

การคัดเลือกและการเก็บรักษาแบคทีเรียเพื่อผสม ที่มีความสามารถในการหมักแก๊สมีเทน

Screening and Maintenance of Mixed Methanogenic Bacterial Populations

เกษร ทวีเศษ¹ และ Susumu Oi²

Gaysorn Dhavises and Susumu Oi

ABSTRACT

Forty two samples of soil, mud, water and animal excreta from various places within Kamphaengsaen Campus, Kasetsart University and Sue-E-Daang village, Kamphaengsaen District, Nakornpathom, Thailand were tested for methane fermentation. The results indicate that where there is deposit of organic matter there is possibility to obtain mixed methanogenic bacterial populations of both thermophilic and mesophilic types. However, acclimatization of these bacterial populations is essential for obtaining the sludge samples which generate appreciable methane gas yield. The acclimatization was performed such that selected Kamphaengsaen soil and small amount of bentonite were mixed and used as the bedding for the bacteria which were maintained on the mixture of glucose, cellulose, plant residues and nitrogen sources.

บทคัดย่อ

เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อผสมที่มีความสามารถสูงในการหมักแก๊สมีเทนที่ใช้ชีวมวลจากพืช (plant biomasses) เป็นวัตถุดิบ ได้เก็บตัวอย่างดิน โคลน และน้ำ ที่สังเกตว่ามีการย่อยสลายเศษพืชและมูลสัตว์กับดินจากบริเวณที่เคยมีการปลูกพืช ในบริเวณวิทยาเขตกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และหมู่บ้านเสืออีค้าง ตำบลสระพัฒนา อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม มาเป็นจำนวน 42 ตัวอย่าง เพื่อทดลองหาประสิทธิภาพในการหมักแก๊สมีเทน ผลการทดลองแสดงว่า ที่ใดก็ตามที่มีการทับถมของอินทรีย์วัตถุเป็นที่ที่มีโอกาสที่จะได้แบคทีเรียเพื่อผสมที่สามารถหมักอินทรีย์วัตถุต่าง ๆ เป็นแก๊สมีเทน แบคทีเรียเพื่อผสมเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพในการหมักแก๊สมีเทนดีขึ้นอย่างเป็นที่น่าพอใจ เมื่อได้ผ่านการเก็บรักษาในโคลนที่ตกตะกอนนอนก้นง่ายอันเป็นของผสมของดินกำแพงแสน ซึ่งเป็นดินที่มี silt เป็นองค์ประกอบใน

ปริมาณที่สูงมาก กับ bentonite โคลนที่มีคุณสมบัติดังกล่าวทำหน้าที่เป็นที่อยู่ของแบคทีเรีย ในขณะที่แบคทีเรียได้รับอาหารในรูปของสารเคมี เช่น กลูโคส เซลลูโลส กับแหล่งไนโตรเจน หรืออินทรีย์วัตถุที่ต้องการทดลองใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการหมักมีเทน

คำนำ

ชีวมวลจากพืชซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมาก ทั้งที่เป็นวัชพืช เช่น หญ้าชนิดต่าง ๆ ผักตบชวา วัสดุเหลือทิ้งจากการปลูกพืชเศรษฐกิจ เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด ชังข้าวฟ่าง เศษผักที่เหลือทิ้งภายหลังการเก็บเกี่ยว และเศษวัสดุเหลือทิ้งจากกิจการอุตสาหกรรมอาหารที่ใช้ผลิตผลจากการเกษตรเป็นวัตถุดิบ เช่น เปลือกผลไม้ชนิดต่าง ๆ อาจเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญถ้าได้นำมาหมักแก๊สมีเทนหรือแก๊สชีวภาพ ซึ่งอาจใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันและแก๊สธรรมชาติสำหรับชุมชนเพื่อกิจการต่าง ๆ เช่น ใช้เป็น

1 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2 Faculty of Science, Osaka City University, Osaka.

แก๊สหุงต้ม ใช้เดินเครื่องสูบน้ำ และเครื่องผลิตไฟฟ้า โดยเฉพาะในประเทศไทย ถ้าได้มีการจัดการให้มีการใช้ชีวมวลร่วมกับมูลสัตว์หมักเป็นแก๊สมีเทนสำหรับเป็นเชื้อเพลิงผลิตกระแสไฟฟ้าสำหรับชุมชน อาจจะลดการสั่งซื้อน้ำมันจากต่างประเทศได้บางส่วน ในขณะที่เดียวกัน เป็นการรักษาสภาพลักษณะของชุมชน ป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรคบางชนิด และได้ประโยชน์สำหรับปลูกพืช

เพื่อให้การหมักชีวมวลจากพืชต่าง ๆ เป็นแก๊สมีเทนมีประสิทธิภาพ มีการปฏิบัติหลายอย่างเพื่อปรับปรุงคุณภาพของพืชให้อยู่ในลักษณะที่บักเตรีสามารถย่อยสลายอินทรีย์สารที่เป็นองค์ประกอบของพืชและเปลี่ยนเป็นแก๊สมีเทนได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ใช้สารเคมี ใช้วิธีการทางฟิสิกส์ หรือใช้เชื้อราบางชนิด อย่างเฉพาะเจาะจง (Klass and Emert, 1981; Ibrahim and Pearce, 1983) อีกวิธีหนึ่งที่น่าจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการหมักแก๊สมีเทนจากพืชสูงขึ้น คือ การใช้จุลินทรีย์เชื้อผสมที่มีความสามารถย่อยสลายพืชจนเป็นแก๊สมีเทนได้ เพื่อที่จะให้ได้บักเตรีเชื้อผสมดังกล่าวจำเป็นที่จะต้องมีการคัดบักเตรีที่ต้องการ ดังนั้น เราจึงได้วางแผนการทดลองคัดบักเตรีเชื้อผสมจากแหล่งต่าง ๆ โดยการเก็บตัวอย่างดิน น้ำ และโคลนที่สังเกตว่ามีการทับถมและการผุเปื่อยของพืชและอินทรีย์วัตถุอื่น ๆ เช่น มูลสัตว์ ซึ่งน่าจะเป็นแหล่งที่มีเชื้อบักเตรีที่สามารถหมักแก๊สมีเทนได้ นอกจากนี้ เพื่อให้มีบักเตรีเชื้อผสมที่อยู่ในสภาวะที่ผลิตแก๊สมีเทนได้ดีเมื่อเป็นที่ต้องการสำหรับการใช้ในการทดลองในห้องปฏิบัติการ เราได้ทดลองเก็บรักษาบักเตรีเชื้อผสมที่คัดเลือกได้ในโคลนที่เป็นของผสมของดินก้ำแพงแสน และ bentonite ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แหล่งที่มาของตัวอย่างบักเตรีเชื้อผสม เป็น ดิน น้ำ หรือโคลนที่มีการทับถมของมูลสัตว์ เศษพืช และอินทรีย์วัตถุอื่น ในบริเวณวิทยาเขตกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กับจากหมู่บ้านเสืออีดำ ตำบลสระพัฒนา อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

2. การเก็บตัวอย่างแหล่งที่มาของบักเตรีเชื้อผสม

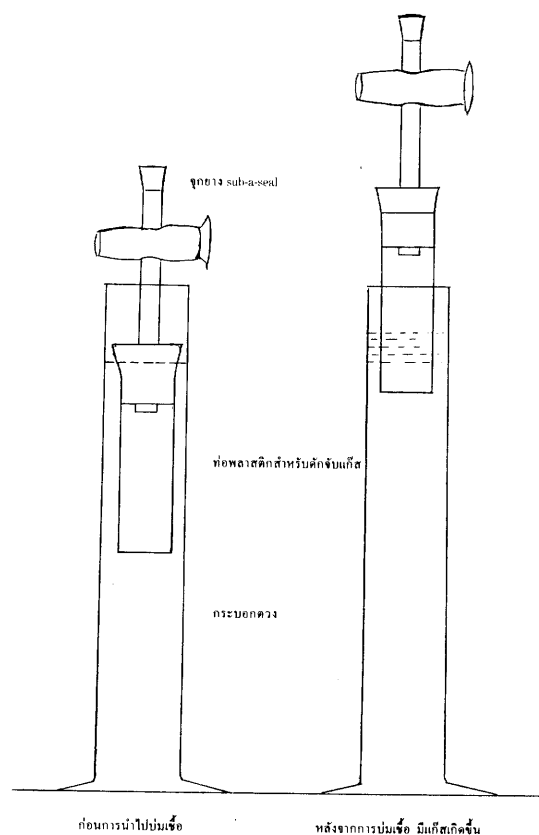
ถ้าเป็นดินที่เคยใช้ปลูกพืชและไม่มีน้ำขัง จะขุดลึกจากระดับผิวดินไม่ต่ำกว่า 10 ซม. แล้วเก็บดินประมาณ 300-500 กรัม

ถ้าเป็นดินที่มีการทับถมของเศษพืช จะเก็บทั้งบริเวณผิวดินและใต้ดินปนกัน

สำหรับบริเวณที่มีการทับถมของมูลสัตว์ เนื่องจากในระหว่างการเก็บตัวอย่างเป็นหน้าฝน บางแห่งมีน้ำขังมองเห็นฟองแก๊สซึ่งแสดงว่ามีการหมักเนื่องจากจุลินทรีย์ จะเก็บเอาดินโคลนมา

3. การทดลองใช้ดิน โคลน และน้ำตัวอย่างหมักแก๊สมีเทน

การทดลองนี้ใช้อุปกรณ์อย่างง่ายที่ผู้เขียน (Susumu Oi) คิดประดิษฐ์ขึ้น ดังรูปที่ 1. จะเห็นว่า



ภาพที่ 1 อุปกรณ์สำหรับการทดลองหมักดิน น้ำ หรือโคลน ตัวอย่างที่เป็นที่มาของบักเตรีเชื้อผสม

เป็นเครื่องมือที่ประกอบด้วย (1) กระบอกตวง ขนาด 200 มล. เป็นตัวรับส่วนประกอบทั้งหมดของการหมัก (2) เครื่องดักจับแก๊ส ประกอบด้วยท่อพลาสติกขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 25 มม. และยาว 85 มม. ที่มีก๊อ และอุดจุกด้วยจุกยางชนิด sub-a-seal เพื่อความสะดวกในการเอาตัวอย่างแก๊สไปวิเคราะห์หาแก๊ส ที่เป็นองค์ประกอบ

ใส่ตัวอย่างดิน หรือโคลน 50 กรัม หรือน้ำตัวอย่าง 50 มล. ลงในกระบอกตวง เติมสารละลายของกลูโคส polypeptone และ yeast extract โดยให้ในแต่ละกระบอกตวงมีสารเหล่านี้ 500, 20 และ 20 มิลลิกรัม ตามลำดับ แล้วเติมน้ำที่ได้ผ่านการต้มไล่ออกซิเจนแล้วให้ได้ระดับ 200 มล. แล้วใช้เข็มและกระบอกเข็มฉีดยาคูดสารละลายขึ้นมาแทนที่อากาศในเครื่องดักแก๊สจนหมด แล้วเติมน้ำที่ปราศจากออกซิเจนจนได้ระดับ 200 มล. อีก แล้วจึงนำไปบ่มที่ 55° ซ สำหรับการตรวจว่ามี thermophilic bacteria หรือที่อุณหภูมิห้องสำหรับการตรวจว่ามี mesophilic bacteria เมื่อบักเตรีเจริญ สร้างแก๊สขึ้นมา แก๊สที่เกิดขึ้นจะแทนที่น้ำในกระบอกเก็บแก๊สดังกล่าว

4. การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของแก๊ส ใช้แก๊สโครมาโตกราฟ Hitachi 163S ใช้ thermal conductivity detector สารที่บรรจุในคอลัมน์เป็น Porapak Q มีแก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา ที่อุณหภูมิเริ่มต้น อุณหภูมิของคอลัมน์ และอุณหภูมิสำหรับการแยกแก๊ส (detecting temperature) 30°, 30° และ 50° ซ ตามลำดับ สำหรับการหาปริมาณของแก๊ส คาร์บอนไดออกไซด์และมีเทน กระทำโดยเปรียบเทียบความสูงของเส้นกราฟของแก๊สที่เกิดจากการหมักของบักเตรีกับของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์หรือแก๊สมิเทน บริสุทธิ์ที่ใช้เป็นแก๊สมาตรฐาน

5. การคัดเลือกบักเตรีเชื้อผสมที่คาดว่าจะมีความสามารถมากในการหมักพืช

เนื่องจากสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของพืชที่จุลินทรีย์นำมาใช้เปลี่ยนเป็นแก๊สมิเทนได้ยาก คือ เซลลูโลส ดังนั้น การคัดเลือกบักเตรีเชื้อผสมที่ต้องการจึงใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งธาตุคาร์บอนและพลังงานสำหรับบักเตรีที่ต้องการทดสอบ

และใช้วิธีการหมักในกระบอกเข็มฉีดยา โดยใช้กระบอกเข็มฉีดยาเป็นเครื่องหมัก (เกษร, 2526) ทั้งนี้ใช้เซลลูโลส 0.5–1.0 กรัม ต่อโคลนที่มีบักเตรีอยู่ 20 มล. และปริมาตรทั้งหมดในกระบอกเข็มฉีดยาเป็น 60 มล.

6. การเก็บรักษาบักเตรีเชื้อผสมให้อยู่ในสภาพที่พร้อมที่จะใช้หมักแก๊สมิเทนเมื่อเป็นที่ต้องการ วิธีการเก็บรักษาบักเตรีเชื้อผสมที่คัดเลือกไว้ให้อยู่ในสภาพที่พร้อมที่จะใช้หมักแก๊สมิเทน เป็นวิธีการที่เลียนธรรมชาติและในขณะเดียวกันอยู่ในสภาพที่เหมาะสมสำหรับการเอาบักเตรีมาใช้ในการหมักแก๊สมิเทนในห้องทดลอง โดยเฉพาะเมื่อใช้วิธีที่ใช้กระบอกเข็มฉีดยาเป็นเครื่องหมัก โดยที่โคลนจะเป็นที่อยู่ของบักเตรี โคลนดังกล่าวเตรียมโดยใช้ดินกำแพงแสนที่มี silt เป็นปริมาณมาก สามารถตกตะกอนนอนกันเร็ว (นี่เป็นคุณสมบัติที่ดีของดินที่เหมาะสมสำหรับการนี้ กล่าวคือ โคลนจะช่วยให้อบักเตรีเกาะตัวอยู่ใน anaerobic phase) ผสมกับ bentonite ปริมาณ 70 กรัม ต่อลิตร มีรายงานว่า bentonite ช่วยทำให้มีการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันของ methanogens และ acetogenic bacteria (Stephan, B. – ดิดต่อส่วนตัว) สำหรับอาหารที่ใช้เลี้ยงบักเตรีเชื้อผสม ในระหว่างการเก็บในโคลนดังกล่าว อาจใช้สารเคมีบริสุทธิ์ เช่น กลูโคส เซลลูโลส เป็นแหล่งธาตุคาร์บอนและพลังงาน กับใช้ yeast extract และ polypeptone เป็นแหล่งวิตามินและไนโตรเจนตามลำดับ เมื่อต้องการทำให้บักเตรีคืนเคยกับพืชที่ต้องการนำมาหมักเป็นแก๊สมิเทน ได้ใช้พืชชนิดนั้นผสมกับสารเคมีบริสุทธิ์ หรือใช้พืชนั้น ๆ เพียงอย่างเดียวเป็นอาหารของบักเตรี

ผลและวิจารณ์

จากตัวอย่างน้ำ ดิน หรือโคลนที่มีการย่อยสลายเศษพืชและมูลสัตว์ เป็นจำนวน 42 ตัวอย่าง 25 ตัวอย่าง สามารถหมักกลูโคสเป็นมิเทนได้ภายในเวลา 4 วัน ในจำนวน 25 ตัวอย่างนี้ 12 ตัวอย่างสามารถหมักมิเทนได้ที่ 55° ซ อย่างไรก็ตาม เชื่อ 12 ตัวอย่างนี้อาจเป็นเพียงชนิด thermotrophic เท่านั้น ซึ่งจะได้ทำการทดลองต่อไป (ตารางที่ 1)

จากการทดลองตรวจวิเคราะห์แก๊สเมื่อหมักมีเทนเป็นเวลา 48 ชม. กับ 4 วัน และประมาณ 3 สัปดาห์ พบว่า ถ้าต้องการตรวจหาแหล่งที่มีแบคทีเรียที่มีความสามารถหมักแก๊สมีเทนดีพอสมควรอยู่แล้ว อาจทำได้โดยการหมักกลูโคสเป็นเวลา 48 ชม. อย่างไรก็ตาม ดูเหมือนว่า ถ้าต้องการตรวจหาว่าที่ใดมีแบคทีเรีย methanogens และต้องการคัดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ ควรบ่มเชื้อ (หรือหมัก) เป็นเวลา ไม่น้อยกว่า 4-5 วัน หรือ 2-3 สัปดาห์ (ตารางที่ 2) เพื่อให้โอกาสแบคทีเรีย methanogens ที่อาจมีอยู่น้อยและโดยธรรมชาติเจริญเข้าได้เจริญ ตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า ถ้าตรวจแก๊สภายใน 2 วัน ดินตัวอย่างที่ 32, 33, 34, 35 และ 41 สร้างแก๊สมีเทนที่ตรวจวัดไม่ได้ แต่เมื่อทิ้งไว้ 3 สัปดาห์ ในแก๊สที่ถูกสร้างขึ้นมีมีเทน 68.5-91.4%

ถ้าประสงค์จะทราบว่ที่ใดเหมาะสมสำหรับหาแบคทีเรียเชื้อผสมที่สามารถหมักแก๊สมีเทนได้ การทดลองครั้งนี้แสดงว่า ไม่ว่าจะเป็น้ำ ดิน หรือโคลน ที่มีการทับถมและการผุเปื่อยของอินทรีย์วัตถุสามารถเป็นแหล่งที่มาของแบคทีเรียเชื้อผสมที่สร้างแก๊สมีเทนได้ (ตารางที่ 1)

สำหรับความสามารถของแบคทีเรียเหล่านี้ในการหมักเซลลูโลสเป็นมีเทนนั้น พบว่า จากจำนวนที่คัดไว้ 22 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างมีความสามารถในการหมักเซลลูโลสเป็นมีเทน แต่ด้วยความสามารถที่ไม่เท่ากัน (ไม่แสดงผลการทดลอง)

ผลการทดลองเก็บรักษาแบคทีเรียเชื้อผสมในโคลนที่ผสมดินก้ำแพงแสนกับ bentonite นั้น ได้ทดลองเก็บรักษาแบคทีเรียเชื้อผสมตัวอย่างที่ 4 โดยวิธีการให้อาหารในลักษณะที่ไม่เฉพาะเจาะจง ดังนี้

17 กรกฎาคม 2526 - 24 สิงหาคม 2526
เลี้ยงด้วยเซลลูโลสและกลูโคส

25 สิงหาคม 2526 - 22 กันยายน 2526
เลี้ยงด้วยเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลือง

5 ตุลาคม 2526 เลี้ยงด้วย 1-2 กรัม/ลิตร
ของหญ้าผสมวัชพืช

เราได้รับเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักแก๊สมีเทนที่ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ กล่าวคือ ถ้าหมักแบบ batch โดยให้ความเข้มข้นของวัตถุดิบพอเหมาะ

นั่นคือ ถ้าคิดเป็นกลูโคสในปริมาณ 100-200 มิลลิกรัมต่อโคลนที่มีแบคทีเรีย 20 มิลลิลิตร จะให้แก๊สที่มีมีเทนสูงกว่า 50% ภายใน 48 ชั่วโมง ตั้งแต่เมื่อเดือนพฤศจิกายน 2526 (แก๊สชีวภาพจะจุดไฟติดถ้ามีมีเทนตั้งแต่ 50% ขึ้นไป) (ตารางที่ 3)

โดยสรุป อาจกล่าวได้ว่า ที่ใดมีการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ ที่นั่นมีโอกาสมักจะมีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักมีเทน การกักพันธุ์แบคทีเรียเชื้อผสมด้วยการใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอน อาจจำเป็นที่จะต้องบ่มเชื้อเป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ การเลี้ยงและการเก็บรักษาแบคทีเรียเชื้อผสมที่มีความสามารถในการหมักจนได้แก๊สที่จุดไฟติดเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ (inoculum) ในงานทดลอง อาจทำได้โดยเก็บแบคทีเรียไว้ในโคลนที่ตกตะกอนนอนก้นง่ายและที่เป็นของผสมของดินก้ำแพงแสนอันเป็นดินที่มี silt เป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูง กับ bentonite และเลี้ยงด้วยอินทรีย์วัตถุที่อาจเป็นสารเคมี หรือชีวมวลจากพืช อย่างไรก็ตาม วิธีการเลี้ยงและการเก็บรักษาแบคทีเรียเชื้อผสมยังไม่เป็นที่พอใจที่สุด จำเป็นที่จะต้องทำการทดลองต่อ เพื่อให้ได้ความรู้ที่เป็นระบบที่สามารถทำซ้ำได้ ซึ่งจะได้อายางานต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- เกษร ทวีเศษ. 2526. การใช้กระบอกล้างหมักแก๊สมีเทน. รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2526. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Ibrahim, M.N.M. and G.R. Pearce. 1983. A soak-and press method for the alkali treatment of fibrous crop residues. Laboratory Studies on Aspects of the Procedure. Agri. Wastes. 8: 195-213.
- Klass, D.L. and G.H. Emert. 1981. Fuels from Biomass and Wastes. Ann Arbor Science Publishers Inc.

ตารางที่ 1 การผลิตแก๊ส และองค์ประกอบของแก๊ส จากการทดลองหมักกลูโคสด้วย น้ำ ดิน และโคลนตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ธรรมชาติของตัวอย่าง	ปริมาณแก๊ส มล. ที่ % มีเทนในแก๊สที่				หมายเหตุ
		อุณหภูมิห้อง	55° ซ	อุณหภูมิห้อง	55° ซ	
1	โคลนบริเวณขอบสระที่สังเกตเห็นการนำปุ๋ยของหญ้าและพืชน้ำ	+	0	+	-	- ไม่มีแก๊สสำหรับการวิเคราะห์
2	โคลนริมฝั่งคูน้ำ ในบริเวณวิทยาเขตกำแพงแสน สังเกตเห็นการหมักอินทรีย์วัตถุ	15	0	+	-	
3	น้ำในคูน้ำที่มีการเจริญของแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ ซึ่งบ่งถึงลักษณะที่มี anaerobic fermentation ก่อนหน้านั้นแล้ว	10	0	+	-	
4	ดินหน้าคอกสัตว์ปีกของภาควิชาสัตวบาล มีมูลห่าน	35	0	55	-	*แก๊สเกิดจากการหมักเป็นเวลานานกว่า ๔ วัน
5	ดินหน้าคอกสัตว์ปีก มีมูลเป็ด	30	0	55	-	
6	มูลโคนม	35	8	30	ตรวจไม่พบ	ขนาดของตัวอย่างแก๊สที่ฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์แก๊สเป็น 5-10 ไมโครลิตร
7	มูลสุกร	35	8	30	30	
8	มูลโคเนื้อ	30	35	30	55	
9	น้ำจากแอ่งน้ำในทุ่งที่มีหญ้าปุ๋ย	20	0	+	-	
10	น้ำจากคูน้ำที่มีการปุ๋ยของหญ้า	0	0	-	-	
11	โคลนจากคูน้ำที่มีหญ้าปุ๋ย	30	0	ตรวจไม่พบ	-	
12	ดินจากแปลงที่เคยมีการปลูกข้าวโพด	25	0	ตรวจไม่พบ	-	
13	ดินจากบริเวณที่มีการทิ้งน้ำล้างภาชนะใส่อาหาร	25	0	ตรวจไม่พบ	-	
14	โคลนผสมเศษพืชที่ปุ๋ย	25	0	ตรวจไม่พบ	-	
15	ดินผสมเศษหญ้าที่ปุ๋ย		0	ตรวจไม่พบ	-	
16	โคลนจากขอบสระบัวหลวง	15	0	ตรวจไม่พบ	-	
17	โคลนจากขอบสระบัวหลวง	25	0	ตรวจไม่พบ	-	
18	ดินผสมมูลโค	35	0	+	-	
19	ดินผสมมูลโคและมูลม้า	40	0	+	-	
20	โคลนจากสระที่มีพืชปุ๋ย	40	0	+	-	
21	ดินผสมมูลโค	22	30	+	80*	
22	ดินบริเวณที่มีการเก็บกากสุกร	5	5	ตรวจไม่พบ	45*	
23	ดินจากบริเวณที่มีการย่อยสลายฟางข้าว มูลโค และมูลสุกร	20	35	++	74*	

ตารางที่ 1 ต่อ

ตัวอย่างที่	ธรรมชาติของตัวอย่าง	ปริมาณแก๊ส มล. ที่ % มีเทนในแก๊สที่				หมายเหตุ
		อุณหภูมิห้อง	55° ซ	อุณหภูมิห้อง	55° ซ	
24	ดินจากบริเวณที่มีการย่อยสลายฟางข้าว มูลโค และมูลสุกร	10	35	60	60*	
25	มูลโค	25	35	60	60*	
26	ดินผสมมูลสุกรจากบริเวณที่มีการเก็บกักสัตว์	30	35	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	
27	ดินบริเวณทางเดินในหมู่บ้าน	30	30	10	10	
28	ดินจากบริเวณที่มีการเก็บกักไก่ และสุกร	35	35	61*	10*	
29	มูลโค	35	35	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	
30	โคลนและน้ำจากสระในบริเวณหมู่บ้านซึ่งเป็นแหล่งรับน้ำที่ระบายจากพื้นผิวดินจากบ้านและคอกสัตว์เมื่อมีฝนตก	5	0	ตรวจไม่พบ	—	
31	น้ำจากสระหน้าหมู่บ้านที่มีบักเตรีที่สังเคราะห์แสงได้กำลังเจริญ	15	5	49	10	
32	ดินที่มีการผุเปื่อยของเศษพืช	35	5	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	
33	ดินจากบริเวณแปลงถั่วฝักยาว	35	0	ตรวจไม่พบ	—	
34	กองปุ๋ยที่ประกอบด้วยมูลสัตว์ปีกและแกลบ	35	35	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	
35	กองปุ๋ยที่ประกอบด้วยมูลสัตว์ปีกและแกลบ	35	0	+	—	
36	มูลสัตว์ปีกที่ผุเปื่อย	30	2	+	—	
37	โคลนขอบสระที่มีผักคตขวาเจริญและมีการทับถมของเศษผักคตขวา	35	20	32	40	
38	โคลนจากขอบบ่อน้ำที่มีการเลี้ยงห่านด้วยผักคตขวา	35	0	ตรวจไม่พบ	—	
39	มูลไก่และแกลบ	35	17	+	ตรวจไม่พบ	
40	โคลนจากขอบสระบัวหลวง	35	0	ตรวจไม่พบ	—	
41	โคลนจากคูน้ำที่มีการระบายมูลสัตว์ปีกลงมาทับถม	45	ไม่มีการทดลอง	65.8*	ไม่ได้ทดลอง	
42	โคลนที่มีการหมักมูลห่าน	35	10	41	76	

ตารางที่ 2 ปริมาณแก๊สมีเทนในแก๊สที่เกิดจากการหมักกลูโคสด้วยดิน โคลนและน้ำตัวอย่าง เป็นเวลา 2 วัน และ 3 สัปดาห์

ตัวอย่างดิน โคลน หรือน้ำ	ปริมาณแก๊สมีเทน (% ปริมาตร/ปริมาตร) ในแก๊สที่เกิดจากการหมัก กลูโคสเป็นเวลา	
	2 วัน	3 สัปดาห์
ตัวอย่างที่ 32	ตรวจไม่พบ	68.5
„ 33	„	89.02
„ 34	„	91.40
„ 35	„	88.33
„ 41	„	83.30

ตารางที่ 3 ปริมาตรของแก๊สทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์แก๊สมีเทนที่ได้จากการหมักกลูโคสและน้ำกากส่าด้วยแบคทีเรียเชื่อมสมที่ได้ผ่านการเก็บรักษาในโคลนที่เป็นของผสมของดินกำแพงแสนและ bentonite

เวลาของการหมัก (วัน)	การหมักกลูโคส ¹ (200 มก.)		การหมักน้ำกากส่า (เทียบเป็นกลูโคสได้ 110 มก.)	
	มล. ของแก๊ส	% มีเทน	มล. ของแก๊ส	% มีเทน
1	21-42	21-38	13	42.6
2	31-54		ไม่มีการวัดปริมาตรและวิเคราะห์แก๊ส	
3	ไม่มีการวัดปริมาตรและวิเคราะห์แก๊ส		45	60.5*
4	71-119	63-69**	ไม่มีการวัดปริมาตรและวิเคราะห์แก๊ส	
5	79-135		50	71.9***
6	87-150	71-74		

หมายเหตุ 1 การหมักกลูโคสทำสามซ้ำ แสดงว่าการกระจายของแบคทีเรียในโคลนที่ใช้เก็บไม่สม่ำเสมอ

* แก๊สที่เกิดจากการหมักในวันที่ 2 และ 3 รวมกัน

** แก๊สที่เกิดจากการหมักในวันที่ 3 และ 4 รวมกัน

*** แก๊สที่เกิดจากการหมักในวันที่ 4 และ 5 รวมกัน