บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

ตาราง 4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์/เครื่องมือวิเคราะห์	รูปแบบ/ชนิด	บริษัท/ประเทศ
Gas chromatography (GC)	GC-2014	Shimadzu, Japan
pH meter	BP-20	Satorius, Germany
Syringe for GC-17A	10 uL	SGE, Australia
Gas tight syringe for GC-2014	1 mL และ 10 mL	ITO, Japan
Hot air oven	LDO-100E	Lab tech
Balance	PB602-S	Mettler Toledo, Switzerland

3.1.2 สารเคมี

ตาราง 5 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	ชื่อสาร	สูตรเคมี	บริษัท/ประเทศ
1	Sodium hydroxide	NaOH	ซิกกี่เคมีคอลซัพพลาย, ไทย
2	Hydrochloric acid	HCl	ซิกกี่เคมีคอลซัพพลาย, ไทย
3	Nitrogen gas	N_2	ร้านทรัพย์ประเสริฐ ออกซิเจน, ไทย
4	Hydrogen gas (standard)	H_2	ร้านทรัพย์ประเสริฐ ออกซิเจน, ไทย
5	Methane gas(standard)	CH_4	ร้านทรัพย์ประเสริฐ ออกซิเจน, ไทย
6	Carbon dioxide (standard)	CO_2	ร้านทรัพย์ประเสริฐ ออกซิเจน, ไทย

3.1.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

3.1.3.1 มูลแพะจากฟาร์มเส้นทางเห็ด 193 ม.11 ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก

3.1.3.2 ฟางข้าวเหลือทิ้งภายในเขตจังหวัดพิษณุโลก

3.1.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตแก๊สมีเทนเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ในมูลแพะจากฟาร์มเส้นทางเห็ด 193 ม.11 ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก

3.2 วิธีการทดลองการศึกษาสภาวะเริ่มต้นที่เหมาะสมของการผลิตแก๊สมีเทนจากสับเตรทร่วมระหว่างมูลแพะกับฟางข้าวโดยกลุ่มจุลินทรีย์ไร้อากาศโดยการหมักแบบกะ (Batch fermentation) โดยใช้วิธี RSM (Response Surface Methodology)

3.2.1 การเตรียมฟางข้าว

นำฟางข้าวมาทำให้มีขนาดเล็กลงด้วยวิธีการบด ด้วยเครื่องบดให้มีขนาด 0.2-1.0 เซนติเมตร แล้วนำมาผสมกับน้ำประปา ในอัตราส่วนระหว่างฟางข้าวกับน้ำประปาเท่ากับ 1:0.5 วิเคราะห์ปริมาณ COD โดยวิธีมาตรฐาน (APHA, 1997) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยใช้วิธี Colorimetric (Harwood และคณะ, 1970) และค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นโดยใช้ pH meter

3.2.2 การเตรียมมูลแพะ

มูลแพะที่ใช้เป็นมูลแพะที่ได้จากฟาร์มเส้นทางเห็ดซึ่งเหมาะแก่การเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการผลิตแก๊สมีเทน นอกจากนั้นมูลแพะยังเป็นแหล่งของกลุ่มจุลินทรีย์ไร้อากาศที่ใช้ในการผลิตแก๊สมีเทนนำมูลแพะมาบดให้ละเอียดวิเคราะห์ปริมาณ COD และปริมาณชีวมวลโดยการวัดค่าของแข็งระเหยง่าย (Volatile Suspended Solid; VSS) ด้วยวิธีมาตรฐาน (APHA, 1997) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยใช้วิธี Colorimetric (Harwood และคณะ, 1970) และค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นโดยใช้ pH meter

3.2.3 ออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีการตอบสนองต่อพื้นที่ผิว (RSM) แบบ Central Composite Design (CCD)

ทำการศึกษาปัจจัยหลักที่คาดว่าจะมีผลต่อการผลิตแก๊สมีเทน โดยการคัดเลือกปัจจัยเบื้องต้นที่มีผลต่อการผลิตแก๊สมีเทนจากสับเตรทร่วมระหว่างมูลแพะกับฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน จำนวน 2 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) (A) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (ค่าความเป็นกรด-ด่าง) (B) ซึ่งในแต่ละปัจจัยมีความแปรผันเป็น 5 ระดับ ดังแสดงไว้ในตาราง 5 และประกอบด้วย 13 ทรีตเมนต์ แสดงไว้ในตาราง 6 กำหนดให้ค่าการตอบสนอง (Response) คือ ปริมาตรของแก๊สมีเทนและผลได้ของแก๊สมีเทน

ทำการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) โดยทำการอาศัยแบบจำลองเด็มรูปแบบดังสมการ

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_j x_j$$

เมื่อ Y = response

β_0 = the model intercept

β_j = the linear coefficient

x_j = the level of the independent variable

ตาราง 6 สภาวะที่ใช้ในการออกแบบการทดลองโดยวิธีการสอบสนองต่อพื้นที่ผิวแบบ Central Composite Design

รหัส	ปัจจัย	ระดับของปัจจัย				
		$-\alpha$ level	Low level	Medium level	High level	α level
A	อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	17.93	20.00	25.00	30.00	32.07
B	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	5.59	6.00	7.00	8.00	8.41

ตาราง 7 ชุดการทดลองที่ออกแบบการทดลองโดย Central Composite Design

ชุดการทดลอง	A(Actual)	A(Code)	B(Actual)	B(Code)
1	20.000	-1.000	8.000	1.000
2	32.071	1.414	7.000	0.000
3	30.000	1.000	8.000	1.000
4	17.929	-1.414	7.000	0.000
5	25.000	0.000	7.000	0.000
6	30.000	1.000	6.000	-1.000
7	25.000	0.000	5.590	-1.414
8	25.000	0.000	7.000	0.000
9	25.000	0.000	7.000	0.000
10	25.000	0.000	8.410	1.414
11	20.000	-1.000	6.000	-1.000

ตาราง 7 (ต่อ)

ชุดการทดลอง	A(Actual)	A(Code)	B(Actual)	B(Code)
12	25.000	0.000	7.000	0.000
13	25.000	0.000	7.000	0.000

หมายเหตุ -2 = -α, -1 = low level, 0 = mean level, 1 = high level, 2 = α

3.2.4 การหมักแก๊สมีเทนแบบกะ (batch fermentation)

การหมักแก๊สมีเทนแบบกะโดยกลุ่มจุลินทรีย์แบบไร้อากาศ ทำในขวดซีรั่มขนาด 100 มิลลิลิตรซึ่งจะมีปริมาตรการทำงาน 70 มิลลิลิตร โดยกำหนดการแปรผันระดับของปัจจัยที่ได้จากการออกแบบการทดลอง ดังตารางที่ 5 และ 6 ปิดด้วยฝาจุกยาง และฝาจุกอะลูมิเนียม โดยใช้ คีมบีบรัดฝาจุก (Supelco, USA) ไล่ออกซิเจนในน้ำหมักและวิเคราะห์ช่องว่างเหนือน้ำหมักโดยใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศ นำไปเขย่าในเครื่องปั่น (shaker) โดยกำหนดให้มีการหมุนที่ 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการหมักเป็นเวลา 30 วัน

3.2.5 การพิสูจน์แบบจำลอง (Confirm test)

ทำการพิสูจน์แบบจำลองภายหลังจากที่ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อค่าตอบสนอง (Response) ที่ศึกษาคือปริมาตรของแก๊สมีเทน และผลได้ของแก๊สมีเทน โดยทำการทดลองซ้ำอีกครั้งจำนวน 4 การทดลอง ได้แก่ 1) ระดับของปัจจัยระดับต่ำ 2) ระดับของปัจจัยระดับสูงตามตาราง 5 การทดลองที่ 3) สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง และ 4) สภาวะควบคุม (ค่าระดับของปัจจัยที่อยู่ในช่วงค่ากลางตามตาราง 6)

3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.3.1 การวิเคราะห์แก๊ส

การวิเคราะห์แก๊สทำได้โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยใช้ gas tight syringe ใส่ในขวดซีรั่มขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกซิลิโคนและฝาอะลูมิเนียม นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊ส โดยใช้ Gas chromatography ภายใต้สภาวะตามที่แสดงในตาราง 8

ตาราง 8 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สโดยวิธี gas chromatography

Equipment	GC-2014(Shimadzu)
Column type	Shin carbon (size 3m x 3mm, activated charcoal 60/80 mesh)
Injection temp	130°C
Detector temp	140°C
Detector type	TCD
Current	140 mA
Total flow of carrier gas (He)	25 ml/min
Injection volume	1ml
Stop time	7 min

(Sreela-or และคณะ, 2011)

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ด้วยวิธี Chemical Oxygen Demand (COD)

การวิเคราะห์ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand) ทำได้โดยการนำหลอดทดลองที่ล้างสะอาดแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบแล้วทิ้งให้เย็นในอุณหภูมิห้องดูดน้ำตัวอย่าง 2.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นเพื่อเจือจางอัตราส่วน 1:2 คือเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำแบลงค์โดยใส่น้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 7.5 มิลลิลิตร เติมโพแตสเซียมไดโครเมต 1.5 มิลลิลิตร ในน้ำตัวอย่างและแบลงค์ เติมกรดซัลฟิวริก 3.5 มิลลิลิตร ในน้ำตัวอย่างและแบลงค์ นำหลอดทดลองใส่ไว้ในตะแกรง และนำเข้าตู้อบที่มีอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงหลังจากอบครบ 2 ชั่วโมงแล้วนำออกมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเทน้ำตัวอย่างลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หยดเฟอโรอินดิเคเดอร์ 2-3 หยด จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมน้ำเงิน ไตเตรทด้วยเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้น 0.025 นอร์มอล ทีละหยดจนถึงจุดยุติ คือสีของน้ำตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีแดงอิฐ บันทึกผล ซึ่งปริมาณของไดโครเมตที่หายไปคือสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำตัวอย่าง

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ด้วยการหาของแข็งระเหย (Volatile Suspended Solid; VSS)

การวิเคราะห์ของแข็งแขวนลอยระเหย หรือตะกอนแขวนลอยระเหย (Volatile Suspended Solids) ทำได้โดยการนำฟางข้าวและมูลแพะมาอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 103-105 องศาเซลเซียส จนแห้งแล้วจึงนำไปทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น (Desiccators) และนำมาชั่ง จากนั้นนำฟางข้าวกับมูลแพะที่อบแห้งแล้วมาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 ชั่วโมง และนำมาชั่งน้ำหนักที่หายไปจากการชั่งครั้งแรกจะเป็นค่าของของแข็งแขวนลอยระเหย และนำน้ำหนักที่ชั่งได้มาลบกับน้ำหนักแห้งของฟางข้าวกับมูลแพะนำไปหาค่าของแข็งระเหย (VSS) ซึ่งค่าที่ได้ถือว่าเป็นค่าที่ใช้แทนปริมาณของเซลล์จุลินทรีย์ในระบบได้

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

ทำการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้พื้นที่บริเวณ สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร และอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก สาขาวิชาวิศวกรรมโยธา คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร สาขาวิชาเทคโนชีวภาพ คณะเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยขอนแก่น