บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) รุ่น H1 บริษัท Lab Service LTD, Thailand.

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) รุ่น Dwyer MARK II บริษัท Dwyer Instruments , Inc. USA

เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (Shaker) รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific : USA

เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด (Analytical Balance) รุ่น AG204 บริษัท Mettller Toledo, Switzerland.

เครื่องชั่งน้ำหนักแบบหยาบ (Laboratory Balance) รุ่น PB3002 บริษัท Mettller Toledo, Switzerland.

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical co.,LTD, Japan.

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmitting Electron Microscope) รุ่น JEM200 CX บริษัท JEOL

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) รุ่น JSM 5800 LV บริษัท JEOL

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) รุ่น Cyberscan 1000 บริษัท Eutech Cyberscan , Singapore

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Novaspec II model 80-2688-64 บริษัท Pharmacia Biotech : England

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Centrikon model T42K Kontron Instrument , Japan

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Sorvall Biofuge Stratos บริษัท Kendg Laboratory Products : Germany

ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot Air Oven) รุ่น UL-60 บริษัท Memmert, U.S.A.

เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave) รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo : Japan

สารเคมี

เปปโตน (Peptone) บริษัท Difco , U.S.A.

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) บริษัท Fluka , Switzerland.

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck , Germany.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)บริษัท Merck , Germany.

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Carlo Erba Reagenti

เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) บริษัท Merck , Germany.

เอทิลินไดอะมีนเตตระอะซิติคแอซิด (EDTA : Ethyleaediaminetetaraacetic acid) บริษัท Fluka Switzerland.

กลูโคส (Food Grade)

ซูโครส (Food Grade)

ผงมอลต์สกัด (Malt-Extract)

ผงยีสต์สกัด (Yeast-Extract)

กรดไฮโดรคลอริค (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

ชุดทดสอบการใช้คาร์บอนชนิดต่างๆ เพื่อจัดจำแนกจุลินทรีย์ (API test kit)

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 คัดแยกหายีสต์ที่มีความสามารถในการกำจัดสีน้ำกากส่าจากแหล่งต่างๆ

3.1.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างดิน น้ำ และจากแหล่งต่างๆเพื่อนำมาคัดแยกหายีสต์

โดยทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างดินและน้ำในบริเวณที่มีกิจกรรมเกี่ยวกับน้ำกากส่า ได้แก่ บริเวณโรงงานผลิตแอลกอฮอล์ที่มีการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ โรงงานผลิตสุรา ได้แก่ ตัวอย่างดินและน้ำบริเวณขอบบ่อทิ้งน้ำกากส่า อ.คอนตูม จ. กาญจนบุรี ดินบริเวณที่จอดรถขนน้ำกากส่า น้ำจากท่อระบายน้ำ น้ำล้างถังหมัก น้ำล้างถังรถบรรทุกน้ำกากส่า และน้ำจากบ่อเติมอากาศ ณ โรงงานแสงโสม จ.นครปฐม และในวัสดุที่มักจะพบยีสต์ได้ง่าย เช่น ที่ผิวของเปลือกผลไม้สุกชนิดต่างๆ ได้แก่ กล้วย สัปปะรด องุ่นม่วง มะละกอ ตะขบ มะขาม ส้ม มะนาว สตรอเบอรี่ แคนตาลูป ทุเรียน ขนุน มังคุด เงาะ ชมพู่ องุ่นเขียว มะเขือเทศ มะม่วง แอปเปิ้ล และดอกไม้ ได้แก่ ดอกพุทธรักษา และดอกเข็ม และในอากาศบริเวณห้องทดลอง ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อนำมาคัดแยกหายีสต์ต่อไป

3.1.2 ทำการแยกยีสต์ออกจากแหล่งตัวอย่างที่เก็บมา

ตัวอย่างที่เป็นดิน นำตัวอย่างมาเจือจางในน้ำกลั่นและนำมาทำการแยกเชื้อโดยใช้สารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.2 มิลลิลิตร (ประมาณ 0.02 กรัมของน้ำหนักแห้งของตัวอย่างดิน) หยดลงบนจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหารแข็ง YM (YMPDA) ซึ่งผสม chloramphenecol 200 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และทำการ spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่ว บ่มไว้

ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้น จึงนำโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายยีสต์มาทำ sub-culture ต่อเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง YM (YMPDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน ตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการนำมาย้อมแกรมและตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากใช่ยีสต์ ให้ทำการเก็บใน slant ของอาหารแข็ง YM (YMPDA) พร้อมทั้งบันทึกลำดับไว้

ตัวอย่างที่เป็นของเหลว ให้ใช้สารละลายตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร หยดลงบนจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหารแข็ง YM (YMPDA) ซึ่งผสม chloramphenecol 200 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และทำการ spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่ว บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้น จึงนำโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายยีสต์มาทำ sub-culture ต่อเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง YM (YMPDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน ตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการนำมาย้อมแกรมและตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากใช่ยีสต์ ให้ทำการเก็บใน slant ของอาหารแข็ง YM (YMPDA) พร้อมทั้งบันทึกลำดับไว้

ตัวอย่างที่เป็นผลไม้ และดอกไม้ ใช้วิธีการทำเป็นสารละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ โดยการคั้นเนื้อและเปลือกผลไม้ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในถุงพลาสติก และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร หยดลงบนจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหารแข็ง YM (YMPDA) ซึ่งผสม chloramphenecol 200 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และทำการ spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่ว บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้น จึงนำโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายยีสต์มาทำ sub-culture ต่อเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง YM (YMPDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน ตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการนำมาย้อมแกรมและตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากใช่ยีสต์ ให้ทำการเก็บใน slant ของอาหารแข็ง YM (YMPDA) พร้อมทั้งบันทึกลำดับไว้

ตัวอย่างที่เป็นอากาศ ให้ใช้วิธีเปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง YM (YMPDA) ซึ่งผสม chloramphenecol 200 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ปิดฝา บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้น จึงนำโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายยีสต์มาทำ sub-culture ต่อเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง YM (YMPDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน ตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการนำมาย้อมแกรมและตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากใช่ยีสต์ ให้ทำการเก็บใน slant ของอาหารแข็ง YM (YMPDA) พร้อมทั้งบันทึกลำดับไว้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 คัดเลือกหายีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดสีน้ำกากส่าในอาหารเลี้ยงเชื้อจากยีสต์ที่คัดแยกได้

3.2.1 คัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำกากส่าเบื้องต้น บนอาหารแข็ง YM (YMPDA) ผสมน้ำกากส่าสกัด

โดยนำยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.1.2 มาแตะลงบนอาหารแข็ง YM (YMPDA) และ อาหารแข็ง YM (YMPDA) ผสมน้ำกากส่าสกัด เปรียบเทียบกันระหว่างการเจริญของยีสต์ในอาหารแข็ง YM (YMPDA) และอาหารแข็ง YM (YMPDA) ผสมน้ำกากส่า สังเกตยีสต์ที่มีประสิทธิภาพการกำจัดสีน้ำกากส่า โดยวัดเปรียบเทียบเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนี หรือลักษณะสีของโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงในอาหารแข็ง YM (YMPDA) ผสมน้ำกากส่า เมื่อเปรียบเทียบกับโคโลนีที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง YM (YMPDA)

3.2.2 คัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำกากส่าเบื้องต้น ในอาหารเหลว YM (YMPDB) ผสมน้ำกากส่าสกัด

นำยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.2.1 มาทำการเพิ่มจำนวน โดยเลี้ยงลงบนอาหารเหลว YM (YMPDB) นำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น ใช้ loop แตะเชื้อที่เตรียมไว้ถ่ายลงในอาหารเหลว YM (YMPDB) ผสมน้ำกากส่าสกัด จากนั้น นำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความเข้มสีสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างกลุ่มทดลองที่เติมเชื้อและกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ โดยนำตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มไปทำการปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีแล้วนำส่วนใสไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 475 นาโนเมตร ทุกๆ วัน เป็นระยะเวลา 5 วัน

3.2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีน้ำกากส่าสกัดโดยยีสต์ที่คัดเลือก

ศึกษาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม โดยนำยีสต์ที่ได้จาก 3.2.2 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM (YMPDB) ผสมน้ำกากส่าสกัด ที่ปรับเปลี่ยนปริมาณแหล่งคาร์บอน (glucose) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 , 0.5 , 1.0 , 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเป็น 1 มิลลิลิตร (1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร) ทำการตรวจวัดความเข้มสีที่เปลี่ยนไป ทำการบันทึกผลค่าความเข้มสีของสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อทุกๆ วัน โดยนำตัวอย่างไปทำการปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีแล้วนำส่วนใสไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 475 นาโนเมตร ทุกๆ วัน เป็นเวลา 5 วัน

ศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยนำยีสต์ที่ได้จาก 3.2.2 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM (YMPDB) ผสมน้ำกากส่าสกัด ที่ปรับเปลี่ยนปริมาณไนโตรเจน (peptone) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 , 0.25 , 0.5 , 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเป็น 1 มิลลิลิตร (1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร) ทำการตรวจวัดความเข้มสีที่เปลี่ยนไป ทำการบันทึกผลค่าความเข้มสีของสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อทุกๆ วัน โดยนำตัวอย่างไปทำการปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีแล้วนำส่วนใสไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 475 นาโนเมตร ทุกๆ วัน เป็นเวลา 5 วัน

ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสม โดยโดยนำยีสต์ที่ได้จาก 3.2.2 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM (YMPDB) ผสมน้ำกากส่าสกัด ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ตั้งแต่ 3.5 , 4.5 , 5.5 , 6.5 และ 7.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเป็น 1 มิลลิลิตร (1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร) ทำการตรวจวัดความเข้มสีที่เปลี่ยนไป ทำการบันทึกผลค่าความเข้มสีของสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อทุกๆ วัน โดยนำตัวอย่างไปทำการปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีแล้วนำส่วนใสไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 475 นาโนเมตร ทุกๆ วัน เป็นเวลา 5 วัน

3.2.4 ทดสอบความสามารถของยีสต์ที่เลือกได้ในการกำจัดสีน้ำกากส่าสกัดในสภาวะที่เหมาะสม

นำค่าของปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมตามข้อ 3.2.3 มาใช้เตรียมอาหารเหลว YM (YMPDB) ที่ผสมน้ำกากส่าสกัด มาทำการเลี้ยงยีสต์ที่ได้จาก 3.2.3 ในอาหารดังกล่าว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้เชื้อเริ่มต้นเป็น 1 มิลลิลิตร (1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เพื่อสังเกตปริมาณการกำจัดสีในสภาวะที่เหมาะสม โดยทำการวัดปริมาณความเข้มสีเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อทุกๆ วัน โดยนำตัวอย่างไปทำการปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 475 นาโนเมตร ทุกๆ วัน เป็นเวลา 5 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 นำยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีน้ำกากส่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุดในสภาวะเหมาะสมมาศึกษาเปรียบเทียบการกำจัดสีน้ำกากส่าจากโรงงานสุรา

โดยเตรียมน้ำกากส่าสดที่ได้จากโรงงานสุราแสงโสม จ.นครปฐม 100 มิลลิลิตร ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร 2 ชุด ชุดที่ 1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ชุดที่ 2 ไม่ต้องทำการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นให้เติมเชื้อยีสต์เริ่มต้นที่ได้จากข้อ 3.2.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ที่ความเข้มข้น 1 x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร) ลงในน้ำกากส่าทั้ง 2 ชุด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เพื่อสังเกตปริมาณการกำจัดสี เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ โดยนำตัวอย่างไปทำการปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 475 นาโนเมตร ทุกๆ วันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30

3.4 นำยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีสูงสุดในน้ำกากส่าจากโรงงานสุรา มาศึกษาทดลองกับน้ำกากส่าที่ปรับสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดสี

เตรียมน้ำกากส่าที่ได้จากโรงงานสุราแสงโสม จ.นครปฐม 100 มิลลิลิตร ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร 2 ชุด ชุดที่ 1 ปรับให้เป็นสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ชุดที่ 2 เตรียมเหมือนชุดที่ 1 แต่ไม่นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นให้เติมเชื้อยีสต์เริ่มต้นที่ได้จากข้อ 3.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ที่ความเข้มข้น 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร) ลงในน้ำกากส่าทั้ง 2 ชุด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เพื่อสังเกตความเข้มสีเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ โดยนำตัวอย่างไปทำการปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 475 นาโนเมตร ทุกๆ วันที่ 1, 2, 3, 4 และ 5

3.5 ศึกษายีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5.1 ศึกษาลักษณะโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) ทำการศึกษาลักษณะของยีสต์ที่ย้อมติดสีคริสตัลไวโอเลต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา โดยการ นำกระจกสไลด์ที่สะอาดวางไว้ แล้วหยดด้วยน้ำกลั่น 1 หยด นำยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.4 มาทำการป้าย (smear) บนหยดน้ำ ให้กว้างประมาณหนึ่งในสามของกระจกสไลด์ ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง

นำสไลด์ที่แห้งแล้วไปทำการย้อมด้วยสีย้อม crystal violet ประมาณ 30 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5.2 ศึกษาลักษณะโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning election microscope) โดยการ

ตัดชิ้นส่วนของอาหารแข็ง YM (YMPDA) ที่มีโคโลนีของยีสต์ซึ่งได้จากข้อ 3.4 เป็นชิ้นเล็กๆ หากตัวอย่างที่ทำการทดสอบอยู่ในอาหารเหลว ให้ทำการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดของรูกระดาษกรองเท่ากับ 0.45 ไมครอน

คองตัวอย่าง (fixation) ด้วย glutaraldehyde 2.5% ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที

ขจัดน้ำออก (dehydration) โดยการแช่ตัวอย่างลงในอันดับของเอธิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนี้ 30 , 50 , 70 , 90 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละความเข้มข้นใช้เวลาปริมาณ 10-15 นาที และที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์อีก 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 10-15 นาที

ทำตัวอย่างให้แห้ง (drying) ด้วยเครื่อง critical point dryer

ฉาบตัวอย่าง (coating) นำตัวอย่างติดตัวอย่างลงบนแท่นวางตัวอย่างที่เป็นทองเหลือง (stub) ยึดด้วยเทปสองหน้า ฉาบทองด้วยเครื่อง ion-sputter (Balzers รุ่น SCD 040) 4-5 นาที

ตัวอย่างที่ผ่านการฉาบ นำไปทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (JEOL รุ่น JSM 5800 CV) ที่ acceleration voltage เท่ากับ 15 kV

3.5.3 ศึกษาลักษณะโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) โดยการ

นำตัวอย่างที่อยู่ในอาหารเลี้ยงมาปั่นให้ตกตะกอน จากนั้น ให้นำตะกอนที่ได้มาเติมวุ้น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอนและให้วุ้นแข็งตัว และนำวุ้นที่ได้มาตัดให้มีขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

คองตัวอย่าง (fixation) ด้วย 2.5 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde ใน 0.1 M cacodylate Buffer pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ล้างตัวอย่างด้วย cacodylate buffer pH 7.2 อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที

ขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration) โดยการแช่ตัวอย่างลงในอันดับของเอธิลแอลกอฮอล์ ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนี้ 30 , 50 , 70 , 95 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 15 นาที และความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์อีก 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 15 นาที เมื่อครบแล้วจึงทำการแทนที่เอธิลแอลกอฮอล์ด้วยสารจำพวกเรซิน (Spurr's resin) เริ่มจากการแช่ตัวอย่างลงในอัตราส่วนระหว่างเอธิลแอลกอฮอล์กับเรซินตั้งแต่ 3:1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง , 1:1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ 1:3 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวอย่างแข็งตัวและเรซินแทนที่แอลกอฮอล์ได้ทั้งหมด

ฝังตัวอย่าง (embedding) ในเบ้ากลมขนาดเล็ก (BEEM's capsule) ซึ่งจะถูกนำไปเฉือนเพื่อทำการตกแต่ง (trimming) ให้หน้าตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู อบตัวอย่างที่

อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำตัวอย่างไปตัดด้วยเครื่องตัด (ultramicrotome)

ตัดตัวอย่าง (sectioning) ด้วยเครื่อง ultramicrotome (LBK) ให้ชิ้นของตัวอย่างมีความหนาระหว่าง 60-90 นาโนเมตร และนำชิ้นตัวอย่างที่ได้หลังจากการตัดแล้ว วางไว้บนแผ่นวางตัวอย่าง (copper grid ขนาด 300 mesh)

ทำการย้อมตัวอย่าง (staining) โดยนำ 2 เปอร์เซ็นต์ uranyl acetate ใน 50 เปอร์เซ็นต์ เอธิลแอลกอฮอล์ หยดลงบนแผ่น parafilm นำแผ่นวางตัวอย่างที่มีตัวอย่างอยู่ มาวางทับลงบนหยดสารละลาย โดยให้ด้านที่มีตัวอย่างคว่ำลงสัมผัสกับสารละลาย ปิดไว้ด้วยภาชนะทึบแสง ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้น นำแผ่นวางตัวอย่างจุ่มล้างในน้ำกลั่น น้ำต้ม และน้ำกรอง ประมาณ 10-15 ครั้ง นำตัวอย่างที่ล้างแล้วมาจุ่มลงในสารละลาย lead citrate โดยให้ใช้ฝาของจานอาหารเลี้ยงเชื้อปิดไว้เพื่อลดประมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ใช้เวลา 10 นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง และนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่านต่อไป

3.6 จำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดเลือกได้

3.6.1 ศึกษาลักษณะของโคโลนีของยีสต์บนอาหารแข็ง YM (YMPDA) และบนอาหารเหลว YM (YMPDB)

3.6.2 การทดสอบทางชีวโมเลกุล (biochemistry) โดยการใช้คาร์บอนชนิดต่างๆ ทำการศึกษาด้วยระบบจัดจำแนกจุลินทรีย์ เอพีไอ (API test kit)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย