บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถย่อยสลายสีย้อมผ้า

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทนเค็ม จำนวน 14 ไอโซเลต ได้แก่ KL2-4 , NSW13-3 , B15-4-2, I15-2, SSK3-2 , SR5-3 , RF2-5 , RBU1-1 , J15-8 , AS1-18 , SR5-3A(W) , C15-2 , D15-4 และ RF1-11 ในหลอดทดลองที่มีอาหาร JCM No.377 (5% NaCl) 5ml โดยจะใส่เชื้อละ 1 loop เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่า (Shaker) โดยเขย่า 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 37 องศาเซลเซียส สำหรับเป็นหัวเชื้อ (Inoculumn) ซึ่งเมื่อได้หัวเชื้อแล้วนั้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm เพื่อดูปริมาณเชื้อแต่ละชนิด ทำการทดสอบการฟอกจางสี โดยใช้ปริมาตร 5ml ประกอบด้วยอาหาร JCM no. 377 ปริมาร 4.5ml และ 0.5 ml ของหัวเชื้อ และ 25 µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าสีน้ำเงิน เมื่อเชื้อทำการฟอกจางสีหมด เติม 25µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าสีน้ำเงิน เมื่อเชื้อทำการฟอกจางสีหมด เติม 50µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าสีน้ำเงิน รวมเป็น 100µl เมื่อเชื้อทำการฟอกจางสีหมด เติมสีย้อมผ้า 50µl รวมเป็น 150µl สำหรับหลอดควบคุม (Control) จะใช้หลอดที่มีอาหาร JCM (5% NaCl) เติม 150µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าสีน้ำเงิน เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีเริ่มต้น โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

คำนวณเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีได้ดังนี้

$$\text{ค่า OD เฉลี่ย} = \frac{OD\ 1 + OD\ 2 + OD\ 3}{3}$$

$$\%\ \text{การฟอกจางสี} = \frac{\text{ค่า OD เฉลี่ย} \times 100}{\text{ค่า OD สีเริ่มต้น}}$$

3.2 การเจริญเติบโตแบคทีเรียทนเค็ม [SR5-3A(W) และ C15-2]

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทนเค็ม จำนวน 2 ไอโซเลท SR5-3A(W) และ C15-2 ในหลอดทดลองที่มีอาหาร JCM (5% NaCl) 5 ml เชื้อละ 8 หลอด โดยจะใส่เชื้อ 1 ลูป เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 37 องศาเซลเซียส สำหรับเป็นหัวเชื้อที่ทำทั้งหมด 8 หลอด เนื่องจากจะดูการเจริญเติบโตของเชื้อที่ 0 ,1 , 2 , 3 ,4 , 5 , 6 และ 7 ชั่วโมง เมื่อได้หัวเชื้อแล้วนั้นจะนำแต่ละหลอดใส่ลงในอาหาร JCM (5% NaCl) ที่อยู่ในขวดภาพชมพู่ 100 ml แล้วนำทั้ง 7 ขวดไปเขย่าต่อที่ 200 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ขวดที่ 8 ทำการวัดการดูดกลืนแสงทันทีที่ 660 nm เพื่อดูการเจริญเติบโตของเชื้อที่ 0 ชั่วโมง และวัดการดูดกลืนแสงทุกๆ ชั่วโมง

3.3 ทดสอบการฟอกจางสีระหว่างเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Cultured broth) กับเซลล์แขวนลอย (Cell suspension)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 เชื้อที่อยู่ในขวดภาพชมพู่ปริมาตร 100 ml จำนวน 8 ขวด เขย่าต่อที่ 200 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะเรียกว่า “ เชื้อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ” โดยทุกๆ ชั่วโมง จะนำเชื้อที่เขย่าในขวดภาพชมพู่ออกมาจากเครื่องเขย่า จำนวน 1 ขวด ปิเปตเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารมา จำนวน 5 ml เติม 40µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าน้ำเงิน ทำการเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การเตรียมเซลล์แขวนลอย โดยหมุนเหวี่ยงเชื้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงที่นำออกมาจากเครื่องเขย่าที่เหลือทั้งหมด ที่ 10,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้วให้รวมตะกอนเซลล์ เข้าด้วยกัน แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย 100 ml ของ 1M NaCl สารละลายที่ได้จะเรียกว่า “เซลล์แขวนลอย” ทำการปิเปตเซลล์แขวนลอย มา 5 ml เติม 40µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าสีน้ำเงิน ทำการเขย่าให้เข้ากันนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการจับเวลาการฟอกจางสี และชั่วโมงต่อๆไป ทำเช่นกัน

3.4 ผลของสารละลายที่ละลายเซลล์ให้เป็นของเหลวต่างๆต่อการฟอกจากสี

เตรียมหัวเชื้อโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่มีอาหาร JCM (5% NaCl) 5ml เขย่า 200 rpm นาน 24 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส นำหัวเชื้อไปใส่ในขวดภาพชมพู่ที่มีอาหาร JCM (5% NaCl) 100 ml นำไปเขย่า 200 rpm ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ทดสอบการฟอกจากสีของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยง โดยปิเปตเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงมา 5 ml เติม 40µl ของ 0.1% สีผ้อมผ้าสีน้ำเงิน ทำการเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกระยะเวลาการฟอกจางสี จนกระทั่งไม่มีสี นำเชื้อที่เหลือในขวดภาพชมพู่ทั้งหมด ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้วให้รวมตะกอนเซลล์ เข้าด้วยกัน แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย 100 ml ของ 1M NaCl ทดสอบการฟอกจางสีของเซลล์แขวนลอย โดยปิเปตเซลล์แขวนลอยมา 5 ml เติม 40µl ของ 0.1 % สีย้อมผ้าน้ำเงิน 40µl ทำการเขย่าให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกระยะเวลาการฟอกจางสี จนกระทั่งไม่มีสี นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ มาทดสอบในสารละลายที่ละลายเซลล์ให้เป็นของเหลวต่างๆ ในปริมาตรดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารต่างๆที่ใช้ในการทดสอบการฟอกจางสี

สารละลายที่ใช้ละลายเซลล์	ปริมาณสารละลายที่ใช้ละลายเซลล์ (ml)	ปริมาณเซลล์แขวนลอย (ml)	ปริมาณสีน้ำเงิน (µl)
JCM no. 377 (5% NaCl)	4.5	0.5	40
0.1M Potassium phosphate buffer pH 6.5	4.5	0.5	40
0.1M Acetate buffer pH 4.9	4.5	0.5	40
0.1M Tris – HCl buffer pH 8	4.5	0.5	40
1M NaCl	4.5	0.5	40

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกระยะเวลาการฟอกจางสีจนดหมด

จากการทดลองในแต่ละตัวอย่างแล้วนั้น พบว่า เมื่อเซลล์แขวนลอย อยู่ในอาหาร JCM no. 377 (5% NaCl) สามารถทำการฟอกจางสีได้ดีที่สุด จึงทำการศึกษาต่อด้วยการเจือจางอาหาร JCM no. 377 (5% NaCl) ด้วย 1M NaCl ตามความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 1/2,1/4 และ 1/16 ซึ่งทุกความเข้มข้นจะทำอย่างละ 3 ซ้ำ วิธีการทดลองเหมือนดังข้างต้น

3.5 การเตรียมตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพโดยใช้อัลจิเนตและเจลาติน

3.5 การทดสอบการดูดกลืนสีย้อมของวัสดุสำหรับตรึงเซลล์

ตัวกลางที่จะใช้ในการตรึงเซลล์ มีดังต่อไปนี้ เจลาติน วุ้น อัลจิเนต และ พีวีเอ : อัลจิเนต ซึ่งแต่ละตัวกลางที่จะนำมาตรึงเซลล์นั้นจะใช้ความเข้มข้น ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3.2 วิธีการเตรียมตัวกลางแต่ละตัวกลาง

10 % เจลาติน (20 ml)	ทำให้ละลายด้วยการให้ความร้อน แล้วเทลงในเพลทพลาสติก ปล่อยให้เย็นตัดเป็นภาพสี่เหลียมจัตุรัส
2% วุ้น (20 ml)	ทำให้ละลายด้วยการให้ความร้อน แล้วเทลงในเพลทพลาสติก ปล่อยให้เย็นตัดเป็นภาพสี่เหลียมจัตุรัส
2% อัลจิเนต (20 ml)	คนให้ละลายกับน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้เข็มฉีดยาดูดอัลจิเนตแล้วหยดลงใน 100 ml ของ 2.94% $CaCl_2$ กวนไปเรื่อยๆ แล้วนำทั้งหมดไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่น
7% พีวีเอ + 0.5% อัลจิเนต (20 ml)	นำพีวีเอ ใส่ในน้ำกลั่น แล้วนำเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อทำให้ละลาย เมื่อละลายแล้วใส่อัลจิเนต กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใช้เข็มฉีดยาดูดแล้วหยดลงใน 100 ml ของ 2.94% $CaCl_2$ กวนไปเรื่อยๆ แล้วนำทั้งหมดไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่น

ทดสอบการดูดกลืนสีของวัสดุสำหรับตรึงเซลล์ โดยนำเม็ดบีดใส่ในบีกเกอร์ ซึ่งมี 40 ml ของน้ำกลั่น และ 200 µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าสีน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีเริ่มต้นที่ 580 nm และวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆชั่วโมง จนครบ 4 ชั่วโมง เพื่อดูการดูดกลืนสีของแต่ละตัวกลางที่จะใช้ตรึงเซลล์

3.5.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์

จากการทดลองขั้นต้นในการทดสอบหาตัวกลางในการตรึงเซลล์ พบว่าเจลลาตินดูดกลืนสีได้น้อยที่สุด แต่ไม่สามารถคงภาพให้เป็นเม็ดกลมได้ ดังนั้นจึงใช้อัลจิเนตช่วยในการคงภาพของเจลลาตินให้เป็นเม็ดกลม โดยใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนต ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3.3 วิธีการเตรียมอัลจิเนตแต่ละความเข้มข้น

1% อัลจิเนต (20 ml)	คนให้ละลายกับน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้เข็มฉีดยาดูด อัลจิเนต แล้วหยดลงใน 100 ml ของ 2.94% $CaCl_2$ กวนไปเรื่อยๆ แล้วนำทั้งหมดไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่น
1.5% อัลจิเนต (20 ml)	
1.75% อัลจิเนต (20 ml)	
2% อัลจิเนต (20 ml)	

การสอบการดูดกลื่นสีย้อมผ้าสีน้ำเงิน โดยนำเม็ดบีดใส่ในบิกเกอร์ที่ประกอบไปด้วย 40 ml ของน้ำกลั่น และ 200 µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีเริ่มต้นที่ 580 nm และวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆชั่วโมง จนครบ 4 ชั่วโมง เพื่อดูการดูดกลืนสีของแต่ละความเข้มข้น

จากการทดสอบ พบว่าความเข้มข้นของ 1% อัลจิเนต มีการดูดกลืนสีได้น้อยสุด ดังนั้นจึงทำการทดสอบหาปริมาณเจลลาตินที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ โดยใช้เจลลาตินความเข้มข้นต่างๆ ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3.4 วิธีการเตรียมเจลลาตินแต่ละความเข้มข้น

2.5% เจลาติน + 1% อัลจิเนต (20 ml)	ละลายเจลลาติน ด้วยการให้ความร้อน ใส่อัลจิเนต กวนให้เข้ากัน ใช้เข็มฉีดยาดูด แล้วหยดลงใน 100 ml ของ2.94% $CaCl_2$ กวนไปเรื่อยๆ แล้วนำทั้งหมดไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่น
5% เจลาติน + 1% อัลจิเนต (20 ml)	
7.5% เจลาติน + 1% อัลจิเนต (20 ml)	
10% เจลาติน + 1% อัลจิเนต (20 ml)	

การสอบการดูดกลื่นสีย้อมผ้าสีน้ำเงิน โดยนำเม็ดบีดใส่ในบิกเกอร์ที่ประกอบไปด้วย 40 ml ของน้ำกลั่น และ 200 µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีเริ่มต้นที่ 580 nm และวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆชั่วโมง จนครบ 4 ชั่วโมง เพื่อดูการดูดกลืนสีของแต่ละความเข้มข้น

3.5.3 การตรึงเซลล์

เพาะเลี้ยงหัวเชื้อในอาหาร JCM no. 377 (5% NaCl) ปริมาณ 5 ml เขย่า 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 37 องศาเซลเซียส นำหัวเชื้อไปใส่ในขวดภาพชมพู่ที่มีอาหาร JCM (5% NaCl) ปริมาณ 100 ml เขย่า 200 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาแล้ว ทดสอบการฟอกจากสีของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยง โดยปิเปตเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงมา 5 ml เติม 40µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าสีน้ำเงิน ทำการเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกระยะเวลาการฟอกจางสี จนกระทั่งไม่มีสี นำเชื้อที่เหลือในขวดภาพชมพู่ทั้งหมด ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้วให้รวมตะกอนเซลล์เข้าด้วยกัน แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10 ml ของ 1/16 JCM (5% NaCl) ทดสอบการฟอกจางสีของเซลล์แขวนลอย โดยปิเปตเซลล์แขวนลอยมา 0.5 ml เติม 4.5 ml ของ 1/16 JCM (5% NaCl) เติม 40µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าสีน้ำเงิน ทำการเขย่าให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกระยะเวลาการฟอกจางสี จนกระทั่งไม่มีสี

ตรึงเซลล์โดยใช้ 1.25 กรัม ของเจลาติน (2.5%) ละลายด้วย 45 ml ของน้ำกลั่น นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้เจลาตินละลาย เติม 0.5 กรัม ของอัลจิเนต (1%) กวนให้เข้ากัน เมื่อสารละลายอยู่ที่อุณหภูมิ เติมเซลล์แขวนลอย 5 ml ผสมให้เข้ากัน หยดลงใน 100 ml ของ 2.94% $CaCl_2$ ด้วยเข้มฉีดยาขนาด 25 ml ระหว่างหยด ควรกวนเบาๆ นำไปแช่ตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว ล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง นับจำนวนเม็ดบีดทั้งหมด และนำเม็ดบีดไปใส่ใน 100 ml ของ 1/16 JCM (5% NaCl) เพื่อทำการเก็บรักษาเม็ดบีดไว้ บีดควบคุม (Control) จะใช้เม็ดบีดที่ไม่มีเซลล์แขวนลอย

3.5.3.1 การหาจำนวนเซลล์ตรึงภาพที่เหมาะสมต่อการฟอกจางสี

ใช้เซลล์ตรึงภาพ 0 , 100 , 200 , 300 , 400 และ 500 เม็ด ใส่ในบีกเกอร์ที่มี 40 ml ของ 1/16 JCM (5% NaCl) และ 200 µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีเริ่มต้นก่อนเติมเซลล์ตรึงภาพ บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 ชั่วโมง จนกระทั่งฟอกสีสมบูรณ

3.5.3.2 การฟอกจางสีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆ (pH)

โดยใช้ 40 ml ของ1/16 JCM (5% NaCl) ที่ pH 4.0-10.0 และ 200 µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าสีน้ำเงิน และ 500 เม็ด ของเซลล์ตรึงภาพ วัดค่าการดูดกลืนแสง (580 nm) ของสีเริ่มต้นก่อนเติมเซลล์ตรึงภาพของแต่ละ pH นำทุกบีกเกอร์บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 ชั่วโมง การทดลองควบคุม (Control) จะใช้เม็ดบีดที่ไม่มีเซลล์แขวนลอยเป็นตัวควบคุม

การศึกษาการฟอกจากสีของเซลล์อิสระ ใช้ 40 ml ของ1/16 JCM (5% NaCl) ที่ pH 4.0-10.0 และ 200 µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าน้ำเงิน และ 2.5 ml ของเซลล์แขวนลอย วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีเริ่มต้นของแต่ละpH นำทุกหลอดทดลองบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 ชั่วโมง การทดลองควบคุม (Control) จะใช้ 5 ml ของ1/16 JCM (5% NaCl) ที่ pH 4.0-10.0 และ 40 µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าน้ำเงิน

3.5.3.3 ทดสอบการฟอกจางสีที่อุณหภูมิต่างๆ (Temperature)

โดยใช้ 40 ml ของ1/16 JCM (5% NaCl) ที่ pH 7.2 และ 200 µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าสีน้ำเงิน และ 500 เม็ด ของเซลล์ตรึงภาพ วัดค่าการดูดกลืนแสง (580 nm) ของสีเริ่มต้นก่อนเติมเซลล์ตรึงภาพของแต่ละ pH นำทุกบีกเกอร์บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 ชั่วโมง การทดลองควบคุม (Control) จะใช้เม็ดบีดที่ไม่มีเซลล์แขวนลอยเป็นตัวควบคุม

การศึกษาการฟอกจากสีของเซลล์อิสระ ใช้ 40 ml ของ1/16 JCM (5% NaCl) ที่ pH 7.2 และ 200 µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าน้ำเงิน และ 2.5 ml ของเซลล์แขวนลอย วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีเริ่มต้นของแต่ละpH นำทุกหลอดทดลองบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 ชั่วโมง การทดลองควบคุม (Control) จะใช้ 5 ml ของ1/16 JCM (5% NaCl) ที่ pH 4.0-10.0 และ 40 µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าน้ำเงิน

3.5.4 การทดสอบประสิทธิภาพการฟอกจางสีโดยนำเซลล์ตรึงภาพกลับมาใช้ซ้ำ

โดยใช้ 40 ml ของ1/16 JCM (5% NaCl) ที่ pH 7.2 และ 200 µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าสีน้ำเงิน และ 500 เม็ด ของเซลล์ตรึงภาพ วัดค่าการดูดกลืนแสง (580 nm) ของสีเริ่มต้นก่อนเติมเซลล์ตรึงภาพของแต่ละ pH นำทุกบีกเกอร์บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 ชั่วโมง เมื่อการฟอกจางสีสมบูรณ์ ล้างเม็ดบีดของเซลล์ตรึงภาพด้วยน้ำกลั่น นำเม็ดบีดของเซลล์ตรึงภาพ ใส่ใน 40 ml ของ1/16 JCM (5% NaCl) ที่ pH 7.2 และ 200 µl ของ 0.1% สีย้อมผ้าสีน้ำเงิน เมื่อการฟอกจางสีสมบูรณ์ ทำการทดลองซ้ำข้างต้น จนกระทั่งไม่เกิดการฟอกจางสี บันทึกจำนวนรอบการฟอกจางสี และระยะเวลาในการฟองจางสีสมบูรณ์ในแต่ละรอบการฟอกจางสี

3.6 การเตรียมตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพโดยใช้อัลจิเนต เจลาติน และไคโตซาน

3.6.1 การหาความเข้มข้นสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสมที่สุด ในการฟอกจางสี

อาหารสูตร JCM ที่มีสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 5, 8 และ 10 กรัมต่อลิตร ทำให้อาหารปราศจากเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ความดัน 15 ปอร์นต่อตารางนิ้ว เขี้ยเชื้อ 1 ลูป ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร 5 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อใส่ในอาหาร สูตรที่มีสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ปิเปตหัวเชื้อใส่ในอาหารสูตรข้างต้น 20 มิลลิลิตรเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างไป 5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ปรับปริมาณเชื้อให้คงที่ นำไปทดสอบการฟอกจางสีย้อมอะโซโดยมีสีที่ใช้ทดสอบคือ สีน้ำเงิน (Cationic blue 41) อัตราส่วนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture borth) ต่อ สีย้อมอะโซ เท่ากับ 5 มิลลิลิตร ต่อ 5 ไมโครลิตร บันทึกเวลาการฟอกจางสีเสร็จสมบูรณ์

เพื่อใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ SR5-3AW และ C15-2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบการฟอกจางสีน้ำเงิน (Cationic blue 41) โดยนำเชื้อทั้งสองสายพันธุ์คือ SR5-3AW และ C15-2 มาสายพันธุ์ละ 5 ไมโครลิตร และสีน้ำเงิน (Cationic blue 41) เติมครั้งละ 5 ไมโครลิตร จับเวลาการฟอกจางสี เมื่อฟอกจางสีหมดให้เติมสีเพิ่มที่ปริมาณเดิม ทำซ้ำให้ได้ปริมาณสี 30 ไมโครลิตร

3.6.2 การฟอกจางสีย้อมอะโซโดยเชื้อสายพันธุ์ SR5-3AW และ C15-2

เตรียมอาหารสูตร JCM ที่มีสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เขี้ยเชื้อ 1 ลูป ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร 5 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อใส่ในอาหาร สูตรที่มีสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ปิเปตหัวเชื้อใส่ในอาหารสูตรข้างต้น 20 มิลลิลิตรเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างไป 5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ปรับปริมาณเชื้อให้คงที่ นำไปทดสอบการฟอกจางสีย้อมอะโซโดยมีสีที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 7 สี คือ สีน้ำเงิน (Cationic blue 41), สีน้ำเงิน (Blue 201),สีดำ (Black 46) , สีแดง (Red 13), สีแดง (Red 46) ,สีเหลือง (Yellow 13), สีเหลือง (Yellow 86) อัตราส่วนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture broth) ต่อ สีย้อมอะโซ เท่ากับ 5 มิลลิลิตร ต่อ 5 ไมโครลิตร บันทึกเวลาการฟอกจางสีเสร็จสมบูรณ์

3.6.3 หาอัตราส่วนของวัสดุตรึงรูปที่เหมาะสมที่สุดในการฟอกจางสี

วัสดุตรึงรูปที่จะใช้ในการตรึงเซลล์มีดังต่อไปนี้ โซเดียม อัลจิเนต ไคโตซาน เจลาติน พีวีเอ ผงถ่านและเบนโทไนซ์ แบ่งเป็นสูตร ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3.5 แสดงสูตรปริมาณวัสดุตรึงรูป

ชื่อสูตร	โซเดียม อัลจิเนต	ไคโตซาน	เจลาติน	สารละลายเซลล์	พีวีเอ	ผงถ่าน	เบนโทไนซ์
T1	1	-	-	10	-	-	-
T2	1	-	-	10	0.5	-	0.5
T3	1	0.5	2.5	10	-	-	-
T4	1	1	-	10	-	-	-
T5	1.5	0.5	-	10	-	-	-
T6	1	1	1	10	-	-	-
T7	1	-	-	10	-	-	1.25
T8	1	-	-	10	-	1	1.25
T9	1	-	-	10	-	2	1.25

3.6.3.1 การเตรียมสารละลายเซลล์

เตรียมอาหารสูตร JCM ที่มีสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เขี้ยเชื้อ SR5-3aw จำนวน เ1 ลูป ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร 5 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อใส่ในอาหาร สูตรที่มีสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ปิเปตหัวเชื้อใส่ในอาหารสูตรข้างต้น 20 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปหมุนเวี่ยงที่ความร็วรอบ 7600 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปหมุนเวี่ยงอีกรอบที่ความเร็วรอบ 7600 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 100 มิลลิลิตร ของโซเดียม คลอไรด์ 1 โมลาร์ เรียกว่า สารละลายเซลล์

3.6.3.2 การเตรียมวัสดุตรึงรูป

สูตร T1 ชั่งโซเดียม อัลจิเนต ให้ได้น้ำหนักตามตารางที่ 1.1 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียว เมื่ออุณหภูมิลดลงจนใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง เติม 10 มิลลิลิตรของสารละลายเซลล์ลงไป ผสมให้เข้ากัน ใช้เข็มฉีดยาหยดสารละลายผสมลงไปใน 3% แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร นำไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บเม็ดบีดในอาหาร JCM ที่เจือจาง 16 เท่า

สูตร T2 ชั่งโซเดียม อัลจิเนต, พีวีเอ ,เบนโทไนซ์ ให้ได้น้ำหนักตามตารางที่ 1.1 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียว เมื่ออุณหภูมิลดลงจนใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง เติม 10 มิลลิลิตรของสารละลายเซลล์ลงไป ผสมให้เข้ากัน ใช้เข็มฉีดยาหยดสารละลายผสมลงไปใน 3% แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร นำไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บเม็ดบีดในอาหาร JCM ที่เจือจาง 16 เท่า

สูตร T3 ชั่งโซเดียม อัลจิเนต, ไคโตซาน,เจลาติน ให้ได้น้ำหนักตามตารางที่ 1.1 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียว เมื่ออุณหภูมิลดลงจนใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง เติม 10 มิลลิลิตรของสารละลายเซลล์ลงไป ผสมให้เข้ากัน ใช้เข็มฉีดยาหยดสารละลายผสมลงไปใน 3% แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร นำไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บเม็ดบีดในอาหาร JCM ที่เจือจาง 16 เท่า

สูตร T4 ชั่งโซเดียม อัลจิเนต, ไคโตซาน ให้ได้น้ำหนักตามตารางที่ 1.1 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียว เมื่ออุณหภูมิลดลงจนใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง เติม 10 มิลลิลิตรของสารละลายเซลล์ลงไป ผสมให้เข้ากัน ใช้เข็มฉีดยาหยดสารละลายผสมลงไปใน 3% แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร นำไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บเม็ดบีดในอาหาร JCM ที่เจือจาง 16 เท่า

สูตร T5 ชั่งโซเดียม อัลจิเนต, ไคโตซาน ให้ได้น้ำหนักตามตารางที่ 1.1 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียว เมื่ออุณหภูมิลดลงจนใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง เติม 10 มิลลิลิตรของสารละลายเซลล์ลงไป ผสมให้เข้ากัน ใช้เข็มฉีดยาหยดสารละลายผสมลงไปใน 3% แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร นำไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บเม็ดบีดในอาหาร JCM ที่เจือจาง 16 เท่า

สูตร T6 ชั่งโซเดียม อัลจิเนต, ไคโตซาน,เจลาติน ให้ได้น้ำหนักตามตารางที่ 1.1 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียว เมื่ออุณหภูมิลดลงจนใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง เติม 10 มิลลิลิตรของสารละลายเซลล์ลงไป ผสมให้เข้ากัน ใช้เข็มฉีดยาหยดสารละลายผสมลงไปใน 3% แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร นำไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บเม็ดบีดในอาหาร JCM ที่เจือจาง 16 เท่า

สูตร T7 ชั่งโซเดียม อัลจิเนต,เบนโทไนซ์ ให้ได้น้ำหนักตามตารางที่ 1.1 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียว เมื่ออุณหภูมิลดลงจนใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง เติม 10 มิลลิลิตรของสารละลายเซลล์ลงไป ผสมให้เข้ากัน ใช้เข็มฉีดยาหยดสารละลายผสมลงไปใน 3% แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร นำไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่นที่ ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บเม็ดบีดในอาหาร JCM ที่เจือจาง 16 เท่า

สูตร T8 ชั่งโซเดียม อัลจิเนต, ผงถ่าน ,เบนโทไนซ์ ให้ได้น้ำหนักตามตารางที่ 1.1 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียว เมื่ออุณหภูมิลดลงจนใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง เติม 10 มิลลิลิตรของสารละลายเซลล์ลงไป ผสมให้เข้ากัน ใช้เข็มฉีดยาหยดสารละลายผสมลงไปใน 3% แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร นำไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บเม็ดบีดในอาหาร JCM ที่เจือจาง 16 เท่า

สูตร T9 ชั่งโซเดียม อัลจิเนต, ผงถ่าน ,เบนโทไนซ์ ให้ได้น้ำหนักตามตารางที่ 1.1 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียว เมื่ออุณหภูมิลดลงจนใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง เติม 10 มิลลิลิตรของสารละลายเซลล์ลงไป ผสมให้เข้ากัน ใช้เข็มฉีดยาหยดสารละลายผสมลงไปใน 3% แคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร นำไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเม็ดบีดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บเม็ดบีดในอาหาร JCM ที่เจือจาง 16 เท่า นำบีดแต่ละสูตรมาอย่างละ 25 เม็ด เติมในอาหารเจือจาง 16 เท่าที่มีสีน้ำเงิน (cationic blue 41)หรือ สีแดง (red 46) 5 ไมโครลิตร เครื่องหมุนปั่น (Rotating shaker) นาน 4 ชั่วโมง ย้ายไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเม็ดบีดมีการฟอกจางสี ทำการสกัดสีที่เหลือให้เม็ดบีด โดยเติมเอทานอลในเม็ดบีด บ่มในอ่างน้ำเดือดนาน 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (spin down) แยกตะกอนออกจากส่วนใส นำน้ำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร สำหรับสีน้ำเงิน (Cationic blue 41)

3.6.4 กลไกการฟอกจางสีย้อมอะโซ

เตรียมอาหารสูตร JCM ที่มีสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เขี้ยเชื้อ SR5-3aw จำนวน 1 ลูป ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร 5 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อใส่ในอาหาร สูตรที่มีสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ปิเปตหัวเชื้อใส่ในอาหารสูตรข้างต้น 20 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7600 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปหมุนเหวี่ยงอีกรอบที่ความเร็วรอบ 7600 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 100 มิลลิลิตร ของโซเดียม คลอไรด์ 1 โมลาร์ เรียกว่า สารละลายเซลล์

ชั่ง 1 กรัม ไคโซตาน, 1 กรัม โซเดียวอัลจิเนต และ 1 กรัม เจลาติน เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในอ่างน้ำเดือด ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเหลือ 30-40 องศาเซลเซียส เติมสารสะลายเซลล์ (10 %) แล้วปรับปริมาณให้ได้ 100 มิลลิลิตร ใช้หลอดหยดดูดวัสดุตรึงผสม หยดลงใน 3 % แคลเซียมคลอไรด์ แช่ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างบีดด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อ เก็บบีดที่อาหารเจือจาง 16 เท่า นับบีด 25 บีด เติมใน อาหาร JCM เจือจาง 16 เท่าที่มี สีน้ำเงิน (cationic blue 41)หรือ สีแดง (red 46) 5 ไมโครลิตร หมุนที่เครื่องเขย่าแบบวงกลม (Rotating shaker) นาน 4 ชั่วโมง ย้ายไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างส่วนน้ำและบีดทุก 1 ชั่วโมง สกัดสีที่เหลือให้เม็ดบีด โดยเติมเอทานอลในเม็ดบีด บ่มในอ่างน้ำเดือดนาน 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spin down centrifuge) นำตะกอนออกทั้งส่วนใสและส่วนน้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสงของ สีน้ำเงิน (cationic blue 41)600 นาโนเมตร และ สีแดง (red 46) 560 นาโนเมตร

3.4.5 เปรียบเทียบการฟอกจางสีของบีดตรึงเซลล์ และสารละลายเซลล์

เตรียมอาหารสูตร JCM ที่มีสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เขี้ยเชื้อ SR5-3aw จำนวน 1 ลูป ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร 5 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อใส่ในอาหาร สูตรที่มีสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ปิเปตหัวเชื้อใส่ในอาหารสูตรข้างต้น 20 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7600 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปหมุนเหวี่ยงอีกรอบที่ความเร็วรอบ 7600 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 100 มิลลิลิตร ของโซเดียม คลอไรด์ 1 โมลาร์ เรียกว่า สารละลายเซลล์

ชั่ง 1 กรัม ไคโซตาน, 1 กรัม โซเดียวอัลจิเนต และ 1 กรัม เจลาติน เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 900 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในอ่างน้ำเดือด ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเหลือ 30-40 องศาเซลเซียส เติมสารสะลายเซลล์ (10 %) แล้วปรับปริมาณให้ได้ 100 มิลลิลิตร ใช้หลอดหยดดูดวัสดุตรึงผสม หยดลงใน 3 % แคลเซียมคลอไรด์ แช่ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างบีดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เก็บบีดที่อาหารเจือจาง 16 เท่า นับบีด 25 บีด เติมใน อาหาร JCM เจือจาง 16 เท่า

สารละลายเซลล์ 1 มิลลิตร เติม สีน้ำเงิน (Cationic blue 41) หรือสีแดง (Red 46) 1 ไมโครลิตร บีดที่มีเซลล์ 1 มิลลิลิตร เติมลงในอาหาร JCM เจือจาง 16 เท่าที่มีสีน้ำเงิน (cationic blue 41) หรือสีแดง (red 46) 1 ไมโครลิตร หมุนด้วยเครื่องหมุนปั่น (Rotating shaker) แล้วนำไปบ่มที่ อ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อการฟอกจางสีเสร็จสมบูรณ์จึงเติมสีอะโซ 1 ไมโครลิตร ทำซ้ำจนไม่สามาถฟอกจางสีได้อีก บันทึกเวลาการฟอกจางสี

3.6.6 การนำบีดตรึงเซล์กลับมาใช้ซ้ำ

เติมบีดที่มีเซลล์ 25 เม็ด ใน 5 มิลลิลิตร ของอาหาร JCM เจือจาง 16 เท่า ที่มี 5 ไมโครลิตร เติมสีน้ำเงิน (Cationic blue 41) หรือสีแดง (Red 46) บ่มที่เครื่องเขย่าแบบวงกลม (Rotating shaker)แล้วนำไปบ่มที่ อ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อการฟอกจางสีเสร็จสมบูรณ์ นำบีดมาล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วทำซ้ำเหมือนเดิม บันทึกเวลาการทดลอง

3.7 การเตรียมตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี

เตรียมสารละลายเหล็กไนเตรต ($FeNO_3)_3$ เข้มข้น 1 M ปริมาตร 500 mL เติมลงในเม็ดคอมโพสิทซีโอไลต์หนัก 8 กรัม แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80°C นาน 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100°C นาน 24 ชั่วโมง จะได้ตัวเร่งปฏิกิริยาออกมาโดยให้ชื่อว่า Fe/P

3.9.1 การเตรียมสารละลายสีย้อมเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

ทำการเตรียมสารละลายชั่งสีย้อม cationic blue dye 41 เข้มข้น 1000 ppm โดยชั่งย้อม cationic blue dye 41 หนัก 0.1 g ละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดปริมาตรขนาด 100 mL เจือจางความเข้มข้นลงเรื่อย ๆ จาก 1000 ppm เป็น 20 ppm 10 ppm 5 ppm และ 0.5 ppm นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 606 nm ด้วยเครื่อง UV-vis Spectrometer จากนั้นนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

3.9.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสีย้อม cationic blue dye 41

เตรียมสารละลายสีย้อมเข้มข้นเริ่มต้น 20 ppm จากนั้น เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาตร 0.2 1 และ 5 mL ตามลำดับปรับ pH = 4 แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร 25 mL จากนั้นชั่งตัวเร่ง Fe/P ประมาณ 0.1 g เติมลงในหลอดทดลองที่มีสี ทำปฏิกิริยาการย่อยที่อุณหภูมิ 50 °C จับเวลาและเก็บสารละลายสีย้อมตัวอย่างที่ 10 นาที 20 นาที 30 นาที 1.00 ชม 2.00 ชม 3.00 ชม และจนกว่าสีย้อมจะคงที่นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 606 nm โดยใช้เครื่อง UV-vis Spectrometer ทำซ้ำ 2 ครั้ง