บทที่ 3 เทคนิคในการศึกษาแบคทีเรีย

การเตรียมวัสดุเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

การเตรียมตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์เพื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงธรรมดา อาจกระทำได้ 2 วิธี คือ เลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาพของเหลวเพื่อทำสไลด์สดหรือหยดแขวน และอีกวิธีหนึ่งโดยการทำให้เซลล์แห้งตรึงติดอยู่กับที่ และย้อมสีเพื่อให้เห็นความแตกต่างได้

เทคนิคการเตรียมสไลด์สดและการทำหยดแขวน

วิธีนี้จะช่วยให้มองเห็นจุลินทรีย์ในสภาพธรรมชาติจริง ๆ โดยที่จุลินทรีย์จะลอยอยู่ในของเหลว

การเตรียมสไลด์สด

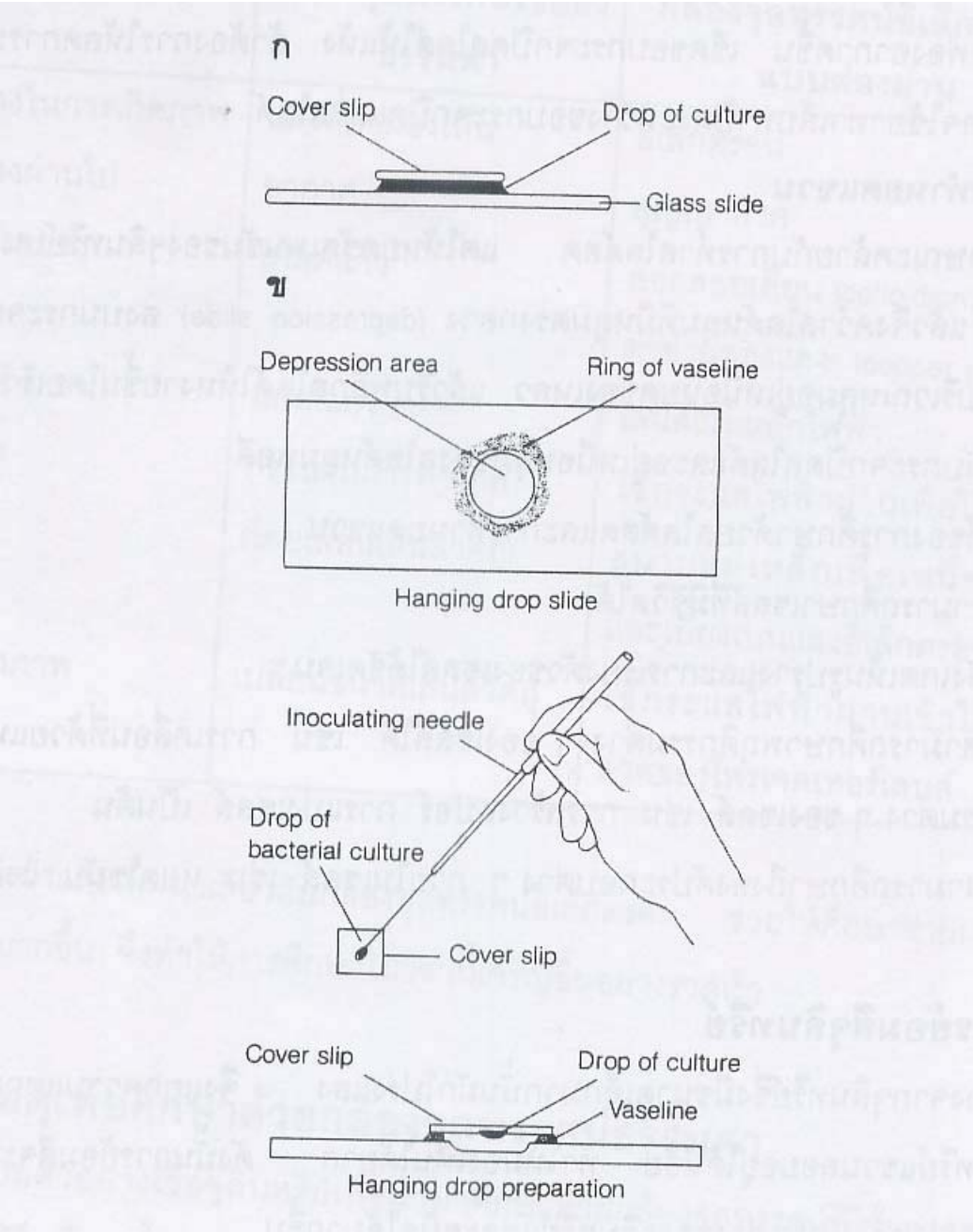
โดยหยดของเหลวที่มีจุลินทรีย์บนแผ่นแก้วสไลด์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยค่อย ๆ วางกระจกปิดให้ด้านหนึ่งสัมผัสกับหยดของเหลว แล้วค่อย ๆ ปล่อยกระจกปิดลงช้า เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้น เช็ดชอบกระจกปิดสไลด์ให้แห้ง ถ้าต้องการให้ลดการระเหยของของเหลว อาจใช้ยาทาเล็บทาปิดระหว่างขอบกระจกปิดและสไลด์

การทำหยดแขวน

มีลักษณะคล้ายกับการทำสไลด์สด แต่ให้หยดซัสเพนชันของจุลินทรีย์บนกระจกปิดสไลด์ก่อน แล้วจึงคว่ำสไลด์หลุมที่มีหลุมตรงกลาง (depression slide) ลงบนกระจกปิด กะประมาณให้บริเวณหลุมอยู่เหนือของเหลว แล้วรีบพลิกสไลด์ให้หงายขึ้นโดยเร็ว หยดเชื้อจะแขวนอยู่กับกระจกปิดสไลด์และอยู่เหนือหลุมของสไลด์หลุมพอดี

ข้อดีของการศึกษาด้วยสไลด์สดและการทำหยดแขวน

1. สามารถศึกษาเซลล์ที่มีชีวิตได้
2. สังเกตเห็นรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ได้ชัดเจน
3. สามารถศึกษาพฤติกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ได้ เช่น การเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา ศึกษากิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น การสร้างสปอร์ การแบ่งเซลล์ เป็นต้น
4. สามารถศึกษาถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น หยดไขมัน แวคิวโอล



รูปที่ 2.12 เทคนิคการทำสไลด์หยดแขวน

(ก) การทำสไลด์ โดยหยดของเหลวที่มีจุลินทรีย์บนสไลด์ที่สะอาด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

(ข) การทำงานหยดแขวน โดยหยดซัสเพนชันเชื้อบนกระจกปิดสไลด์ ส่วนสไลด์หลุมทาวาสลินรอบ ๆ หลุม และนำกระจกปิดสไลด์ไปคว่ำบนสไลด์หลุม

การย้อมสีจุลินทรีย์

เนื่องจากจุลินทรีย์ซึ่งมีขนาดเล็กมากนั้นมักโปร่งแสง จึงแยกความแตกต่างกับของเหลวที่จุลินทรีย์แขวนลอยอยู่ได้น้อย ทำให้มองเห็นได้ยาก ดังนั้นการย้อมสีจะช่วยให้เห็นรายละเอียดและความแตกต่างของจุลินทรีย์แต่ละชนิดได้มากขึ้น

สีที่ใช้ย้อมจุลินทรีย์พวกแบคทีเรีย แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

สีที่ใช้ย้อมแบคทีเรียเป็นสีสังเคราะห์ ซึ่งมีส่วนประกอบทางเคมีและคุณสมบัติต่างกัน แต่โดยทั่วไปแล้วแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

ก. acid dyes หรือ anionic dyes สีชนิดนี้ตัวทำให้เกิดสีมีประจุไฟฟ้าเป็นลบ (anion) จึงย้อมติดได้กับสารที่มีประจุไฟฟ้าบวก (cation) สีนี้ใช้ย้อมไซโตปลาสซึม เช่น eosin (สีนี้จะใช้ในรูปของเกลือ sodium eosinate)

ข. basic dyes หรือ cationic dyes สีชนิดนี้ตัวทำให้เกิดสีมีประจุไฟฟ้าเป็นบวก จึงย้อมติดได้ดีกับสารที่มีประจุไฟฟ้าเป็นลบ สีนี้ใช้ย้อมนิวเคลียสและโครมาติน เช่น methylene blue (สีนี้จะใช้ในรูปของ methylene blue chloride)

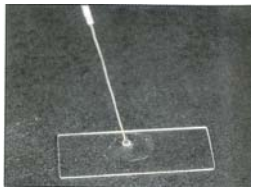
กระบวนการติดสีย้อมของเซลล์แบคทีเรียเป็นปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนประจุไฟฟ้า (lon-exchange) ระหว่างสีกับผิวเซลล์หรือองค์ประกอบภายในเซลล์ นั่นคือ ประจุไฟฟ้าของสีจะเข้าแทนที่ประจุไฟฟ้าบนผิวเซลล์หรือส่วนประกอบของเซลล์ เกิดเป็นสารประกอบของเกลือและสีจะเข้าไปติดกับเซลล์ นอกจากนี้องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกของเซลล์อาจมีส่วนร่วมในการเกิดเกลือกับสารที่มีประจุไฟฟ้าเป็นบวก เช่น Na^+ หรือ K^+ เนื่องจากผิวเซลล์ของแบคทีเรียมีประจุไฟฟ้าเป็นลบ จึงทำปฏิกิริยากับสารประจุไฟฟ้าบวก เช่น (Bacterial $cell^-$) (Na^+) สีที่ใช้ย้อมแบคทีเรีย เช่น เมทิลีนบลูอยู่ในรูปของเกลือเมทิลีนบลูคลอไรด์ (MB^+ CI^-) เมื่อใช้ย้อมแบคทีเรียจะเกิดการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างสี (MB^+) กับประจุบวก (Na^+) ที่เซลล์

$$(\text{bacterial cell}^-)(Na^+) + (MB^+)(CI^-) \longrightarrow (\text{bacterial cell}^-)(MB^+) + (Na^+\ CI^-)$$

วิธีการย้อมสีแบคทีเรีย มีวิธีการที่สำคัญ 2 แบบ คือ

1. การย้อมแบบธรรมดา (simple staining)

ขั้นตอนการปฏิบัติ



1. ล้างสไลด์ด้วยสบู่ หรือผงซักฟอกให้สะอาดแล้วผึ่งลมหรือเช็ดให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ไปลนไฟเพื่อกำจัดไขมันที่ติดอยู่บนสไลด์

2. ใช้ loop แตะน้ำกลั่น แล้วนำไปแตะบนสไลด์ 1 หยด

3. เขี่ยเชื้อแบคทีเรียจาก culture slant แล้ว smear ลงบนหยดน้ำกลั่นให้เชื้อกระจายออกเป็นแผ่นฟิลม์บางๆ

4. ให้ทำ smear ของเชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งลงบนสไลด์แผ่นเดียวกันแต่อยู่คนละตำแหน่ง ปล่อยให้ smear แห้งในอากาศ (air dry) แล้วนำไป fix บนเปลวไฟ (heat fix) โดยผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง

5. เตรียม smear ของเชื้อทั้งหมดเชื้อละ 3 สไลด์ สไลด์แผ่นที่ 1 นำไปย้อมสี methylene blue สไลด์แผ่นที่ 2 นำไปย้อมสี safranin แผ่นที่ 3 นำไปย้อมสี crystal violet

6. การย้อมสี ให้หยดสีย้อมให้ท่วมบริเวณที่ smear ปล่อยไว้ประมาณ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำก็อก ซับด้วยกระดาษ โดยคว่ำสไลด์ด้านที่มีเชื้อลงบนกระดาษแล้วยกขึ้น (ห้ามรูด) ปล่อยให้สไลด์แห้ง จากนั้นตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (oil immission objective)

2. การย้อมมากกว่าหนึ่งสี (differenatial staining)

โดยการใช้สีย้อมมากกว่าหนึ่งชนิด ทำให้สีย้อมติดส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ไม่เท่ากัน จึงเห็นความแตกต่างระหว่างเซลล์หรือองค์ประกอบของเซลล์ ตัวอย่างเช่น การย้อมแบบแกรม (Gram staining) การย้อมสีแบบทนกรด (acid fast staining) การย้อมสีสปอร์ (spore staining)

2.1 การย้อมสีแบบแกรม

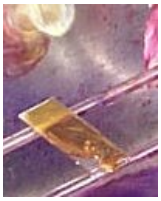
การย้อมสีวิธีนี้มีความสำคัญที่สุด และใช้กันแพร่หลาย สามารถใช้ศึกษารูปร่างลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ และทำให้จำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ วิธีการย้อมมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การเกลี่ยเชื้อ (smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบาง ๆ ไม่ให้หนาแน่นเกินไปและปล่อยให้แห้งในอากาศ (air dry)

2. การตรึงเชื้อ (fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ ทำให้หลุดออกยากขณะย้อมสี การตรึงเชื้อทำได้โดยการผ่านสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อไว้แล้วไปบนเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง

3. หยดสีคริสตัสไวโอเลต (crystal violet) บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วเทสีทิ้ง

4. หยดสารละลายลูกอลไอโอดีน (lugol's iodine) บนรอยเกลี่ยของเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง สารละลายไอโอดีนทำหน้าที่เป็นมอร์แดนต์ (mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น



5. ล้างสีออก (decolorize) ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที ล้างน้ำสะอาด ขั้นตอนการล้างน้ำนี้สำคัญมากเพราะเป็นการหยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างสี

6. หยดสีซาฟรานิน (safranin) บนรอยเกลี่ย ประมาณ 15-30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

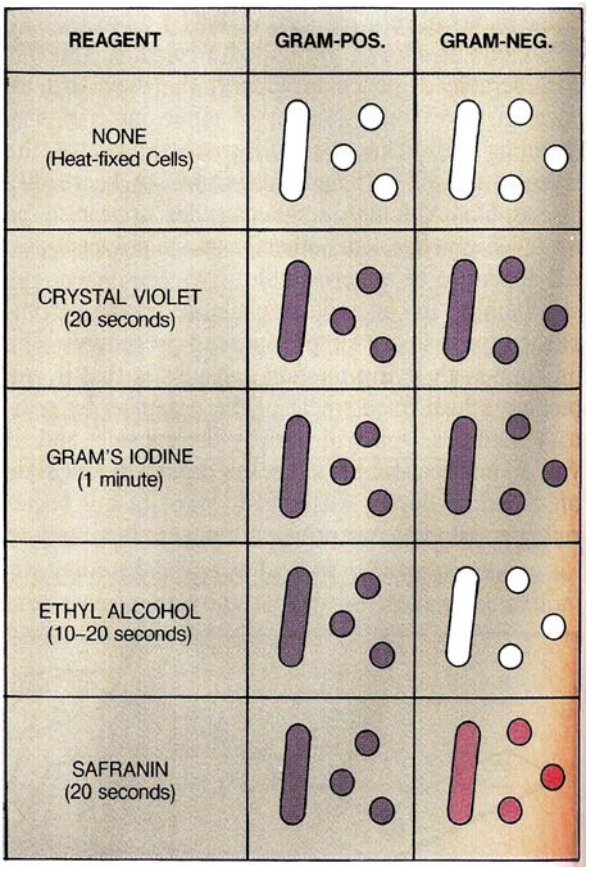
ลำดับและปฏิกิริยาการย้อมสีแบบแกรมแสดงไว้ในตารางที่ 2.2

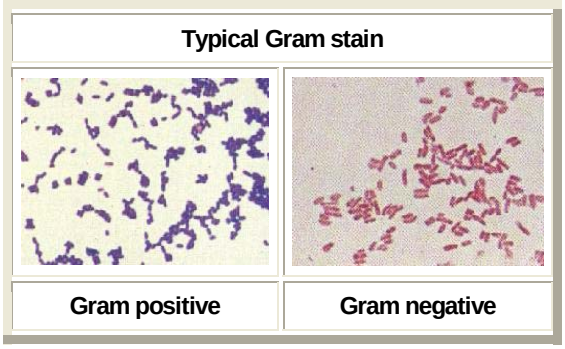
กลไกการติดสีแกรมของแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับโครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมลบจะมีสารพวกไขมันที่ผนังเซลล์มากกว่าของแบคทีเรียแกรมบวกและยังมีชั้นของผนังเซลล์บางกว่าด้วย ในกระบวนการย้อมสี เมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์ จะไปละลายไขมัน ทำให้รูเปิดของผนังเซลล์กว้างขึ้น จึงยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ของสีคริสตัล – ไวโอเลต - ไอโอดีนคอมเพล็กซ์หลุดออกมา เมื่อย้อมสีซาฟรามินจึงติดสีแดงของซาฟรานิน

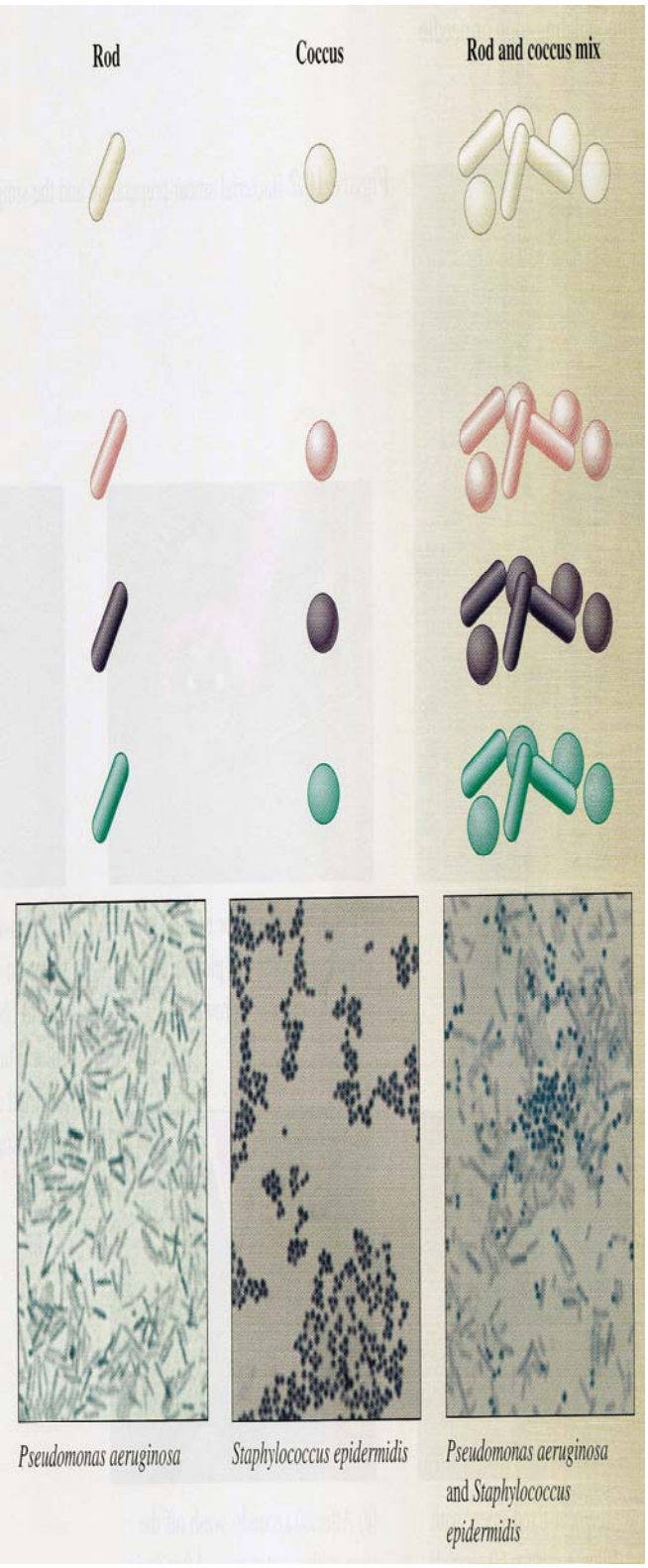
แต่ในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าและมีความซับซ้อนขององค์ประกอบที่ผนังเซลล์น้อยกว่า เมื่อล้างสีด้วยแอลกอฮอล์ เซลล์จะเหี่ยว เพราะเกิดการสูญเสียน้ำ เยื่อหุ้มเซลล์มีรูขนาดเล็กลง สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีละลายออกมาไม่ได้ เซลล์ยังคงติดสีม่วง เมื่อย้อมทับด้วยซาฟรานิน จึงย้อมไม่ติดสีแดง

ตารางที่ 2.2 แสดงลำดับและปฏิกิริยาในการย้อมสีแบบแกรม

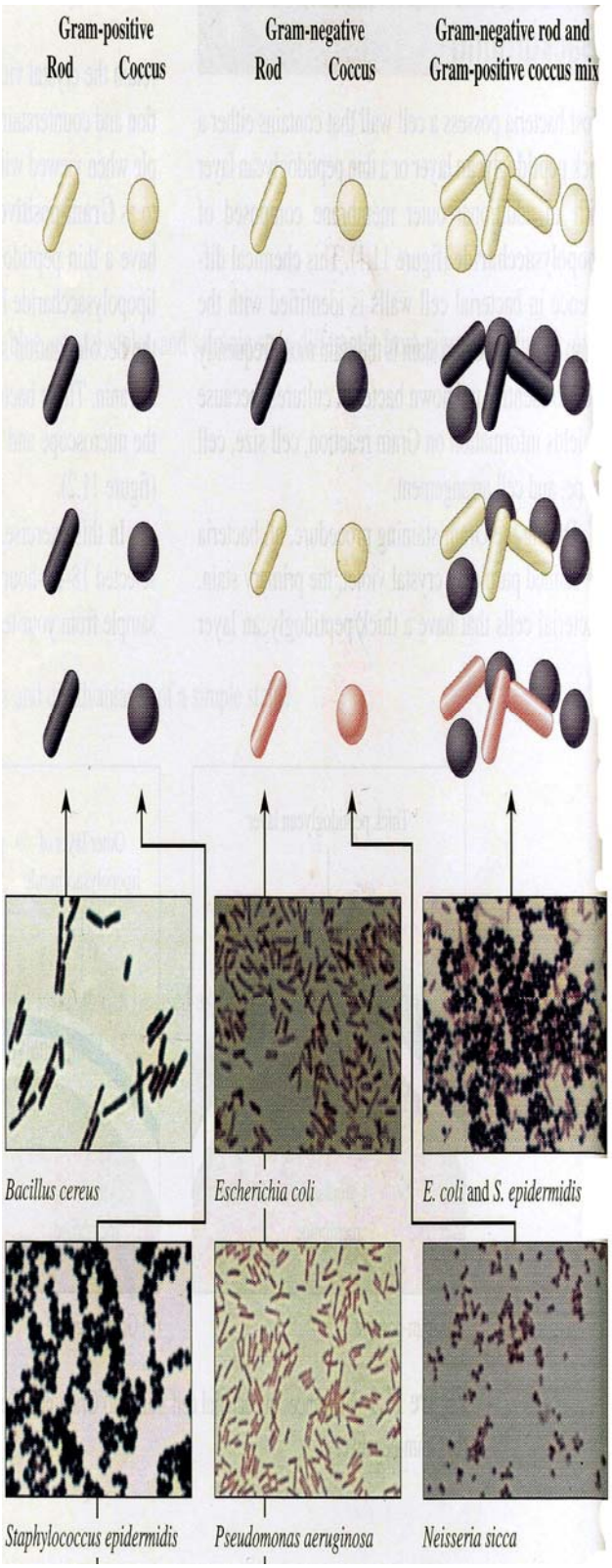
สารละลายที่ใช้	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น	
	แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ
1. คริสตัลไวโอเลต	เซลล์ติดสีม่วง	เซลล์ติดสีม่วง
2. สารละลายไอโอดีน	เกิดเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ของคริสตัลไวโอเลต - ไอโอดีนคอมเพล็กซ์ เซลล์ยังคงติดสีม่วง	เกิดเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ของคริสตัลไวโอเลต – ไอโอดีนคอมเพล็กซ์ เซลล์ยังคงติดสีม่วง
3. เอทิลแอลกฮอล์ 95%	ผนังเซลล์เกิดการสูญเสียน้ำเซลล์เหี่ยว เยื่อหุ้มเซลล์มีรูเล็กลง สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีไม่สามารถละลายออกมาได้เซลล์ยังคงติดสีม่วง	แอลกอฮอล์จะไปละลายไขมันที่ผนังเซลล์ ทำให้รูของผนังเซลล์กว้างขึ้น จึงยอมให้สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีหลุดออกมาได้
4. ซาฟรานิน	เซลล์ไม่ทำปฏิกิริยากับสีซาฟรานิน จึงติดสีม่วง	เซลล์ทำปฏิกิริยากับสีซาฟรานินติดสีแดง







Simple stain



Gram stain

บางครั้งการย้อมสีแกรม อาจมีปัญหาทำให้ผลการย้อมไม่เป็นไปตามทฤษฎี เช่น แบคทีเรียแกรมบวกในบางสภาพอาจให้ผลแตกต่างในการย้อม คือ ไม่ติดสีแกรมบวก หรืออายุของเชื้อ ถ้าเชื้อแก่แบคทีเรียบวกบางชนิดอาจสูญเสียความสามารถในการติดสีคริสตัลไวโอเลตทำให้ติดสีแกรมลบแทน หรือขึ้นกับสภาพแวดล้อมของแบคทีเรีย หรือขึ้นอยู่กับวิธีเกลี่ยเชื้อ วิธีการย้อมสี และคุณภาพของสีที่ใช้ เป็น

วิธีการย้อมสีแบบแกรม มีประโยชน์ในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็นแกรมบวกและแกรมลบ แต่สำหรับจุลินทรีย์ชนิดอื่นจะติดสีย้อมชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น เช่น ยีสต์ ติดสีแกรมบวก

2.2 การย้อมสีแบบทนกรด

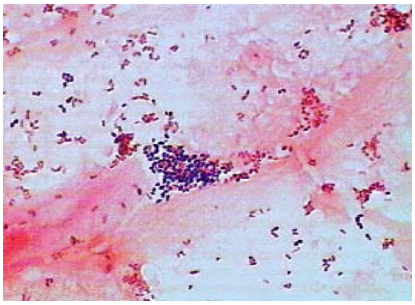
แบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถที่จะทนต่อการล้างด้วยแอลกอฮอล์เจือกรดเราเรียกแบคทีเรียที่เรียกพวกนี้ว่า แบคทีเรียทนกรด (acid-fast bacterial) ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล Mycobacterium

วิธีการย้อมสีแบบทนกรดตามวิธีของซีล-นีลเซน (Ziehl-Neelsen) จะมีการเตรียมสไลด์การเกลี่ยเชื้อ ตรึงเชื้อในลักษณะเดียวกับการย้อมสีแบบแกรม หลังจากนี้หยดสีคาร์บอนฟุตซิน (carbol fuchsin) ให้ท่วมรอยเกลี่ย นำไปผ่านไอน้ำร้อน 3-5 นาที หรือใช้เปลวไฟแกว่งลนไปมาบนรอยเกลี่ยเชื้อนาน 3 นาที เทสีทั้ง และทิ้งให้เย็น จึงล้างด้วยน้ำสะอาด หลังจากนั้นหยดแอลกอฮอล์กรด (acid alcohol) นาน 1-2 นาที หรือจนไม่มีสีละลายออกมา ล้างน้ำย้อมทับด้วยเมทิลีนบลู 1 นาที ล้างน้ำซับให้แก้ง ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลการย้อมสี แบคทีเรียที่เป็นพวกทนกรดจะติดสีแดงของคาร์บอลฟุคซิน ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นจะติดสีน้ำเงินของเมทิลีนบลู

การที่แบคทีเรียจะติดสีแบบทนกรดได้นั้น ขึ้นกับปริมาณไขมัน (wax) ที่อยู่ในเซลล์ โดยเฉพาะไขมันที่ประกอบด้วย กรดไมโคลิก (mycolic acid) ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียมีสมบัติติดสีย้อมแบบทนกรด

การย้อมสีแบบนี้ ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่เป็นสาเหตุของโรควัณโรค (tuberculosis) และเชื้อ *M. leprae* ที่เป็นสาเหตุของโรคเรื้อน (leprosy)



แบคทีเรียที่ย้อมด้วยวิธี Acid-fast

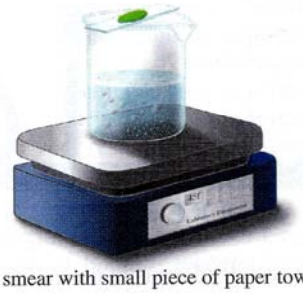
2.3 การย้อมสีสปอร์

แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* และ *Clostridium* จะมีการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ที่เรียกว่า เอนโดสปอร์ สปอร์ติดสีย้อมยาก แต่เมื่อย้อมติดแล้วก็ล้างออกยากด้วย จึงต้องใช้ความร้อนช่วยเพื่อให้ติดสีมากขึ้นและเร็วขึ้น

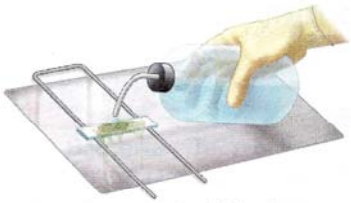
การย้อมสปอร์นิยมใช้วิธีของแซฟเฟอร์และฟลุตัน (Schaeffer and Fulton) โดยหยดสีมาลาไคท์กรีน (malachite-green) ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ วางสไลด์บนไอน้ำเดือดนานประมาณ 5 นาที คอยเติมสี ระวังอย่าให้สไลด์แห้ง เมื่อครบเวลา เทสีทิ้ง ทิ้งไว้ให้เย็น ล้างน้ำ ย้อมทับด้วยสีซาฟรานินนาน 1 นาที ล้างน้ำออก ซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลการย้อมสี พบว่าสปอร์ของแบคทีเรียจะติดสีเขียวของมาลาไคท์กรีน ส่วนเซลล์ปกติจะติดสีแดงของซาฟรานิน

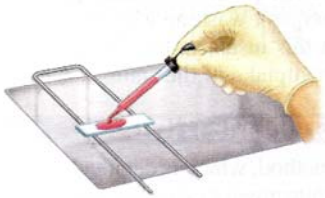
จากการย้อมสีสปอร์ ช่วยให้ศึกษาขนาดรูปร่างและตำแหน่งของสปอร์ได้ จึงสามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิด (species) ของแบคทีเรียในวงศ์แบซิลลาซี (Bacillaceae)



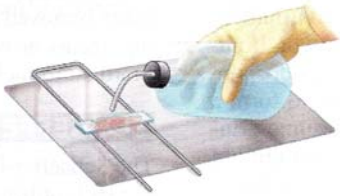
(1) Cover smear with small piece of paper toweling and saturate it with malachite green. Steam over boiling water for *5 minutes*. Add additional stain if stain boils off.



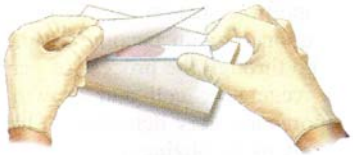
(2) After the slide has cooled sufficiently, remove the paper toweling and rinse with water for 30 seconds.



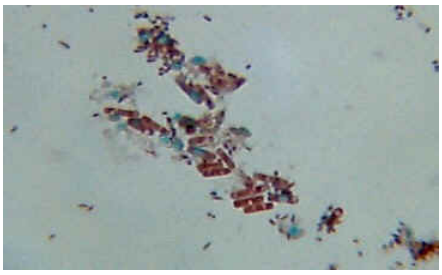
(3) Counterstain with safranin for about *20 seconds*.

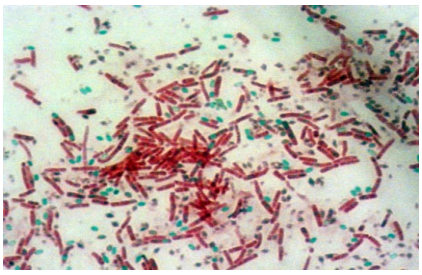


(4) Rinse briefly with water to remove safranin.



(5) Blot dry with bibulous paper, and examine slide under oil immersion.

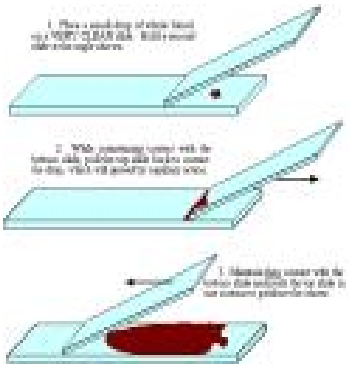


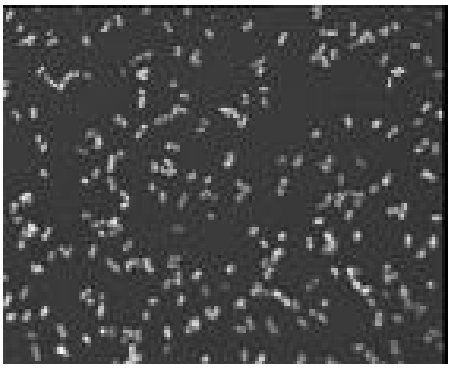


Endospore หลังการย้อมสี

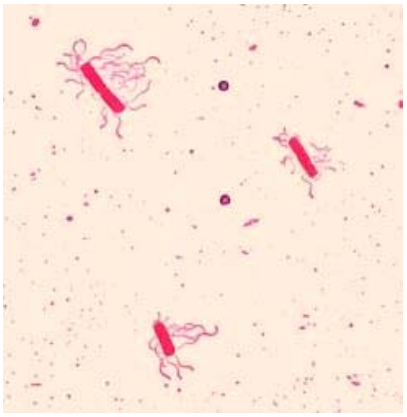
2.4 การย้อมสีโครงสร้างต่าง ๆ ในเซลล์แบคทีเรีย

โครงสร้างต่าง ๆ ของเซลล์แบคทีเรีย เช่น แฟลกเจลลา แคปซูล ซีสต์ ผนังเซลล์เม็ดแกรนูลต่าง ๆ มีวิธีการย้อมที่ต้องใช้เทคนิคพิเศษ จึงจะเห็นความแตกต่างของโครงสร้างเหล่านั้น





การย้อมสี Capsule ด้วยวิธี Indian ink



ภาพ flagella หลังการย้อมสี

2.5 การย้อมสีแบบเนกาทีฟ (negative staining)

โดยวิธีการย้อมแบบเนกาทีฟตัวเซลล์แบคทีเรียจะไม่ถูกย้อมสี แต่สีจะไปติดแน่นกับแผ่นสไลด์ จึงมองเห็นเป็นฉากมืด ส่วนตัวเซลล์แบคทีเรียจะโปร่งแสง จึงมองเห็นได้ชัด สีที่นิยมใช้ คือ สีนิโกรซิน หรือหมึกอินเดีย

วิธีนี้มีข้อดี คือ ทำให้ขนาดและรูปร่างของแบคทีเรียไม่เปลี่ยนแปลง เนื่องจากไม่มีการใช้ความร้อนซึ่งจะทำให้รูปร่างบิดเบี้ยวไปจากความเป็นจริง

สมรรถนะที่ต้องการ

1. ผู้เรียนสามารถเตรียมสไลด์สดได้
2. ผู้เรียนสามารถย้อมสีตัวอย่างจุลินทรีย์ได้

คำถามท้ายบท เทคนิคในการศึกษาแบคทีเรีย

1. การเตรียมตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์เพื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงธรรมดาอาจกระทำได้ 2 วิธี คือ

   1……

   2……...

2. acid dyes หรือ anionic dyes สีชนิดนี้ตัวทำให้เกิดสีมีประจุไฟฟ้าเป็น..... จึงย้อมติดได้กับสารที่มีประจุไฟฟ้า.....

3. lon-exchange คือ .....

4. จากข้อ 3 เกี่ยวข้องกับการย้อมสีจุลินทรีย์คือ.....

5. ในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าและมีความซับซ้อนขององค์ประกอบที่ผนังเซลล์น้อยกว่า เมื่อล้างสีด้วยแอลกอฮอล์ เซลล์จะเหี่ยว เพราะเกิดการสูญเสียน้ำ เยื่อหุ้มเซลล์มีรูขนาดเล็กลง สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีละลายออกมาไม่ได้เซลล์ยังคงติดสี..... เมื่อย้อมทับด้วยซาฟรานิน จึงย้อมไม่ติดสี.....

6. ยีสต์ ติดสีเฉพาะแกรม.....

7. การย้อมสีแบบเนกาทีฟ (negative staining)โดยวิธีการย้อมแบบเนกาทีฟตัวเซลล์แบคทีเรียจะไม่ถูกย้อมสี แต่สีจะไปติดแน่นกับแผ่นสไลด์ จึงมองเห็นเป็นฉากมืด ส่วนตัวเซลล์แบคทีเรียจะโปร่งแสง จึงมองเห็นได้ชัด สีที่นิยมใช้ คือ .....