก./ล. จะเกิดความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ แต่งานค้นคว้าในปี คศ.1958 ของ Schlenz และ Raju[40] พบว่ากรดโวลาไทล์ที่มีความเข้มข้นเกิน 3,000 มก./ล. จึงจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ งานวิจัยทั้งสองนี้พิจารณาว่ากรดโวลาไทล์เป็นพิษต่อจุลินทรีย์โดยตรง ผลที่เกิดขึ้นจากกรดโวลาไทล์ทำให้ค่าพีเอชของระบบลดลง

นักวิจัยบางท่านในขณะนั้นไม่เห็นด้วยกับข้อสรุปนี้เช่น Cassell และ Sawyer ในปี คศ.1959[41,42] และ Kaplovsky[43] ในปี คศ.1951 ซึ่งสรุปว่ากรดโวลาไทล์จะเป็นอันตรายต่อระบบ เนื่องจากค่าพีเอชลดลง จึงอาจแก้ไขได้ด้วยการเติมด่างลงไปก็เป็นการเพียงพอ

ต่อมาในปีคศ.1961 McCarty และ McKinney[44] ได้ให้ข้อสรุปที่แตกต่างออกไป โดยพบว่า ปริมาณกรดโวลาไทล์ที่สูงขึ้นถึง 6,000 มก./ล. นั้น ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ แต่การที่ระบบล้มเหลวเป็นผลมาจากการเติมสารที่เพิ่มค่าความเป็นด่างลงไปเพื่อรักษาระดับพีเอชแล้วทำให้เกิดเกลือที่เป็นพิษแทน แนวความคิดนี้เป็นที่ยอมรับจนถึงปัจจุบัน

ต่อจากนั้นมีการค้นพบว่าแม้ระบบจะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมและมีความเข้มข้นของกรดโวลาไทล์ในระบบต่ำ แต่ระบบก็ยังล้มเหลว งานวิจัยต่างๆจึงมุ่งไปที่กรดโวลาไทล์ที่เกิดภายในระบบ Buswell และ Morgan[45] ได้สรุปว่า กรดโพรพิโอนิค(propionic)เป็นพิษต่อแบกทีเรียที่ผลิตมีเทน แต่ข้อสรุปนี้ถูกคัดค้านจาก Lawrence[21] และ McCarty[24] และ Schlenz[40] โดยชี้ให้เห็นว่าอัตราการย่อยสลายกรดโพรพิโอนิคนั้นสูงมากกว่าอัตราการย่อยสลายกรดอะซิติคประมาณ 100 เท่า การที่พบว่ากรดโพรพิโอนิคมีการสะสมในระบบที่ล้มเหลวอยู่สูง อาจเป็นเพราะระบบขาดแบกทีเรียชนิด propionicum มากกว่า ทั้งนี้ Muller et.al.[46] และPohland [47] สรุปว่าการที่ระบบล้มเหลวนั้นเป็นเพราะความสัมพันธ์ของกรดโวลาไทล์ต่อความเป็นด่างในระบบ (VFA/Alkalinity) ถูกทำลาย เป็นเหตุให้ค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นและลงอย่างรวดเร็ว ระบบจึงล้มเหลวแม้ว่ามีค่ากรดโวลาไทล์ต่ำก็ตาม

ในปีคศ.1969 Water Pollution Control Federation (WPCF)[9] ได้ยอมรับการใช้ค่า VFA/Alkalinity มาเป็นตัวควบคุมการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียแบบ

ไร้อากาศ โดยสรุปว่า

VFA/Alkalinity	<	ø.3-ø.4	ระบบทำงานได้ดี
VFA/Alkalinity	>	ø.8	ระบบล้มเหลว

โดยกรดโวลาไทล์วัดในรูปของกรดอะซิติค (CH_3COOH) และค่าความเป็นด่างวัดในรูปของแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) เมื่อใช้วิธีการติเตรทถึงพีเอช 4

จากงานของ Hattingh et.al.[48] ได้คัดค้านข้อสรุปของการใช้ค่าอัตราส่วนของ VFA/Total-Alkalinity บางส่วนว่าเนื่องจาก

Total-Alkalinity = [HCO_3-Alkalinity] - [VA-Alkalinity]

โดยที่ Total-Alkalinity = ค่าความเป็นด่างรวมเมื่อวัดโดยการติเตรทถึงพีเอช ø.4 (มก./ล. ในรูป $CaCO_3$)

HCO_3-Alkalinity = ค่าความเป็นด่างไบคาร์บอเนต

VA-Alkalinity = ค่าความเป็นด่างของกรดโวลาไทล์

ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องพิจารณาถึงปริมาณของ HCO^-_3-Alk. เปรียบเทียบกับ VFA-Alk. ด้วย โดยเมื่อค่าอัตราส่วน VFA/HCO^-_3 มีค่าต่ำกว่า ø.4 ระบบจึงจะมีบัฟเฟอร์ที่ดี และเมื่อใดที่ค่าอัตราส่วน VFA/HCO^-_3 มีค่าสูงกว่า ø.8 ระบบจะมีแนวโน้มว่าล้มเหลว

การใช้ค่าอัตราส่วน VFA/Total-Alk.และค่าอัตราส่วน VFA/HCO^-_3-Alk. เป็นตัวบอกเสถียรภาพของระบบจึงเป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน

สำหรับปริมาณของค่าความเป็นด่างในกระบวนการแบบไร้อากาศนอกจากที่มีอยู่ตามธรรมชาติในน้ำทิ้งที่เข้าระบบก็จะได้จากการย่อยสลายโปรตีนดังกล่าวในหัวข้อค่าพีเอชมาแล้ว

2.3.4 ความต้องการอาหารที่จำเป็น (Nutrient Requirement)

การที่แบกทีเรียจะทำงานได้ดีจำเป็นที่จะต้องมีสารหลายชนิด เพื่อให้แบกทีเรียนำไปใช้ทั้งในการเจริญเติบโตและการให้พลังงาน สารอาหารโดยทั่วไปอาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ประเภทแรกได้แก่ สารอาหารที่จำเป็น ถ้าขาดสารอาหารประเภทนี้จะไม่มีการเจริญเติบ

โต อีกประเภทหนึ่ง คือ สารอาหารที่เป็นประโยชน์แต่ไม่จำเป็นต้องมีก็ได้ สารอาหารบางชนิดจะเป็นทั้งแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต แต่บางชนิดเป็นเพียงแหล่งพลังงาน โดยที่แบกทีเรียไม่นำเข้ามาใช้เป็นส่วนประกอบของเซลล์

สารอาหารที่จำเป็นต่อแบกทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ สารอาหารหลัก(Macronutrient) และสารอาหารรอง(Micronutrient) ขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารที่ต้องการมากหรือน้อย ถ้าต้องการมากจะเป็นสารอาหารหลักและถ้าต้องการน้อยจะเป็นสารอาหารรอง ปริมาณของสารอาหารรองบางครั้งต้องการน้อยมากจนยากต่อการวัด จนในบางครั้งไม่รู้ว่ามีอยู่แล้วในที่ที่แบกทีเรียเติบโต[49]

สารอาหารหลักที่สำคัญได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ แหล่งสามัญของสารอาหารหลักทั้ง 4 ชนิด แสดงดังตารางที่ 2.4 แบกทีเรียบางชนิดสามารถใช้สารอาหารได้อย่างกว้างขวาง แต่บางชนิดก็มีความจำกัดในการใช้สารอาหาร

สำหรับกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ มีงานวิจัยบางชิ้นที่มีการหาปริมาณสารอาหารที่ต้องการ ในปี 1964 Speece และ McCarty[50] ได้แสดงให้เห็นว่าแบกทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนอิสระต้องการธาตุไนโตรเจน เมื่อเทียบกับน้ำหนักเซลล์ = 9.4 (Cell Weight/N = 9.4) Sanders และ Bloodgood[51] พบว่า จุลินทรีย์ต้องการฟอสฟอรัสเท่ากับ 1 ใน 7 ของธาตุไนโตรเจน (N/P = 7) และ McCarty[50] กล่าวว่า อัตราส่วนอย่างน้อยที่สุดของแบกทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนควรมีค่าดังนี้ BOD_L : N : P = 100 : 1.1 : 0.2 และเมื่อต้องการอัตราส่วนการย่อยสลายสูงแล้ว พบว่า จำเป็นต้องเพิ่มสารอนินทรีย์บางชนิด เช่น เหล็ก โคบอลท์ ไทอะมิน และวิตามิน B_{12} ด้วย ตารางที่ 2.6 แสดงปริมาณสารอาหารรอง (Micronutrient) ที่เชื่อว่าเหมาะสมกับกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ[52]

และในปีคศ.1979 Sohonheit et.al.[53] ได้แสดงให้เห็นว่านิเกิลซึ่งแต่เดิมเชื่อว่าเป็นสารพิษ[54] เป็นสารที่มีผลช่วยในการเจริญเติบโตของแบกทีเรียที่สร้างมีเทนชื่อ Methanobacterium thermoautotrophicum ในงานวิจัยของ Diekert[55] ก็พบว่า แบกทีเรียที่ ชื่อ Methanobrevibactro smithii และ Methanosarcina barkeri ก็มีสารนิเกิลเป็นสารที่มีผลช่วยในการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน

Thauer[56] ได้สรุปว่า นิเกิล โคบอลท์ และโมลิบดินัม เป็นสารจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบกทีเรียหลายชนิด แต่เนื่องจากมีปริมาณน้อยมากจึงทำให้ตรวจสอบยากและเชื่อว่าสารเหล่านี้ได้จากการสึกกร่อนของข้อต่อและท่อที่ทำจาก Stainless Steel ที่ใช้ใน

ตารางที่ 2.4 แหล่งสามัญของสารอาหารหลัก (Macronutrient) [63]

ธาตุ	แหล่งที่ได้
คาร์บอน	CO_2, น้ำตาล, โปรตีน, ไขมัน
ไนโตรเจน	โปรตีน, แอมโมเนีย, ไนเตรต
ซัลเฟอร์	โปรตีน, ซัลเฟต
ฟอสฟอรัส	ฟอสเฟต

ตารางที่ 2.5 ปริมาณสารอาหารรองที่จำเป็น [25]

สารอาหาร	ความเข้มข้น (mg/l)
โซเดียม	125-250
โปตัสเซียม	200-400
แคลเซียม	100-200
แมกนีเซียม	75-125
แอมโมเนีย	80-170
เหล็ก	1-10
โคบอลท์	1-5
ไทอะมีน	1-5
กรดเพนโทเทนิค (Pentothenic acid)	1-5

ระบบเป็นแหล่งใหญ่

2.3.5 สารพิษ

สารเคมีใดๆที่เข้าสู่ระบบเมื่อถึงค่าความเข้มข้นหนึ่ง ที่สภาวะหนึ่งแล้วยังผลให้ประสิทธิภาพหรือเสถียรภาพของระบบลดลง สารนั้นจัดว่าเป็นสารพิษ McCarty[57] พบว่าความเป็นพิษต่อระบบของสารพิษนั้นมีได้ตั้งแต่ยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์(Inhibited)จนถึงฆ่าจุลินทรีย์(Toxic) โดยขึ้นกับชนิดของสาร และปริมาณของสารนั้นๆ การควบคุมความเป็นพิษของสารที่มีต่อระบบ อาจแบ่งได้เป็น 4 วิธี ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 แสดงวิธีการควบคุมความเป็นพิษของสารพิษ[8]

วิธีที่	วิธีการ
1	กำจัดออกก่อนเข้าระบบ
2	เจือจางจนถึงระดับที่ไม่มีพิษ
3	ตกตะกอนให้อยู่ในรูปของสารประกอบอื่นที่ไม่เป็นพิษ
4	ใช้สารอื่นช่วยลดความเป็นพิษของสารนั้นๆ (antagonism)

พิจารณาจากวิธีการในการควบคุมความเป็นพิษของสารพิษ จะเห็นได้ว่าความเป็นพิษของสารใดๆ ไม่อาจที่จะพิจารณาเพียงค่าใดค่าหนึ่งได้ ตัวอย่างเช่น F.J. Feng และ A.Gaucy , Jr[8] พบว่า ไซยาไนด์(Cyanide) ซึ่งเป็นพิษโดยตรงต่อจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 2 mg/L นั้น สามารถมีได้สูงถึง 20 mg/L ได้ ถ้าเลี้ยงจุลินทรีย์ภายในระบบให้คุ้นเคยเสียก่อน (acclimation) นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาปรากฏการณ์แอนทาโกนิซึม (antagonism) ด้วย

ความเป็นพิษของสารใดๆ อาจมีพิษมากขึ้นหรือต่ำลงได้ เมื่อพบที่พีเอชต่างๆ กัน หรืออุณหภูมิที่ต่างกันด้วย[35]

โดยทั่วไปสำหรับกระบวนการแบบไร้อากาศ สารที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์แบ่งได้เป็น 4 ประเภท คือ

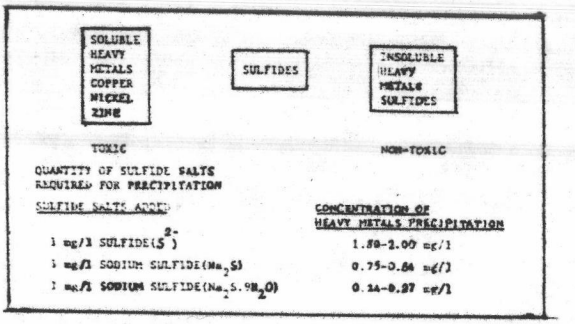
2.3.5.1 พิษของกรดโวลาไทล์

กรดโวลาไทล์เป็นพิษต่อจุลินทรีย์พวกสร้างมีเทนเพราะการเกิดโวลาไทล์มากขึ้น จะทำให้พีเอชต่ำลงไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต Kotze et.al.[28] แสดงให้เห็นว่า โมเลกุลของกรดอ่อนและด่างอ่อนที่ไม่แตกตัวเป็นอิออนสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้เร็วมากทำให้เซลล์เสียการสมดุลย์ของการส่งและการขับถ่าย จุลินทรีย์จึงตาย และด่างอ่อนก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

2.3.5.2 พิษของอิออนหรือโลหะหนัก

ระดับความเข้มข้นของอิออนหรือโลหะหนักใดๆ เมื่อเกินค่าหนึ่งๆ แล้วจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ได้ อิออนที่พบทั่วไปได้แก่ Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} และ S^{2-} McCarty และ McKinney[58] กล่าวว่า อิออนบวกที่มีวาเลนซี่ 2 จะมีพิษมากกว่าอิออนที่มีวาเลนซี่ 1 ถึง 10 เท่า ดังนั้น อาจสรุปได้ว่าความเป็นพิษของอิออนบวกจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีวาเลนซี่สูงขึ้นและน้ำหนักอะตอมที่มากขึ้น วิธีการควบคุมความเป็นพิษวิธีหนึ่งคือ ลดความเป็นพิษลงได้โดยวิธีแอนทาโกนิซึม (Antagonism) คือ ใช้หลักการที่พิษของอิออนบวกชนิดหนึ่ง เช่น พิษของ Na^+ ที่ความเข้มข้น 3,500 มก./ล.สามารถลดลงได้ถ้ามี Ca^{2+} หรือ Mg^{2+} อยู่ 50-100 มก./ล.[32] แต่บางครั้งอิออนบวกบางชนิดสามารถเสริมความเป็นพิษของอิออนบวกอีกชนิดได้เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ซิลเนอร์ยิสซึม (Synergism) ปรากฏการณ์ทั้งสองนี้สามารถสรุปเป็นตารางที่ 2.7

ส่วนพิษของโลหะหนัก ได้แก่ แมงกานีส สังกะสี แคดเมี่ยม นิเกิล โคบอลท์ และโคเมี่ยม เป็นต้น โลหะหนักเหล่านี้จะอยู่ในน้ำทั้งในรูปของอิออน ความเป็นพิษของโลหะหนักจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณของไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ที่มีอยู่ เพราะว่าไฮโดรเจนซัลไฟด์สามารถรวมกับโลหะหนัก เกิดเป็นเกลือของโลหะหนักซึ่งไม่ละลายน้ำ[57] ดังรูปที่ 2.11 ความเข้มข้นและโลหะหนักที่จะเกิดเป็นพิษต่อระบบ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.8



รูปที่ 2.11 ปฏิกิริยาการทำลายพิษของโลหะหนักโดยซัลไฟด์ในสภาวะไร้ออกซิเจน[57]

ตารางที่ 2.7 แสดงปรากฏการณ์แอนทาโกนิซึมและซินเนอร์ยิสซึม[52]

Cation	Antagonist	Synergist	Concentration of Secondary Cation at which Antagonism Ends or Synergism Begin (mg/l)
Na^+	K^+		4,000-5,000
Na^+		NH_4^+	200-400
Na^+		Ca^{2+}	400-2.000
Na^+		Mg^{2+}	250-1,250
NH_4^+	Na^+		1,000-2,000
NH_4^+		K^+	1,000
NH_4^+		Ca^{2+}	400-800
NH_4^+		Mg^{2+}	120-250
K^+	Na^+		2,000-2,500
K^+	Ca^{2+}		2,000-4,000
K^+	Mg^{2+}		1,700-2,000
K^+	NH_4^+		1,700
Mg^{2+}	Na^+		2,000-2,500
Mg^{2+}	K^+		4,000-5,000
Mg^{2+}		NH_4^+	100-200
Mg^{2+}		Ca^{2+}	200
Ca^{2+}	Na^+		1,000-1,200
Ca^{2+}	K^+		4,000-5,000
Ca^{2+}		NH_4^+	700-900
Ca^{2+}		Mg^{2+}	100-250

ตารางที่ 2.8 แสดงความเข้มข้นของอิออนและโลหะหนักที่เกิดเป็นพิษต่อระบบหมักโดยตรง[57]

อิออนและโลหะหนักที่เป็นพิษ	ความเข้มข้น		ผลที่มีต่อระบบ
	โมล/ลิตร	มก./ลิตร	
Na^+	0.2	4,600	เริ่มมีการยับยั้งการทำงาน (inhibition)
	0.4	9,200	หยุดการทำงาน (complete inhibition)
K^+	>0.10	>3,900	เริ่มมีการยับยั้งการทำงาน
	>0.35	>13,650	หยุดการทำงาน
Mg^{2+}	>0.05	>1,200	เริ่มมีการยับยั้งการทำงาน
	>0.20	>4,800	หยุดการทำงาน
Ca^{2+}	>0.075	>3,000	เริ่มมีการยับยั้งการทำงาน
	>0.20	>8,000	หยุดการทำงาน
S^{2-}	-	150-200	เริ่มมีการยับยั้งการทำงาน
	-	>800	หยุดการทำงาน
Cu	-	387	ก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นลดลงเหลือเพียงร้อยละ 24 ของเกณฑ์ควบคุม
Zn	-	>500	หยุดการเกิดก๊าซ
	-	350-400	ก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นลดลงเหลือเพียงร้อยละ 5 ของเกณฑ์ควบคุม
	-	>1,000	แบกทีเรียถูกทำลายหมด
Ni	-	200	แบกทีเรียเริ่มถูกทำลาย
	-	367	ก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นลดลงเหลือเพียงร้อยละ 23 ของเกณฑ์ควบคุม
	-	500-1,000	แบกทีเรียถูกทำลายอย่างรุนแรง (serious toxic)
	-	>1,000	แบกทีเรียถูกทำลายหมด
Cr	-	200	แบกทีเรียเริ่มถูกทำลาย
	-	>2,000	แบกทีเรียถูกทำลายหมด

2.3.5.3 พิษของก๊าซบางชนิด

พิษของแอมโมเนีย แอมโมเนียที่พบในกระบวนการแบบไร้อากาศจะมาจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนคือพวกโปรตีนโดยอาจจะอยู่ในรูป แอมโมเนียมอิออน (NH_4^+) หรือก๊าซแอมโมเนีย (NH_3) ขึ้นอยู่กับค่าพีเอชในขณะนั้น ดังแสดงในสมการที่ 12

$$NH_4^+ \underset{\text{สูงกว่า 7.2}}{\overset{\text{ต่ำกว่า 7.2}}{\rightleftharpoons}} NH_3 + H^+ \qquad (12)$$

แอมโมเนีย (NH_3) จะเป็นตัวยับยั้งการทำงานและเป็นพิษต่อแบกทีเรียชนิดที่ไม่ใช้อากาศมากกว่าแอมโมเนียม(NH_4) ปริมาณของแอมโมเนียไนโตรเจน (NH_3-N) ซึ่งวิเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการจะรวมทั้ง NH_3 และ NH_4^+ ในตารางที่ 2.9 ได้แสดงปริมาณของแอมโมเนียไนโตรเจนที่มีผลต่อกระบวนการแบบไร้อากาศ

ตารางที่ 2.9 ผลของแอมโมเนียไนโตรเจนต่อกระบวนการแบบไม่ไร้อากาศ[57]

แอมโมเนียไนโตรเจน มก./ล.	ผลต่อระบบ
50-200	ปริมาณพอเหมาะ
200-1,000	ยังไม่เกิดผล
1,500-3,000	เริ่มมีการยับยั้งถ้าพีเอชสูง
>3,000	เป็นพิษโดยตรง

การลดพิษแอมโมเนียไนโตรเจนทำได้โดยการเจือจางน้ำทิ้งก่อนเข้าสู่กระบวนการ

พิษของซัลไฟด์ เมื่อมีการย่อยสลายโปรตีนหรือซัลเฟต (SO_4^{2-}) หรือซัลไฟด์ปะปนเข้ามากับน้ำทิ้งสู่ระบบ ซัลไฟด์ส่วนหนึ่งจะรวมตัวกับโลหะหนักตกตะกอน แต่หากมีซัลไฟด์มากกว่า 200 มก./ล. จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์โดยตรง[57]

การลดพิษของซัลไฟด์ด้วยการตกตะกอนหรือการทำเจือจางหรือแยกซัลไฟด์ออกจากน้ำทิ้งก่อนเข้าสู่ระบบ

2.3.5.4 พิษของสารอินทรีย์

สารอินทรีย์บางชนิดจะยับยั้งการทำงานของแบกทีเรียชนิดที่ไม่ใช้อากาศ เช่น แอลกอฮอล์ หรือกรดไขมันที่มีขนาดใหญ่ (long chain fatty acid) ซึ่งความเป็นพิษของสารอินทรีย์เหล่านี้สามารถลดลงได้ โดยการป้อนเข้าสู่ระบบอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้จุลินทรีย์คุ้นเคย หรืออาจแก้ไขโดยการเติมสารเคมีเพื่อให้ตกตะกอน

ใน ๗๘๑๕๒๒