

## บทที่ 1

### การศึกษาแบคทีเรียโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

การศึกษาแบคทีเรียซึ่งมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่านั้น ต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์ (microscopy) ช่วยให้เห็นรายละเอียดต่าง ๆ ดังนั้นจึงจำเป็นเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเรียนรู้เกี่ยวกับกล้องจุลทรรศน์และวิธีการใช้ที่ถูกต้อง และสิ่งที่สำคัญที่สุดของกล้องจุลทรรศน์ไม่ได้อยู่ที่ความสามารถในขยายเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการจะดูเพียงอย่างเดียว เพราะอาจเป็นไปได้ที่จะขยายเซลล์แบคทีเรียจนมีขนาดใหญ่แต่เห็นไม่ชัดเจน ดังนั้นกล้องจุลทรรศน์ที่ดีต้องประกอบด้วยเลนส์ (lens) ที่มีความสามารถในการแยกรายละเอียดของวัตถุ เรียกว่า resolving power คือ ระยะทางที่สั้นที่สุดระหว่างจุด 2 จุดหรือเส้น 2 เส้นซึ่งสามารถมองเห็นเป็นจุด 2 จุดหรือเส้น 2 เส้นได้ ความสามารถในการแยกรายละเอียดของเลนส์จะถูกจำกัดด้วยขนาดของคลื่นแสงที่ใช้ โดยค่า resolving power จะมีขนาดประมาณครึ่งหนึ่งของคลื่นแสงที่ใช้ภายใต้สภาวะที่ดีที่สุด แต่คลื่นแสงที่ใช้กับกล้องจุลทรรศน์มักจะมีค่าคงที่ ดังนั้นตัวแปรอีกอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญ คือ numerical aperture (NA) หรือความสามารถในการรวมแสงของเลนส์วัตถุ (objective lens) กล่าวคือ ถ้าความสามารถในการรวมแสงของเลนส์วัตถุสูงขึ้นจะทำให้ความสามารถในการแยกจุด 2 จุดหรือเส้น 2 เส้นที่อยู่ใกล้กันมีมากยิ่งขึ้นด้วย ซึ่งถ้าช่องว่างระหว่างวัตถุที่ดูและเลนส์วัตถุเป็นอากาศจะมีค่า NA เท่ากับ 1.0 แต่ถ้าหยดน้ำมันลงบนตัวอย่างและดูด้วยเลนส์น้ำมัน (oil immersion lens) จะมีค่า NA เท่ากับ 1.2-1.4

### ชนิดของกล้องจุลทรรศน์

ปัจจุบันมีกล้องจุลทรรศน์ที่ประดิษฐ์ขึ้นเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการและใช้ในการศึกษาทางด้านแบคทีเรียวิทยา (Bacteriology) หลายชนิด ได้แก่

1. **Light microscope หรือ Bright field microscope** เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้กันแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทั่วไป ประกอบด้วยเลนส์ธรรมดา (optical lens) ซึ่งต้องใช้แสงส่องตัวอย่างที่ต้องการจะศึกษา ดังนั้นจะเห็นพื้นภาพ (background) เป็นพื้นขาวสว่างในขณะที่เซลล์แบคทีเรียมักจะมีสีเข้มกว่าหรือมีสีตามสีย้อม

2. **Dark field microscope** ประกอบด้วยคอนเดนเซอร์ (condenser) ชนิดพิเศษ ซึ่งจะช่วยให้ตัวอย่างที่ดูได้รับแสงเป็นมุมเฉียง ทำให้ไม่มีแสงใดมากกระทบตาผู้ดูกล้องจุลทรรศน์นอกจากแสงที่สะท้อนจากตัวอย่างที่ดูเท่านั้น ดังนั้นจะเห็นพื้นภาพเป็นสีดำและเห็นเซลล์แบคทีเรียสว่างกว่าพื้นภาพโดยรอบ ใช้ส่องดูเซลล์แบคทีเรียที่ติดสียาก เช่น พวก spirochete เป็นต้น

3. **Phase contrast microscope** เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่มีหลักการในการทำงาน คือ เมื่อคลื่นแสงผ่านตัวอย่างโปร่งแสงจะทะลุผ่านออกมาเป็นหลายระยะ (phase) ซึ่งขึ้นอยู่กับความลึกและความหนาแน่นของตัวอย่างนั้น และเมื่อใช้ระบบ optical พิเศษจะเปลี่ยนความแตกต่างของแต่ละระยะเป็นความแตกต่างของความเข้มแสง ถ้าใช้ส่องดูแบบที่เรียกที่ยังไม่ได้ย้อมสีจะเห็นได้ชัดเจนกว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิด bright field microscope โดยจะเห็นความแตกต่างของลักษณะภายในของแบคทีเรียซึ่งแตกต่างจากสิ่งแวดล้อมภายนอกได้

4. **Fluorescence microscope** เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงซึ่งให้แสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet light; UV) ใช้ส่องดูแบคทีเรียที่ย้อมด้วยสีเรืองแสง (fluorescein dye) โดยเมื่อกระทบกับ UV light จะเปลี่ยนเป็น visible light และเห็นแบคทีเรียติดสีเป็นสีเขียว สีแดง และสีส้ม ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสีเรืองแสงที่ใช้ และมักจะเห็นพื้นภาพเป็นสีดำ

5. **Electron microscope (EM)** เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูงมาก มีกำลังขยายของตัวกล้องประมาณ 25,000-100,000 เท่า โดยใช้แม่เหล็กทำให้ประจุลบรวมตัวกันเป็นลำแสงอิเล็กตรอนแทนลำแสงธรรมดาส่องกระทบตัวอย่างที่จะดู ภาพจากตัวอย่างที่ศึกษาจะถูกถ่ายเป็นภาพให้ปรากฏบนฉากที่เรืองแสงซึ่งสามารถขยายให้มีขนาดใหญ่ขึ้นอีกหลายแสนเท่า สามารถใช้ศึกษาส่วนประกอบและโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียได้อย่างละเอียดซึ่งทำไม่ได้ในกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา โดยตัวอย่างที่จะส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะต้องเป็นตัวอย่างที่แห้งและเป็นแผ่นบาง ๆ เพื่อจะได้เห็นรายละเอียดต่าง ๆ ชัดเจนขึ้น กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมี 2 ชนิด คือ

5.1 Transmission electron microscope (TEM) สามารถขยายภาพตัวอย่างที่ต้องการศึกษาได้มากถึง 1,000,000 เท่า

5.2 Scanning electron microscope (SEM) สามารถดูภาพตัวอย่างได้ถึง 3 มิติและขยายภาพตัวอย่างได้มากถึง 75,000-100,000 เท่า

### **การขยาย (Magnification)**

กำลังขยายของภาพ (magnifying power) ของกล้องจุลทรรศน์มาจากเลนส์ 2 ระบบ คือ เลนส์ที่อยู่ใกล้ตัวอย่างซึ่งเรียกว่าเลนส์วัตถุ (objective lens) จะขยายตัวอย่างและให้ภาพจริงในลำกล้อง (body tube) และจะถูกขยายต่อโดยเลนส์ที่อยู่ใกล้ตาซึ่งเรียกว่าเลนส์ตา (ocular หรือ

eyepiece lens) โดยจะขยายภาพจริงให้ได้เป็นภาพเสมือนซึ่งตาจะมองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ทั้งหมดได้จากผลคูณของกำลังขยายของเลนส์วัตถุและเลนส์ตา

ระบบเลนส์วัตถุประกอบด้วยเลนส์นูนและเลนส์เว้า โดยกล้องจุลทรรศน์ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยา คือ ชนิด light microscope หรือ bright field microscope นั้น มักจะประกอบด้วยเลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 3-4 ขนาด ได้แก่ เลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำ (low power objective) มีกำลังขยาย 4 เท่า (4x) 10 เท่า (10x) หรือ 20 เท่า (20x) เลนส์วัตถุกำลังขยายสูง (high dry objective) มีกำลังขยาย 40x และเลนส์น้ำมัน (oil immersion objective) มีกำลังขยาย 100x

ปุ่มสำหรับปรับโฟกัส (focus) ระหว่างเลนส์วัตถุและตัวอย่างมี 2 ปุ่ม คือ ปุ่มปรับหยาบ (coarse adjustment) ซึ่งเมื่อหมุนจะทำให้ลำกล้องเคลื่อนที่ขึ้นลงได้อย่างรวดเร็ว และปุ่มปรับละเอียด (fine adjustment) ซึ่งเมื่อหมุนจะทำให้ลำกล้องเคลื่อนที่ขึ้นลงอย่างช้า ๆ

### Resolving power

resolving power เป็นความสามารถที่จะแสดงจุด 2 จุดที่อยู่ใกล้กันให้แยกออกจากกัน คุณสมบัตินี้ขึ้นอยู่กับความยาวคลื่น (wavelength) ของแสงที่ใช้และลักษณะเฉพาะของเลนส์ซึ่งเรียกว่า numerical aperture (NA) โดยค่า resolving power มีค่าเท่ากับเส้นผ่าศูนย์กลางของจุดที่เล็กที่สุดที่มองเห็น กล่าวคือ

$$\text{resolving power} = \frac{\text{ความยาวคลื่น}}{\text{numerical aperture}}$$

นั่นคือ ถ้าความยาวคลื่นแสงสั้นลงเท่าใดก็จะสามารถมองเห็นจุดที่เล็กลงเท่านั้น ตัวอย่างเช่น แสงสีน้ำเงินจะสามารถให้รายละเอียด (resolution) มากกว่าแสงสีแดง เป็นต้น

### ส่วนประกอบพื้นฐานของกล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา

กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตาที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยา โดยทั่วไปจะมีส่วนประกอบพื้นฐานดังต่อไปนี้

1. แหล่งให้แสง (light source) เดิมกล้องจุลทรรศน์จะมีกระจกเงา (mirror) ทำหน้าที่สะท้อนแสงเข้าสู่คอนเดนเซอร์ โดยแผ่นกระจกเงาจะมี 2 ด้าน ด้านเว้าจะรวมแสงได้ดีกว่าด้าน

เรียบ ควรจะปรับให้กระจกเงารวมแสงเข้าสู่กล้องจุลทรรศน์ได้อย่างเต็มที่ กล้องจุลทรรศน์รุ่นใหม่ มักมีแหล่งกำเนิดแสงจากหลอดไฟทั้งสแตนในตัวของกล้องจุลทรรศน์เอง ทำหน้าที่แทนกระจกเงา สามารถปรับความเข้มแสงได้ ทำให้สะดวกแก่การใช้งานมากกว่ากล้องจุลทรรศน์รุ่นเดิม

2. ม่านปรับแสง (iris diaphragm) เป็นตัวปรับปริมาณแสงให้เข้าสู่คอนเดนเซอร์ได้ มากน้อยตามต้องการ

3. คอนเดนเซอร์ (condensor หรือ substage condensor หรือ เลนส์รวมแสง) ประกอบด้วยเลนส์ 2 อันซึ่งสามารถปรับเลื่อนขึ้นลงได้ โดยหมุนปุ่ม condensor adjustment knob ทำหน้าที่รวมแสงเพื่อให้ลำแสงจากตัวอย่างผ่านเข้ากล้องจุลทรรศน์ได้ดีขึ้น

4. แท่นวางสไลด์ (stage) เป็นแท่นสี่เหลี่ยมสำหรับวางสไลด์ (slide) หรือตัวอย่าง มักเป็นส่วนที่สามารถปรับให้เลื่อนขึ้นลงได้

5. Mechanical stage control เป็นอุปกรณ์พิเศษที่ช่วยยึดสไลด์และช่วยเลื่อนสไลด์ขึ้นลง (แกน Y) และซ้ายขวา (แกน X) ในแนวราบขนานกับพื้น นอกจากนั้นยังมีสเกลตัวเลข (number scale) ที่จะบอกตำแหน่งของภาพบนสไลด์ทั้งด้านแกน X และแกน Y

6. ปุ่มปรับโฟกัสหยาบ (coarse adjustment knob) ใช้ปรับแท่นวางสไลด์ (stage) ขึ้นลงเพื่อปรับระยะโฟกัสให้เห็นภาพได้อย่างรวดเร็ว เพราะเมื่อหมุนจะทำให้แท่นวางสไลด์ เคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็ว หลักการที่สำคัญในการหมุนปุ่มปรับหยาบ คือ ต้องเลื่อนแท่นวางสไลด์ ลงหรือเคลื่อนแท่นวางสไลด์ออกจากปลายเลนส์วัตถุเสมอ

7. ปุ่มปรับโฟกัสละเอียด (fine adjustment knob) ใช้ปรับแท่นวางสไลด์ขึ้นลงอย่าง ช้า ๆ เพื่อปรับระยะโฟกัสให้เห็นภาพได้ชัดเจนยิ่งขึ้นหลังจากที่หมุนปุ่มปรับโฟกัสหยาบ

8. เลนส์วัตถุ (objective lens) เป็นเลนส์ที่อยู่ใกล้วัตถุหรือตัวอย่าง ประกอบด้วย เลนส์ที่มีกำลังขยายหลายขนาดอยู่ติดกับ revolving nosepiece ซึ่งเป็นแกนใช้สำหรับจับหมุนเวลา ต้องการเปลี่ยนเลนส์ เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยายต่ำจะมีความโค้งของผิวแก้วน้อย (หรือมีทางยาว โฟกัสมาก) และมีพื้นที่รับแสงมาก เวลาใช้ส่องดูจึงควรจะหมุน iris diaphragm หรือลด คอนเดนเซอร์ลงเพื่อหรือแสงที่ส่องไปยังตัวอย่างให้น้อยลง

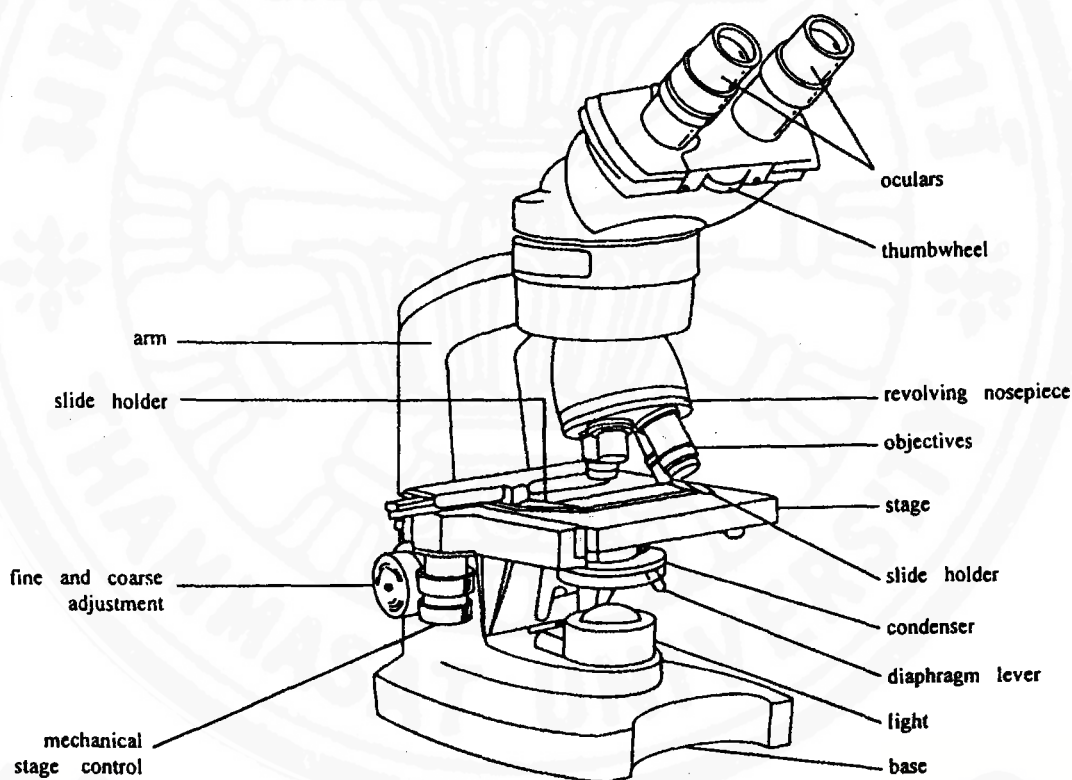
9. ลำกล้อง (Body tube) เป็นส่วนตัวกล้องจุลทรรศน์ที่ประกอบด้วยกระจกและปริซึม

ซึ่งจะส่งภาพจากเลนส์วัตถุไปสู่เลนส์ตา

10. **เลนส์ตา (ocular หรือ eyepiece)** เป็นเลนส์ที่อยู่ส่วนบนของตัวกล้องและอยู่ใกล้ตา ซึ่งมักจะมีกำลังขยาย 10x (กล้องจุลทรรศน์บางชนิดอาจมีกำลังขยาย 4x, 5x หรือ 15x) กล้องจุลทรรศน์สมัยใหม่มักมีระบอกลেনส์ที่ตา 2 อัน จึงเรียกว่ากล้อง 2 ตา (binocular microscope)

11. **Arm** คือ ส่วนที่ใช้จับถือกล้อง

12. **ฐานกล้อง (base)** คือ ส่วนที่เป็นแท่นรับน้ำหนักและยึดส่วนประกอบต่าง ๆ ของกล้องให้มั่นคง



**รูปที่ 1-1** ส่วนประกอบของกล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา

### **การใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา**

1. หมุนปุ่มปรับหยาบเพื่อเลื่อนแท่นวางสไลด์ลงให้ต่ำที่สุด ใช้มือบีบ slide holder ให้เปิดกว้างออก วางสไลด์ลงบนแท่นวางสไลด์โดยให้ด้านที่มีตัวอย่างอยู่ด้านบน เลื่อนสไลด์ให้ส่วนที่



ต้องการจะส่องดูอยู่ตรงกับรูที่อยู่ตรงกลางของแท่นวางสไลด์ของกล้องจุลทรรศน์ เสียบปลั๊กไฟฟ้า และเปิดสวิทช์

2. ปรับ iris diaphragm และคอนเดนเซอร์ให้แสงผ่านตัวอย่างที่จะดูให้สว่างที่สุด ปรับ revolving nosepiece ให้เลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำที่สุดเข้าที่ จะได้ยินเสียงดังกึกซึ่งจะลงล็อกพอดี หมุนปุ่มปรับหยาบเลื่อนแท่นวางสไลด์ขึ้นให้สูงที่สุด ฟังระวังอย่าให้ชนเลนส์ เพราะจะทำให้เลนส์เสียหายหรือสไลด์ตัวอย่างแตกได้

3. มองผ่านเลนส์ตาโดยปรับระยะห่างระหว่าง binocular ทั้งสองให้พอเหมาะกับระยะห่างของดวงตา สังเกตว่าเมื่อมองโดยตาทั้ง 2 ข้างจะเห็นภาพเป็นวงกลมเพียง 1 วง หากเห็นเป็นวงกลม 2 วงซ้อนกันให้ค่อย ๆ ปรับระยะห่างเข้าออกจนเห็นเป็นวงกลมเพียง 1 วง และควรจจะมองภาพโดยเปิดตาทั้ง 2 ข้างจะทำให้ไม่รู้สึกปวดตาเมื่อมองกล้องจุลทรรศน์ไปนาน ๆ

4. หมุนปุ่มปรับหยาบเพื่อค่อย ๆ เลื่อนแท่นวางสไลด์ลง จนกระทั่งมองเห็นภาพตัวอย่าง แล้วหมุนปุ่มปรับละเอียดเพื่อโฟกัสจนมองเห็นตัวอย่างได้ชัดเจน หลังจากนั้นปรับ iris diaphragm และคอนเดนเซอร์จนกระทั่งได้ภาพที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

5. หลังจากตรวจดูตัวอย่างโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำสุดแล้ว เปลี่ยนไปใช้กำลังขยายสูงขึ้นโดยหมุน revolving nosepiece แล้วค่อย ๆ หมุนปุ่มปรับละเอียดจนได้ภาพตามต้องการ

6. การใช้เลนส์น้ำมันต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ โดยหมุน revolving nosepiece เพื่อยกเลนส์วัตถุขึ้น หยดน้ำมัน (immersion oil) ลงบนสไลด์เพียง 1 หยดให้ตรงตำแหน่งของเลนส์ แล้วค่อย ๆ ปรับเลนส์น้ำมันลงมาจนแตะกับหยดน้ำมันบนสไลด์พอดี หมุนปุ่มปรับละเอียดจนได้ภาพตามต้องการ หลังจากใช้เลนส์น้ำมันเสร็จแล้ว ต้องเช็ดน้ำมันออกจากเลนส์ให้หมดด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ทุกครั้ง อย่าปล่อยให้ น้ำมันแห้งเกรอะกรังติดเลนส์ เพราะทำความสะอาดยาก และอาจทำให้เลนส์เสียหายได้ ถ้ามีคราบสกปรกมากให้ใช้กระดาษเช็ดเลนส์จุ่ม xylol เช็ดเบา ๆ

7. เมื่อตรวจดูตัวอย่างเสร็จแล้ว ให้หมุนปุ่มปรับหยาบเลื่อนแท่นวางสไลด์ให้ลงต่ำที่สุด และหมุน revolving nosepiece ยกเลนส์ขึ้น แล้วจึงบีบ slide holder และดึงสไลด์ออก ปิดสวิทช์ และถอดปลั๊กไฟ หลังจากใช้กล้องจุลทรรศน์เสร็จแล้วต้องทำความสะอาดตัวกล้อง หากเลนส์สกปรกให้ใช้กระดาษเช็ดเลนส์เช็ดเบา ๆ โดยห้ามใช้สิ่งอื่นใดแตะเลนส์โดยเด็ดขาด

8. เก็บสายไฟให้เรียบร้อยโดยพันรอบฐานกล้อง คลุมกล้องจุลทรรศน์ด้วยผ้าคลุมและนำไปเก็บในกล่องหรือตู้สำหรับเก็บกล้องจุลทรรศน์ เวลายกและเคลื่อนย้ายกล้องจุลทรรศน์ให้ใช้มือขวาจับที่ arm และมือซ้ายซ้อนรองใต้ฐานกล้อง โดยให้กล้องอยู่ในสภาพตั้งตรง

## การศึกษาแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### การเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่มีชีวิตหลายชนิดสามารถเคลื่อนที่ได้ ซึ่งปกติจะเคลื่อนที่ไปเป็นระยะทางหนึ่ง ในทิศทางที่แน่นอน แบคทีเรียบางชนิดจะเคลื่อนที่ไม่ได้ แต่จะมีการเคลื่อนที่แบบบราวเนียน (Brownian movement) ซึ่งเป็นการเคลื่อนที่ที่เกิดจากการกระทบกันกับโมเลกุลของของเหลวที่อยู่รอบ ๆ และเป็นการเคลื่อนที่ที่ไม่มีทิศทางแน่นอน

### การวัดขนาดของเซลล์แบคทีเรีย

การวัดขนาดของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต้องใช้ไมโครมิเตอร์ ซึ่งประกอบด้วย ocular micrometer และ stage micrometer โดย ocular micrometer จะเป็นแผ่นแก้ววงกลมบาง ๆ ที่บริเวณตรงกลางมีสเกลแบ่งเป็นช่อง ๆ ที่มีความกว้างเท่ากัน แต่ไม่ทราบความกว้างของแต่ละช่อง เพราะขึ้นอยู่กับกำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ (รูปที่ 1-2) ส่วน stage micrometer นั้นเป็นแผ่นสไลด์ที่มีสเกลแบ่งออกเป็นช่อง ๆ บริเวณตำแหน่งตรงกลาง แต่ละช่องมีความกว้างเท่ากับ 0.01 มิลลิเมตร (หรือ 10 ไมโครเมตร) สเกลจะเห็นได้ชัดเจนเมื่อวาง stage micrometer ลงบนแท่นวางสไลด์และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 1-3)

การวัดขนาดของเซลล์แบคทีเรียจะต้องทำการเทียบ (calibration) จำนวนช่องใน ocular micrometer กับ stage micrometer โดยการบรรจุ ocular micrometer เข้าไปใน ocular lens (รูปที่ 1-4) แล้วเทียบจำนวนช่องของ ocular micrometer กับจำนวนช่องของ stage micrometer ในแต่ละกำลังขยายของเลนส์วัตถุ หมุนสเกลของ ocular micrometer ให้ซ้อนทับกับสเกลของ stage micrometer (รูปที่ 1-5) แล้วนับจำนวนช่องของ ocular micrometer ที่ซ้อนทับกับระยะที่ทราบแน่ชัดบนสเกลของ stage micrometer และคำนวณหาว่า 1 ช่องของ ocular micrometer มีความกว้างเป็นเท่าไร โดยใช้สูตรดังนี้

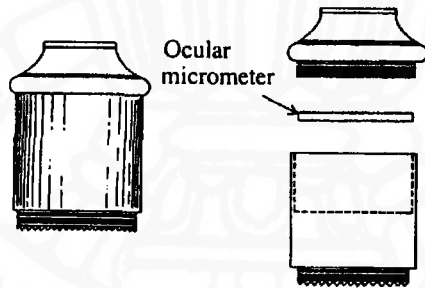
$$1 \text{ ช่องของ ocular micrometer (mm)} = \frac{\text{ความยาวของ stage micrometer}}{\text{จำนวนช่องของ ocular micrometer}}$$



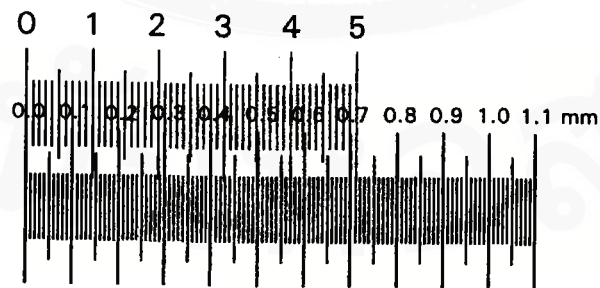
รูปที่ 1-2 สเกลของ ocular micrometer



รูปที่ 1-3 สเกลของ stage micrometer



รูปที่ 1-4 การบรรจุ ocular micrometer เข้าไปภายใน ocular



รูปที่ 1-5 การซ้อนสเกลของ ocular micrometer และ stage micrometer



ในการวัดขนาดของเซลล์แบคทีเรานั้น สิ่งที่เป็นอีกอย่างหนึ่ง คือ การย้อมสีแบคทีเรีย เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียมีความแตกต่างจากพื้นภาพอย่างชัดเจน ในการย้อมสีแบคทีเรียโดยทั่วไป แบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ

1. **การย้อมแบบ negative (negative stain)** การย้อมสีแบคทีเรียลักษณะนี้เซลล์แบคทีเรียจะไม่ติดสี แต่ส่วนพื้นที่รอบเซลล์หรือพื้นภาพจะติดสี สีที่ใช้ย้อมมักเป็นสีที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น india ink หรือ nigrosin

2. **การย้อมแบบ positive (positive stain)** เป็นการย้อมสีที่เซลล์หรือโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียติดสี แต่พื้นที่โดยรอบไม่ติดสี ถ้าใช้สีในการย้อมเพียงชนิดเดียวเรียกว่า simple stain สีที่ใช้ย้อมจะเป็นสีที่อยู่ในรูปของเกลือที่ประกอบด้วยอออนบวกและลบ ถ้าส่วนที่แสดงสี (chromophoric group) เป็นอออนบวกเรียกว่า basic dyes เช่น สี methylene blue (อยู่ในรูปของเกลือ methylene blue chloride) ถ้าส่วนที่แสดงสีเป็นอออนลบเรียกว่า acidic dyes เช่น สี eosin (อยู่ในรูปของเกลือ sodium eosinate)

โดยสีที่นิยมใช้ในการย้อมเซลล์หรือโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียส่วนใหญ่มักจะเป็นสี basic dyes และสีที่นิยมใช้ในการย้อมเพื่อวัดขนาดของเซลล์แบคทีเรีย คือ india ink

### **วัตถุประสงค์**

1. เพื่อให้นักศึกษาได้เรียนรู้วิธีการและขั้นตอนในการตรวจสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย และวัดขนาดของเซลล์แบคทีเรีย ตลอดจนการย้อมสีแบคทีเรียแบบ negative ด้วย india ink

2. เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกฝนและเรียนรู้วิธีการใช้กล้องจุลทรรศน์ จนเกิดทักษะและความชำนาญ และมีวิสัยทัศน์ในการศึกษาทางด้านแบคทีเรียวิทยา

### **การทดลองที่ 1**

#### **การตรวจสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย**

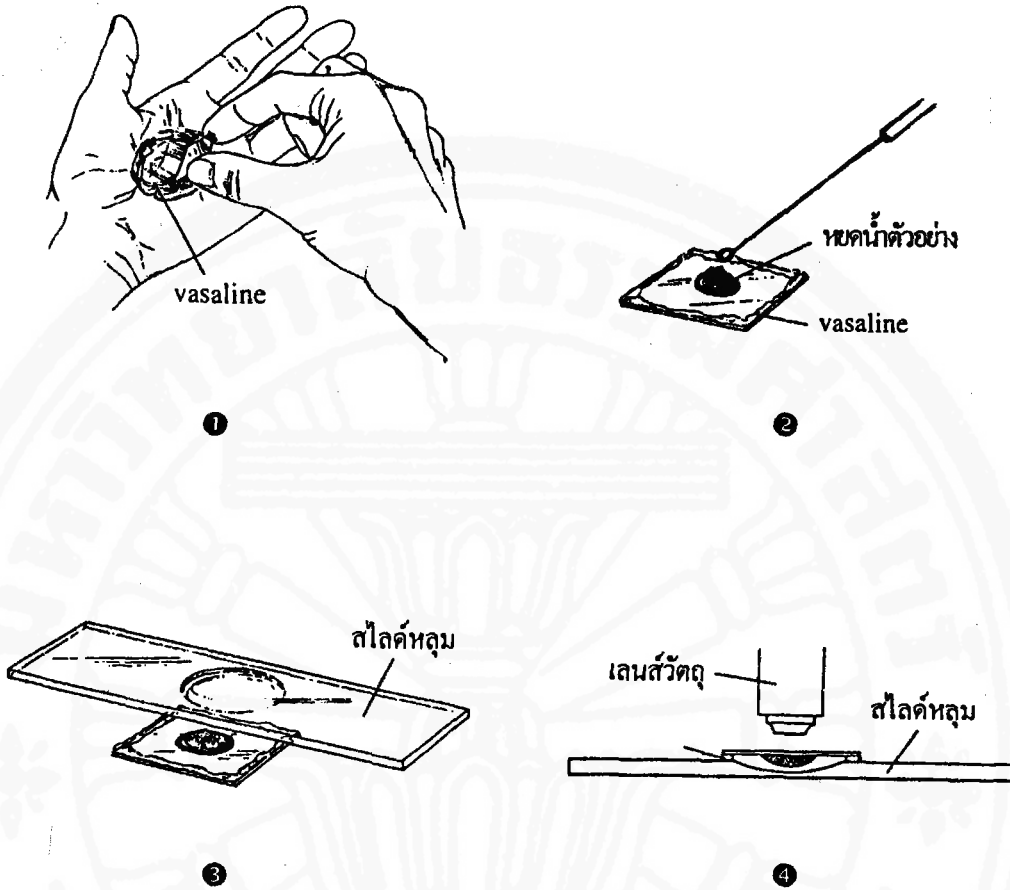
#### **อุปกรณ์**

1. ลูป (inoculating loop)
2. สไลด์และกระจกปิดสไลด์ (cover glass)

3. ตะเกียงบนเส้น
4. สไลด์หลุม (depression หรือ hanging drop slide)
5. วาสลิน
6. แบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus cereus* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (broth)
7. กล้องจุลทรรศน์

### วิธีการ

1. ล้างสไลด์แก้วให้สะอาด โดยถ้าเป็นสไลด์ใหม่ให้แช่ใน 95% ethanol แล้วใช้ผ้ากรองเช็ดให้แห้ง ถ้าเป็นสไลด์ที่เคยใช้งานมาแล้วให้ล้างด้วยน้ำยาล้างจานหรือผงซักฟอกและน้ำประปาให้สะอาด แล้วแช่ใน 95% ethanol และใช้ผ้ากรองเช็ดให้แห้ง
2. เตรียมสไลด์ชนิด wet mount ของแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยวิธี aseptic technique คือ แฉลูปบนเปลวไฟจากตะเกียงบนเส้นจนร้อนแดง ปล່อยให้เย็นสักครู่ เขี่ยหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงแบคทีเรียจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วใช้นิ้วก้อยของมือขวาคลายฝาเกลียวหรือจุกสำลีของหลอดทดลองนั้น แล้วใช้ลูปจุ่มรับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย นำมาแตะบนแผ่นสไลด์แก้วที่เตรียมไว้ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์
3. เตรียมสไลด์ชนิด hanging drop ของแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยวิธี aseptic technique โดยป้ายวาสลินรอบ ๆ ขอบของกระจกปิดสไลด์ แล้วใช้ลูปจุ่มรับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย นำมาแตะลงตรงกลางของกระจกปิดสไลด์ 2-3 ครั้ง คว่ำสไลด์หลุมและนำไปวางบนกระจกปิดสไลด์ที่มีหยดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียอยู่ โดยให้หลุมของสไลด์หลุมอยู่ตรงตำแหน่งของหยดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียบนกระจกปิดสไลด์ หลังจากนั้นกดสไลด์หลุมให้ติดกับกระจกปิดสไลด์โดยใช้นิ้วโป้งกดลงบนสไลด์หลุมเบา ๆ เสร็จแล้วรีบกลับสไลด์หลุมที่เตรียมได้ขึ้นอย่างรวดเร็ว ระวังให้หยดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียแขวนติดอยู่บนกระจกปิดสไลด์ อย่าให้หยดลงไปหรือแตะกับกันหลุม (รูปที่ 1-6)
4. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยหรี iris diaphragm ลงเพื่อให้ความเข้มแสงแตกต่างกันระหว่างเซลล์แบคทีเรียและพื้นภาพ การโฟกัสให้เริ่มจากขอบของหยดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียก่อน ซึ่งจะสังเกตได้ง่ายโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำ ๆ แล้วจึงปรับไปใช้เลนส์น้ำมัน



รูปที่ 1-6 ขั้นตอนการเตรียมสไลด์ชนิด hanging drop

5. สังเกตการเคลื่อนที่ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการเคลื่อนที่ที่แท้จริงและการเคลื่อนที่แบบบราวเนียน (Brownian movement)

**ผลการทดลอง**

แบคทีเรีย	ลักษณะการเคลื่อนที่
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	

## วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

## ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

## การทดลองที่ 2

### การวัดขนาดของแบคทีเรีย

#### อุปกรณ์

1. ลูป (inoculating loop)
2. สไลด์และกระจกปิดสไลด์ (cover glass)
3. ตะเกียงเบนเส้น
4. ไมโครมิเตอร์ (stage micrometer และ ocular micrometer)
5. สี india ink
6. แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Bacillus megatherium* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง (agar) ในหลอดทดลอง
7. กล้องจุลทรรศน์

#### วิธีการ

1. ล้างสไลด์แก้วให้สะอาด แล้วใช้ผ้ากรอสเช็ดให้แห้ง หยดสี india ink 1 หยดบนปลายด้านหนึ่งของสไลด์
2. เผาลูปบนเปลวไฟจากตะเกียงเบนเส้นจนร้อนแดง ปล່อยให้เย็นสักครู่ ใช้ลูปจุ่มรับน้ำกลั่นมาแตะบนสไลด์ข้างหยดสี 2-3 ครั้ง

3. จับหลอดบรรจุอาหารเลี้ยงแบคทีเรียด้วยมือซ้าย ใช้นิ้วก้อยของมือขวาคลายฝาเกลียวหรือดึงจุกสำลีของหลอดทดลองที่มีแบคทีเรียเจริญเป็นโคโลนี (colony) อยู่บนผิวของอาหารแข็ง ใช้รูปป้ายโคโลนีของแบคทีเรียให้ติดปลายรูปมาเล็กน้อย นำมาแตะและผสมลงในหยดน้ำจนเป็นเนื้อเดียวกัน

4. ใช้ขอบสไลด์แก้วอีกแผ่นหนึ่งวางแตะหยดแบคทีเรีย แล้วลากไปแตะหยดสี india ink จนผสมรวมกัน โดยวางในแนวทำมุมประมาณ 30-45 องศา กับแผ่นสไลด์แผ่นแรก

5. ดันสไลด์ไปตามแนวยาวจนสุดปลายอีกด้านหนึ่งของสไลด์ ให้ส่วนผสมของแบคทีเรียและสีแผ่กระจายไปบนผิวสไลด์แก้ว (ดังรูปที่ 1-7)

6. วางทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ วัดขนาดของเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ไมโครมิเตอร์ (stage micrometer และ ocular micrometer)

**ผลการทดลอง**

แบคทีเรีย	ขนาดของแบคทีเรีย ( $\mu\text{m}$ )
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Bacillus megatherium</i>	

**วิจารณ์และสรุป**

.....

.....

.....

.....

**ข้อเสนอแนะ**

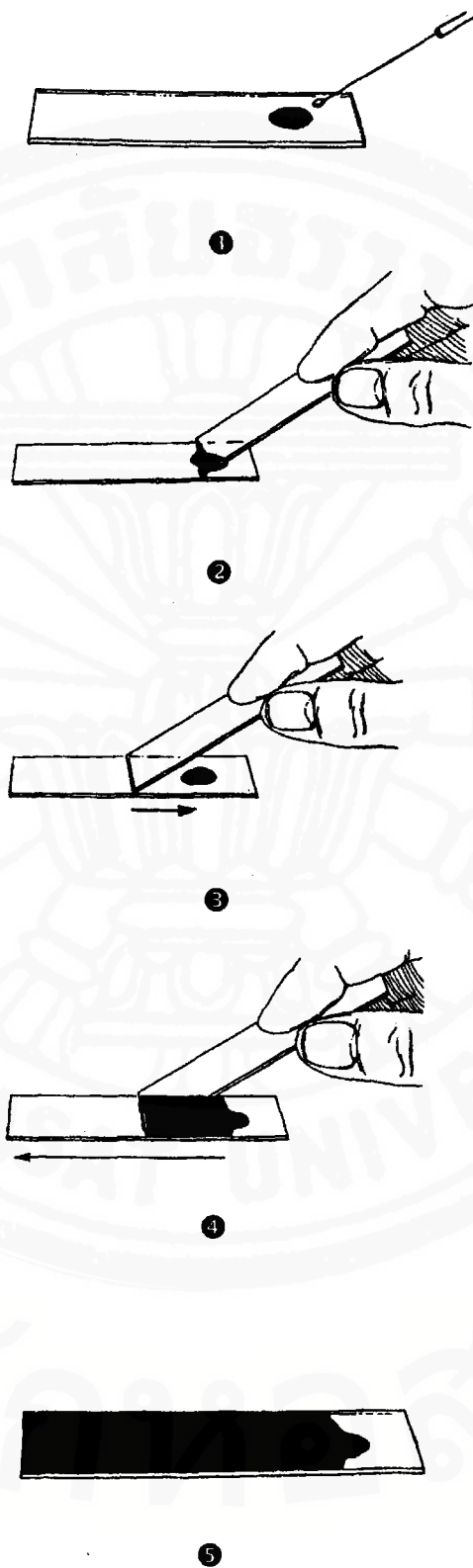
.....

.....

.....

.....





รูปที่ 1-7 ขั้นตอนการย้อมเซลล์แบคทีเรียด้วย india ink