

บทปฏิบัติการที่ 4 เรื่อง การย้อมโครงสร้างพิเศษ

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกเทคนิคการย้อมสีโครงสร้างบางชนิดของแบคทีเรียและได้ศึกษารูปร่างลักษณะของโครงสร้างนั้นๆ โดยการส่องกล้องจากสไลด์ที่ย้อมสีด้วยตนเองหรือจาก DEMONSTRATION SLIDE

การทดลองที่ 4.1 การย้อมเอนโดสปอร์

วัสดุอุปกรณ์

1. สไลด์ ลวดเขี่ยเชื้อ กระจกปอกคิ๊บ ลวดรองสไลด์ย้อมสี สามขา ตะเกียงเบนเสน กล้องจุลทรรศน์
2. สีย้อม Malachite green และ Safranin-O

เชื้อจุลินทรีย์

Bacillus sp. อายุ 36 ชั่วโมง

วิธีปฏิบัติ

เนื่องจากเอนโดสปอร์เป็นโครงสร้างที่มีผนังหนา มีน้ำอยู่น้อยมากหรือไม่มีเลย การย้อมสี เอนโดสปอร์จึงต้องใช้ความร้อนช่วย ในขณะที่หยดสีแรกลงไป โดยที่ความร้อนจะช่วยให้สปอร์โคท (Spore coat) บวมหรือขยายตัวออก ทำให้น้ำและสีซึมผ่านเข้าไปได้ วิธีย้อมมีหลายวิธี แต่วิธีที่แนะนำที่นี้เป็นของ Schaeffer-Fulton โดยใช้สี Malachite green และ Safranin-O เป็นสีแรกและที่ 2 ตามลำดับ ขั้นตอนการย้อมมีดังนี้คือ

1. เตรียมสไลด์สเมียร์เชื้อและฟิกซ์ แล้วนำไปวางบนลวดรองสไลด์แล้วนำไปวางพาดบนสามขา ควรใช้กระดาษฟางหรือกระดาษหนังสือพิมพ์รองบนพื้นโต๊ะปฏิบัติการ เพื่อป้องกันไม่ให้สีไหลเปื้อนบนโต๊ะปฏิบัติการ
2. หยดสี Malachite green ให้ท่วมรอยสเมียร์ พร้อมทั้งจัดสไลด์ให้อยู่ในแนวราบ เพื่อป้องกันสีหยดลงบนโต๊ะ
3. ใช้ตะเกียงเบนเสนปรับเปลวไฟให้ต่ำๆ แล้วเลื่อนเข้าไปลงใต้สไลด์ ไม่ควรลนอยู่ที่เดียวจะทำให้สไลด์แตก และเมื่อมีไอสีเกิดขึ้น ก็ให้เลื่อนตะเกียงออก อย่าให้เดือด ทำซ้ำเช่นนี้และคอยเติมสีอยู่เรื่อย ๆ อย่าให้สีแห้ง จนครบเวลา 10 นาที

4. เมื่อสไลด์เย็นแล้ว นำไปล้างสีออกโดยผ่านน้ำประปาเบา ๆ จนน้ำล้างไม่มีสีติดออกมา ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ
5. ย้อมทับโดยการหยดสี Safranin-O ลงไปให้ท่วมบริเวณสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปา ซับให้แห้งและนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

วิธีการให้ความร้อนในขณะหยดสี Malachite green นั้น อาจกระทำได้อีกวิธีคือการอังบนไอน้ำเดือด โดยวางกระป๋องเคลือบที่มี น้ำ บนสามขาแล้วต้มให้เดือด แล้วจึงวางสไลด์ที่สเมียร์เชื้อและฟิกซ์แล้ว พาดบนปากกระป๋องพร้อม ทั้งหยดสี Malachite green คอยเติมสีอย่าให้แห้งจนครบเวลาที่ต้องการ

การตรวจผลการย้อมเอนโดสปอร์

ให้ตรวจดูการติดสีของเอนโดสปอร์ที่อยู่ภายในเซลล์และเอนโดสปอร์ที่หลุดอยู่ภายนอกเซลล์ (Free endospore) ซึ่งจะติดสีเขียวของสี Malachite green ส่วน Vegetative cell และเซลล์ที่อยู่ในเอนโดสปอร์ หรือ Sporangium จะติดสีแดง วาดรูปลงในสมุดรายงานปฏิบัติการ

การทดลองที่ 4.2 การย้อมแคปซูล

1. วัสดุอุปกรณ์

- 1.1 สไลด์ ลวดเขี่ยเชื้อ กระป๋อง ปากคีบ ลวดรองสไลด์ย้อมสี สามขา ตะเกียงบุนเสน กล้องจุลทรรศน์
- 1.2 สีย้อม India ink และ Crystal violet

2. เชื้อจุลินทรีย์

- 2.1 *Klebsiella pneumoniae* เลี้ยงในอาหาร Tryptose phosphate agar

3. วิธีปฏิบัติ

วิธีที่ใช้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Gin ซึ่งรวมเอาวิธีการย้อมแบบ Negative และ Positive มาทำร่วมกัน การย้อมสีแคปซูลไม่จำเป็นต้องตรึงรอยสเมียร์โดยผ่านเปลวไฟ ทำดังนี้

- 3.1 ขั้นตอนแรกในการย้อมแคปซูลใช้วิธีการย้อม Negative stain โดยการผสมสี India ink และน้ำในอัตราส่วนเท่า ๆ กัน ลงบนด้านหนึ่งของสไลด์
- 3.2 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ Sterile เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงอยู่บนอาหารผิวเอียง Tryptose phosphate agar ผสมลงในหยดน้ำและสี

ใช้สไลด์ที่สะอาดอีกแผ่นหนึ่งแตะลงบนส่วนผสมของน้ำสีและเชื้อ ลากสไลด์ในแนวราบให้ส่วนผสมกระจายแผ่เต็มผิวหน้าสไลด์ (ดังรูปที่แสดงในส่วนของ การย้อม Negative stain) ทิ้งให้แห้ง

4. หยดสี Gram's crystal violet ให้ทั่วบริเวณที่ทำ Negative stain ของเชื้อไว้แล้วทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำเบา ๆ ซับให้แห้ง หรือทิ้งไว้ให้แห้งเอง แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจผล

การย้อมแคปซูล ให้ตรวจดูการติดสีโดยที่พื้นสไลด์ (Background) รอบ ๆ แคปซูล จะติดสีเทาดำ ส่วนแคปซูลจะใส เป็นวงรอบเซลล์และตัวเซลล์จะติดสีม่วง วาดรูปลงในสมุดรายงาน ปฏิบัติการ อย่างน้อย 2 ชนิด