หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. <u>การศึกษาข้อมูลพื้นฐานของน้ำกากส่าและระบบกำจัด</u>

การศึกษาข้อมูลพื้นฐานของน้ำกากส่าและระบบการกำจัดน้ำกากส่า โดยดำเนินการศึกษา ดังนี้

1.1 การศึกษาระบบการกำจัดน้ำกากส่า

ได้ทำการศึกษาระบบการกำจัดน้ำกากส่าของโรงงานสุราแสงโสม จังหวัดนครปฐม

1.2 การเก็บตัวอย่างน้ำกากส่า

ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำกากส่าจากจุดต่าง ๆ ของระบบกำจัดน้ำเสียของโรงงานสุราแสงโสม จังหวัดนครปฐม ดังนี้

1.2.1 น้ำกากส่าก่อนเข้าระบบกำจัดน้ำเสีย ซึ่งเรียกว่าน้ำกากส่าสด (Stillage)

1.2.2 น้ำกากส่าหลังผ่านระบบกำจัดน้ำเสียแบบไร้อากาศ (anaerobic treatment)

1.2.3 น้ำกากส่าหลังผ่านระบบกำจัดน้ำเสียแบบให้อากาศ (aerobic treatment)

1.3 การศึกษาข้อมูลพื้นฐานของน้ำกากส่า

โดยนำน้ำกากส่าที่เก็บจากจุดต่าง ๆ จากข้อ 1.2 ทำการศึกษาข้อมูลพื้นฐานดังนี้

1.3.1 วัดความเป็นกรดเป็นด่าง ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH-meter) ของ Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.3.2 วัดความเข้มของสีน้ำกากส่า โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปค-โตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 475 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Ueda (1983) (ภาคผนวกหน้า 135)

1.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี Somogyi (1952) และ Nelson (1944) (ภาคผนวกหน้า 135)

1.3.4 วิเคราะห์หาค่า บี.ไอ.ดี. ตามวิธีของ American Public Health Association (APHA AWWA and WPCF, 1971) (ภาคผนวกหน้า 136)

1.3.5 วิเคราะห์หาค่า ซี.ไอ.ดี. โดยใช้ Dichromate reflux method ซึ่งปรับปรุงวิธีการโดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 141)

1.3.6 วิเคราะห์หาค่า แอมโมเนียไนโตรเจน โดยวิธีกลั่น ซึ่งปรับปรุงวิธีการเสริมพลและไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 142)

1.3.7 วิเคราะห์หาค่า ออร์แกนนิคไนโตรเจน โดยวิธี Kjeldahl method ซึ่งปรับปรุงวิธีการโดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 144)

1.3.8 หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ซึ่งเท่ากับผลรวมของแอมโมเนียไนโตรเจน และออร์แกนนิคไนโตรเจน

1.3.9 วิเคราะห์หาค่าไนเตรท โดยวิธี บรูซีน ซึ่งปรับปรุงวิธีการโดย เสริมพล และไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 145)

1.3.10 วิเคราะห์หาค่าฟอสเฟต โดยวิธี อะมิโนแนฟโธซัลโฟลิค แอซิค ซึ่งปรับปรุงวิธีการโดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 147)

2. <u>เก็บตัวอย่าง เพื่อแยกสายพันธุ์เชื้อรา</u>

เก็บตัวอย่างดิน และน้ำ เพื่อแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการฟอกสีกากน้ำตาล สถานที่เก็บตัวอย่างดิน และน้ำ ดังนี้

2.1 ดินบริเวณจุดต่าง ๆ ของโรงงานสุรา

ทำการ เก็บตัวอย่างดินบริเวณจุดต่าง ๆ ของโรงงานสุราอยุธยา โรงงานสุรามหาราษฎร์ บางยี่ขัน โรงงานสุรามหาราษฎร์ จังหวัดปทุมธานี โรงงานสุราไทยทำ จังหวัดปทุมธานี โรงงานสุราแสงโสม จังหวัดนครปฐม โดยทำการ เก็บตัวอย่างดินบริเวณถัง เก็บกากน้ำตาล (molasses tank) ดินบริเวณถังหมัก (fermentation tank) ดินบริเวณหอกลั่น (distillation tank) ดินบริเวณบ่อ เก็บและกำจัดน้ำกากส่า (slop tank and waste water treatment pond)

2.2 ดินและน้ำจากแหล่งต่าง ๆ นอกบริเวณโรงงานสุรา

ทำการ เก็บตัวอย่างดินและน้ำตามแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่เก็บ

สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	
	ดิน	น้ำ
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย บางเขน	5	2
ฟาร์มโคนม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน	6	3
ฟาร์มโคนม จังหวัดขอนแก่น	10	2
แหล่งน้ำใกล้คอกหมู จังหวัดนครปฐม	3	1
แหล่งน้ำ จังหวัดเชียงใหม่	6	9
แหล่งน้ำ จังหวัดพังงา	5	10
ไร่มันสำปะหลัง จังหวัดชลบุรี	15	-
บ่อเลี้ยงปลา จังหวัดสุพรรณบุรี	2	1

3. การแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินและน้ำ

นำตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บได้จากข้อ 2 มาแยกเชื้อรา โดยนำตัวอย่างดินและน้ำ มาเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วนำมาแยกเชื้อราโดยเติมสารละลายตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร (ประมาณ 0.02 กรัม น้ำหนักแห้งของตัวอย่างดิน หรือ 0.02 มิลลิลิตร ของตัวอย่างน้ำ) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri-dish) ที่ปราศจากเชื้อ ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 (ภาคผนวก หน้า 128) ลงไปประมาณ 20 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างกระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 3 วัน แยกเชื้อราสายพันธุ์ที่รอบ ๆ โคโลนี (colony) มีสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจางลง ซึ่งเป็นการแสดงถึงความสามารถในการฟอกสีของกากน้ำตาล ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เก็บไว้ศึกษาต่อไป

4. การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการฟอกสีกากน้ำตาลบนอาหารวุ้น

คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการฟอกสีกากน้ำตาลได้ดี ทำการทดลองโดยใช้เชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้

4.1 เชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากข้อ 3

4.2 เชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้จาก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 188 สายพันธุ์ ดังนี้

4.2.1 เชื้อราจำพวก Phycomycetes จำนวน 57 สายพันธุ์

4.2.2 เชื้อราจำพวก Ascomycetes จำนวน 21 สายพันธุ์

4.2.3 เชื้อราจำพวก Deuteromycetes จำนวน 82 สายพันธุ์

4.2.4 เชื้อราจำพวก Basidiomycetes จำนวน 28 สายพันธุ์

โดยนำเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ในข้อ 4.1 4.2.1 4.2.2 และ 4.2.3 มาขีด (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 (ภาคผนวกหน้า 128) และเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ในข้อ 4.2.4 มาลากบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 (ภาคผนวกหน้า 128) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด นาน 4 วัน ตรวจดูความสามารถในการฟอกจางสีกากน้ำตาล โดยสังเกตจากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อรอบ ๆ โคโลนี ของเชื้อจะเจือจางลง ซึ่งเป็นการแสดงถึงความสามารถในการฟอกสีของกากน้ำตาล บันทึกผลการทดลองเป็น

+ + + เมื่อสามารถฟอกสีกากน้ำตาลได้ดีมาก

+ + เมื่อสามารถฟอกสีกากน้ำตาลได้ดี

+ เมื่อสามารถฟอกสีกากน้ำตาลได้พอใช้

- เมื่อสามารถฟอกสีกากน้ำตาลไม่ได้

โดยมีเชื้อเห็ดสายพันธุ์ Coriolus versicolor (B30) ที่ได้จากประเทศญี่ปุ่น เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน

5. ทำการทดสอบความสามารถในการฟอกสีกากน้ำตาลในอาหารเหลว

ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 ในการฟอกสีกากน้ำตาลในอาหารเหลว โดยเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 50

มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปกรวย ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (reciprocal shaker) ที่มีอัตราความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 4 วัน โดยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดลอง มีดังนี้

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 (ภาคผนวกหน้า 128)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรนี้ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อราจำพวก Phycomycetes Ascomycetes Deuteromycetes และเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 4.1

5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 (ภาคผนวกหน้า 129)

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรนี้ใช้สำหรับเชื้อราจำพวก Basidiomycetes

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เป็น 1 มิลลิลิตรของสารแขวนลอยของสปอร์ (1×10^7 สปอร์/มิลลิลิตร) หรือ 1 มิลลิลิตรของสารแขวนลอยเส้นใย (ประมาณ 0.01 กรัม น้ำหนักแห้ง) (ภาคผนวกหน้า 134) แล้วแต่ชนิดของเชื้อรา ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร ทำการตรวจวัดอัตราการฟอกสีกากน้ำตาล โดยวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงของสีกากน้ำตาลดังกล่าว ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตรมิเตอร์ โดยอาศัยความยาวคลื่นแสงที่ 475 นาโนเมตร และบันทึกผลการฟอกสีเป็นเปอร์เซนต์ของการฟอกสี ซึ่งคิดจากเปอร์เซนต์การลดลงของความสามารถในการดูดกลืนแสงของสีกากน้ำตาลหลังการฟอกสีแล้วเทียบกันกับก่อนการฟอกสี ตามวิธีการของ Ueda (1983) (ภาคผนวกหน้า 135)

6. <u>การทดสอบความสามารถในการฟอกสีกากน้ำตาลของเชื้อผสม (2 เชื้อ) และเชื้อเดียว</u>

ทำการทดสอบความสามารถในการฟอกสีกากน้ำตาลโดยเลี้ยงเชื้อรา 2 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 (ภาคผนวกหน้า 128) 100 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดรูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 5 วัน เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์เดียว โดยเชื้อราที่ใช้ในการทดลองได้จากการคัดเลือกในข้อ 5 ซึ่งมีทั้งเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์ และเชื้อราสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสปอร์ และปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลอง เป็นดังนี้

6.1 เชื้อผสม (2 เชื้อ) ใช้สารแขวนลอยเส้นใย (0.01 กรัม/มิลลิลิตร) หรือสารแขวนลอยของสปอร์ (1×10^7 สปอร์/มิลลิลิตร) (ภาคผนวกหน้า 134) ของเชื้อผสมทั้ง 2 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 1 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร

6.2 เชื้อเดียว ใช้สารแขวนลอยเส้นใย (0.01 กรัม/มิลลิลิตร) หรือสารแขวนลอยสปอร์ (1×10^7 สปอร์/มิลลิลิตร) (ภาคผนวกหน้า 134) 2 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร

ทำการตรวจวัดอัตราการฟอกสีกากน้ำตาลโดยวิธีของ Ueda (1983) (ภาคผนวกหน้า 135) และบันทึกผลการฟอกสีกากน้ำตาล เป็นเปอร์เซนต์การฟอกสีกากน้ำตาล

7. <u>การศึกษาสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการฟอกสีกากน้ำตาล</u>

ทำการทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 4 และ 5 ในการฟอกสีกากน้ำตาล ดังนี้

7.1 การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 (ภาคผนวกหน้า 128) ที่มีการแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคสเป็น 0.5% 1.0% 1.5% 2.0% 2.5% และ 3.0% ตามลำดับ โดยหยด 10 มิลลิลิตรของสารแขวนลอยเส้นใย (ปริมาณเชื้อ 0.1 กรัมน้ำหนักแห้ง) หรือ 2 มิลลิลิตรของสารแขวนลอยสปอร์ (1×10^7 สปอร์/มิลลิลิตร) (ภาคผนวกหน้า 134) ลงใน 100 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุในขวดรูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 6 วัน ทำการตรวจวัดอัตราการฟอกสีกากน้ำตาลโดยวิธีของ Ueda (1983) (ภาคผนวกหน้า 135) และบันทึกผลการฟอกสีกากน้ำตาลเป็นเปอร์เซนต์การฟอกสีกากน้ำตาล

7.2 การหาชนิดของแหล่งอาหารไนโตรเจน

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 (ภาคผนวกหน้า 128) ที่มีการแปรผัน แหล่งอาหารไนโตรเจน 4 ชนิดคือ โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) แอมโมเนียมซัลเฟต เปปโตน (peptone) ผงยีสต์สกัด และ ยูเรีย (urea) โดยหยด 10 มิลลิลิตรสารแขวนลอยเส้นใย (ปริมาณเชื้อ 0.1 กรัมน้ำหนักแห้ง) หรือ 2 มิลลิลิตรของสารแขวนลอยสปอร์ (1×10^7 สปอร์/มิลลิลิตร) (ภาคผนวกหน้า 134) ลงใน 100 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุในขวดรูปกรวย 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 6 วัน ทำการตรวจวัดอัตราการฟอกสีกากน้ำตาลโดยวิธีของ Ueda (1983) (ภาคผนวกหน้า 135) และบันทึกผลการฟอกสีกากน้ำตาลเป็นเปอร์เซนต์การฟอกสีกากน้ำตาล

7.3 การหาความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 (ภาคผนวกหน้า 128) ที่มีการแปรผันความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ โดยหยด 10 มิลลิลิตรของสารแขวนลอยเส้นใย (ปริมาณเชื้อ 0.1 กรัมน้ำหนักแห้ง) หรือ 2 มิลลิลิตรของสารแขวนลอยสปอร์ (1×10^7 สปอร์/มิลลิลิตร) ลงใน 100 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุในขวดรูปกรวย ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 6 วัน ทำการตรวจวัดอัตราการฟอกสีกากน้ำตาลโดยวิธีของ Ueda (1983) (ภาคผนวกหน้า 135) และบันทึกผลการฟอกสีกากน้ำตาลเป็นเปอร์เซนต์การฟอกสีกากน้ำตาล

8. <u>การศึกษาหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการฟอกสีกากน้ำตาลของเชื้อราที่แยกได้ D90</u>

ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ D90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 (ภาคผนวกหน้า 128) โดยมีการแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้น ซึ่งเป็นสารแขวนลอยเส้นใย ดังนี้ 5 10 15 20 และ 25 มิลลิลิตร (ปริมาณเชื้อ 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 กรัมน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ภาคผนวกหน้า 134) ใน 100 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุในขวดรูปกรวย ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 6 วัน ทำการตรวจวัดอัตราการฟอกสีกากน้ำตาลโดยวิธีของ Ueda (1983) (ภาคผนวกหน้า 135) และบันทึกผลการฟอกสีกากน้ำตาลเป็นเปอร์เซนต์การฟอกสีกากน้ำตาล

9. <u>การศึกษาหาสภาพการฟอกสีกากน้ำตาลของเชื้อราที่แยกได้ D90 โดยสูตรอาหารที่มีการปรับปรุงและปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม</u>

ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ D90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมที่มีการปรับปรุงแล้วจากผลการทดลองข้อ 7 และปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 8 ตลอดจนความเหมาะสมของแหล่งอาหารไนโตรเจน โดยได้มีการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวได้ 3 สูตร มีองค์ประกอบต่าง ๆ ตลอดจนความเป็นกรดเป็นด่างเหมือนกัน แต่ที่ต่างกันคือแหล่งอาหารไนโตรเจนที่ใช้ โดยแหล่งอาหารไนโตรเจนที่ใช้คือ ไซเตียมไนเตรท ผงยีสต์-สกัด และยูเรีย ซึ่งใช้ในปริมาณ 0.2 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตร ดังนี้

สูตร ก : เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 7 (ภาคผนวกหน้า 130) โดยเติม 0.2% โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน

สูตร ข : เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 7 (ภาคผนวกหน้า 130) โดยเติม 0.2% ยูเรียเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน

สูตร ค : เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 7 (ภาคผนวกหน้า 130) โดยเติม 0.2% ผงยีสต์สกัด เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน

โดยหยด 15 มิลลิกรัมสารแขวนลอยเส้นใย (ปริมาณเชื้อ 0.15 กรัมน้ำหนักแห้ง) (ภาคผนวกหน้า 134) ใน 100 มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ ตามแสดงข้างต้นที่บรรจุในขวดรูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่ 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 9 วัน ทำการตรวจหาสภาพการฟอกสีกากน้ำตาลทุก 24 ชั่วโมง ดังนี้

9.1 วัดความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่างแบบของ Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา

9.2 วัดอัตราการฟอกสีกากน้ำตาลโดยวิธีของ Ueda (1983) (ภาคผนวกหน้า 135) และบันทึกผลการฟอกสีกากน้ำตาลเป็นเปอร์เซนต์การฟอกสีกากน้ำตาล

9.3 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi (1952) และ Nelson (1969) (ภาคผนวกหน้า 135

9.4 วัดปริมาณเซลที่เกิดขึ้น โดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง ตามวิธีของ Calam (1969) (ภาคผนวกหน้า 150)

10. <u>การศึกษาสภาพการฟอกสีน้ำกากส่า โดยเชื้อราที่แยกได้ D90</u>

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำกากส่าจากโรงงานสุราแสงโสม จังหวัดนครปฐม มาเพื่อใช้ในการทดลอง โดยได้ทำการเก็บตัวอย่างจากจุดต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้อ 1.2 ดังนี้ น้ำกากส่าก่อนเข้าระบบกำจัดน้ำเสีย (น้ำกากส่าสด) น้ำกากส่าที่ผ่านระบบกำจัดน้ำเสียแบบไร้อากาศ และน้ำกากส่าที่ผ่านระบบกำจัดน้ำเสียแบบให้อากาศ โดยนำน้ำกากส่านี้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มของสีในการดูดกลืนแสงเท่ากับ 4 หน่วย ที่ความยาวคลื่นแสง 475 นาโนเมตร (ภาคผนวกหน้า 135) และเติมอาหารเสริมดังนี้ กลูโคส 2.5% โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1%

แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05% โซเดียมไนเตรท 0.2% และปรับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซนติเกรด นาน 15 นาที

หยด 15 มิลลิลิตรของสารแขวนลอยเส้นใย (ปริมาณเชื้อ 0.15 กรัมน้ำหนักแห้ง) (ภาคผนวกหน้า 134) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปกรวย ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 12 วัน ทำการตรวจหาสภาพการฟอกสีน้ำกากส่าดังนี้

10.1 วัดความเป็นกรดเป็นด่าง ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง ของ Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา ทุก 24 ชั่วโมง

10.2 วัดอัตราการฟอกสีน้ำกากส่า โดยวิธีของ Ueda (1983) (ภาคผนวกหน้า 135) ทุก 24 ชั่วโมง และบันทึกผลการฟอกสีน้ำกากส่า เป็นเปอร์เซนต์การฟอกสีน้ำกากส่า

10.3 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi (1952) และ Nelson (1944) (ภาคผนวกหน้า 135) ทุก 24 ชั่วโมง

10.4 วัดปริมาณเซลที่เกิดขึ้นโดยวิธีหาน้ำหนักแห้งของ Calam (1969) (ภาคผนวกหน้า 150) ทุก 24 ชั่วโมง

10.5 วิเคราะห์หาค่า บี.โอ.ดี. โดยวิธีของ American Public Health Association (ภาคผนวกหน้า 136) ทุก 72 ชั่วโมง

10.6 วิเคราะห์หาค่า ซี.โอ.ดี. โดยวิธี Dichromate reflux method ปรับปรุงวิธีการโดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 141) ทุก 72 ชั่วโมง

10.7 วิเคราะห์หาค่า แอมโมเนียไนโตรเจน โดยวิธีกลั่น ปรับปรุงวิธีการโดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524) ทุก 72 ชั่วโมง

10.8 วิเคราะห์หาค่า ออร์แกนนิคไนโตรเจน โดยวิธี Kjeldahl method ปรับปรุงวิธีการโดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 144) ทุก 72 ชั่วโมง

10.9 หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ทุก 72 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับผลรวมของแอมโมเนีย-ไนโตรเจนกับออร์แกนนิคไนโตรเจน

10.10 วิเคราะห์หาค่า ฟอสฟอรัส โดยวิธี อะมิโนแนฟโธซัลโฟนิค แอซิด ปรับปรุงวิธีการโดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 147) ทุก 72 ชั่วโมง

10.11 วิเคราะห์หาค่าไนเตรท โดยวิธีบรูซีน ปรับปรุงวิธีการ โดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 145) ทุก 72 ชั่วโมง

11. <u>การศึกษาผลของอาหารเสริมต่ออัตราการฟอกสีน้ำกากส่าสดของเชื้อราที่แยกได้ D90</u>

ทำการทดลองศึกษาผลของอาหารเสริมต่าง ๆ เช่น กลูโคส โซเดียมไนเตรท โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต ที่เติมลงในน้ำกากส่าสดที่เก็บจากโรงงานสุราแสงโสม จังหวัดนครปฐม ต่ออัตราการฟอกสีน้ำกากส่าของเชื้อราที่แยกได้ D90 โดยนำน้ำกากส่าสดดังกล่าวมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มของสีในการดูดกลืนแสง เท่ากับ 4 หน่วย ที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 475 นาโนเมตร (ภาคผนวกหน้า 136) และนำมาเติมอาหารเสริมต่าง ๆ ดังนี้

สูตรที่ 1 เติมกลูโคส 2.5% โซเดียมไนเตรท 0.2% โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05% และปรับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6

สูตรที่ 2 เติมโซเดียมไนเตรท 0.2% โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05% และปรับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6

สูตรที่ 3 เติมกลูโคส 2.5% โซเดียมไนเตรท 0.2% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05% และปรับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6

สูตรที่ 4 เติมกลูโคส 2.5% โซเดียมไนเตรท 0.2% โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1% และปรับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6

สูตรที่ 5 เติมกลูโคส 2.5% โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05% และปรับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6

สูตรที่ 6 ไม่เติมอาหารเสริมทุกชนิด แต่ปรับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซนติเกรด นาน 15 นาที

หยด 15 มิลลิลิตรของสารแขวนลอยเส้นใย (ปริมาณเชื้อ 0.15 กรัมน้ำหนักแห้ง) (ภาคผนวกหน้า 134) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ ข้างต้น 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด

รูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 10 วัน ทำการตรวจหาสภาพการฟอกสีน้ำกากส่าทุก 24 ชั่วโมง ดังนี้

11.1 วัดความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่างของ Bechman ประเทศสหรัฐอเมริกา

11.2 วัดอัตราการฟอกสีน้ำกากส่าโดยวิธีของ Ueda (1983) (ภาคผนวกหน้า 135)

11.3 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi (1952) และ Nelson (1944) (ภาคผนวกหน้า 135)

11.4 วัดปริมาณเซลที่เกิดขึ้น โดยวิธีหาน้ำหนักแห้งของ Calam (1969) (ภาคผนวกหน้า 150)

12. <u>ทำการศึกษาสภาพการฟอกสีน้ำกากส่า โดยเชื้อราที่แยกได้ D90 ในสภาพไม่ปลอดเชื้อ (non-sterile condition)</u>

ทำการทดลองและตรวจหาสภาพการฟอกสีน้ำกากส่า เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 10 ต่างกันเพียงอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไม่ต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อ และทำการทดลองอีกชุดหนึ่งโดยไม่เติมเชื้อเริ่มต้นเพื่อเปรียบเทียบสภาพการฟอกสีน้ำกากส่า

13. <u>ทำการทดลองศึกษาสภาพการฟอกสีกากน้ำตาลแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) โดยเชื้อราที่แยกได้ D90</u>

ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ D90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 7 โดยใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน ในเครื่อง u-carrier magnetic stirrer ของบริษัท Bellco ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใส่สารแขวนลอยเส้นใย (ปริมาณเชื้อ 0.75 กรัมน้ำหนักแห้ง) 75 มิลลิลิตร ลงใน μ-carrier spinner flask ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อดังสูตรข้างต้น 500 มิลลิลิตร อัตราความเร็วในการกวน 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 27-32 องศาเซนติเกรด) ทำการตรวจหาสภาพการฟอกสีกากน้ำตาลทุก 24 ชั่วโมง ดังนี้

13.1 วัดความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่างของ Bechman ประเทศสหรัฐอเมริกา

13.2 วัดอัตราการฟอกสีกากน้ำตาลโดยวิธีของ Ueda (1983) (ภาคผนวกหน้า 135) และบันทึกผลการฟอกสีกากน้ำตาลเป็น เปอร์เซนต์การฟอกสีกากน้ำตาล

13.3 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi (1952) และ Nelson (1944) (ภาคผนวกหน้า 135)

13.4 วัดปริมาณเซลที่เกิดขึ้นโดยวิธีหาน้ำหนักแห้งของ Calam (1969) (ภาคผนวกหน้า 150)

เมื่อผลการฟอกสีกากน้ำตาลคงที่ ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าออกครึ่งหนึ่ง ประมาณ 250 มิลลิลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ลงแทน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่มีส่วนประกอบเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมทุกประการ แต่แตกต่างกันที่ความเข้มของสีในการดูดกลืนแสงเท่ากับ 7 ที่ความยาวคลื่นแสง 475 นาโนเมตร (ภาคผนวกหน้า 135) และทำการตรวจหาสภาพการฟอกสีกากน้ำตาลทุก 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับข้างต้น ทำการทดลองเช่นนี้ ซ้ำกัน 2 ครั้ง

14. <u>ทำการทดลองศึกษาสภาพการฟอกสีน้ำกากส่าสดแบบกึ่งต่อเนื่องโดยเชื้อราที่แยกได้ D90</u>

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 13 แต่ใช้น้ำกากส่าสดแทนสารละลายสีกากน้ำตาล และทำการตรวจหาสภาพการฟอกสีน้ำกากส่าเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 13 นอกจากนี้ยังตรวจหาสภาพการฟอกสีน้ำกากส่าอื่น ๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการฟอกสีและหลังการฟอกสี ดังนี้

14.1 วิเคราะห์หาค่า บี.โอ.ดี. โดยวิธีของ American Public Health Association (APHA AWWA and WPCR, 1971) (ภาคผนวกหน้า 136)

14.2 วิเคราะห์หาค่า ซี.โอ.ดี. โดยวิธี Dichromate reflux method ซึ่งปรับปรุงวิธีการโดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 141)

14.3 วิเคราะห์หาค่า แอมโมเนียไนโตรเจน โดยวิธีกลั่น ซึ่งปรับปรุงวิธีการโดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 142)

14.4 วิเคราะห์หาค่า ออร์แกนนิคไนโตรเจน โดยวิธี Kjeldahl method ซึ่งปรับปรุงวิธีการโดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 144)

14.5 หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ซึ่งเท่ากับผลรวมของแอมโมเนียไนโตรเจนกับออร์แกนนิคไนโตรเจน

14.6 วิเคราะห์หาค่าฟอสฟอรัส โดยวิธีอะมิโนแนฟโธซัลโฟนิค แอซิค ซึ่งปรับปรุงวิธีการโดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 147)

14.7 วิเคราะห์หาค่าไนเตรท โดยวิธีบรูซีน ซึ่งปรับปรุงวิธีการโดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524) (ภาคผนวกหน้า 145)

15. <u>การศึกษาลักษณะของ เชื้อราที่แยกได้ D90</u>

15.1 ศึกษาลักษณะการ เจริญของ เชื้อราบนอาหาร เลี้ยง เชื้อแข็งแบบต่าง ๆ ดังนี้

15.1.1 โพเตโต เดกซ์โตรส อการ์ (Potato dextrose agar) (ภาคผนวกหน้า 129)

15.1.2 ยีสต์ เอกซแทรก-มอลท์ เอกซแทรก อการ์ (Yeast extract-malt extract agar) (ภาคผนวกหน้า 130)

15.1.3 ชา เพค อการ์ (Czapek 's agar) (ภาคผนวกหน้า 130)

15.1.4 คอร์น มิล อการ์ (Corn meal agar) (ภาคผนวกหน้า 131)

15.1.5 อาหารวุ้นที่ผสมสารละลายสีกากน้ำตาล (อาหาร เลี้ยง เชื้อสูตรที่ 1) (ภาคผนวกหน้า 128)

โดยทำการ เลี้ยง เชื้อราที่แยกได้ D90 บนอาหาร เลี้ยง เชื้อแข็งแบบต่าง ๆ ดังข้างต้น บ่ม เชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศา เซนติ เกรด เป็นเวลา 7 วัน และศึกษาลักษณะของโคโลนี

15.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ เชื้อรา

ทำการทดลอง เลี้ยง เชื้อราที่แยกได้ D90 บนโพเตโต เดกซ์โตรส อการ์ บ่ม เชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศา เซนติ เกรด นาน 5 วัน และนำ เส้นใยมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ (microscope)

16. <u>การศึกษาโครงสร้างภายในเส้นใย เชื้อราที่แยกได้ D90 ด้วยกล้องจุลทัศน์อิ เลคตรอนแบบลำแสงผ่านตัวอย่าง (transmission electron microscope)</u>

ทำการทดลองศึกษาโครงสร้างภายในเส้นใย เชื้อราที่แยกได้ D90 ด้วยกล้องจุลทัศน์อิ เลคตรอนแบบลำแสงผ่านตัวอย่าง ดังขั้นตอนต่อไปนี้

i 17861706

16.1 เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว

ทดลองเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ D90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 7 (ภาคผนวกหน้า 130) ที่มีไซเตียมในเตรทเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน และ ไพเดโด เดกซโตรส บรอท (ภาคผนวกหน้า 129) โดยหยด 15 มิลลิลิตรสารแขวนลอยเส้นใย (ปริมาณเชื้อ 0.15 กรัมน้ำหนักแห้ง) (ภาคผนวกหน้า 134) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรข้างต้น 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปกรวย ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 7 วัน นำมาแยกเส้นใยเชื้อราไปศึกษาต่อด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

16.2 เตรียมตัวอย่างเส้นใยเพื่อศึกษาทางกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่านตัวอย่าง (เวคิน, 2524)

โดยนำตัวอย่างเส้นใยเชื้อราจากข้อ 16.1 มาทำการทดลองตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

16.2.1 นำเส้นใยเชื้อราดังกล่าวมาแช่ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ ที่ได้ปรับความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.3 (ภาคผนวกหน้า 131) เป็นเวลา 15 นาที และเปลี่ยนสารละลาย 2 หน

16.2.2 นำตัวอย่างเส้นใยเชื้อราแช่ในน้ำยาดองคาร์นอว์สกี้ (karnovsky 's fixative) (ภาคผนวกหน้า 131) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

16.2.3 แยกเอาเส้นใยออกจากน้ำยาดองโดยนำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ล้างเส้นใยด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ ที่ได้ปรับความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.3 (ภาคผนวกหน้า 131) เป็นเวลา 15 นาที เปลี่ยนสารละลาย 2 หน

16.2.4 เติมน้ำยา 1% ออสเมี่ยม เททราออกไซด์ (osmium tetraoxide) (ภาคผนวกหน้า 132) โดยแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เทน้ำยาออกทิ้ง

16.2.5 กำจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration) โดยนำตัวอย่างเส้นใยแช่ในสารละลายตัวอย่างตามลำดับ ดังนี้

แช่ใน 35% 70% และ 95% สารละลายแอลกอฮอล์ 1 หน แต่ละหน 15 นาที ตามลำดับ ต่อมาแช่ในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ แต่ละหน 30 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย 2 หน

16.2.6 นำตัวอย่างไปฝังในตัวกลางและทำให้แข็ง (embed and polymerize)

นำตัวอย่างที่ผ่านการ เอาน้ำออกจาก เซลแล้ว จะนำไปใส่ในตัวกลาง (media) เพื่อให้ตัวกลางนี้ เสริมให้ตัวอย่างมีความแข็งและทนต่อขบวนการต่าง ๆ ขั้นต่อไป เช่น การตัดตัวอย่าง และทนต่อความร้อนของลำแสงอิเลคตรอนในขณะศึกษาและตรวจสอบ โดยดำ เนินการทดลอง ดังนี้

16.2.6.1 แช่ในโปรไพลีนออกไซด์ (propylene oxide) แต่ละหน นาน 30 นาที โดย เปลี่ยนสารละลาย 2 หน

16.2.6.2 แช่ในของผสมระหว่างโปรไพลีนออกไซด์กับพลาสติก (Epon 7:3) (ภาคผนวกหน้า 132) อัตราส่วน 1:1 นาน 3 ชั่วโมง

16.2.6.3 แช่ในพลาสติก (Epon 7:3) (ภาคผนวกหน้า 132) ใน เบ้า (flat mold) ที่เตรียมไว้นาน 12 ชั่วโมง

16.2.6.4 นำ เบ้าตัวอย่างดังกล่าวอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศา-เซนติ เกรด นาน 3 วัน เพื่อให้พลาสติกแข็งตัว

16.2.7 ตัดชิ้นตัวอย่างให้บาง เป็นพิ เศษ (ultra-thin sectioning)

ขบวนการ เตรียมตัวอย่างให้ เป็นแผ่นบาง เป็นพิ เศษด้วย เครื่องตัดแบบบาง (ultramicrotome) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนดังนี้

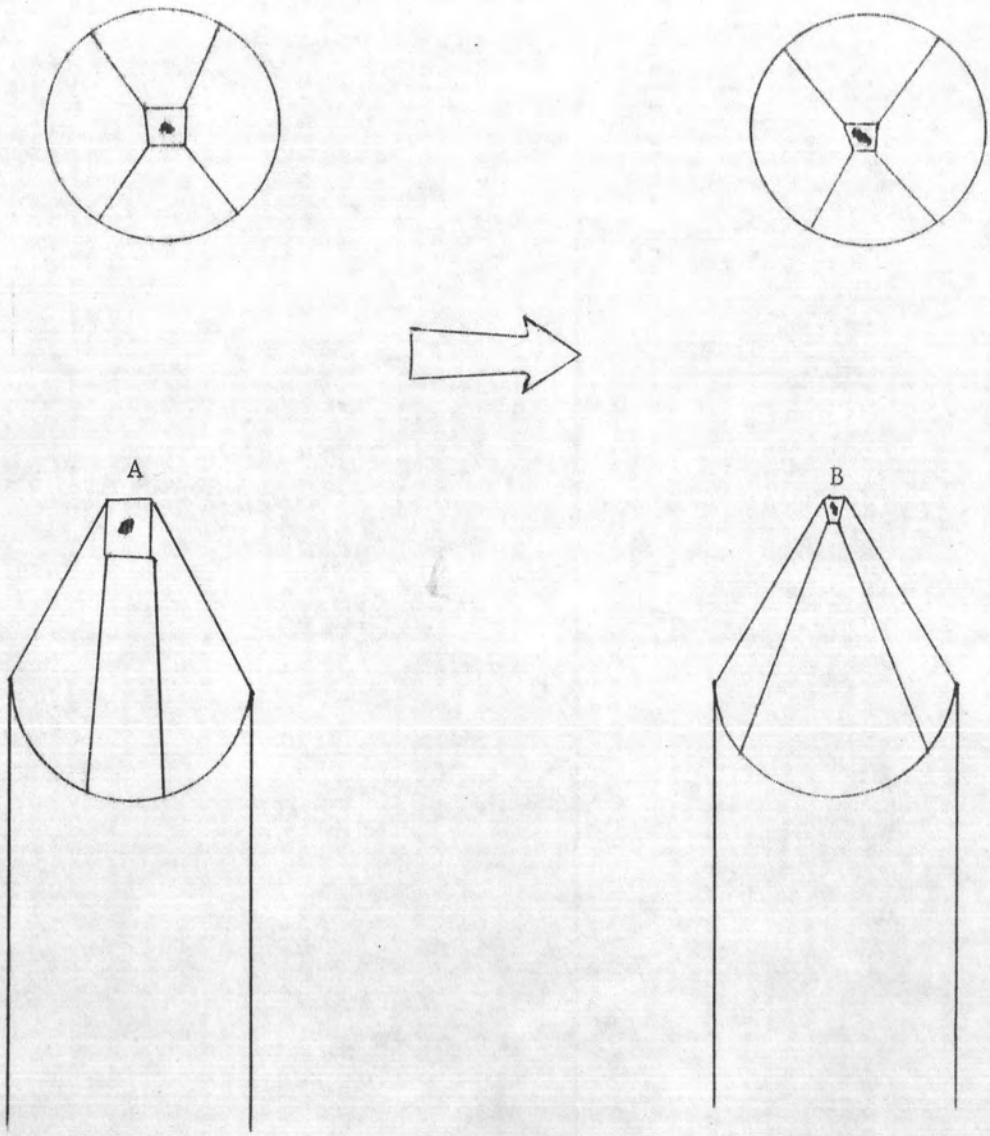
16.2.7.1 เฉือนและตกแต่ง เบ้าให้ เหมาะสมต่อการตัดตัวอย่างให้บาง โดย เริ่มจากการใช้ใบมีดโกน เฉือน เอาพลาสติกส่วนที่ไม่-ต้องการออกจนได้ เนื้อที่ของหน้า เบ้า ซึ่งมีตัวอย่างฝังอยู่ได้ขนาดที่ เหมาะสม คือ ด้านยาวที่สุดจะต้องมีขนาดไม่มากกว่า 1 มิลลิ เมตร เบ้าที่ผ่านการ เฉือนอย่างถูกต้อง หน้าตัด เรียบ เมื่อมองจากด้านบนอาจ เป็นรูปสี่ เหลี่ยมคางหมู ดังแสดงในรูปที่ 1

16.2.7.2 ตัดตัวอย่างให้บาง เป็นพิ เศษด้วย เครื่องตัดแบบบาง แบบ ultrotome, LKB. ของประ เทศสวี เดน

โดยให้ได้ชิ้นตัวอย่างมีความหนาประมาณ 60-90 นาโน เมตร โดยสัง เกตจากชิ้นตัวอย่างที่ตัดจะมีสี เทา เงินหรือสีทอง นำแผ่นตัดตัวอย่าง (grid) ช้อนและรองรับตัวอย่าง

16.2.8 การย้อมชิ้นตัวอย่าง (staining)

ขบวนการย้อมชิ้นตัวอย่างบนแผ่นตัดตัวอย่างดำ เนินตามขั้นตอนดังนี้



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงการเฉือนและตกแต่งเบ้าจาก A จนกระทั่งได้ B ซึ่งมีหน้าเบ้าเป็นสี่เหลี่ยมคางหมู

16.2.8.1 หยด 5% ยูเรนิล อะซิเตท (uranyl acetate) (ภาคผนวกหน้า 133) บนแผ่นขี้ผึ้งที่สะอาด ขนาดหยดควรมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-10 มิลลิเมตร

16.2.8.2 แผ่นตัดตัวอย่างที่มีชิ้นตัวอย่างอยู่มาลอยบนผิวของหยดยูเรนิล อะซิเตท โดยให้ด้านที่มีชิ้นตัวอย่างคว่ำลง และใช้ภาชนะทึบแสงปิดบริเวณแผ่นขี้ผึ้ง เป็นเวลานาน 20 นาที

16.2.8.3 ล้างแผ่นตัวอย่างในน้ำกลั่นที่ต้มและกรองแล้ว เป็นเวลานาน 30 นาที

16.2.8.4 ย้อมครั้งสุดท้ายด้วย เลด ซิเตรท (lead citrate) (ภาคผนวกหน้า 133) โดยจุ่มแผ่นวางตัวอย่างให้อยู่ภายในหยดของสารละลาย โดยมีเกล็ดของโซเดียมไฮดรอกไซด์ วางอยู่ใกล้ ๆ หยดของ เลด ซิเตรท เพื่อช่วยดูดคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศบริเวณนั้น ปิดบริเวณหยดสารละลายด้วยฝาครอบแก้ว (Petri dish) เป็นเวลานาน 10 นาที

16.2.8.5 ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.02 นอร์มอล เป็นเวลา 30 วินาที

16.2.8.6 ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ต้มและกรอง ประมาณ 30 วินาที

16.2.8.7 ซับแผ่นตัดตัวอย่างให้แห้งด้วยกระดาษกรอบ เพื่อนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนชนิดลำแสงผ่านตัวอย่าง

16.2.9 ทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนชนิดลำแสงผ่านตัวอย่าง นำชิ้นตัวอย่างดังกล่าวมาทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนชนิดลำแสงผ่านตัวอย่างแบบ JEM 200 Cx ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้กระแสไฟฟ้า (accelerating voltage) 80 กิโลวัตต์ คอนเดนเซอร์เลนส์ (Condenser lens) เส้นผ่าศูนย์กลาง 20 ไมโครเมตร เลนส์สำหรับวัตถุ (objective lens) เส้นผ่าศูนย์กลาง 60 ไมโครเมตร โดยปรับกำลังขยายตามต้องการ ถ่ายภาพด้วยกล้อง Jeol แบบ JEM 200 Cx ของประเทศญี่ปุ่น โดยใช้ฟิล์ม Fuji electron microscopic film G.G. orthochromatic ขนาด 5.9 x 8.2 เซนติเมตร