บทที่ 4
การตรวจสอบจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

กล้องจุลทรรศน์เป็นเครื่องมือที่สำคัญต่อการศึกษาจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการซึ่งช่วยขยายให้มองเห็นจุลินทรีย์และโครงสร้างต่าง ๆ กล้องจุลทรรศน์อาจทำให้มีกำลังขยายได้หลายขนาดตั้งแต่หลายร้อยเท่าจนถึงหลายพันเท่าของเส้นผ่าศูนย์กลาง นอกจากนี้กล้องจุลทรรศน์แบบต่าง ๆ และกลวิธีการเตรียม ตัวอย่างหลายแบบยังช่วยให้สามารถตรวจสอบจุลินทรีย์ได้รายละเอียดมากยิ่งขึ้น กล้องจุลทรรศน์แต่ละแบบและวิธีการเตรียมตัวอย่างแต่ละอย่างจะช่วยให้สามารถศึกษาถึงรูปพรรณสัณฐานเฉพาะลงไปได้ ในบทนี้จะได้ศึกษาถึงวิธีการบางอย่างของนักจุลชีววิทยาเพื่อสังเกต ขนาด รูปร่าง และลักษณะโครงสร้างของจุลินทรีย์

กล้องจุลทรรศน์

กล้องจุลทรรศน์อาจแบ่งออกได้เป็นสองพวกคือ กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างหรือเกี่ยวกับสายตาและกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอน กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างหรือกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ระบบของกระจกเลนซ์ทำให้เกิดการขยายภาพมีดังต่อไปนี้ (1) bright-field (2) dark-field (3) ultraviolet (4) fluorescence และ (5) phase-contrast microscopy ส่วนกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนใช้ลำอีเล็กตรอนแทนแสงทำให้เกิดการขยายภาพ

กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในงานประจำโดยทั่วไปคือ bright-field microscope ส่วนกล้องจุลทรรศน์แบบอื่นมักใช้เพื่อจุดประสงค์พิเศษและงานวิจัยต่าง ๆ อย่างไรก็ตามนักศึกษาควรได้คุ้นเคยกับการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบต่าง ๆ เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์แต่ละอย่างมีลักษณะเฉพาะของตนเอง

BRIGHT – FIELD MICROSCOPY

Bright-field microscope เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ทำให้มองเห็นพื้นหลังของภาพหรือพื้นที่ซึ่งมองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์ใสสว่างแต่วัตถุซึ่งต้องศึกษานั้นค่อนข้างมืดทึบจากรูปที่ 4-1 แสดงโครงสร้างและทางเดินแสงของ bright-field microscope ซึ่งทำให้เกิดการขยายภาพของวัตถุ โดยทั่วไปกล้องจุลทรรศน์แบบนี้มักถูกทำให้มีกำลังขยายซึ่งใช้ประโยชน์ได้สูงสุดประมาณ 1,000 เท่า แต่ด้วยการดัดแปลงบางอย่างเช่นใช้ระบบเลนซ์ใกล้ตา (eyepiece) ที่มีกำลังขยายสูงอาจทำให้มีกำลังขยายเพิ่มขึ้นได้อีกสองหรือสามเท่า อย่างไรก็ตามกำลังขยายซึ่งมีประโยชน์ของ bright-field microscope นั้นไม่เกิน 1,000 ถึง 2,000 เท่า

ความสามารถในการให้รายละเอียดของภาพ (Resolving Power)

นักศึกษาอาจสงสัยว่าทำไมจึงไม่สามารถทำให้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างมีกำลังขยายสูงขึ้นได้ สิ่งจำกัดพื้นฐานนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับการขยายภาพแต่ขึ้นอยู่กับความสามารถในการให้รายละเอียดของภาพหรือความสามารถในการจำแนกจุดสองจุดซึ่งชิดกันมากให้เห็นเป็นสองจุดได้ ดังนั้นการทำให้กล้องจุลทรรศน์มีกำลังขยายสูงมากอาจไม่มีประโยชน์เนื่องจากทำให้ได้ภาพซึ่งไม่ชัดเจนหรือไม่มีรายละเอียด

ความสามารถในการให้รายละเอียดของภาพจากกล้องจุลทรรศน์ขึ้นอยู่กับความยาวช่วงคลื่นของแสงที่ใช้และค่าของช่องแสง (numerical aperture) ซึ่งเป็นลักษณะของระบบเลนซ์

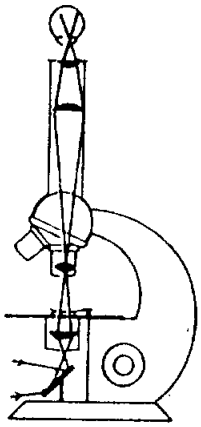
ค่าของช่องแสง (Numerical aperture) ถ้าให้ θ เป็นมุมหนึ่งของกรวยแสงซึ่งกว้างที่สุดที่พุ่งเข้าสู่ระบบเลนซ์ของอ๊อบเจ็กทีฟ (objective) เรียกว่า half-aperture angle ดังแสดงในรูปที่ 4-2 ขนาดของมุมนี้ถูกแสดงออกด้วยค่า sine ค่า sine ของมุมครึ่งหนึ่งของกรวยแสงคูณด้วยดัชนีหักเหแสง (n) ของตัวกลางที่แสงผ่านระหว่างหน้าเลนซ์กับกระจกปิดทับสไลด์ (cover slip) จะทำให้ได้ค่าของช่องแสง (numerical aperture) : $NA = n\sin\theta$

สำหรับอ๊อกเจ็กทีฟแห้ง ตัวกลางที่แสงผ่านระหว่างหน้าเลนซ์กับกระจกปิดทับสไลด์คืออากาศซึ่งมีดัชนีหักเหแสง (n) เท่ากับ 1 แต่เมื่อใช้น้ำมันจุ่มหัวอ๊อบเจ็กทีฟเป็นตัวกลางซึ่ง

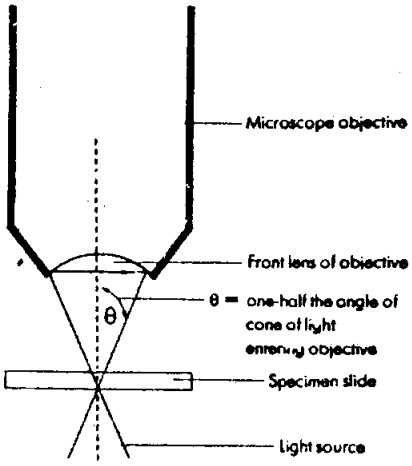
มีดัชนีหักเหแสง (n) เท่ากับ 1.56 และถ้ามีมุม θ เป็น 58° ดังนั้น

$$NA = n \sin 0 = 1.56 \times \text{sine } 58 = 1.56 \times 0.85 = 1.33$$

รูปที่ 4-1 Cutaway sketch of student microscope showing optical parts and path of light



รูปที่ 4-2 The value of θ is determined as shown in this illustration and is needed for the calculation of numerical aperture (NA).



ค่าของช่องแสง (NA) สำหรับอ๊อบเจ็กทีฟอาจถูกทำให้เพิ่มขึ้นได้ในขอบเขตจำกัด ค่าของช่องแสงสูงสุดสำหรับอ๊อบเจ็กทีฟแห้งมักต่ำกว่า 1.0 แต่สำหรับอ๊อบเจ็กทีฟจุ่มน้ำมันมีค่าของช่องแสงสูงกว่า 1.0 เล็กน้อย (1.2 ถึง 1.4) และความยาวช่วงคลื่นของแสงที่ใช้กับกล้องจุลทรรศน์สายตาก็จำกัดเช่นกัน เนื่องจากแสงในช่วงที่สายตามองเห็นอยู่ระหว่าง 400 ถึง 700 นาโนมีเตอร์ (nm) เท่านั้น ความยาว 1 นาโนมีเตอร์เท่ากับ 0.001 ไมโครมีเตอร์ (μm) หรือ 10^{-9} เมตร

รายละเอียดของภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์สายตาถูกจำกัดด้วยค่าของช่องแสงและความยาวช่วงคลื่นของแสงที่มองเห็น ดังนั้นในการทำให้ได้ภาพซึ่งมีรายละเอียดมากที่สุดหรือทำให้มองเห็นวัตถุขนาดเล็กสุดได้อย่างชัดเจนนั้นจะต้องใช้แสงซึ่งมีความยาวช่วงคลื่นสั้นมากและใช้อ๊อบเจ็กทีฟซึ่งมีค่าของช่องแสงมากที่สุด รายละเอียดของภาพ (resolution) หรือความสามารถในการให้รายละเอียดของภาพจากกล้องจุลทรรศน์อาจคำนวณได้ดังต่อไปนี้

ถ้าให้ NA_{obj} และ NA_{cond} เป็นค่าของช่องแสงสำหรับอ๊อบเจ็กทีฟและคอนเดนเซอร์ λ เป็นค่าความยาวช่วงคลื่นของแสงมีหน่วยเป็นไมโครมีเตอร์ ดังนั้นระยะห่างระหว่างจุดสองจุดซึ่งชิดกันมากแต่อาจทำให้มองเห็นเป็นสองจุดได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (มีหน่วยเป็นไมโครมีเตอร์) คือ

$$\text{Resolving power} = \frac{\text{wavelength of light } (\lambda)}{NA_{obj} + NA_{cond}}$$

ตัวอย่าง กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกล้องหนึ่งใช้กระจกกรองแสงสีเขียวทำให้แสงมีความยาวช่วงคลื่น (λ) 0.55 ไมโครมีเตอร์ ใช้หัวอ๊อบเจ็กทีฟจุ่มน้ำมันมีค่าของช่องแสง 1.25 และคอนเดนเซอร์มีค่าของช่องแสง 0.9 เมื่อแทนค่าต่าง ๆ ลงในสมการข้างต้นจะได้

$$\text{Resolving power} = \frac{0.55}{1.25 + 0.9} = 0.255\ \mu m$$

ดังนั้นในการทำให้ได้ภาพจากกล้องจุลทรรศน์มีรายละเอียดสูงมากนั้นจะต้องใช้แสงซึ่งมีความยาวช่วงคลื่นสั้นมากเช่นแสงสีม่วงหรือน้ำเงินที่ได้จากกระจกกรองแสง พร้อมทั้งใช้อ๊อบเจ็กทีฟและคอนเดนเซอร์ซึ่งมีค่าของช่องแสงมากด้วย

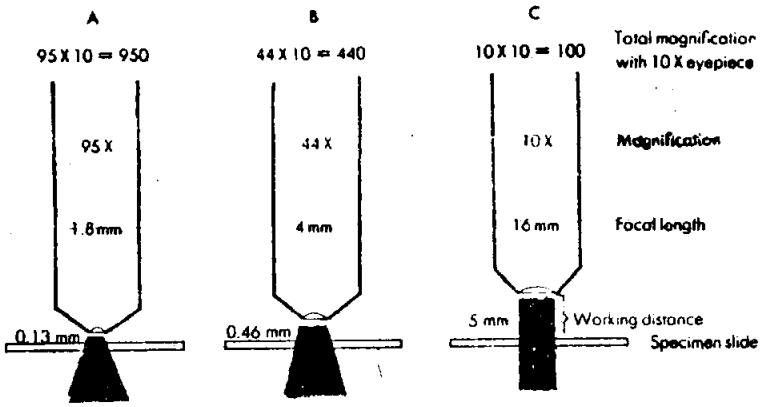
จากตัวอย่างการคำนวณอาจสรุปได้ว่าวัตถุขนาดเล็กที่สุดซึ่งมองเห็นได้ชัดเจนด้วยกล้องจุลทรรศน์นี้จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณไม่น้อยกว่า 0.2 ไมโครมีเตอร์ กำลังขยายที่สูงเกินกว่าความสามารถในการให้รายละเอียดของภาพจะทำให้ได้ภาพที่พร่ามัวไม่มีรายละเอียด

กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่มักประกอบด้วยอ๊อบเจ็กทีฟสามอันมีกำลังขยายต่าง ๆ กัน ปริมาณการขยายภาพของกล้องจุลทรรศน์คำนวณได้จากการคูณกำลังขยายของอ๊อบเจ็กทีฟด้วยกำลังขยายของระบบเลนซ์ใกล้ตา (eyepiece) โดยทั่วไประบบเลนซ์ใกล้ตามักมีกำลังขยาย 10 เท่า แต่อาจใช้ที่มีกำลังขยายสูงกว่าหรือต่ำกว่าได้ รูปที่ 4-3 แสดงลักษณะการใช้อ๊อบเจ็กทีฟที่มีกำลังขยายต่าง ๆ

หมายเหตุ 1 millimeter = 1,000 micrometers (μm)

1 micrometer = 1,000 nanometers (nm)

1 nanometer = 10 angstrom (A°)



รูปที่ 4-3 Objectives used on a light microscope: (A) oil-immersion; (B) high-dry; (C) low-power.

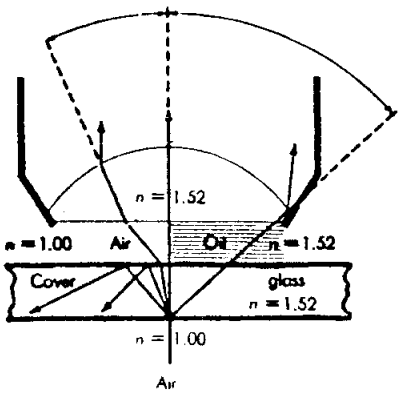
การใช้หัวอ๊อบเจ็กทีฟจุ่มน้ำมัน

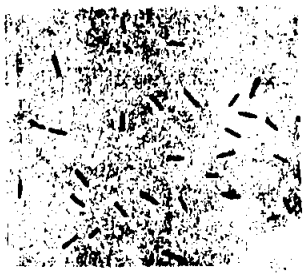
เนื่องจากหัวอ๊อบเจ็กทีฟจุ่มน้ำมันมีกำลังขยายสูงกว่าหัวอ๊อบเจ็กทีฟแบบอื่นจึงถูกใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาโดยทั่วไป การใช้หัวอ๊อบเจ็กทีฟจุ่มน้ำมันจะต้องระมัดระวังเป็นพิเศษเนื่องจากมีจุดโฟกัสใกล้กับวัตถุตัวอย่างมากหรือมีระยะใช้งาน (working distance) สั้นมากคือเมื่อต้องการทำให้มองเห็นภาพจะต้องทำให้หน้าเลนซ์ของอ๊อบเจ็กทีฟอยู่ห่างจากสไลด์เพียงส่วนหนึ่งของมิลลิเมตรเท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 4-3 นอกจากนี้ยังต้องใช้น้ำมันสำหรับจุ่มเพื่อทำให้แสงที่ส่องผ่านกระจกสไลด์และออกจากกระจกสไลด์เข้าสู่หน้าเลนซ์ของอ๊อบเจ็กทีฟเป็นเส้นเดียวกันไม่หักเห ดังนั้นน้ำมันที่ใช้จึงต้องมีดัชนีหักเหแสงเท่ากับกระจกสไลด์ดังแสดงในรูปที่ 4-4 ภาพของแบคทีเรียที่มองเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ bright-field ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4-5

DARK – FIELD MICROSCOPY

Dark-field microscope เป็นกล้องจุลทรรศน์ซึ่งทำให้พื้นหลังของภาพมืดทึบตัดกับตัววัตถุที่ต้องการดูซึ่งใสสว่าง กล้องจุลทรรศน์แบบนี้ทำได้โดยใช้คอนเดนเซอร์พิเศษทำให้แสงพุ่งออกมาเป็นกรวยกลวง ดังรูปที่ 4-6 ถ้าตัวอย่างมีความโปร่งใสสม่ำเสมอกันหมดแสงที่ส่องออกมาจากคอนเดนเซอร์จะไม่เข้าไปในอ๊อบเจ็กทีฟเลยทำให้พื้นที่ทั้งหมดซึ่งมองเห็นในกล้องมืดทึบแต่ถ้ามีวัตถุซึ่งมีดัชนีหักเหแสงแตกต่างกัน วัตถุนั้นจะกระจายแสงโดยการสะท้อนหรือหักเหแสงให้เข้าไปในอ๊อบเจ็กทีฟทำให้มองเห็นวัตถุใสสว่างแต่พื้นที่ส่วนอื่นซึ่ง

รูปที่ 4-4 The function of oil used with the oil-immersion objective. Note that *n* (the refractive index) of the glass slide and the oil are the same. This keeps the light rays from bending as they pass from the glass and oil to the objective, allowing a large cone of light to enter the objective.



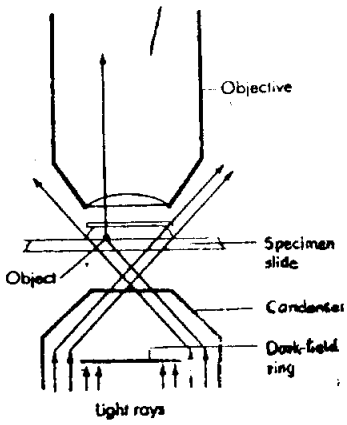


รูปที่ 4-5 *Clostridium botulinum*, a rod-shaped bacterium, as seen from a stained preparation and by bright-field microscopy (× 1,000). *(Armed Forces Institute of Pathology photograph.)*

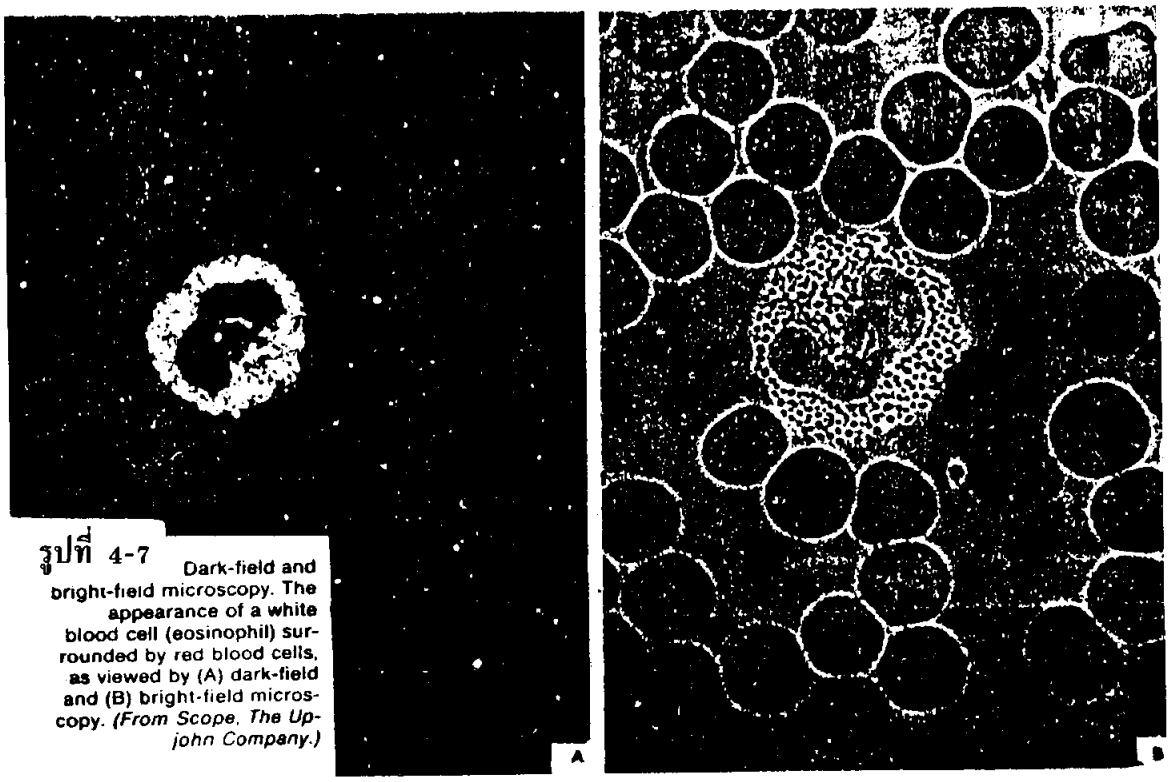
มองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์นั้นมืดทึบ ดังแสดงในรูปที่ 4-7 Dark-field microscope มีประโยชน์ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ย้อมสีแขวนลอยอยู่ในของเหลว

ULTRAVIOLET MICROSCOPE

กล้องจุลทรรศน์อุลตราไวโอเลตทำให้ได้ภาพซึ่งมีรายละเอียดสูงกว่ากล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดาซึ่งสายตามองเห็น ดังนั้นจึงสามารถทำให้มีกำลังขยายสูงขึ้นได้อย่างมีประโยชน์ เนื่องจากแสงอุลตราไวโอเลตมีความยาวช่วงคลื่นสั้นกว่าแสงที่สายตามองเห็น (แสงอุลตราไวโอเลตมีความยาวช่วงคลื่น 180-400 นาโนมีเตอร์แต่แสงที่สายตามองเห็นมีความยาวช่วงคลื่น 400-700 นาโนมีเตอร์) จากสูตรการคำนวณหาความสามารถในการให้รายละเอียดของภาพจะทราบว่าถ้าใช้แสงอุลตราไวโอเลต สามารถทำให้ได้รายละเอียดของภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของการใช้แสงธรรมดา

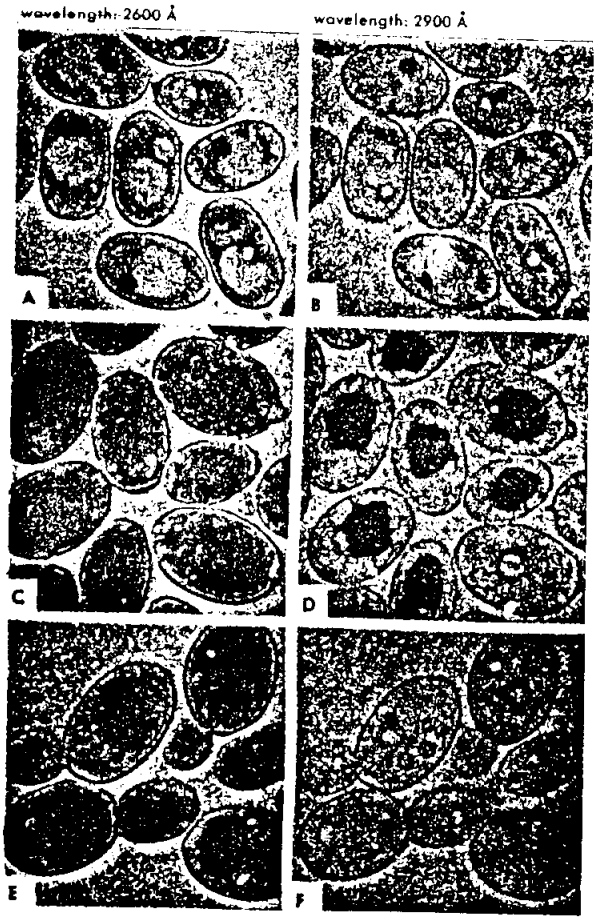


รูปที่ 4-6 Schematic representation of dark-field microscopy. Only the light rays that strike an object on the glass slide are directed through the objective. In practice, oil is used between the condenser and specimen slide and between the specimen slide and the objective.



รูปที่ 4-7 Dark-field and bright-field microscopy. The appearance of a white blood cell (eosinophil) surrounded by red blood cells, as viewed by (A) dark-field and (B) bright-field microscopy. *(From Scope, The Upjohn Company.)*

ข้อดีของกล้องจุลทรรศน์อุลตราไวโอเลตนอกจากนี้คือทำให้สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งของสารบางอย่างซึ่งดูดแสงอุลตราไวโอเลตได้ ดังรูปที่ 4-8 กล้องจุลทรรศน์อุลตราไวโอเลตแตกต่างจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดาคือมีระบบเกี่ยวกับเลนซ์หรือสายตาซึ่งยอมให้แสงผ่านหรือสะท้อนแสงได้ในช่วง 230 ถึง 350 นาโนมีเตอร์ เนื่องจากสายตาไม่อาจมองเห็นรังสีอุลตราไวโอเลตได้ดังนั้นจึงต้องทำให้มองเห็นภาพด้วยฟิล์มถ่ายรูปหรือจอรับภาพ



รูปที่ 4-8 Ultraviolet photomicrographs (× 2,300) of the yeast *Candida utilis* showing how ultraviolet-absorbing substances can be located in living cells. (A, B) Cells as they would appear in plain culture medium at indicated wavelengths. (C, D) Cells which have formed S-adenosylmethionine and have taken up uric acid from an experimental medium. S-adenosylmethionine absorbs strongly at 2600 Å; uric acid at both 2600 and 2900 Å. One vacuole contains S-adenosylmethionine but not uric acid. (E, F) Same conditions as C and D but 3 h later. Uric acid has been utilized; S-adenosylmethionine has not but has been transmitted to buds. *(From G. Svihla, J Bacteriol, 85:399, 1963.)*

FLUORESCENCE MICROSCOPE

กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงคือกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างซึ่งมีรังสีอุลตราไวโอเลตปนอยู่ สารเคมีบางอย่างดูดพลังงานจากรังสีอุลตราไวโอเลตแล้วปล่อยออกมาในรูปของแสงช่วงคลื่นยาวซึ่งสายตามองเห็นสารดังกล่าวเมื่ออยู่ภายใต้แสงสว่างธรรมดาอาจมีสีอย่างหนึ่ง แต่เมื่ออยู่ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตจะมีสีแตกต่างไป ปรากฏการณ์ดังกล่าวถูกเรียกว่าการเรืองแสง (fluorescence) และสารดังกล่าวถูกเรียกว่าสารเรืองแสง (fluorescent)

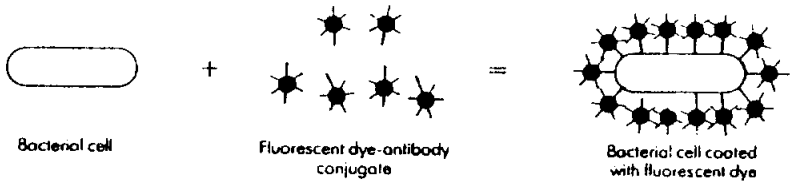
จุลินทรีย์ที่ถูกย้อมด้วยสีเรืองแสงจะมีลักษณะเหมือนวัตถุซึ่งมีแสงสว่างเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างซึ่งมีรังสีอุลตราไวโอเลตปนอยู่ด้วย สีเรืองแสงถูกใช้ในวิชาจุลชีววิทยาหลายอย่างแต่ที่ได้ผลดีที่สุดอย่างหนึ่งคือการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี้ สีเรืองแสงอาจถูกทำให้เชื่อมติดกันได้กับแอนติบอดี้จึงทำให้สามารถตรวจสอบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงว่าแอนติบอดี้ทำปฏิกิริยารวมตัวกับเซลล์ใด กลวิธีเช่นนี้ถูกเรียกว่า fluorescent-antibody technique หรือ immunofluorescence

Immunofluorescence

(Fluorescent-antibody Technique)

เนื่องจากการรวมตัวกันของแอนติเจนและแอนติบอดี้บางอย่างไม่อาจตรวจสอบได้ด้วยตาหรือกล้องจุลทรรศน์ แต่ถ้าใช้แอนติบอดี้ซึ่งมีสารเรืองแสงเกาะติดอยู่เมื่อแอนติบอดี้นี้ทำปฏิกิริยารวมตัวกับแอนติเจนก็จะทำให้มองเห็นแอนติเจนเกาะติดกับแอนติบอดี้ได้จากการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง รูปที่ 4-9 แสดงการใช้ immunofluorescent technique โดยตรง

รูปที่ 4-9 The direct fluorescent antibody staining technique. When a bacterial cell and a specific antibody conjugated with a fluorescent dye are incubated together, the dye-antibody conjugate will cover the surface of the cell. The technique is performed on a glass slide, the excess fluorescent dye–antibody conjugate is washed off, and the preparation is examined using ultraviolet light microscopy. The bacterial cell, coated with the fluorescent dye, will glow brilliantly.

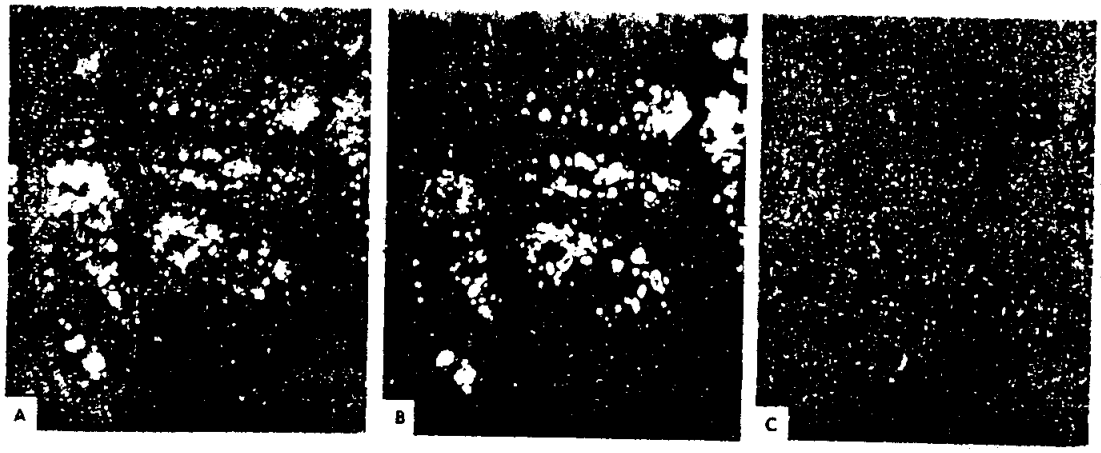


PHASE – CONTRAST MICROSCOPY

Phase-contrast microscope มีประโยชน์สำหรับศึกษาเซลล์ที่มีชีวิตเป็นอย่างมากและใช้ในการศึกษาทางชีววิทยาอย่างกว้างขวาง กล้องจุลทรรศน์แบบ phase-contrast มีการควบคุมการส่องสว่างของตัวอย่างโดยอ๊อบเจ็กทีฟและคอนเดนเซอร์พิเศษซึ่งใช้ประกอบกับกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดา

ด้วยระบบพิเศษเกี่ยวกับสายตาของกล้องจุลทรรศน์แบบ phase-contrast ทำให้สามารถมองเห็นวัตถุซึ่งมีความแตกต่างกันในด้านการเบี่ยงเบนแสงเพียงเล็กน้อยได้ ตัวอย่างเช่น โครงสร้างภายในเซลล์ซึ่งมีดัชนีหักเหแสงใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นจึงไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดาแต่จะมองเห็นต่างกันได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase-contrast

เมื่อแสงส่องผ่านวัตถุอย่างหนึ่งแล้วทะลุผ่านไปในวัตถุอีกอย่างหนึ่งซึ่งมีความหนาแน่นแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยจะทำให้แสงหักเหหรือเบี่ยงเบนไปจากเส้นทางเดิม กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดาไม่อาจทำให้มองเห็นความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยของความหนาหรือดัชนีหักเหแสงได้ถึงแม้ว่าจะมีความปกติเกิดขึ้นเล็กน้อยเมื่อแสงส่องผ่านไปในวัตถุ แต่กล้องจุลทรรศน์แบบ phase-contrast มีการเปลี่ยนแปลงความผิดปกติของลำแสงให้เป็นความสว่าง



รูปที่ 4-10 Phase-contrast microscopy compared with bright-field and dark-field microscopy. The same specimen of protozoa as seen by each method: (A) phase-contrast; (B) dark-field; (C) bright-field. *(Courtesy of O. W. Richards, Research Department, American Optical Company.)*

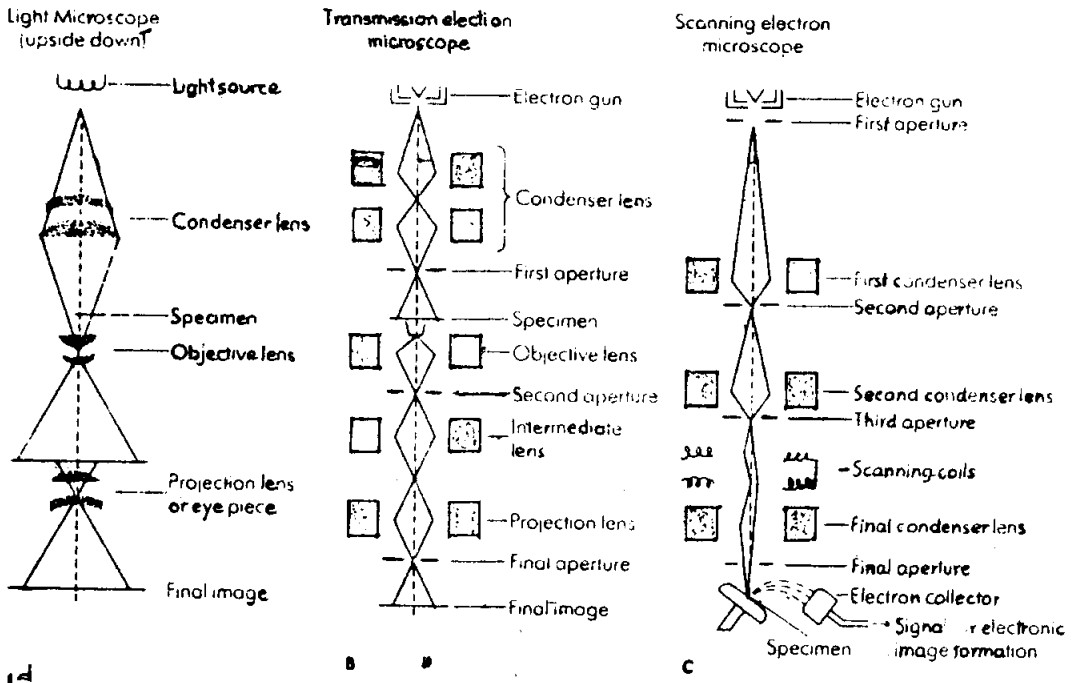
แตกต่างกัน ระบบควบคุมการส่องสว่างแบบ phase-contrast ทำให้สามารถมองเห็นความแตกต่างของรายละเอียดโครงสร้างซึ่งแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในด้านความหนาหรือดัชนีหักเหแสงได้ ดังนั้นความแตกต่างในเซลล์และโครงสร้างซึ่งไม่อาจมองเห็นได้ด้วยวิธีการเกี่ยวกับกล้องจุลทรรศน์แบบอื่น จึงอาจมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase-contrast รูปที่ 4-10 แสดงการเปรียบเทียบภาพที่มองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์แบบ bright-field, dark-field และ phase-contrast

TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

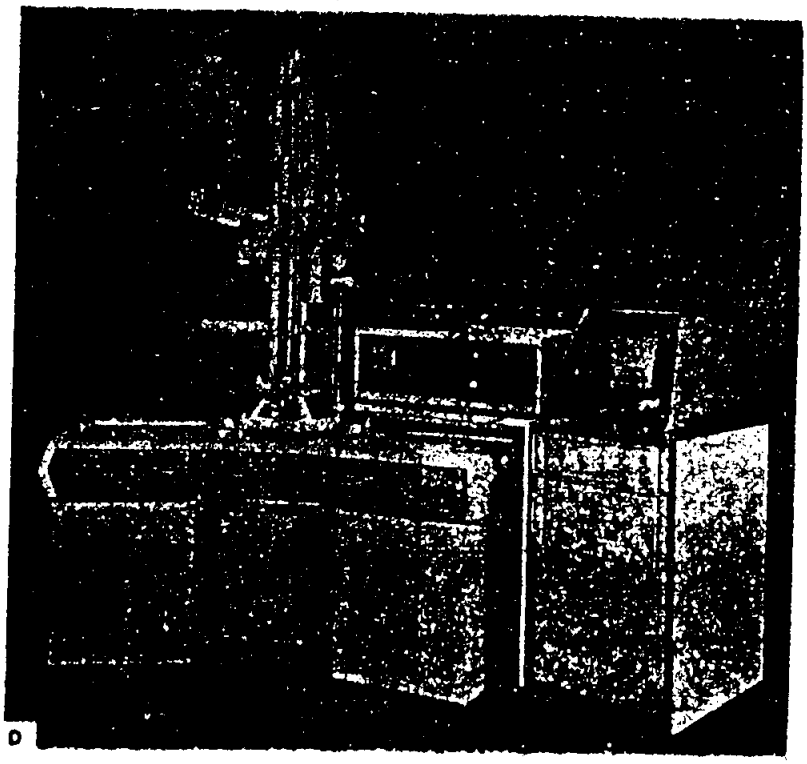
กล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบผ่านทะลุแตกต่างจากกลวิธีทางกล้องจุลทรรศน์สายตาหลายประการ กล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนสามารถทำให้มีกำลังขยายได้มากมายเนื่องจากมีกำลังการให้รายละเอียดของภาพถึง 100 เท่าของกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง เพราะความยาวช่วงคลื่นของลำอีเล็กตรอนที่ใช้ในการขยายภาพนั้นสั้นมาก ตั้งแต่ปี 1960 กล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนได้ถูกใช้ในงานวิจัยทางชีววิทยาอย่างกว้างขวาง รูปที่ 4-11 แสดงแผนภูมิของกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนซึ่งใช้คลื่นอีเล็กตรอนและสนามแม่เหล็กในการทำให้เกิดภาพเปรียบเทียบกับกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างซึ่งใช้คลื่นแสงและกระจกเลนซ์ในการทำให้เกิดภาพ

เมื่อใช้อีเล็กตรอนซึ่งมีกำลัง 60 ถึง 80 กิโลโวลต์ กับกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนจะได้ความยาวช่วงคลื่นเพียง 0.05 อังสตรอม (A°) เท่านั้น (A° คืออังสตรอม (angstrom) 1 อังสตรอมเท่ากับ 1/100,000,000 (10^{-8}) เซนติเมตรหรือ 1/10,000 (10^{-4}) ไมโครมีเตอร์) ดังนั้นจึงสามารถทำให้มองเห็นวัตถุซึ่งมีขนาดเล็กที่สุดได้ถึง 10 อังสตรอม ดังรูปที่ 4-12 ความสามารถในการให้รายละเอียดของภาพจากกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนจึงสูงกว่า 100 เท่าของกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดา และสามารถทำให้มีกำลังขยายซึ่งมีประโยชน์ได้ประมาณ 200,000 ถึง 400,000 เท่า

ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนจะต้องอยู่ในลักษณะแห้งเป็นแผ่นบางมากบนตะแกรงเล็ก ๆ แล้วใส่เข้าไปในเครื่องมือตรงจุดระหว่างคอนเดนเซอร์แม่เหล็กกับอ๊อบเจ็กทีฟแม่เหล็กเปรียบเหมือนกับสเตจรองรับสไลด์ของกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ภาพขยายที่ได้อาจถูกฉายบนจอเรืองแสงหรือฟิล์มถ่ายรูป

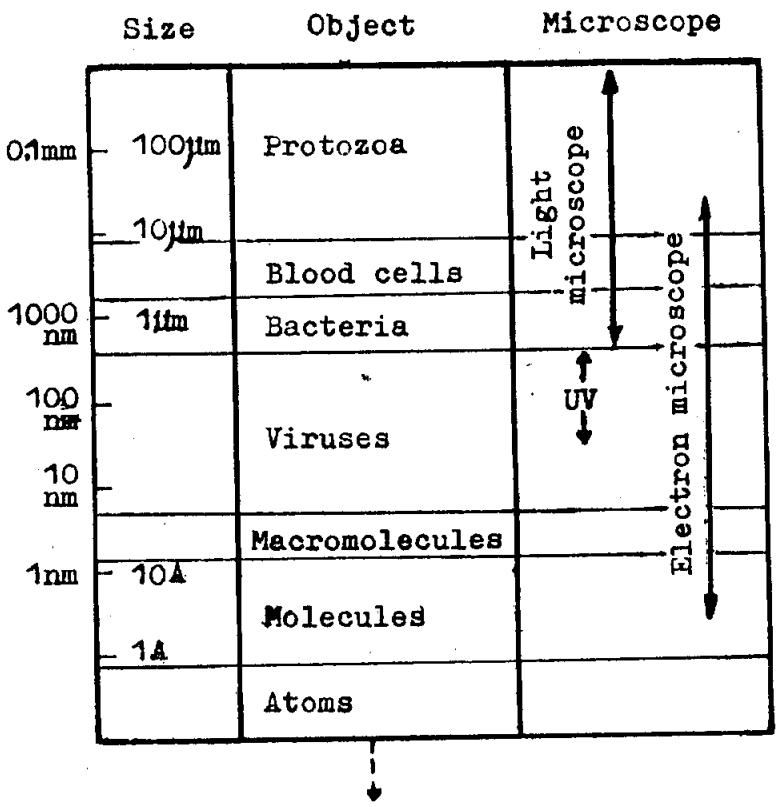


รูปที่ 4-11 Diagrammatic comparison of imaging systems in (A) optical microscope, (B) transmission electron microscope, and (C) scanning electron microscope. *(From L. A. Bulla, Jr., G. St. Julian, C. W. Hesseltine, and F. L. Baker, Scanning Electron Microscopy, in Methods in Microbiology, vol. 8, Academic, New York, 1973.)* (D) A high resolution electron microscope. *(Hitachi-Perkin-Elmer.)*



รูปที่ 4-12

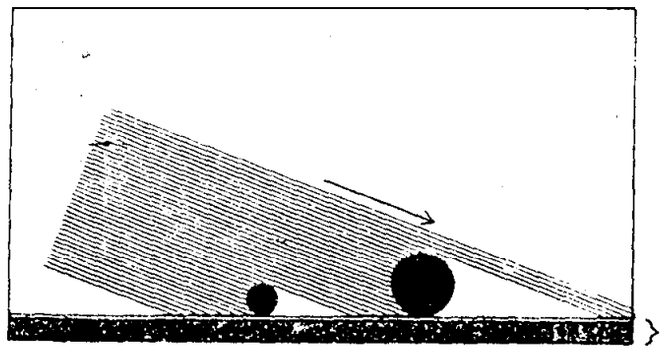
Relative size of microbes, molecules, and atoms is depicted here, together with an indication of the useful range of different types of microscope. *(From A. J. Rhodes and C. E. van Rooyen, Textbook of Virology, Williams & Wilkins, Baltimore, 1968.)*



Shadow Casting

เป็นกลวิธีการสาดโลหะเช่น ปลาตินัมให้สะสมตัวเป็นชั้นบางมากทำมุมลาดเอียงกับวัตถุหรือจุลินทรีย์จนกระทั่งเกิดเงาซึ่งไม่ได้ปิดทับด้วยโลหะ เงาที่เกิดขึ้นแสดงถึงผิวของตัวอย่างดังรูปที่ 4-13

รูปที่ 4-13 Shadow-casting technique. The specimen is dried on a special grid which is placed in a vacuum jar and evaporated. Atoms of a heavy metal, such as platinum, are projected from a highly heated filament to the specimen on a film on the grid at an angle that produces a "shadow" behind the particles being examined. Examination of the "shadowed" image provides information as to the shape of the specimen particles.



Ultrathin Sectioning

เพื่อศึกษาถึงระดับโมเลกุลส่วนใหญ่สารที่นำมาตรวจสอบจะต้องมีขนาดบางมาก ดังนั้นจึงต้องมีกลวิธีการเฉือนหรือหั่นเป็นพิเศษ เซลล์เดียวของแบคทีเรียเมื่อฝังอยู่ในสารพลาสติกอาจถูกตัดให้เป็นแผ่นบางมากได้โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า ultramicrotome เพื่อเพิ่มความแตกต่างกันของโครงสร้างอาจใช้การย้อมแบบพิเศษสำหรับกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนเช่นย้อมด้วยโลหะยูเรเนี่ยมและแลนทานัมเป็นต้น

Negative Staining

ใช้สารซึ่งอีเล็คตรอนผ่านทะลุไม่ได้เช่น phosphotungstic acid เป็นสีย้อมปกปิดส่วนที่อยู่รอบ ๆ วัตถุเช่นเดียวกันกับการย้อม negative staining สำหรับกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง phosphotungstate ซึ่งทึบต่ออีเล็กตรอนไม่แทรกซึมเข้าไปในโครงสร้างแต่สะสมหนาอยู่รอบ ๆ

Freeze Etching

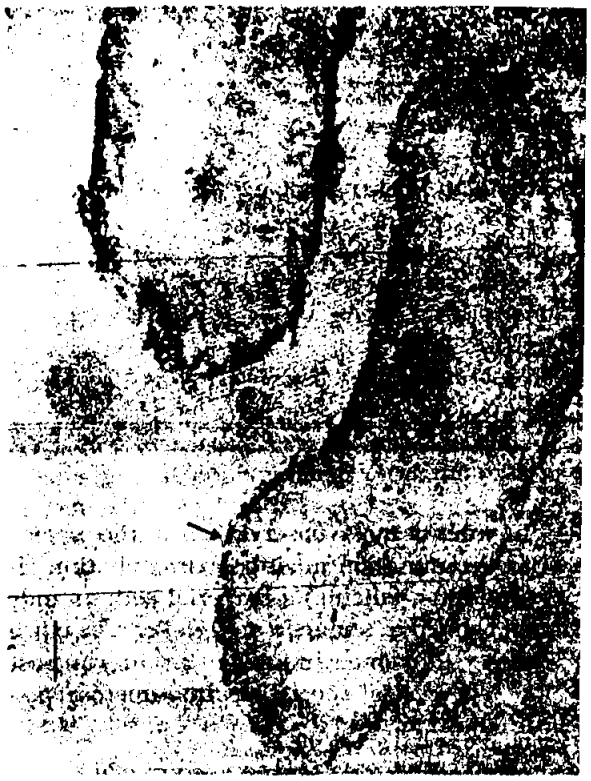
เป็นกลวิธีการเตรียมชิ้นส่วนของตัวอย่างโดยไม่ต้องใช้กรรมวิธีทางเคมีเพื่อทำให้คงตัวซึ่งอาจก่อให้เกิดสิ่งผิดปกติขึ้นได้ ตัวอย่างจะถูกตัดหรือหั่นในขณะที่เย็นแข็งตัว พื้นผิวของโครงสร้างต่าง ๆ จะถูกประทับไว้ให้เป็นร่องรอยบนธาตุคาร์บอนแล้วนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอน

การชี้แสดงตำแหน่งองค์ประกอบของเซลล์

ด้วยกลวิธีการพิเศษทำให้สามารถหาตำแหน่งองค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ของเซลล์ได้ ตัวอย่างเช่น นำชิ้นส่วนบาง ๆ ของเซลล์มาแช่ในแอนติบอดี้ซึ่งมีเฟอร์ริตินเกาะติดอยู่เพื่อชี้บอก การรวมตัวกันระหว่างแอนติบอดี้กับแอนติเจนภายในเซลล์ทำให้เกิดองค์ประกอบซึ่งมองเห็นได้ง่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอน

การชี้บอกตำแหน่งของเอนไซม์ในชิ้นส่วนบางที่ตัดได้

การชี้บอกตำแหน่งของเอนไซม์ในชิ้นส่วนบางที่ตัดได้ต้องใช้วิธีการย้อมแบบพิเศษโดยอาศัยกลวิธีการสะสมผงธุลีของสารซึ่งทึบต่ออีเล็กตรอนในเนื้อเยื่อคล้ายกับว่าสารนั้นเป็นผลผลิตของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ซึ่งต้องการตรวจสอบ จึงทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างภายในเซลล์และการทำงาน โครงสร้างซึ่งละเอียดอ่อนภายในเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์จะต้องเหลืออยู่รอดจากการเตรียมและการย้อมต่าง ๆ และมีผลผลิตของเอนไซม์มากเพียงพอตรงตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาเพื่อทำให้มองเห็นได้ เนื้อเยื่อดังกล่าวจะถูกยึดโดยแช่ในฟอร์มาลดีไฮด์ (ไม่ใช้ osmium tetroxide) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ส่วนใหญ่ไว้ เกลือของโลหะบางอย่างอาจถูกทำให้ตกตะกอนสะสมอยู่ในบริเวณนั้นโดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่และทำให้สามารถตรวจสอบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็คตรอน กลวิธีการนี้ส่วนใหญ่มักใช้การทำให้เกิดตะกอนของเกลือตะกั่ว เช่น lead phosphate โดยการไฮโดรไลสสารอินทรีย์ฟอสเฟตด้วยเอนไซม์ในสภาพที่มีไออ้อนของตะกั่วปรากฏอยู่ ตัวอย่างตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ alkaline phosphatase ซึ่งพบว่าอยู่ในช่องว่างระหว่างผนังเซลล์กันเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียบางชนิดดังแสดงในรูปที่ 4-14



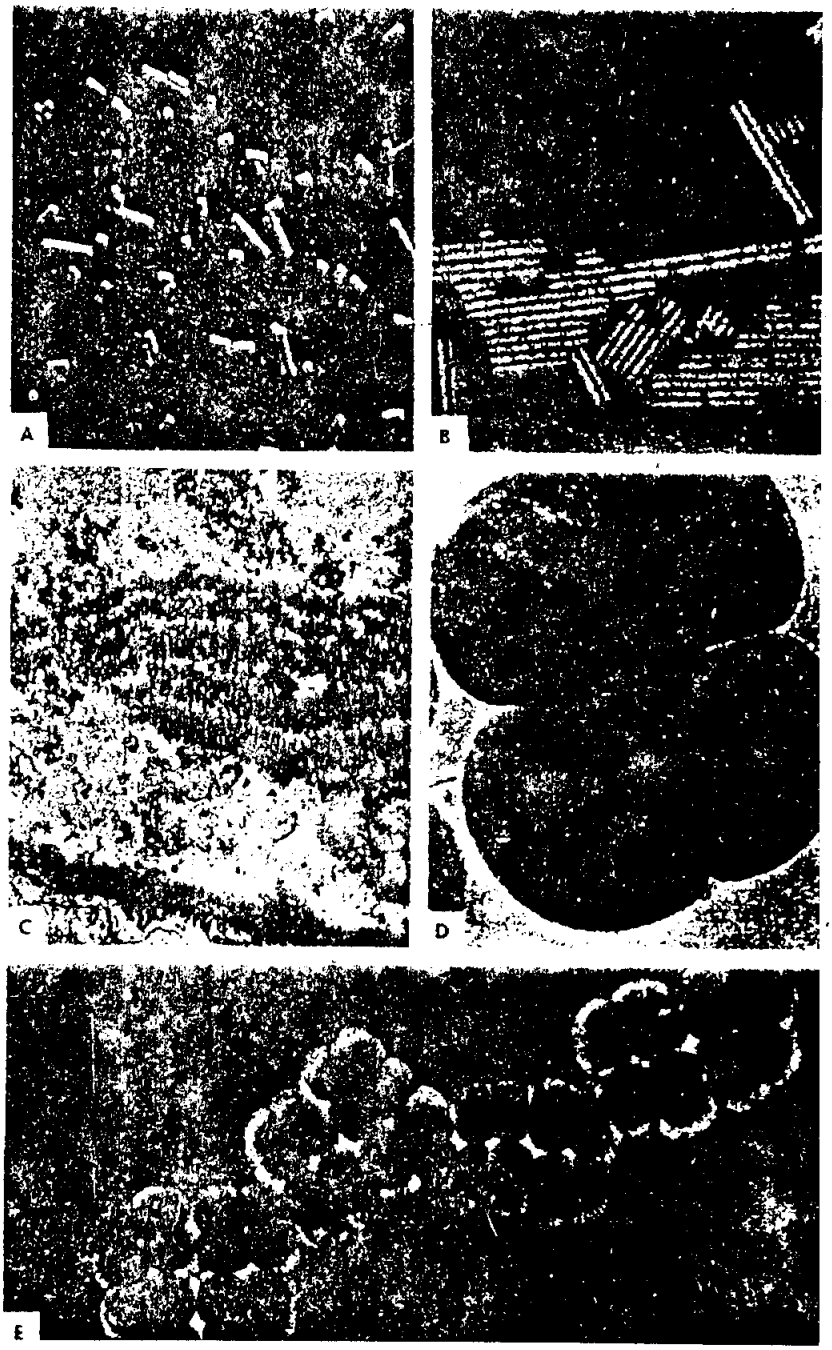
รูปที่ 4-14 Electron micrograph of a thin section of *Pseudomonas aeruginosa* subjected to the Gomori reaction for the localization of the enzyme alkaline phosphatase. In this study it was shown that the enzyme (dark area noted by arrow) is located between the cytoplasmic membrane and the cell wall. Bar represents 0.1 μm. *(Courtesy of K. J. Cheng, J. M. Ingram, and J. W. Costerton, and Can J Microbiol,* **16**:*1319, 1970.)*

Autoradiography

เป็นวิธีการทางเคมีเกี่ยวกับเซลล์เพื่อชี้บอกตำแหน่งองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อเยื่อ โดยบันทึกตำแหน่งของสารกัมมันตภาพรังสีที่ร่วมเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อ วัตถุตัวอย่างบางซึ่งมีสารกัมมันตภาพรังสีถูกนำมาปิดทับด้วยฟิล์มถ่ายรูปที่บางมากแล้วเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลาหลายเดือนหรือหลายสัปดาห์ รังสีไออ้อนที่แผ่ออกมาเนื่องจากการสารละลายตัวของสารกัมมันตภาพรังสีจะทำให้เกิดภาพแฝงอยู่ในฟิล์มถ่ายรูป หลังจากล้างฟิล์มถ่ายรูปเรียบร้อยแล้วภาพที่ปรากฏขึ้นเนื่องจากเม็ดเงินถูกทำให้มองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอน

ภาพที่มองเห็นได้ด้วยวิธีการต่าง ๆ ของ transmission electron microscopy ถูกแสดงไว้ในรูปที่ 4-15

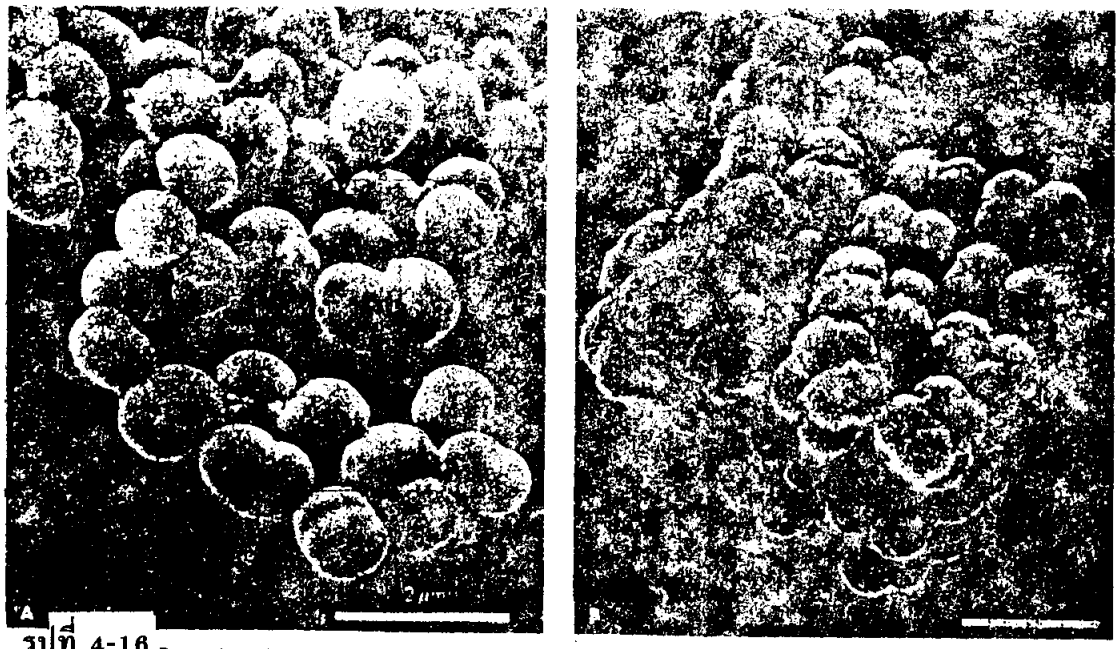
รูปที่ 4-15 Electron micrographs of tobacco rattle virus as seen in three different preparations (A, B, and C). This virus characteristically appears as two different-sized particles: the larger particle measures 184 × 25 nm and the smaller particle measures 74 × 25 nm. (A) Shadow-cast preparation using chromium. (B) Negative-stain preparation using potassium phosphotungstate. (C) Ultrathin section of infected leaf showing intracellular virus crystals, stained with uranyl acetate and lead citrate. *(Courtesy M. Kenneth Corbett).* (D) Electron micrograph of a thin section of *Sarcina maxima*, × 3,100. (E) Phase-contrast micrograph of same bacterium (*Sarcina maxima*) × 1,600 seen in (D). Cells are regularly arranged in four parallelepiped-shaped aggregates or large packets which include four small eight-celled packets each. *(D and E Courtesy E. Canale-Parola and Bacteriol Rev, 34:82, 1970.)*



SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

ในกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบกวาดภาพ วัตถุตัวอย่างถูกฉายด้วยโฟกัสสุดท้ายของลำอีเล็คตรอนที่พุ่งออกมาทำให้อีเล็กตรอนชนิดต่าง ๆ และรังสีประเภทอื่นจากส่วนของวัตถุตัวอย่างที่กระทบกับลำอีเล็คตรอนถูกปลดปล่อยออกมา ความเข้มของรังสีที่หลุดออกมาซึ่งถูกใช้เป็นสัญญาณขึ้นอยู่กับรูปร่างและส่วนประกอบทางเคมีของวัตถุที่ถูกฉาบด้วยลำอีเล็กตรอน สัญญาณถูกกวาดไปบนแผ่นรับภาพของเครื่องโทรทัศน์ซึ่งทำให้เกิดภาพขึ้นได้ในจอรับภาพ ระบบการทำให้เกิดภาพของกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบกวาดภาพได้แสดงไว้ในรูปที่ 4-11c

กล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบกวาดภาพมีความสามารถในการให้รายละเอียดของภาพน้อยกว่ากล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบผ่านทะลุแต่มีข้อดีคือทำให้ภาพในลักษณะเป็นสามมิติด้วยกลวิธีนี้ทำให้สามารถแสดงลักษณะพื้นผิวของตัวอย่างได้อย่างชัดเจนซึ่งไม่อาจทำได้วิธีการอื่น รูปที่ 4-16 แสดงการเปรียบเทียบแบคทีเรียซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบกวาดภาพ



รูปที่ 4-16 Scanning electron micrographs of *M. lysodeikticus* and packet-forming mutants. (A) Parent strain, (B) packet-forming mutant strain. The bars indicate 2 μm. *(From M. Yamada, A. Hirose, and M. Matsuhashi, J Bacteriol,* **123**:*678, 1975.)*

ตารางที่ 4-1

A Comparison of Different Types of Microscopy

TYPE OF MICROSCOPY	MAXIMUM USEFUL MAGNIFICATION	APPEARANCE OF SPECIMEN	USEFUL APPLICATIONS
Bright-field	1,000-2,000	Specimens stained or unstained; bacteria generally stained and appear color of stain	For gross morphological features of bacteria yeasts, molds, algae, and protozoa
Dark-field	1,000-2,000	Generally unstained appears bright or "lighted" in an otherwise dark filed	For microorganisms that exhibit some characteristic morphological feature in the living state and in fluid suspension, e.g., spirochetes
Ultraviolet	1,000-2,000	Not viewed directly photographed	Differentiation of cellular components on basis of their greater or lesser ability to absorb ultraviolet light
Fluorescent	1,000-2,000	Bright and colored; color of the fluorescent dye	Diagnostic techniques where fluorescent dye fixed to organism reveals its identity
Phase-contrast	1,000-2,000	Varying degrees of "darkness"	For examination of cellular structures in living cells of the larger microorganisms, e.g., yeasts, algae, protozoa, and some bacteria
Electron	200,000-400,000	Viewed on fluorescent screen	Examination of viruses and the ultrastructure of microbial cells

ลักษณะสำคัญบางอย่างของกล้องจุลทรรศน์แบบต่าง ๆ ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4-1 ทั้งที่กล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนมีข้อดีในการทำเกิดกำลังขยายได้เป็นอย่างมากแต่ที่ใช้กันในปัจจุบันก็ยังมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น วัตถุตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบต้องอยู่ในสภาพที่แห้งเนื่องจากภายในกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนมีสภาพเป็นสูญญากาศอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจสอบเซลล์ซึ่งมีกิจกรรมทางเมตาโบลิซึ่มได้ นอกจากนี้ขบวนการทำให้แห้งยังอาจทำให้ลักษณะทางสัณฐานเปลี่ยนแปลงไปได้ ข้อจำกัดอีกอย่างหนึ่งของกลวิธีนี้คือลำแสงอีเล็กตรอนมีอำนาจทะลุทะลวงต่ำมาก

ปัญหาที่แท้จริงซึ่งนักเซลล์วิทยาต้องประสบคือการชันสูตรในขั้นสุดท้ายของสิ่งที่อยู่ภายในเซลล์ซึ่งมองเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนว่าเป็นสิ่งใด บ่อยครั้งทีเดียวที่ต้องใช้ประกอบกันกับกล้องจุลทรรศน์แบบอื่น เช่น phase-contrast และ bright-filed เป็นต้น เพื่อช่วยเป็นหลักฐานแสดงความเป็นอย่างหนึ่งอย่างเดียวกันของโครงสร้างได้ถูกต้อง ประสบการณ์และความชำนาญเป็นสิ่งจำเป็นต่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อแปลความหมายในรายละเอียดต่าง ๆ ของเซลล์

การตระเตรียมเพื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

กลวิธีการทั่วไปซึ่งใช้ในการเตรียมวัตถุเพื่อให้เหมาะสมต่อการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างมีสองวิธีการด้วยกัน คือ (1) ทำให้วัตถุแขวนลอยอยู่ในของเหลวบนกระจกสไลด์แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ (2) ทำให้วัตถุแห้งติดแน่นกับสไลด์ในลักษณะเป็นเยื่อบาง (smear) แล้วย้อมสี

กลวิธีแบบทับเปียกและหยดแขวน

การเตรียมสไลด์แบบหยดห้อยแขวน (Hanging-drop) และทับเปียก (wet-mount) ทำให้สามารถตรวจสอบจุลินทรีย์มีชีวิตในสภาพปกติซึ่งแขวนลอยในของเหลวได้การเตรียมสไลด์แบบทับเปียกทำได้โดยการหยดของเหลวซึ่งมีจุลทรีย์แขวนลอยอยู่บนกระจกสไลด์แล้วปิดทับด้วยแผ่นแก้วบาง (cover glass or cover slip) เพื่อลดอัตราการระเหยของของเหลวและป้องกันไม่ให้ได้รับการรบกวนจากกระแสลม หยดของเหลวอาจถูกวงรอบด้วยน้ำมันข้นหรือสารที่คล้ายกันเพื่อเชื่อมรอยต่อระหว่างสไลด์กับกระจกปิดทับ

การเตรียมสไลด์แบบหยดห้อยแขวนทำได้โดยหยดของเหลวซึ่งมีแบคทีเรียแขวนลอยอยู่บนแผ่นกระจกปิดทับแล้วกลับให้หยดห้อยแขวนอยู่ในหลุมของสไลด์หลุม

สถานะการบางอย่างซึ่งเหมาะที่จะใช้การเตรียมสไลด์แบบหยดห้อยแขวนและแบบทับเปียกมีดังต่อไปนี้

1. สัณฐานวิทยา (morphology) ของแบคทีเรียรูปร่างเป็นเกลียวถูกทำให้บิดเสียรูปได้ง่ายเมื่อทำให้แห้งเพื่อย้อมสี ดังนั้นจึงควรตรวจสอบในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ ตัวอย่างเช่น การตรวจสอบหยดของเหลวซึ่งสงสัยว่ามีเชื้อ spirochete ซึ่งทำให้เกิดโรคซิฟิลิสปะปนอยู่ มักเตรียมสไลด์แบบทับเปียกแล้วตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ dark-field เพื่อทำให้เห็นจุลินทรีย์เด่นชัดแตกต่างจากพื้นหลัง (background) ซึ่งมืดทึบ

2. การสังเกตตรวจสอบดูการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียจำเป็นต้องปล่อยให้เซลล์แบคทีเรียแขวนลอยอยู่ในของเหลว

3. เพื่อสังเกตดูการเปลี่ยนแปลงในขณะแบ่งเซลล์และตรวจสอบอัตราการแบ่งเซลล์ จุลินทรีย์ที่นำมาตรวจสอบต้องยังคงมีชีวิตอยู่และการสังเกตดูการเปลี่ยนแปลงในขณะสร้างสปอร์ก็เช่นเดียวกัน

4. ตะกอนหรือโครงสร้างบางอย่างในเซลล์อาจสังเกตเห็นได้ง่ายโดยวิธีการนี้ เช่น vacuole และสารพวกไขมันเป็นต้น

เมื่อนำสไลด์ซึ่งเตรียมแบบทับเปียกมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ bright-field จำเป็นอย่างยิ่งต้องปรับแสงให้เหมาะสม ความเข้มของแสงอาจถูกทำให้ลดลงได้โดยใช้กระจกกรองแสงธรรมดา สำหรับกล้องจุลทรรศน์แบบ Dark-field และ phase-contrast ช่วยในการตรวจสอบดูเซลล์ดูเซลล์ซึ่งไม่ถูกต้องย้อมสีได้เป็นอย่างดี

กลวิธีการเตรียมสไลด์ย้อมสี

การย้อมสีเซลล์ซึ่งถูกทำให้แห้งติดแน่นกับสไลด์มักใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโดยทั่วไป ข้อดีของวิธีการนี้คือ (1) ทำให้มองเห็นเซลล์ได้ชัดเจนภายหลังจากการย้อมสีแล้ว และ (2) ข้อแตกต่างระหว่างเซลล์แบคทีเรีย ทั้งที่ต่างสายพันธุ์หรือสายพันธุ์เดียวกันอาจแสดงให้เห็นได้โดยใช้สีย้อมซึ่งเหมาะสม (การย้อมแบบเลือกหรือแตกต่าง)

ขั้นตอนสำคัญของการเตรียมสไลด์ย้อมสีคือ (1) ละเลงเชื้อแบคทีเรียให้เป็นเยื่อบางบนสไลด์เรียกว่า smear (2) ทำให้แห้งติดแน่นกับสไลด์ (3) ย้อมด้วยสารละลายสีหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิด

การย้อมสีจุลินทรีย์

สารอินทรีย์ซึ่งมีสี (dye) จำนวนมากสามารถนำมาใช้สำหรับย้อมจุลินทรีย์ได้ สารประกอบเหล่านี้โดยทั่วไปมีโครงสร้างของโมเลกุลค่อนข้างซับซ้อนมาก ถ้าจัดแบ่งสีย้อมตามโครงสร้างของโมเลกุลอาจได้เป็นพวกต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ คือ triphenylmethane dyes, oxazine dyes และ thiazine dyes แต่นักเซลล์วิทยามักจัดแบ่งสีย้อมตามพฤติกรรมทางเคมี คือ สีกรด (acid dye) สีด่าง (basic dye) และสีเป็นกลาง (neutral dye) สีกรดหรือ anionic dye คือสารซึ่งมีไออ้อนสีเป็นประจุลบ สีด่างหรือ cationic dye คือสารซึ่งมีไออ้อนสีเป็นประจุบวก สีเป็นกลางคือเกลือซับซ้อนของสีกรดและสีด่าง ตัวอย่างเช่น eosinate of methylene blue สีกรดโดยทั่วไปถูกนำมาใช้ย้อมส่วนประกอบของเซลล์ซึ่งเป็นเบสหรือด่างและสีด่างโดยทั่วไปมักใช้ย้อมส่วนประกอบของเซลล์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกรด

ขบวนการติดสีอาจเกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกริยาแลกเปลี่ยนไออ้อนระหว่างสีตำแหน่งซึ่งว่องไวที่ผิวหรือภายในเซลล์ตัวอย่างเช่น ไออ้อนสีของสารเข้าแทนที่ไออ้อนบนส่วนประกอบของเซลล์ หมู่เคมีบางอย่างซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกในเซลล์อาจมีไออ้อนประจุบวกรวมอยู่ด้วยเช่น Na^+ หรือ K^+ ในลักษณะของสารประกอบพวกเกลือ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าบริเวณรอบนอกของเซลล์นั้นมีประจุลบและรวมอยู่กับไออ้อนซึ่งมีประจุบวก เช่น (Bacterial cell$^-$) (Na^+) เป็นต้น ในกรณีของสีด่าง เช่น methylene bule มีไออ้อนสีเป็นประจุบวก (cation) สี methylene blue นั้นแท้จริงแล้วคือสารเคมีเรียกว่า methylene blue chloride ถ้าเขียนสัญญลักษณ์ของไออ้อนสีเป็น MB สูตรโมเลกุลของ methylene blue คือ MB^+Cl^-

การแลกเปลี่ยนไออ้อนซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างการย้อมอาจเขียนเป็นสมการซึ่ง MB^+ cation เข้าแทนที่ Na^+ ของเซลล์ได้ดังต่อไปนี้

$$(\text{Bacterial cell}^-)(Na^+) + (MB^+)(Cl^-) \longrightarrow (\text{Bacterial cell}^-)(MB^+) + (Na^+Cl^-)$$

การย้อมสีอย่างง่าย (SIMPLE STAINING) การทำให้เกิดสีแก่แบคทีเรียโดยใช้สารละลายสีเพียงชนิดเดียวเพื่อย้อมเยื่อเซลล์ที่แห้งติดแน่นกับสไลด์ถูกเรียกว่า การย้อมสีอย่างง่าย (simple staining) เยื่อเซลล์ซึ่งแห้งติดแน่นกับสไลด์ถูกทำให้ท่วมด้วยสารละลายสีชั่วระยะเวลาหนึ่งแล้วล้างออกด้วยน้ำและซับให้แห้ง เซลล์โดยปกติมักติดสีอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์บางชนิดโดยเฉพาะเมื่อย้อมด้วยสี methylene blue อาจปรากฏว่าก้อนสารบางอย่างภายในเซลล์ติดสีเข้มกว่าส่วนอื่น แสดงว่าส่วนประกอบทางเคมีของก้อนสารนั้นมีความสัมพันธ์ดึงดูดกับสีได้ดีกว่าส่วนอื่นของเซลล์

การย้อมสีเพื่อชี้ความแตกต่าง (DIFFERENTIAL STAINING) คือวิธีการย้อมสีซึ่งทำให้มองเห็นความแตกต่างระหว่างเซลล์แบคทีเรียหรือส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ เป็นวิธีการย้อมซึ่งค่อนข้างปราณีตมากกว่ากลวิธีการย้อมสีอย่างง่ายซึ่งเซลล์อาจต้องได้รับการอาบสารละลายสีมากกว่าหนึ่งชนิด

การย้อมสีแบบแกรม (Gram staining) เป็นการย้อมสีเพื่อชี้ความแตกต่างที่สำคัญมากที่สุดอย่างหนึ่งและใช้กันอย่างกว้างขวางในวิชาจุลชีววิทยา ในขบวนการนี้เยื่อเซลล์แบคทีเรียซึ่งแห้งติดแน่นกับสไลด์ถูกอาบด้วยสารละลายต่าง ๆ เป็นลำดับต่อไปนี้คือ crystal violet, iodine solution, alcohol (เพื่อล้างสี) และ safranin หรือสารละลายสีอย่างอื่นเพื่อย้อมทับ (counterstain) แบคทีเรียที่นำมาย้อมโดยวิธีการแบบแกรมอาจแบ่งออกได้เป็นสองหมู่คือ แบคทีเรียแกรมบวกซึ่งติดสีม่วงของ crystal violet และแบคทีเรียแกรมลบซึ่งไม่ติดสี crystal violet เมื่อย้อมด้วย safranin จึงติดสีแดง ขั้นตอนและผลของวิธีการนี้ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2

The Gram Stain

SOLUTIONS IN ORDER APPLIED	REACTION AND APPEARANCE OF BACTERIA Gram-positive	Gram-negative
1 Crystal violet (CV)	Cells stain violet	Cells stain violet
2 Iodine solution (1)	CV-I complex formed within cells; cells remain violet	CV-I complex formed withing cells; cells remain violet
3 Alcohol	Cell walls dehydrated. shrinkage of pores occurs, permeability decreases, CV-I complex cannot 'pass not of cells; cells remain violet	Lipid extracted from cell walls porosity increases, CV-I is removed from cell
4 Safranin	Cells not affected, remain violet	Cells take up this stain, become red

เป็นระยะเวลาหลายปีมาแล้วได้มีผู้พยายามอธิบายถึงกลไกปฏิกิริยาของแกรมไว้หลายอย่าง แต่ที่ค่อนข้างมีเหตุผลที่สุดคือหลักการซึ่งเกี่ยวกับโครงสร้างและส่วนประกอบของผนังเซลล์ แบคทีเรียแกรมลบมีไขมันมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบางกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก จากหลักฐานการทดลองพบว่าในระหว่างการย้อมเมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์สารพวกไขมันถูกละลายออกมาทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีรูพรุนมากขึ้นและสารซึมผ่านเข้าออกได้ง่าย ดังนั้น crystal violet-iodine (CV-I) complex ที่ติดอยู่จึงถูกสกัดออกมาทำให้แบคทีเรียแกรมลบไม่เกาะติดสี crystal violet แต่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีส่วนประกอบแตกต่างจากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบคือมีไขมันน้อยกว่า เมื่อถูกล้างด้วยแอลกอฮอล์จึงแห้งและมีรูเล็กลงทำให้สารซึมผ่านเข้าออกได้น้อยและ CV-I complex ไม่อาจถูกสกัดหลุดออกจากผนังเซลล์ได้

คำอธิบายอย่างอื่นก็คล้ายคลึงกันคืออาศัยพื้นฐานความแตกต่างกันในด้านการยอมให้สารซึมผ่านเข้าออกของผนังเซลล์ระหว่างแบคทีเรียสองพวกคือในแบคทีเรียแกรมบวก CV-I complex จะถูกกักขังอยู่ในผนังเซลล์หลังจากล้างด้วยแอลกอฮอล์แล้วทั้งนี้อาจเนื่องจากแอลกอฮอล์ทำให้รูของ glycopeptide หรือ peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียมีขนาดเล็กลง ส่วนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีปริมาณของ peptidoglycan

น้อยกว่า ดังนั้นจึงสานตัวกันอย่างไม่แน่นทึบ ทำให้รูของ peptidoglycan ในผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบยังคงมีขนาดโตพอให้ CV-I complex ถูกละลายออกมาได้แม้แต่ภายหลังจากการล้างด้วยแอลกอฮอล์แล้ว นอกจากนี้ถ้าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกถูกลอกออกด้วยเอนไซม์ lysozyme ส่วนของเซลล์ที่เหลือคือ protoplast หรือเซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ยังคงถูกย้อมติดได้ด้วย CV-I complex แต่ถูกล้างออกได้ง่ายด้วยแอลกอฮอล์ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกเป็นที่ซึ่งกักขังสีที่ใช้ย้อม การตรวจสอบแบคทีเรียซึ่งย้อมสีแบบแกรมทำให้สามารถศึกษาได้ทั้งทางสัณฐานวิทยาและปฏิกริยาแบบแกรม

ถึงแม้ว่าพวกแบคทีเรียแกรมลบให้ปฏิกิริยาแบบแกรมคงที่แต่ภายใต้สภาวะต่าง ๆ แบคทีเรียแกรมบวกอาจให้ปฏิกริยาแบบแกรมเปลี่ยนแปลงไปได้เรียกว่า gram-variable reaction ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียแกรมบวกเมื่อเก็บไว้นานเป็นเชื้อเก่าอาจสูญเสียความสามารถในการจับยึดสี crystal violet ดังนั้นจึงถูกย้อมติดสี safranin การเปลี่ยนแปลงแบบนี้บางครั้งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมของจุลินทรีย์หรือดัดแปลงกรรมวิธีการย้อมเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องกำหนดกรรมวิธีการย้อมให้เหมาะสม

แบคทีเรียแกรมบวกยังแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบในลักษณะอื่นอีกนอกจากปฏิกริยาการติดสี ดังในตารางที่ 4-3 แบคทีเรียแกรมบวกโดยทั่วไปตกอยู่ภายใต้อำนาจของเพ็นนิซิลินมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ แต่ทนทานต่อการถูกทำลายด้วยกลวิธีการทางภายภาพหรือเอนไซน์บางอย่างแบคทีเรียแกรมลบมักถูกทำลายได้ง่ายด้วยสารปฏิชีวนะอื่น เช่น streptomycin นอกจากนี้ยังมีรายงานแสดงถึงความแตกต่างอย่างอื่นอีกทำให้เชื่อได้ว่าแบคทีเรียสองหมู่นี้ความแตกต่างกันในระดับพื้นฐานเป็นอย่างมาก

การย้อมสีแบบแกรมมีประโยชน์อย่างมากในการกำหนดลักษณะของแบคทีเรีย แต่ไม่อาจใช้บอกความแตกต่างของจุลินทรีย์ในหมู่อื่นได้ เช่น ยีสต์ โปรโตซัว และฟังไจ เป็นต้น ยีสต์ทุกตัวจะถูกติดสีแกรมบวกเสมอ

ตารางที่ 4-3

Some Characteristics of Gram-positive and Gram-negative Bacteria

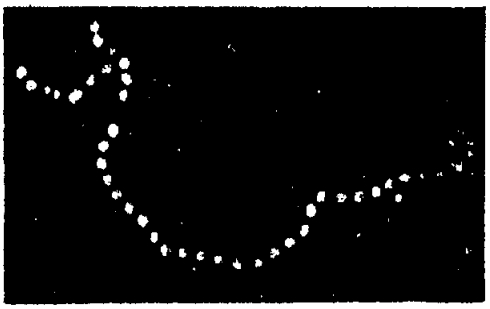
CHARACTERISTIC	RELATIVE DIFFERENCES Gram-positive	Gram-negative
Cell-wall composition	Low in lipids (1-4%)	High in lipids (11.22%)
Susceptibility to penicillin	More susceptible	Less susceptible
Inhibition by basic dyes, e.g., crystal violet	Marked inhibition	Less inhibition
Nutritional requirements	Many species relatively complex	Relatively simple
Resistance to physical disruption	More resistant	Less resistant

การย้อมสีแบบทนกรด (Acid-fast staining) เป็นการย้อมสีเพื่อชี้ความแตกต่างของแบคทีเรียอีกแบบหนึ่งซึ่งใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะแบคทีเรียในจีนัส **Mycobacterium** ซึ่งติดสีแบบทนกรด คราบของเซลล์แบคทีเรียที่แห้งติดแน่นกับสไลด์จะถูกอาบด้วยสารละลายเป็นลำดับดังต่อไปนี้ คือ carbolfuchsin (ร้อน) acid-alcohol และ methylene blue แบคทีเรียที่นำมาย้อมโดยวิธีนี้อาจถูกจัดแบ่งออกได้เป็นพวกทนกรด (acid-fast) ซึ่งติดสีแดงของ carbolfuchsin หรือพวกไม่ทนกรด (non-acid-fast) ถ้าถูกล้างออกได้ด้วยกรดผสมแอลกอฮอล์แล้วติดสี methylene blue ที่ย้อมทับลงไป

การย้อมสีแบบ Giemsa (Giemsa staining) วิธีการย้อมสีแบบนี้มีประโยชน์ในการชี้แสดงตำแหน่งของ rickettsia ในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) โดยเฉพาะ Rickettsia จะติดสีที่แตกต่างซึ่งมองเห็นได้ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน การย้อมสีแบบ Giemsa ยังถูกใช้ในการย้อมคราบเลือดบนสไลด์เพื่อตรวจสอบโปรโตซัวได้อีกด้วย

การย้อมเพื่อแสดงถึงโครงสร้างของเซลล์ วิธีการย้อมแบบพิเศษเพื่อแสดงถึงโครงสร้างภายในและนอกเซลล์แบคทีเรีย เช่น แฟลกเจลล่า แคปซูล นิวเคลียสหรือสารนิวเคลียส เอนโดสปอร์ และก้อนเม็ดต่าง ๆ หลักการและวิธีการย้อมก็เช่นเดียวกันกับการย้อมสีแบบแกรมและสีทนกรดซึ่งเป็นการย้อมเพื่อแสดงความแตกต่าง เนื่องจากโครงสร้างต่าง ๆ ของเซลล์มีความสามารถในการเกาะติดสีแตกต่างกันหรือแตกต่างจากเซลล์ส่วนอื่นทำให้สามารถมองเห็นแตกต่างกันได้

การย้อมสีกลับ (NEGATIVE STAINING) เป็นกลวิธีการย้อมซึ่งไม่ทำให้เซลล์ติดสี ในกรณีนี้เมื่อนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะทำให้มองเห็นภาพคล้ายกับที่มองเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ dark-field คือเซลล์หรือวัตถุที่ต้องการตรวจสอบโปร่งแสงตัดกับพื้นหลังซึ่งมืดทึบ การย้อมสีกลับแตกต่างจากการย้อมสีโดยตรง (Positive staining) ดังกล่าวมาแล้ว คือ สีที่ใช้ย้อมนั้นไม่เกาะติดเซลล์แต่ถูกปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งทับถมอยู่บนสไลด์ ในทางปฏิบัติมักใช้หมึกดำ (india ink) หรือสี nigrosine ผสมกับน้ำซึ่งมีแบคทีเรียแขวนลอยอยู่แล้วทำให้แผ่กระจายบนสไลด์และปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง ข้อดีของการย้อมแบบนี้คือทำให้สามารถศึกษาถึงสัณฐานวิทยาของเซลล์ได้โดยไม่ต้องทำให้เปลี่ยนแปลงทั้งทางเคมีและฟิสิกส์ โดยเฉพาะพวกที่มีแคปซูล การทำให้คราบเซลล์แห้งติดแน่นกับสไลด์ก่อนการย้อมสีและการใช้สารละลายต่าง ๆ ในขณะทำการย้อมอาจมีผลทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ทั้งรูปร่างและขนาด แต่การย้อมสีกลับจะไม่ทำให้เกิดปัญหาเช่นนี้ ดังรูปที่ 4-17



รูปที่ 4-17 Spherical bacteria arranged in chain formation (streptococci), as seen in a negative-stain preparation. *(Courtesy of G. J. Hageage, Jr.)*