

## บทที่ 2

### ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ของเซลล์แบคทีเรียในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยานั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียมีขนาดเล็กมาก คือ มีขนาดเป็นไมครอน (ไมโครเมตร;  $\mu\text{m} = 10^{-6}$  เมตร) จึงไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ดังนั้นวิธีที่จะทำให้มองเห็นเซลล์แบคทีเรียได้ คือ จะต้องขยายด้วยเลนส์ (lens) ที่มีกำลังขยายประมาณ 1,000 เท่าซึ่งประกอบอยู่ภายในกล้องจุลทรรศน์ โดยอาศัยน้ำมัน (immersion oil) เป็นตัวกลางช่วยในการรวมแสงจากเซลล์แบคทีเรียบนสไลด์ (slide) สูเลนส์ แต่ปกติแล้วเซลล์แบคทีเรียมักมีลักษณะโปร่งแสง จึงทำให้การศึกษารายละเอียดต่าง ๆ ทำได้ยาก ดังนั้นวิธีที่จะช่วยให้เห็นรายละเอียดได้ชัดเจนยิ่งขึ้น คือ การย้อมสี (staining) แบคทีเรียที่นิยมนำมาย้อมสี คือ แบคทีเรียที่มีอายุประมาณ 18-24 ชั่วโมง เพราะแบคทีเรียที่มีอายุมากมักจะเสียคุณสมบัติการติดสี นอกจากนี้จะย้อมเพื่อศึกษาลักษณะบางประการที่พบเฉพาะในแบคทีเรียที่มีอายุมากเท่านั้น

### รูปร่างลักษณะของเซลล์แบคทีเรีย

รูปร่างลักษณะของเซลล์แบคทีเรียจำแนกได้หลายแบบ ได้แก่

#### 1. เซลล์ปกติ (vegetative cells)

1.1 รูปร่าง (shape) ของเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่

- bacillus (แท่ง, ทรงกระบอก) (รูปที่ 2-1)
- coccus (กลม, รูปไข่) (รูปที่ 2-2)
- curved (รูปที่ 2-3)
  - spirillum (แข็ง, เป็นเกลียว)
  - spirochete (ยืดหดได้, เป็นเกลียว)
  - vibrio (โค้งเดี่ยว)

1.2 การจัดหมู่ (grouping) ของเซลล์แบคทีเรีย (รูปที่ 2-4) ได้แก่

- bacillus (เดี่ยว, เป็นคู่, เป็นสาย)
- coccus
  - micrococcus (เดี่ยว)

- diplococci (คู่, คู่โดยที่เซลล์ด้านหนึ่งแบน)
- streptococci (สาย)
- staphylococcus (เรียงกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น)
- tetrad (เรียงกันสี่เซลล์)
- sarcina (8 เซลล์เรียงกันเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์)

## 2. เซลล์ที่สร้างสปอร์อยู่ภายใน ได้แก่

- 2.1 รูปแท่ง (ลักษณะเหมือนเซลล์ที่ไม่สร้างสปอร์)
- 2.2 รูปกระสวย (ตรงกลางโป่งออก)
- 2.3 รูปไม้ตีกลอง (ปลายข้างหนึ่งโป่งออก)

## 3. เอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย (รูปที่ 2-5) ได้แก่

- 3.1 รูปร่าง
  - spherical (กลม)
  - oval (รี)
  - cylindrical (ทรงกระบอก)
- 3.2 ตำแหน่งที่อยู่ (location)
  - central (ตรงกลาง)
  - terminal (ตรงปลาย)
  - subterminal (ค่อนข้างปลาย)

## 4. แฟลกเจลลา (flagella) (รูปที่ 2-6) ได้แก่

- 4.1 monotrichous flagella มีเส้นเดี่ยวอยู่ที่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์
- 4.2 lophotrichous มีมากกว่า 1 เส้นอยู่ที่ปลายข้างใดข้างหนึ่ง
- 4.3 amphitrichous มีมากกว่า 1 เส้นอยู่ที่ปลายทั้งสองข้าง
- 4.4 peritrichous มีหลายเส้นอยู่รอบ ๆ ตัว



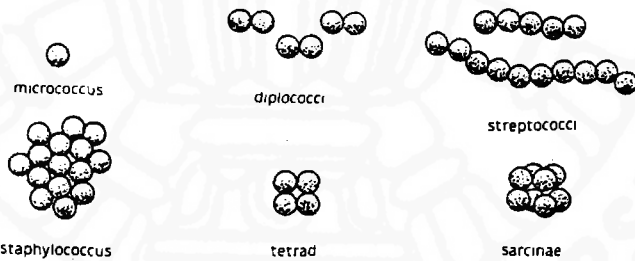
รูปที่ 2-1 รูปร่างของแบคทีเรียแบบ coccus



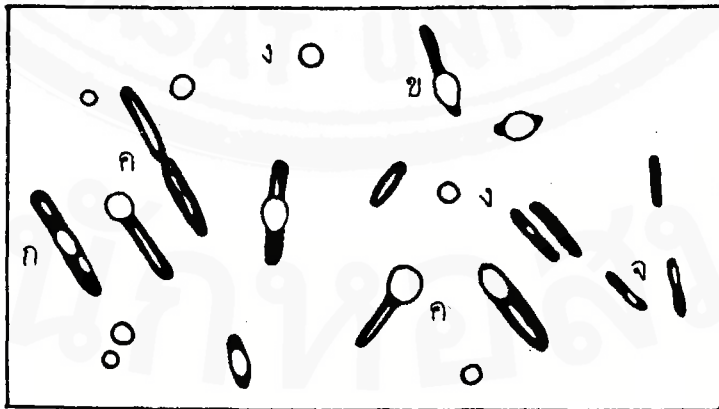
รูปที่ 2-2 รูปร่างของแบคทีเรียแบบ bacillus



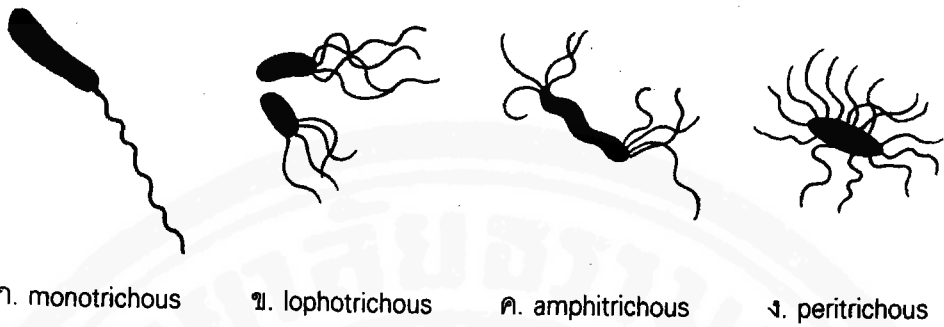
รูปที่ 2-3 รูปร่างของแบคทีเรียแบบ curved



รูปที่ 2-4 การจัดหมู่ของแบคทีเรีย cocci แบบต่าง ๆ



รูปที่ 2-5 ตำแหน่งที่อยู่ของเอนโดสปอร์ (ก. central spore, ข. subterminal spore, ค. terminal spore, ง. free spore, จ. vegetative cell)



**รูปที่ 2-6** ลักษณะและตำแหน่งของแฟลกเจลลาของเซลล์แบคทีเรีย

### **สีย้อมแบคทีเรีย**

สีย้อมเซลล์แบคทีเรียมีหลายชนิดแล้วแต่วัตถุประสงค์ของการย้อม สีที่นิยมใช้โดยทั่วไป ได้แก่

#### **1. Gram's stain**

คิดค้นโดย Hans Christain Gram ในปี ค.ศ. 1884 ใช้ในการแยกแบคทีเรียตามสมบัติการติดสีออกเป็น 2 พวก คือ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) จะติดสีน้ำเงินอมม่วงของ crystal violet และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) จะติดสีแดงอมส้มของ safranin O

#### **วิธีการเตรียมสี Gram's stain (Hucker's modification method)**

##### **1. เตรียม crystal violet solution โดยเตรียม**

###### **1.1 stock crystal violet**

ละลายผง crystal violet (85% dye) จำนวน 20 กรัม ใน 95% ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

###### **1.2 stock oxalate solution**

ละลายผง ammonium oxalate จำนวน 1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

การเตรียม working solution โดยนำ stock crystal violet (ข้อ 1.1) จำนวน 1 ส่วน ผสมกับน้ำกลั่นจำนวน 9 ส่วน แล้วเติม stock oxalate solution (ข้อ 1.2) จำนวน 4 ส่วน ผสมให้

เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรอง บ่มในขวดแก้วสีชา 24 ชั่วโมงก่อนใช้

2. เตรียม Gram iodine solution

บด iodine crystal จำนวน 1 กรัม และ potassium iodine จำนวน 2 กรัม ใน น้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายจนหมด แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 240 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย 5% sodium bicarbonate ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในขวดแก้วสีชา

3. เตรียม decolorizer

ใช้ 95% ethanol เป็น decolorizer

4. เตรียม safranin O solution

ละลายผง safranin O จำนวน 2.5 กรัม ใน 95% ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้เป็น stock solution โดยเก็บไว้ในขวดแก้วสีชา และเตรียม working solution โดย เจือจาง stock solution จำนวน 1 ส่วนในน้ำกลั่น 9 ส่วน (1:10)

2. Acid-fast stain

ใช้ย้อมเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในตระกูล Mycobacteriaceae และ Norcardiaceae ซึ่งติดสีได้ ยาก จึงจัดเป็น differential stain มีประโยชน์ทางด้านการวินิจฉัยโรค (diagnosis) เบื้องต้น เพราะ แบคทีเรียหลายชนิดในตระกูลนี้เป็นสาเหตุของโรคเรื้อนและวัณโรค

วิธีการเตรียมสี Kinyoun acid-fast stain

1. เตรียม Kinyoun carbolfuchsin

1.1 ละลายผง basic fuchsin จำนวน 4 กรัม ใน 95% ethanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นลงไปช้า ๆ ขณะเขย่าขวดจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้วสีชา

1.2 ละลายผง phenol จำนวน 8 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 8 มิลลิลิตร โดยอุ่นใน อ่างน้ำ (water bath) อุณหภูมิ 56°C

1.3 ใช้ปิเปตต์ (pipette) ตูดสารละลาย phenol ไปเติมลงในสีที่เตรียมไว้ แล้วเขย่าให้เข้ากัน

2. เตรียม acid-alcohol

เติม hydrochloric acid (HCl) เข้มข้นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงใน 95% ethanol ปริมาตร 97 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดแก้ว

3. เตรียม methylene blue

ละลายผง methylene blue จำนวน 3 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้ว

**3. Flagella stain**

แฟลกเจลลา (flagella) เป็นอวัยวะที่ช่วยในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย ซึ่งมีขนาดเล็กมาก และสามารถแตกหักได้ง่าย อีกทั้งยังสลายเมื่อโดนความร้อน ดังนั้นการย้อมจึงต้องระมัดระวังเป็นพิเศษและใช้สีพิเศษ เพื่อให้สามารถมองเห็นได้ชัดเจนขึ้น

**วิธีการเตรียมสี flagella stain (simplified Leifson flagella stain)**

1. เตรียมสารละลาย A

ละลายผง basic fuchsin จำนวน 0.6 กรัม ใน 95% ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ละลาย

2. เตรียมสารละลาย B

ละลายผง sodium chloride 0.37 กรัม กับผง tannic acid จำนวน 0.75 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

นำสารละลาย A และ B ผสมกันและเขย่าอย่างแรงให้เข้ากัน ปรับพีเอช (pH) ให้ได้ 5.0 ด้วย 1 N NaOH เก็บในตู้เย็น 4°C โดยใส่ขวดแก้ว ปิดจุกให้สนิท สามารถเก็บไว้ได้ประมาณ 1 เดือน

#### **4. Staining of metachromatic granules**

การย้อม metachromatic granules ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษในแบคทีเรียบางชนิด (เช่น Corynebacterium) นั้น มีหลายวิธี วิธีที่นิยมใช้กันทั่วไป คือ methylene blue stain

##### **วิธีการเตรียมสี methylene blue stain**

ละลายผง methylene blue จำนวน 0.3 กรัม ใน 95% ethanol ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดแก้ว

#### **5. Spore stain**

เอนโดสปอร์ (endospore) เป็นส่วนของแบคทีเรียที่ทนทานต่อสภาวะทางกายภาพและเคมี ซึ่งถูกสร้างขึ้นในเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อให้สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่วิกฤต การย้อมสปอร์ทำได้โดยเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของสีเข้าไปในสปอร์ ซึ่งอาจใช้ความร้อนช่วย

##### **วิธีการเตรียมสีย้อมสปอร์ (Wirtz-Conklin's method)**

##### **1. malachite green**

ละลายผง malachite green จำนวน 1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดแก้ว

##### **2. safranin O**

ละลายผง safranin O จำนวน 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดแก้ว

#### **6. Capsule stain**

แคปซูล (capsule) เป็นโครงสร้างที่ห่อหุ้มอยู่ด้านนอกของเซลล์แบคทีเรียซึ่งพบในแบคทีเรียบางชนิด ทำหน้าที่ในการป้องกันตัวเซลล์จากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เป็นส่วนที่มีสมบัติการติดสีต่างไปจากเซลล์แบคทีเรีย การย้อมอาจทำได้โดยการย้อมเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งจะเห็นส่วนแคปซูลใส (clear zone) ไม่ติดสี หรืออาจใช้วิธีที่แตกต่างออกไป คือ ย้อมแคปซูลให้ติดสีต่างไปจากเซลล์แบคทีเรียก็ได้

### วิธีการเตรียมสีย้อมแคปซูล (Hiss's method)

1. 1% crystal violet

ละลายผง crystal violet จำนวน 1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดแก้ว

2. 20% copper sulfate

ละลายผง copper sulfate จำนวน 5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดแก้ว

### 7. Cell wall stain

ผนังเซลล์ (cell wall) เป็นส่วนที่บางและย้อมติดสียาก เป็นโครงสร้างที่แข็งของแบคทีเรีย และมักจะแยกความแตกต่างจากเซลล์เมมเบรน (membrane) และไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์แบคทีเรียได้ยาก การย้อมผนังเซลล์จึงนิยมทำให้ผนังเซลล์ซึ่งอยู่ติดกับไซโตพลาสซึมแยกออกจากกัน โดยนำเซลล์แบคทีเรียไปแช่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าน้ำภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (hypertonic solution) เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียเกิดพลาสโมไลซิส (plasmolysis) ซึ่งจะทำให้ไซโตพลาสซึมหดตัวแยกจากผนังเซลล์

### วิธีการเตรียมสีย้อมผนังเซลล์

1. 5% tannic acid

ละลายผง tannic acid จำนวน 5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดแก้ว

2. 0.5% crystal violet

ละลายผง crystal violet จำนวน 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดแก้ว

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ให้นักศึกษาได้เรียนรู้วิธีการและขั้นตอนในการย้อมสีแบคทีเรีย



2. เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกหัดย้อมสีแบคทีเรียจนเกิดทักษะและความชำนาญ
3. เพื่อให้นักศึกษาสามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และสามารถบ่งบอกรูปร่างลักษณะของแบคทีเรียได้

## การทดลองที่ 1

### การย้อมสี Gram's stain (Hucker's method)

#### อุปกรณ์

1. ลูบ (inoculating loop)
2. สไลด์
3. ตะเกียงบุนเส้น
4. Crystal violet, Gram iodine, 95% ethanol และ Safranin O
5. ชุดอุปกรณ์ในการย้อมสี
6. แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว (broth) และอาหารแข็ง (media) จำนวน 12 ชนิด
7. กล้องจุลทรรศน์

#### วิธีการ

1. ล้างสไลด์แก้วให้สะอาด โดยถ้าเป็นสไลด์ใหม่ให้แช่ใน 95% ethanol แล้วใช้ผ้ากรองเช็ดให้แห้ง ถ้าเป็นสไลด์ที่เคยใช้งานมาแล้วให้ล้างด้วยน้ำยาล้างจานหรือผงซักฟอกและน้ำประปาให้สะอาด แล้วแช่ใน 95% ethanol และใช้ผ้ากรองเช็ดให้แห้ง
2. เตรียมสไลด์ที่จะย้อม โดยทำเครื่องหมายวงกลมบริเวณที่จะสเมียร์ (smear) ด้านหลังแผ่นสไลด์แก้ว หยดน้ำกลั่นบนสไลด์แก้ว 1 หยดบริเวณกึ่งกลางวงกลม แล้วใช้ลูบป้ายโคโลนี (colony) ของแบคทีเรียมาสเมียร์ให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ บนแผ่นสไลด์ด้วยวิธี aseptic technique คือเผาลูบบนเปลวไฟจากตะเกียงบุนเส้นจนร้อนแดง ปล่อยให้เย็นสักครู่ เปิดฝาจานอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (petri dishes) แล้วใช้ลูบป้ายที่โคโลนีของแบคทีเรียเพียงเล็กน้อย นำมาป้ายที่หยดน้ำกลั่นบนสไลด์แก้วที่เตรียมไว้ แล้วใช้ลูบเกลี่ยเป็นวงกลมกระจายให้บางที่สุด และปล่อยให้แห้ง
3. ถ้าเป็นแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว ไม่ต้องหยดน้ำกลั่นบนแผ่นสไลด์ โดยหลังจาก

เผาสุปและปล่อยให้เย็นแล้ว ให้เขย่าหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงแบคทีเรียจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วใช้นิ้วก้อยของมือขวาคลายฝาเกลียวหรือจุกสำลีของหลอดทดลองนั้น แล้วใช้รูปรุ่มรับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย นำมาป้ายบนแผ่นสไลด์แก้วที่เตรียมไว้ แล้วใช้รูปเกลียวเป็นวงกลมกระจายให้บางที่สุดและปล่อยให้แห้ง

4. นำสไลด์ที่เตรียมผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์ (heat fix) แล้ววางไว้ให้เย็น
5. นำสไลด์ที่เตรียมไปวางบนที่วางสไลด์สำหรับย้อมสีที่อ่างน้ำ เดิมสี crystal violet ให้ท่วมสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที
6. เมื่อครบเวลาเทสีทิ้งไป แล้วล้างสีที่เหลือด้วยน้ำประปาที่ไหลรินเบา ๆ
7. เดิม Gram iodine ให้ท่วมสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที
8. เมื่อครบเวลาเทสีทิ้งไป แล้วล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลรินเบา ๆ
9. วางสไลด์เป็นมุมชันกับพื้นราบ แล้วชะสีส่วนเกินออกด้วย 95% ethanol โดยหยดให้ไหลไปช้า ๆ ตามสไลด์ จนกระทั่งไม่มีสีออกอีก (ประมาณ 5-10 วินาที) โดยสังเกตสีของ 95% ethanol ที่ไหลทิ้งว่าใส แล้วล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลรินเบา ๆ อีกครั้ง
10. ย้อมทับด้วย safranin O ประมาณ 10 วินาที
11. เมื่อครบเวลาเทสีออก และล้างสีออกด้วยน้ำประปาที่ไหลรินเบา ๆ
12. ใช้ทิชชูเช็ดด้านหลังสไลด์ให้สะอาด หากตะกอนสีติดแน่นให้ใช้แผ่นใยขัด (ตัวอย่างเช่น สก็อตไบร์®) ขัดเบา ๆ แล้วเป่าสไลด์ด้านหน้าที่มีแบคทีเรียด้วยพัดลมให้แห้ง
13. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยหยด immersion oil บนสไลด์ 1 หยด แล้วตรวจดูด้วย objective lens หัว 100x
14. บันทึกผลลักษณะพื้นฐานวิทยาและการติดสีแกรม โดยตรวจดูรูปร่างลักษณะของแบคทีเรียว่าเป็นคอคคัส บาซิลลัส หรือสไปริลลัม และตรวจดูการติดสีแกรม ถ้าติดสีน้ำเงินอมม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแกรมบวก ถ้าติดสีแดงอมส้มของ safranin O แสดงว่าเป็นแกรมลบ

**ผลการทดลอง**

ชนิดของแบคทีเรีย	รูปร่างลักษณะที่เห็น	การติดสี
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		
11.		
12.		

**วิจารณ์และสรุป**

.....

.....

.....

.....

.....

**ข้อเสนอแนะ**

.....

.....

.....

.....

.....

## การทดลองที่ 2

### การย้อมสี Kinyoun's acid-fast stain

#### อุปกรณ์

1. ลูป (inoculating loop)
2. สไลด์
3. ตะเกียงบุนเดิน
4. Kinyoun's carbol fuchsin, acid alcohol และ methylene blue
5. ชุดอุปกรณ์ในการย้อมสี
6. แบคทีเรีย *Micrococcus luteus* บนผิวเอียง (Slant) ของอาหารแข็ง (nutrient agar)
7. กล้องจุลทรรศน์

#### วิธีการ

1. ล้างสไลด์แก้วให้สะอาด แล้วใช้ผ้ากรอสเช็ดให้แห้ง
2. เตรียมสไลด์ที่จะย้อม โดยหยดน้ำกลั่นบนสไลด์แก้ว 1 หยด แล้วใช้ลูปป้ายโคโลนีของแบคทีเรีย *Micrococcus luteus* มาสเมียร์ให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ บนแผ่นสไลด์ด้วยวิธี aseptic technique
3. นำสไลด์ที่เตรียมผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์ (heat fix) แล้ววางไว้ให้เย็น
4. นำสไลด์ที่เตรียมไปวางบนที่วางสไลด์สำหรับย้อมสีที่อ่างน้ำ หยดสี Kinyoun's carbol fuchsin ให้ท่วมรอยสเมียร์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เมื่อครบเวลาเทสีทิ้งไป แล้วล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลรินเบา ๆ
5. วางสไลด์เป็นมุมชันกับพื้นราบ แล้วชะสีส่วนเกินออกด้วย acid alcohol โดยหยดให้ไหลไปช้า ๆ ตามสไลด์ จนกระทั่ง acid alcohol ที่ไหลออกมาเป็นสีม่วงแดงจาง ๆ แล้วล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลรินเบา ๆ อีกครั้ง
6. ย้อมทับด้วย methylene blue ประมาณ 3-4 นาที เมื่อครบเวลาเทสีออก และล้างสีออก

ด้วยน้ำประปาที่ไหลรินเบา ๆ แล้วใช้ทิชชูเช็ดด้านหลังสไลด์และเป่าสไลด์ด้านหน้าที่มีแบคทีเรียด้วยพัดลมให้แห้ง

7. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า บันทึกผลลักษณะการติดสีของเซลล์ของแบคทีเรีย

**ผลการทดลอง**

รูปร่างลักษณะที่เห็น	การติดสี

**วิจารณ์และสรุป**

.....

.....

.....

**ข้อเสนอแนะ**

.....

.....

.....

**การทดลองที่ 3**

**การย้อมสี Spore stain (Schaffer-Fulton's method)**

**อุปกรณ์**

1. ลูป (inoculating loop)
2. สไลด์
3. ตะเกียงบนเส้น, tripod และ beaker
4. Malachite green และ Safranin O

5. ชุดอุปกรณ์ในการย้อมสี
6. แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* บนผิวเคี้ยวของอาหารแข็งอายุ 48 ชั่วโมง
7. กล้องจุลทรรศน์

### วิธีการ

1. ล้างสไลด์แก้วให้สะอาด แล้วใช้ผ้าก๊อซเช็ดให้แห้ง
2. เตรียมสไลด์ที่จะย้อม โดยหยดน้ำกลั่นบนสไลด์แก้ว 1 หยด แล้วใช้รูปป้ายโคโลนีของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* มาสเมียร์ให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ บนแผ่นสไลด์ด้วยวิธี aseptic technique
3. นำสไลด์ที่เตรียมผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์ (heat fix) แล้ววางไว้ให้เย็น
4. นำสไลด์ที่เตรียมไปวางบนบีกเกอร์ (beaker) ที่ต้มน้ำจนเดือดและมีไอน้ำนำความร้อนมาถึงแผ่นสไลด์ได้ แล้วเติม malachite green ให้ท่วมสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที ระวังอย่าให้สีแห้งโดยคอยเติมสีย้อมทีละหยด เมื่อครบเวลาเทสีออก และล้างสีออกด้วยน้ำประปาที่ไหลที่รินเบา ๆ
5. นำสไลด์ที่เตรียมไปวางบนที่วางสไลด์สำหรับย้อมสีที่อ่างน้ำ ย้อมทับด้วย safranin O ประมาณ 30 วินาที เมื่อครบเวลาเทสีออก และล้างสีออกด้วยน้ำประปาที่ไหลรินเบา ๆ และใช้ทิชชูเช็ดด้านหลังสไลด์และเป่าสไลด์ด้านหน้าที่มีแบคทีเรียด้วยพัดลมให้แห้ง
6. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า บันทึกผลลักษณะการติดสีของสปอร์และเซลล์ของแบคทีเรีย เซลล์แบคทีเรียจะติดสีแดงอมส้ม ส่วนสปอร์จะติดสีเขียว

### ผลการทดลอง

รูปร่างลักษณะที่เห็น	การติดสี

## **วิจารณ์และสรุป**

.....

.....

.....

## **ข้อเสนอแนะ**

.....

.....

.....

## **การทดลองที่ 4**

### **การย้อมสี Flagella stain (Simplified Leifson flagella stain method)**

#### **อุปกรณ์**

1. ลูป (inoculating loop)
2. สไลด์
3. ตะเกียงบนเส้น
4. Simplified Leifson flagella stain
5. ชุดอุปกรณ์ในการย้อมสี
6. แบคทีเรีย *Proteus vulgaris* บนผิวแข็งของอาหารแข็งอายุ 12-18 ชั่วโมง
7. กล้องจุลทรรศน์

#### **วิธีการ**

1. ล้างสไลด์ให้สะอาดแล้วเช็ดให้แห้ง หยดน้ำกลั่นลงบนแผ่นสไลด์ ใช้ลูปป้ายโคโคไนซ์ของแบคทีเรีย *Proteus vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงใหม่ ๆ (ประมาณ 12-18 ชั่วโมง) มาสเมียร์บนสไลด์ให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ ปล่อยให้แห้ง ระวังอย่าใช้ความร้อน เพราะแฟลกเจลลาจะถูกทำลายได้
2. ย้อมด้วย Flagella stain นาน 8-10 นาที และล้างออกด้วยน้ำประปาที่ไหลรินเบา ๆ แล้วใช้ทิชชูเช็ดด้านหลังสไลด์และเป่าสไลด์ด้านหน้าที่มีแบคทีเรียด้วยพัดลมให้แห้ง

3. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า บันทึกผลจำนวนและลักษณะการติดสีของแฟลกเจลลาและเซลล์ของแบคทีเรีย เซลล์แบคทีเรียจะติดสีฟ้าเข้ม ส่วนแฟลกเจลลาจะติดสีแดง

**ผลการทดลอง**

รูปร่างลักษณะที่เห็น	การติดสี

**วิจารณ์และสรุป**

.....

.....

.....

**ข้อเสนอแนะ**

.....

.....

.....

**การทดลองที่ 5**

**การย้อมสี Cell wall stain**

**อุปกรณ์**

1. ลูป (inoculating loop)
2. สไลด์
3. ตะเกียงบุนเส้น
4. 5% tannic acid และ 0.5% crystal violet
5. ชุดอุปกรณ์ในการย้อมสี



6. แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* บนผิวแข็งของอาหารแข็งอายุ 24 ชั่วโมง
7. กล้องจุลทรรศน์

### วิธีการ

1. ล้างสไลด์ให้สะอาดแล้วเช็ดให้แห้ง หยดน้ำกลั่นลงบนแผ่นสไลด์ ใช้รูปลายโคโลนีของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* มาสเมียร์บนสไลด์ให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ ปล่อยให้แห้ง
2. แช่สไลด์ใน 5% tannic acid นาน 30-60 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา
2. ย้อมด้วย 0.5% crystal violet นาน 2 นาที และล้างออกด้วยน้ำประปาที่ไหลรินเบา ๆ แล้วใช้ทิชชูเช็ดด้านหลังสไลด์และเป่าสไลด์ด้านหน้าที่มีแบคทีเรียด้วยพัดลมให้แห้ง
3. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า บันทึกผลการติดสีของผนังเซลล์และเซลล์แบคทีเรีย ผนังเซลล์จะไม่ติดสี ส่วนเซลล์แบคทีเรียจะติดสีน้ำเงินอมม่วงของ crystal violet

### ผลการทดลอง

รูปร่างลักษณะที่เห็น	การติดสี

### วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

### ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....