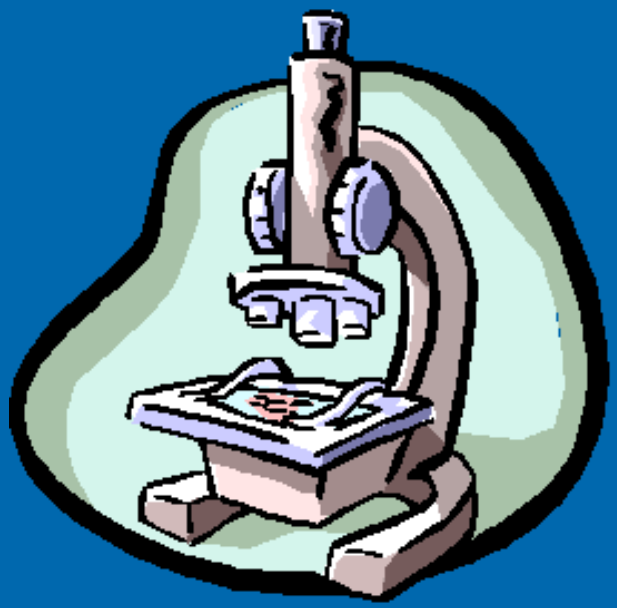


บทที่ 2

การศึกษาจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

กล้องจุลทรรศน์

- สามารถช่วยขยายให้มองเห็นรายละเอียดทั้งรูปร่างและลักษณะของเซลล์
- เนื่องจากจุลินทรีย์มีขนาดเล็กมาก หน่วยที่ใช้ในการวัดจึงแตกต่างกัน

1 ไมโครเมตร(μm) = 10^{-6} เมตร

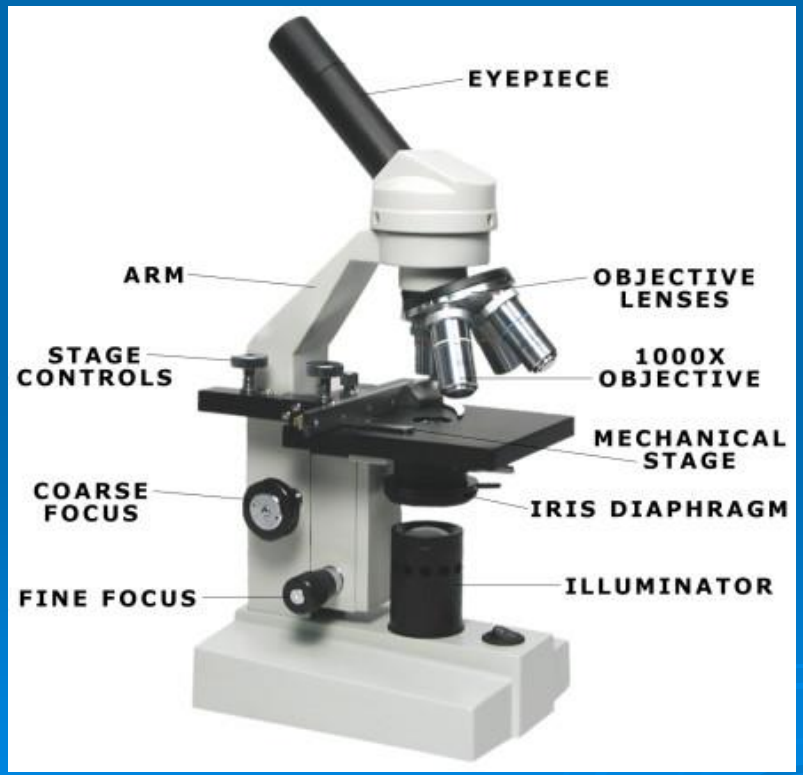
1 มิลลิเมตร(mm) = 10^{-3} เมตร

1 นาโนเมตร(nm) = 10^{-9} เมตร

1 อังสตรอม (ºA) = 10^{-10} เมตร

กล้องจุลทรรศน์(microscope)

- แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ
- กล้องแบบใช้แสงธรรมดา

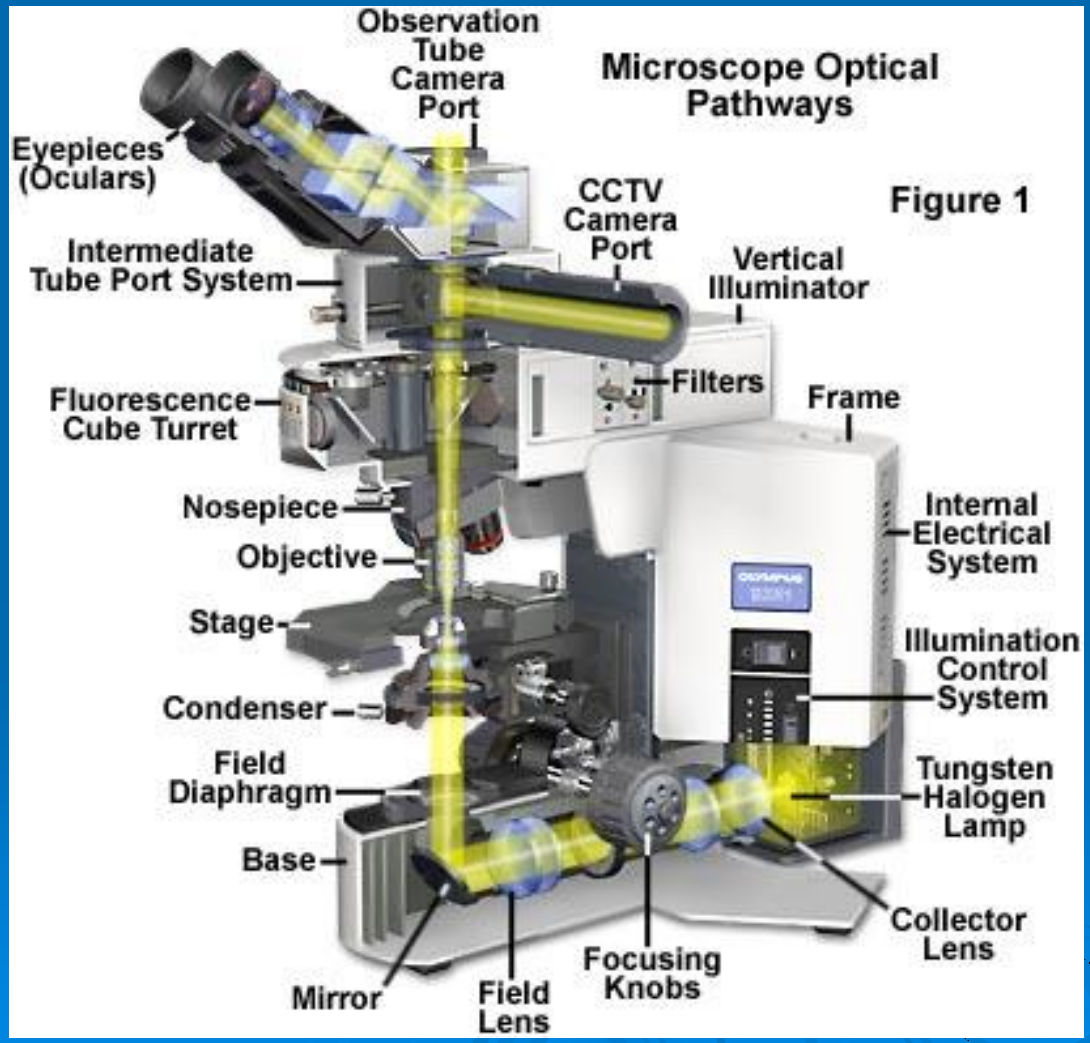


- กล้องแบบใช้แสงอิเลคตรอน

กล้องใช้แสงธรรมดา(compound microscope)

- มีเลนส์ 2 ชุดคือเลนส์วัตถุและเลนส์ตา ใช้แสงธรรมดาเป็นแหล่งกำเนิดแสง
- การขยายภาพจะเกิดจากแสงที่เดินทางจากแหล่งกำเนิดแสงผ่านคอนเดนเซอร์เลนส์(condenser lens) ซึ่งจะบังคับให้แสงตรงเข้าสู่วัตถุที่ต้องการดู แล้วแสงจึงผ่านเข้าสู่เลนส์วัตถุที่อยู่ใกล้กับวัตถุมากที่สุด ภาพของวัตถุจะถูกขยายอีกครั้งหนึ่งด้วยเลนส์ตา

การทำงานของกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง



กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์(magnification)

- ส่วนใหญ่ประกอบด้วยเลนส์วัตถุ 3 ขนาดซึ่งมีกำลังขยายต่างกันคือ
- เลนส์วัตถุชนิดที่ใช้กับน้ำมัน(กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ = 100)
- เลนส์วัตถุกำลังขยายสูง (กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ = 40)
- เลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำ (กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ = 4 และ 10)
- เลนส์ตามักมีกำลังขยายเท่ากับ 10

กำลังขยายรวมของกล้อง = กำลังขยายของเลนส์ใกล้ตา X กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ

คำถาม

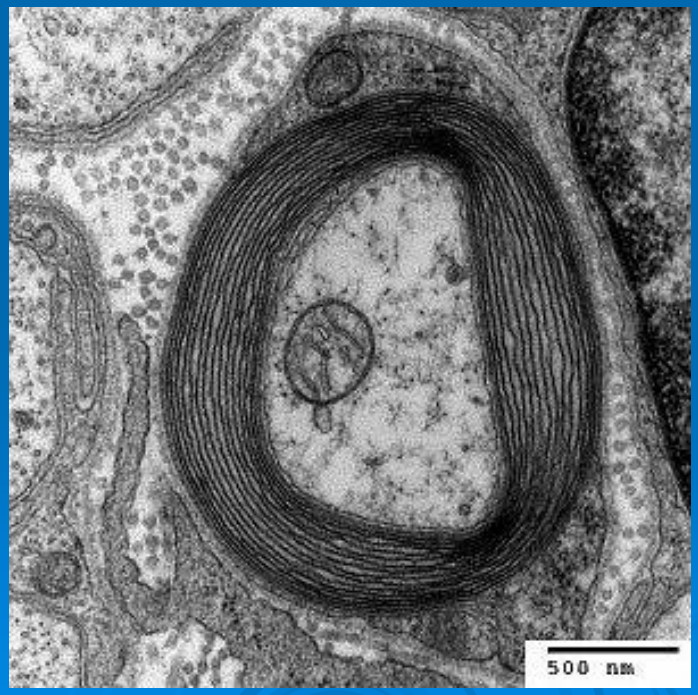
- ถ้ากำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุเท่ากับ 50 กำลังขยายของเลนส์ใกล้ตาเท่ากับ 10 กำลังขยายรวมของกล้องเท่ากับเท่าไหร่

กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน(electron microscope)

- ข้อแตกต่างจากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาคือ
- กำลังขยายสูงมาก มากกว่าแบบธรรมดาหลายร้อยเท่า
- มีความยาวคลื่นอิเลคตรอนสั้นมาก คือ 0.05 อังสตรอม จึงสามารถแยกแยะรายละเอียดของวัตถุที่เล็กขนาด 10 ^{o}A ได้ และสามารถขยายภาพได้ถึง 400,000 เท่า
- ในการเกิดภาพจะใช้สนามแม่เหล็กไฟฟ้า และตัวอย่างที่เตรียมต้องบางและแห้งมากๆ

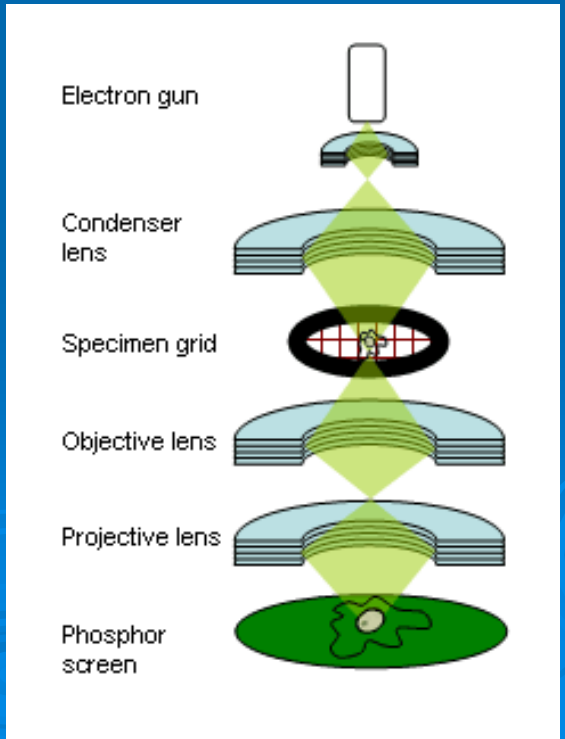
กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope,(TEM))

- ใช้เพื่อศึกษาโครงสร้างภายในและรายละเอียดขององค์ประกอบภายในตัวอย่าง และยังสามารถศึกษารูปร่าง ขนาด และลักษณะภายนอกของตัวอย่างแบบ 2 มิติได้



หลักการทำงานของ TEM

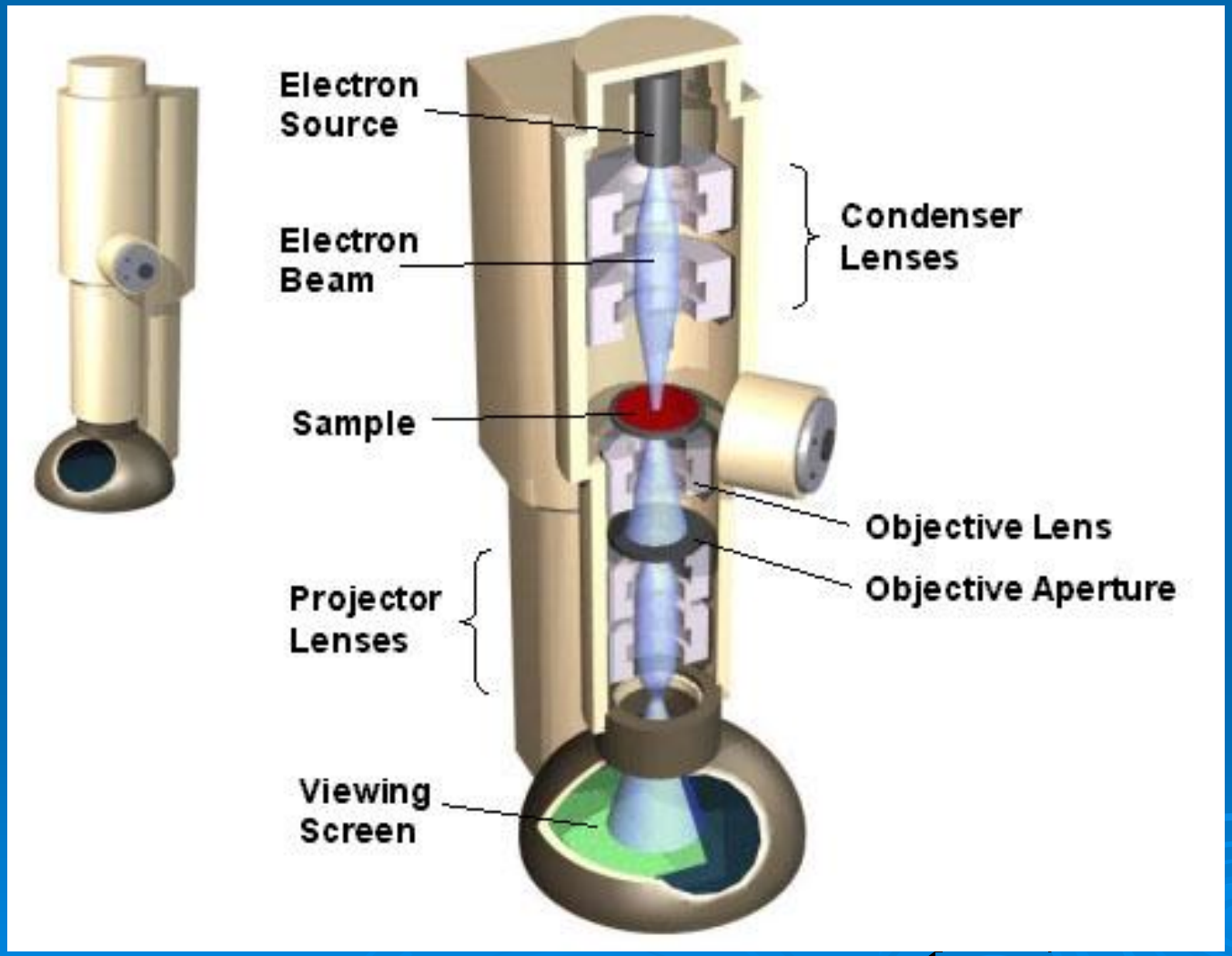
- ลำแสงอิเล็กตรอนจากแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน จะถูกรวบรวมและปรับแสงให้มีความเข้มจนเป็นลำ เพื่อให้ผ่านตัวอย่างที่ตัดเป็นชิ้นบางมากๆ
- การโฟกัสลำแสงอิเล็กตรอนให้เป็นเส้นตรงตกลงบนตัวอย่างชิ้นเล็กๆ โดยอาศัยคอนเดนเซอร์เลนส์ซึ่งเป็นเลนส์แม่เหล็กไฟฟ้า
- ระบบเลนส์ทั้งหมดเป็นเลนส์แม่เหล็กไฟฟ้าทั้งสิ้น ควบคุมระบบแสง การโฟกัสภาพ การขยายภาพ



หลักการทำงานของ TEM

- ชิ้นตัวอย่างจะต้องวางไว้บนแผ่นตาข่ายทองแดง
- เมื่อลำแสงอิเล็คตรอนผ่านตัวอย่างจะผ่านออพเจคทีฟเลนส์ ซึ่งเป็นเลนส์ที่สำคัญที่สุด เพราะขยายและปรับโฟกัสภาพให้ได้รายละเอียดได้มากที่สุด
- หลังจากนั้นโปรเจคเตอร์เลนส์จะขยายภาพอีกต่อหนึ่ง และปรับจุดโฟกัสของแสงอิเล็กตรอนให้ยาวพอที่จะตกบนฉากเรืองแสง (fluorescent screen) และฟิลม์บันทึกภาพ

ภาพกล้อง TEM


Electron Source
Electron Beam
Sample
Condenser Lenses
Objective Lens
Objective Aperture
Projector Lenses
Viewing Screen

กล้อง TEM

- ข้อดี
- มีค่าความละเอียดสูงมากจึงขยายภาพของวัตถุได้มากถึงแสนเท่าได้

- ข้อเสีย
- ลำแสงอิเล็กตรอนมีอำนาจทะลุทะลวงได้จำกัด จึงต้องใช้ชิ้นตัวอย่างที่บางมาก (60-90 นาโนเมตร)
- ไม่สามารถเห็นภาพ 3 มิติได้
- ตัวอย่างต้องผ่านการตรึง ดูดน้ำออก ส่องในสภาพสุญญากาศ เพื่อควบคุมลำแสงอิเล็คตรอน
- เป็นการฆ่าตัวอย่าง และทำให้มีรูปร่างเหี่ยวย่น เสียรูปทรงด้วย

กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope,SEM)

- ข้อดี
- ไม่ต้องตัดชิ้นตัวอย่างให้บางมากๆ และสามารถมองเห็นภาพ 3 มิติได้
- ใช้ศึกษาสัณฐานและลักษณะของผิวตัวอย่าง

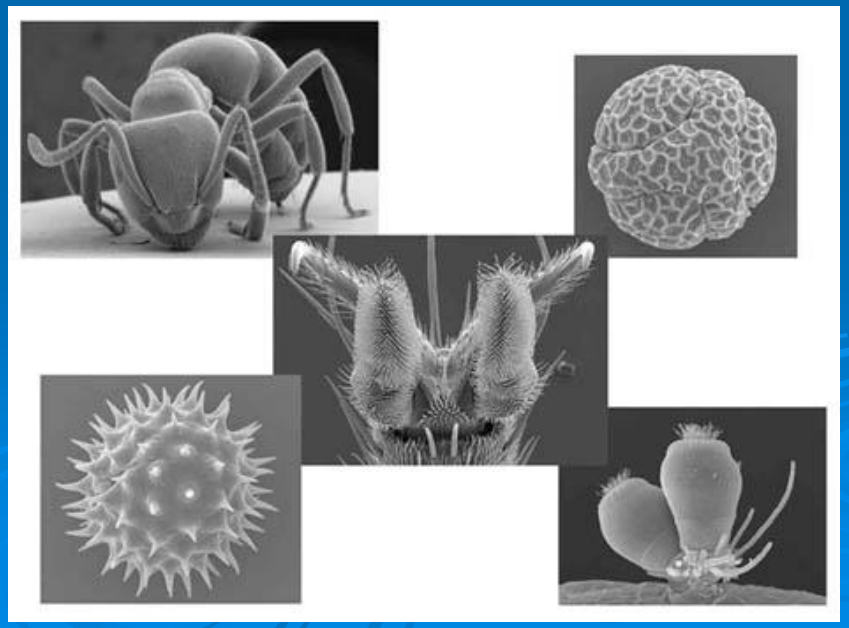
- ข้อเสีย
- กำลังขยายที่ได้ไม่สูงเท่ากับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การทำงานของกล้อง SEM

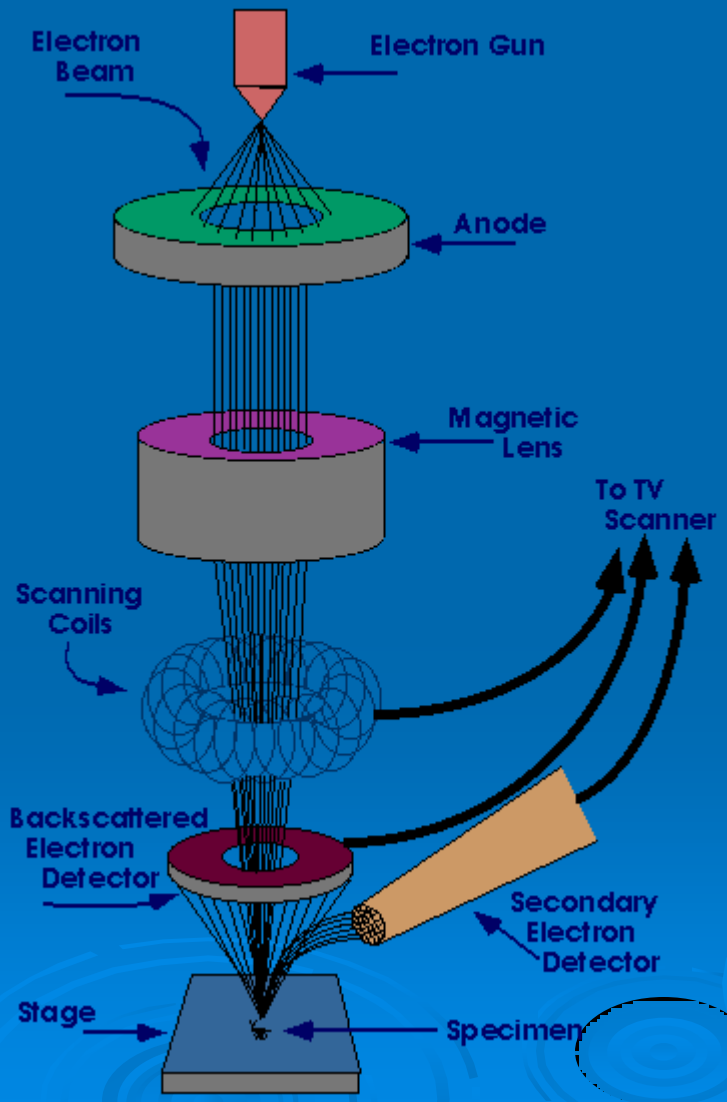
- ระบบแสงและสุญญากาศ จะเหมือนกล้อง TEM
- ระบบการเกิดภาพเป็นการส่งสัญญาณคลื่น โดยแสงอิเล็กตรอนจะถูกโฟกัสให้เป็นลำอิเล็คตรอนเรียกว่า primary electron beam
- อิเล็คตรอนนั้นเคลื่อนผ่านเลาส์แม่เหล็กไฟฟ้าจะถูกโฟกัสลงไปในผิวของตัวอย่าง และถูกควบคุมให้เคลื่อนที่ไปตามบริเวณที่ต้องการศึกษาด้วยระบบกวาดภาพ(scan)

การทำงานของกล้อง SEM

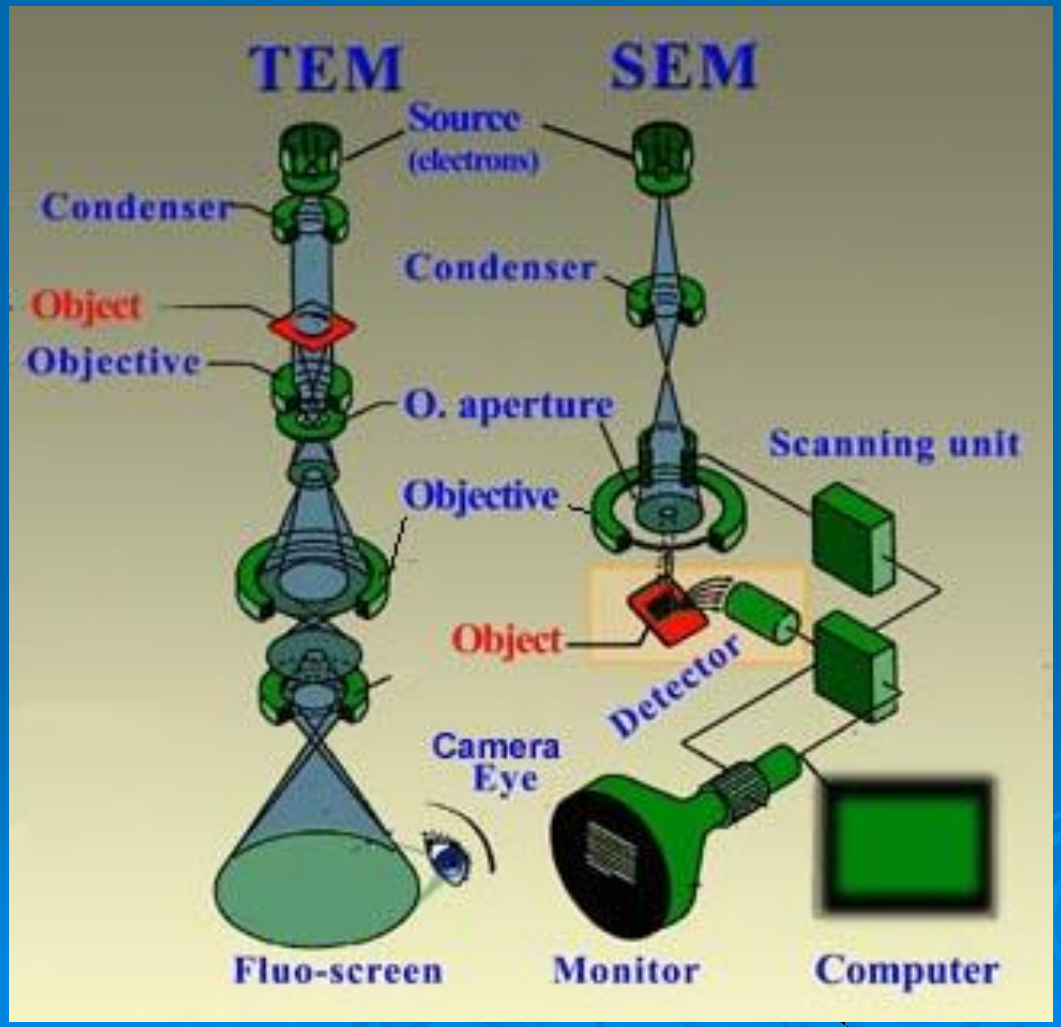
- แสงอิเล็คตรอนที่ไปกระทบตัวอย่างจะทำให้อิเล็คตรอนของตัวอย่างหลุดออกมาเป็น secondary electron ซึ่งสะท้อนไปยังเครื่องรวบรวมอิเล็คตรอน และจะจับสัญญาณได้
- แล้วขยายสัญญาณให้มากขึ้นเพื่อแปรเป็นภาพที่หลอดแคโทด ที่จอโทรทัศน์ การบันทึกภาพ สามารถบันทึกผ่านหน้าจอได้เลย



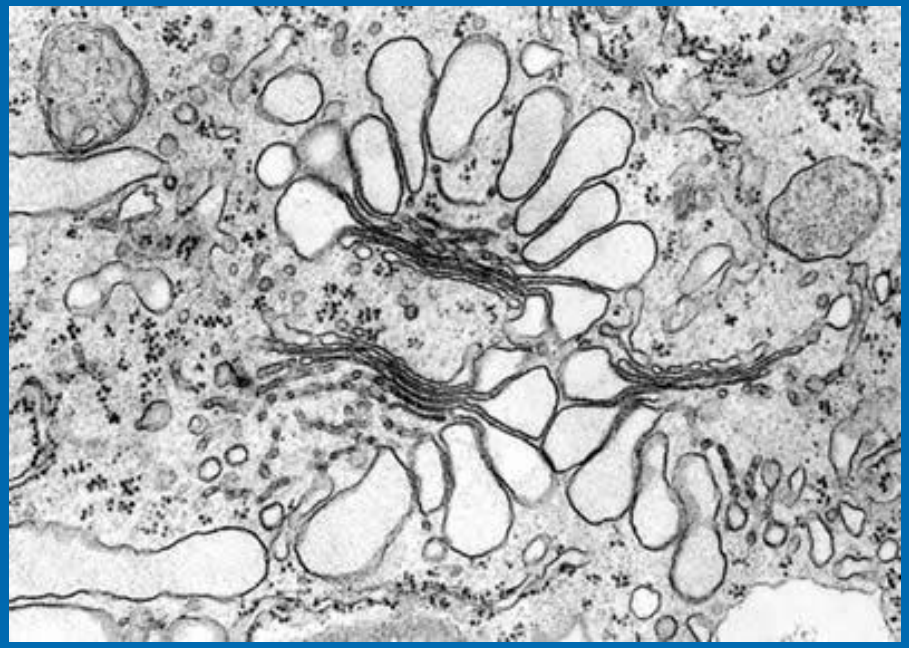
กล้อง SEM


Electron Beam
Electron Gun
Anode
Magnetic Lens
To TV Scanner
Scanning Coils
Backscattered Electron Detector
Secondary Electron Detector
Stage
Specimen

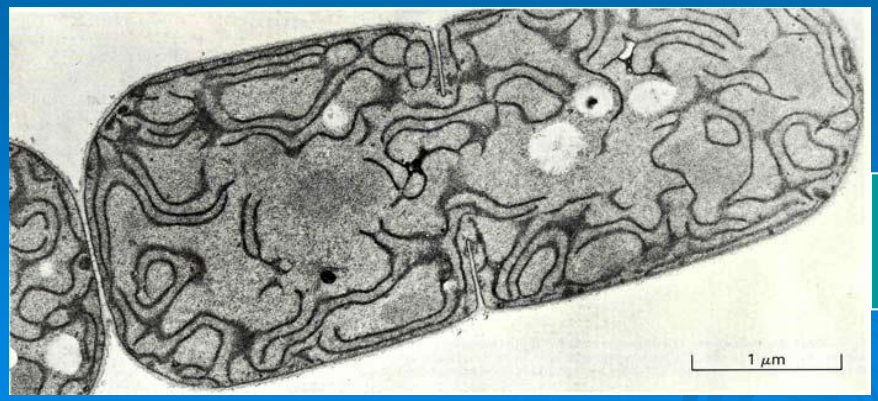
เปรียบเทียบการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ แบบ SEM และ TEM



ภาพจาก SEM และ TEM



SEM▲



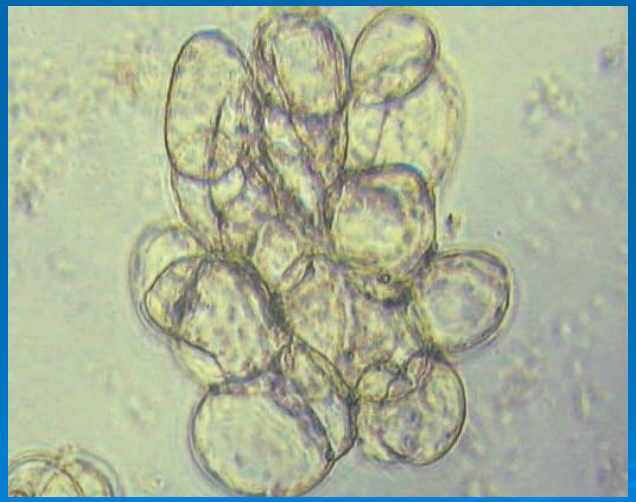
◄TEM

ความแตกต่างระหว่างกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดากับกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน

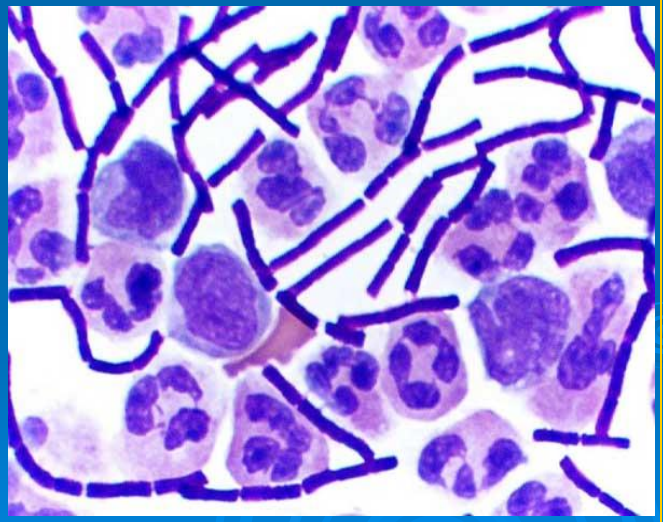
สมบัติ	กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดา	TEM
แหล่งของแสงในการเกิดภาพ	แสงที่ตามองเห็น	อิเล็คตรอน
ตัวกลางที่แสงผ่านไป	อากาศ	สุญญากาศ
วัสดุรองรับตัวอย่าง	สไลด์แก้ว	ตาข่ายทองแดง
ชนิดของเลนส์	เลนส์แก้ว	เลนส์แม่เหล็กไฟฟ้า
การโฟกัสภาพ	โดยเลื่อนเลนส์วัตถุ	ใช้กระแสไฟฟ้าผ่านเพื่อให้เกิดสนามแม่เหล็กเพื่อเหนี่ยวนำให้เบี่ยงเบนแสงอิเล็คตรอน
กำลังขยายของภาพ	เปลี่ยนเลนส์วัตถุ	ใช้กระแสไฟฟ้าผ่านเข้าขดลวดของโปรเจคเตอร์เลนส์

การเตรียมวัสดุเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

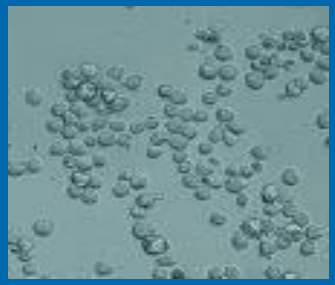
- เลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาพของเหลวเพื่อทำสไลด์สดหรือหยดแขวน



- ทำให้เซลล์แห้งตรึงติดอยู่กับที่ และย้อมสีเพื่อให้เห็นความแตกต่างได้

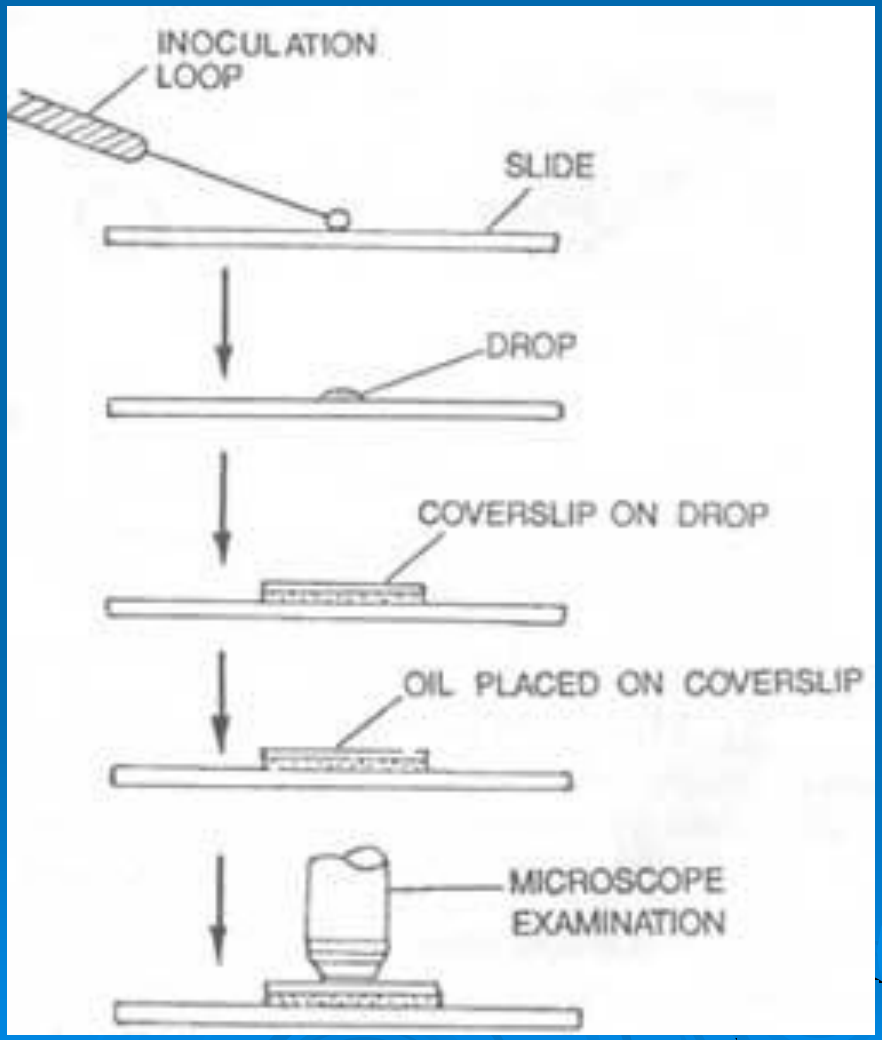


การทำสไลด์สด



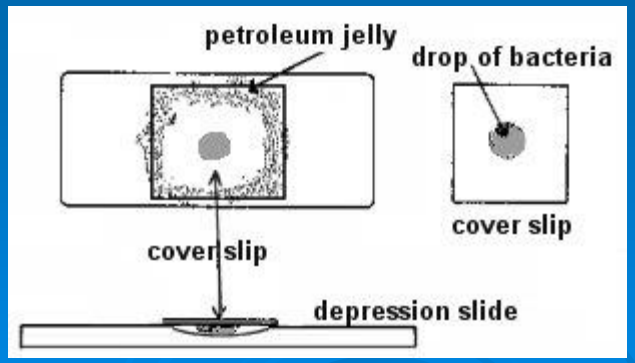
- ช่วยให้มองเห็นจุลินทรีย์ในสภาพจริงๆ โดยจุลินทรีย์จะลอยบนของเหลว
- หยดของเหลวที่มีจุลินทรีย์บนแผ่นแก้วสไลด์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์
- ค่อยๆวางกระจกปิดให้ด้านหนึ่งสัมผัสกับหยดของเหลว แล้วค่อยๆ ปล่อยกระจกปิดลงช้าๆ เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้น เช็ดขอบกระจกปิดสไลด์ให้แห้ง อาจใช้น้ำยาทาเล็บทาปิดกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันน้ำระเหย

วิธีการทำสไลด์สด

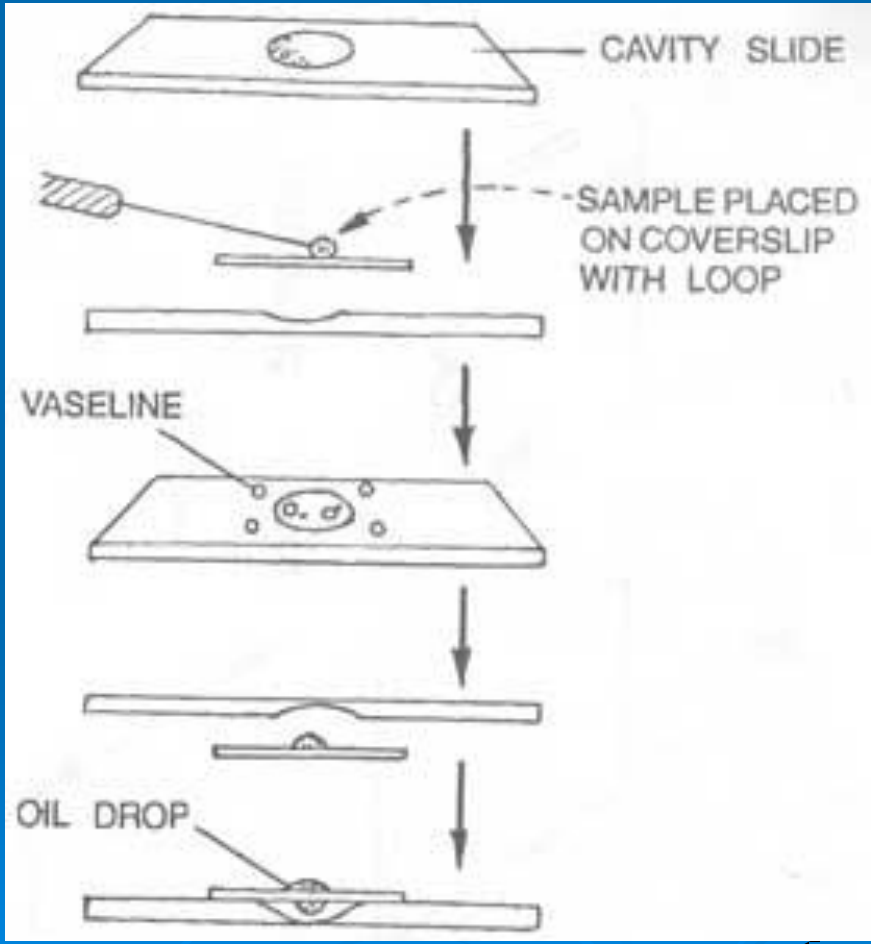


การทำหยดแขวน

- ทำคล้านสไลด์สด แต่ให้หยดของน้ำจุลินทรีย์บนกระจกปิดสไลด์ก่อน
- แล้วคว่ำสไลด์ที่มีหลุมตรงกลาง ลงบนกระจกปิด กะประมาณให้บริเวณหลุมอยู่เหนือหยดของเหลว
- แล้วรีบพลิกสไลด์ให้หงายขึ้นโดยเร็ว
- หยดเชื้อจะแขวนอยู่กับกระจกปิดสไลด์และอยู่เหนือหลุมของสไลด์หลุมพอดี



วิธีการทำหยดแขวน



ข้อดีของการศึกษาด้วยสไลด์สดและหยดแขวน

- สามารถศึกษาเซลล์ที่มีชีวิตได้
- สังเกตเห็นรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ได้ชัดเจน
- สามารถศึกษาพฤติกรรมต่างๆของเซลล์ได้ เช่น การเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า

- สามารถศึกษาองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ เช่น หยดไขมัน แวคคิวโอ

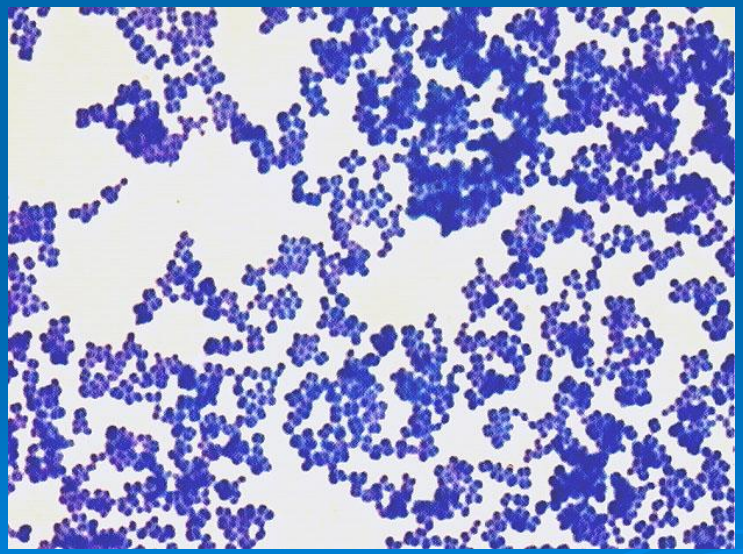
วิธีการย้อมสีแบคทีเรีย มีวิธีสำคัญ 2 แบบ คือ

- การย้อมสีแบบธรรมดา(simple staining)
- โดยใช้สีชนิดเดียวย้อมเซลล์ทิ้งไว้ระยะหนึ่ง หลังจากนั้นล้างออกด้วยน้ำและซับให้แห้ง เซลล์จะย้อมติดสีสม่ำเสมอกัน
- การย้อมนี้เพื่อศึกษารูปร่าง ขนาดของเซลล์
- ตัวอย่างสีที่ใช้คือ เมทิลีนบลู คริสตัสไวโอเลต

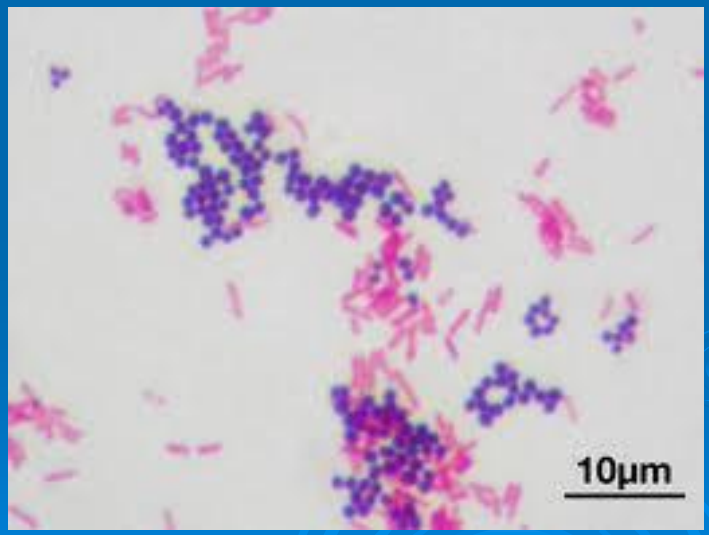
- การย้อมมากกว่า 1 สี (differential staining)
- ใช้สีย้อมมากกว่า 1 ชนิด ทำให้สีย้อมติดส่วนต่างๆของเซลล์ไม่เท่ากัน จึงเห็นความแตกต่างระหว่างเซลล์หรือองค์ประกอบของเซลล์ เช่น การย้อมสีแบบแกรม(gram staining) การย้อมสีสปอร์ (spore staining)

ภาพเปรียบเทียบ

- การย้อมสีธรรมดา



- การย้อมสีแกรม

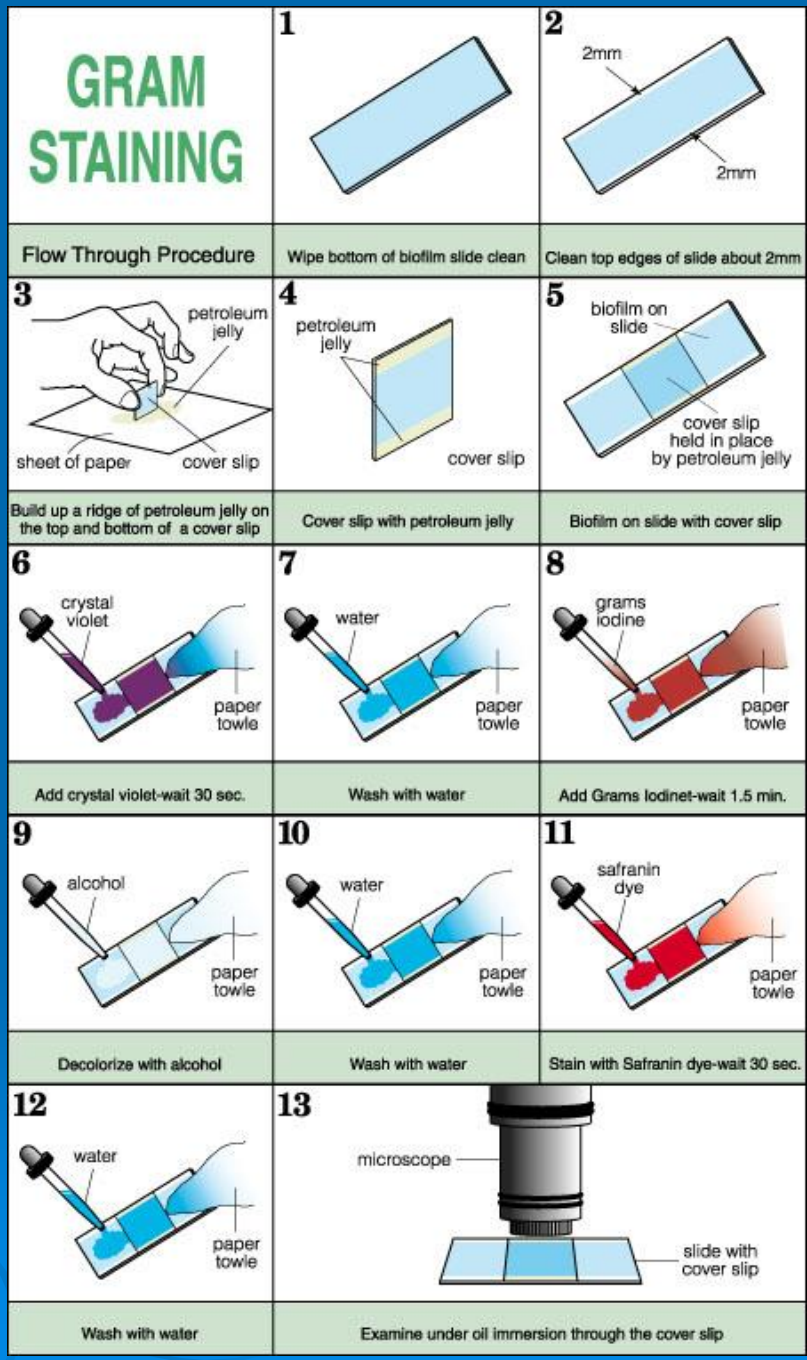


การย้อมสีแกรม

- วิธีนี้สำคัญที่สุด และใช้กันแพร่หลาย สามารถใช้ศึกษารูปร่างลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ ทำให้แยกแบคทีเรียเป็น 2 ชนิดคือ แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

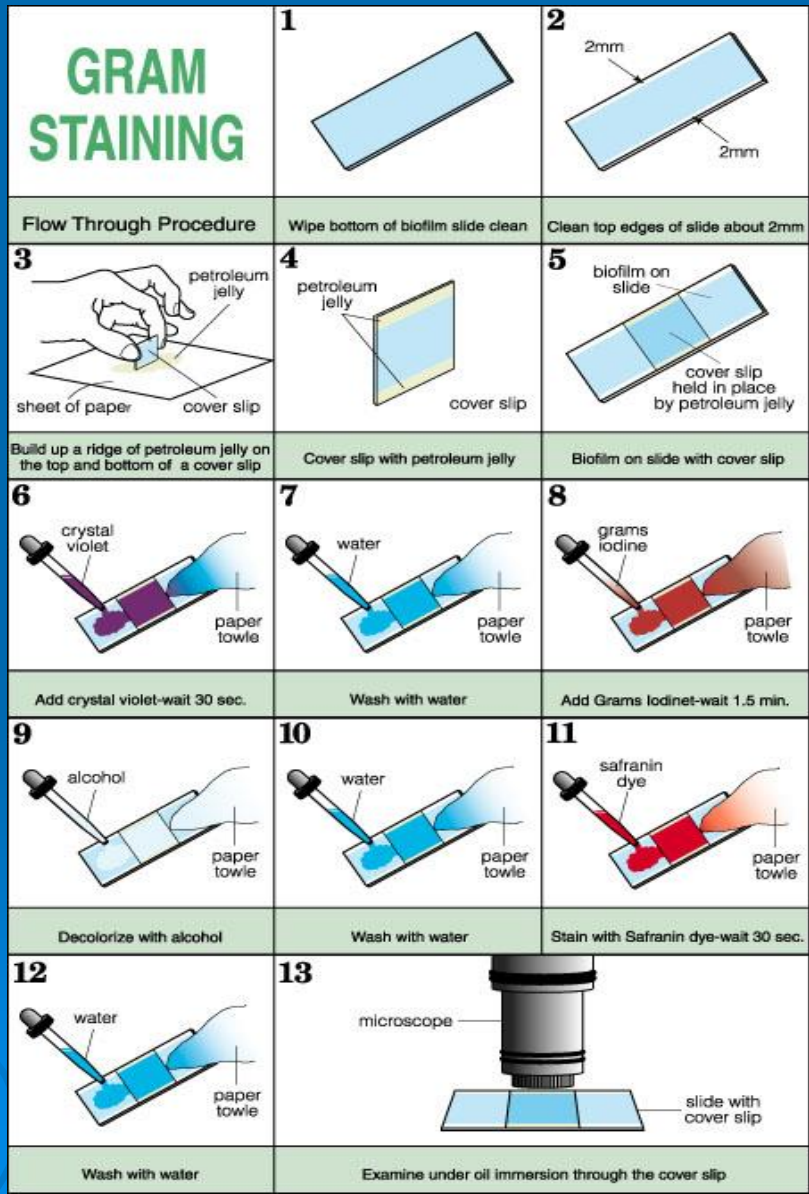
วิธีการย้อมสีแกรม

- การเกลี่ยเชื้อ(smear) บนสไลด์เป็นฟิลม์บางๆ และปล่อยให้แห้งในอากาศ
- การตรึงเชื้อ(fix)ให้แน่นติดกับสไลด์ ทำให้ไม่หลุดออกขณะย้อมสี ทำโดยผ่านสไลด์บนเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง
- หยดสีคริสตัสไวโอเลต(crystal violet) บนรอยเกลี่ยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที เทสีทิ้ง



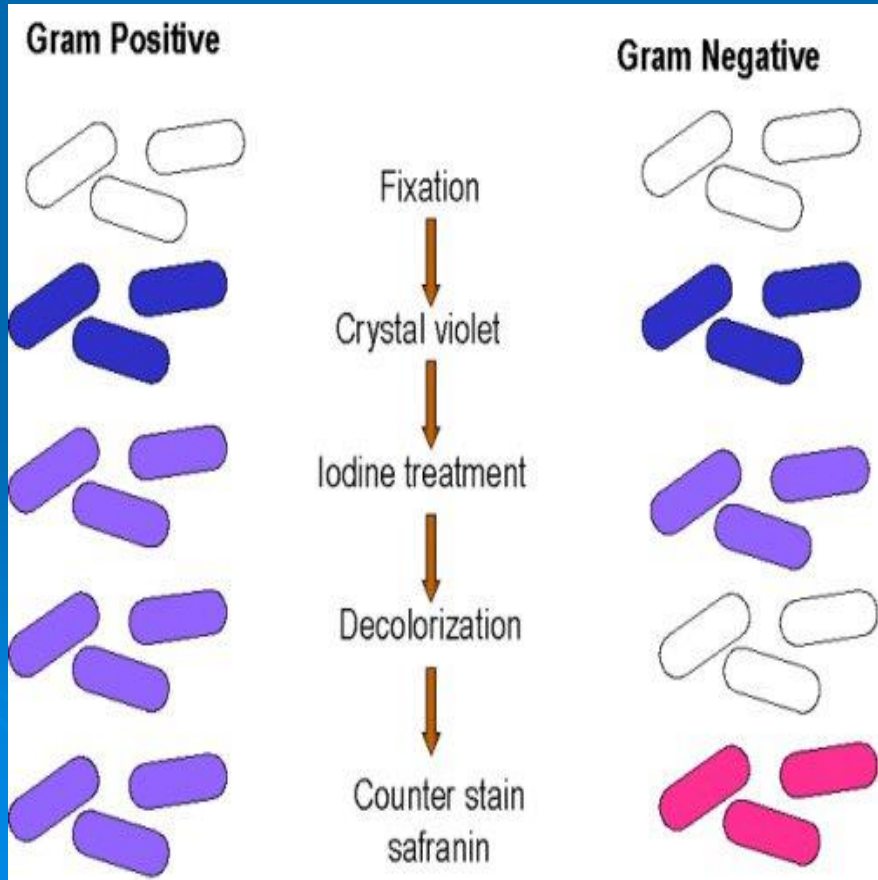
วิธีการย้อมสีแกรม

- หยดสารละลายลูกอลไอโอดีน (ligol's iodine) บนรอยเกลี่ยของเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง ไอโอดีนทำหน้าที่เป็นสารมอร์แดนต์(mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมดีขึ้น
- ล้างสีออก(decolorize)ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ 15 วินาที ล้างน้ำสะอาด(การล้างน้ำนี้สำคัญมาก เพราะเป็นการหยุดปฏิกิริยาการล้างสี)



วิธีการย้อมสีแกรม

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



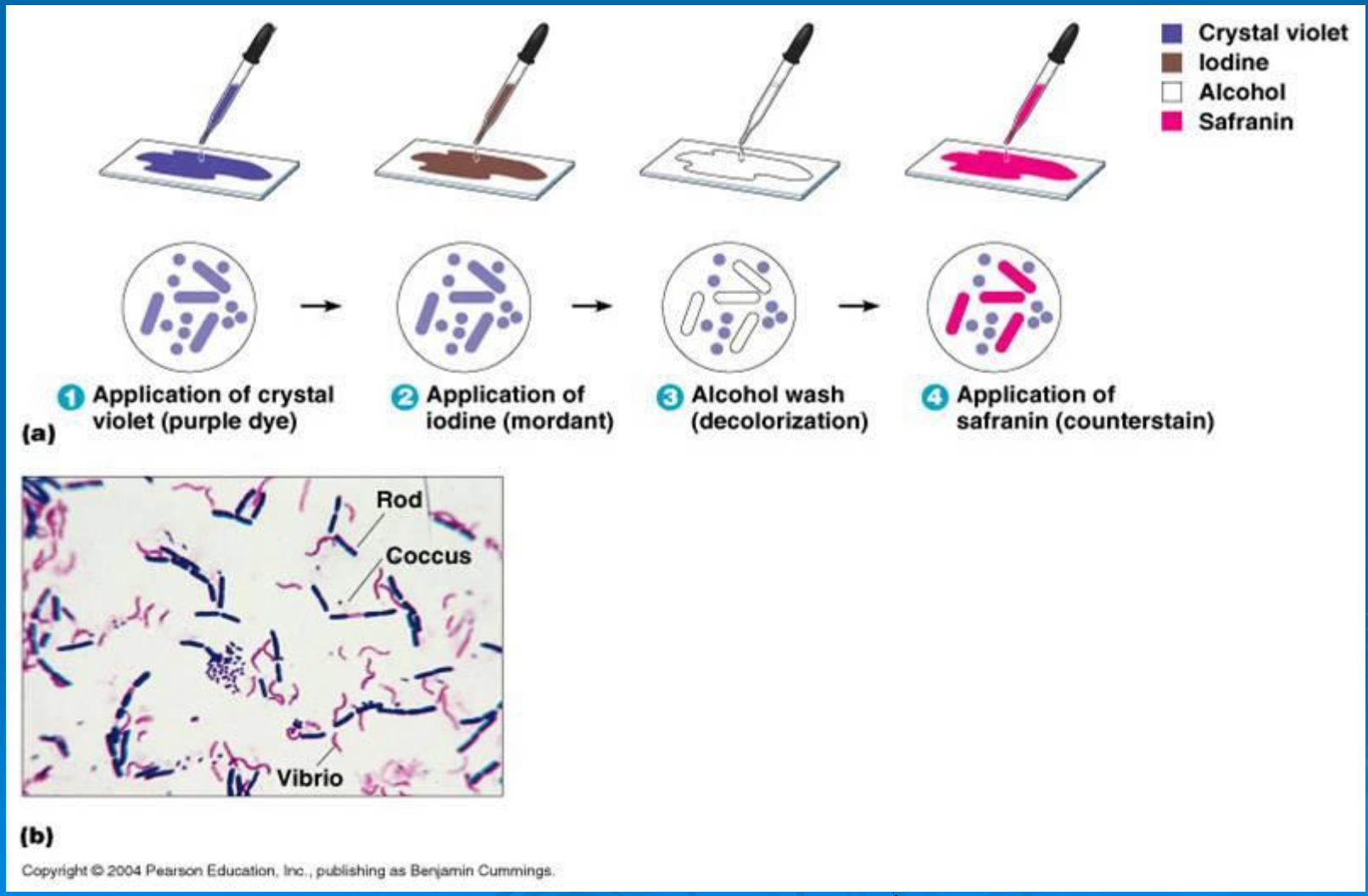
แสดงลำดับและปฏิกิริยาในการย้อมสีแบบแกรม

สารละลายที่ใช้	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น	
	แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ
1.คริสตัลไวโอเลต	เซลล์ติดสีม่วง	เซลล์ติดสีม่วง
2.สารละลายไอโอดีน	เกิดเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ของคริสตัลไวโอเลต-ไอโอดีน คอมเพล็กซ์ เซลล์ยังคงติดสีม่วง	เกิดเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ของคริสตัลไวโอเลต-ไอโอดีน คอมเพล็กซ์ เซลล์ยังคงติดสีม่วง

แสดงลำดับและปฏิกิริยาในการย้อมสีแบบแกรม

สารละลายที่ใช้	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น	
	แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ
3.เอทิลแอลกอฮอล์ 95%	ผนังเซลล์เกิดการสูญเสียน้ำ เซลล์เหี่ยว เยื่อหุ้มเซลล์มีรูเล็กลง สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีไม่สามารถละลายออกมาได้เซลล์ยังติดสีม่วง	แอลกอฮลล์ไปละลายไขมันที่ผนังเซลล์ ทำให้รูผนังเซลล์กว้างขึ้น จึงยอมให้สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีหลุดออกมาได้
4.ซาฟรานิน	เซลล์ไม่ทำปฏิกิริยากับซาฟรานิน จึงติดสีม่วง	เซลล์ทำปฏิกิริยากับซาฟรานิน จึงติดสีแดง

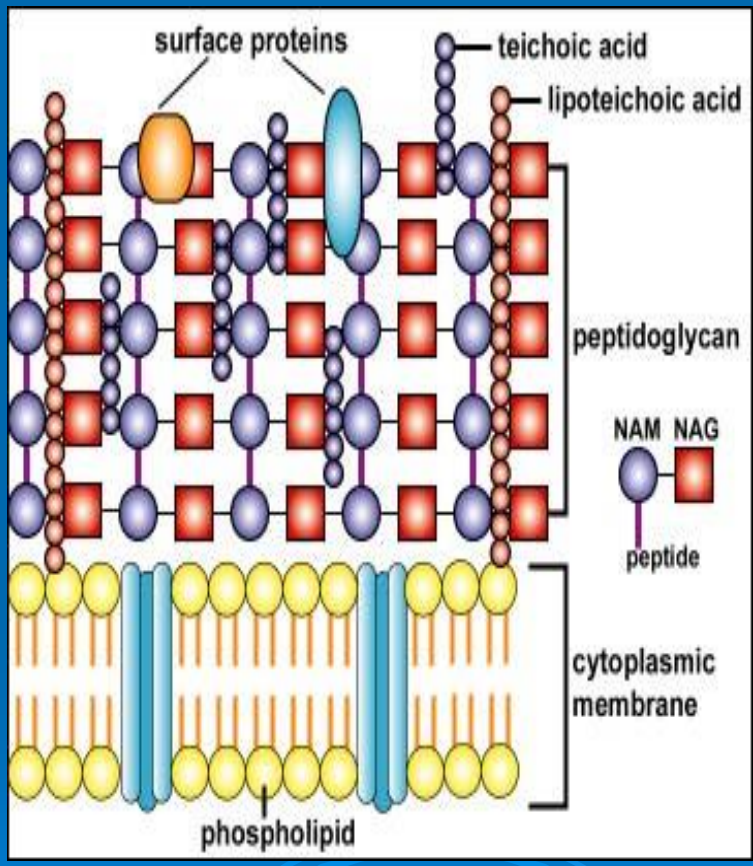
Gram staining



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

แบคทีเรียแกรมบวก

- แบคทีเรียแกรมบวกนั้น มีลักษณะของเมมเบรนที่มี peptidoglycan อยู่ชั้นนอกสุด เวลาที่ Crystal Violet ลงไปเนี่ย มันก็จะสร้าง Complex บนเมมเบรน เวลาที่ใช้ Alcohol ชะออก มันก็จะไม่หลุดไปด้วย ดังนั้นการใช้สี Safranin ย้อมอีกจึงไม่ติด สไลด์ที่ได้ก็ให้สีน้ำเงิน เรียกว่า positive result ดังนั้นจึงเรียกแบคทีเรียที่ย้อมติดสีนี้ว่า แกรมบวก



แบคทีเรียแกรมลบ

- ส่วน แบคทีเรียแกรมลบ นั้น มี outer membrane ที่เป็น Phospholipid อยู่ดังนั้น complex ของ crystal violet จึงหลุดออก เวลาที่ชะด้วย Alcohol ออก และย้อมติดด้วยสีแดงของ Safranin สไลด์ที่ได้คือสีแดง เรียกว่าให้ negative result จึงเรียก แกรมลบนั่นเอง