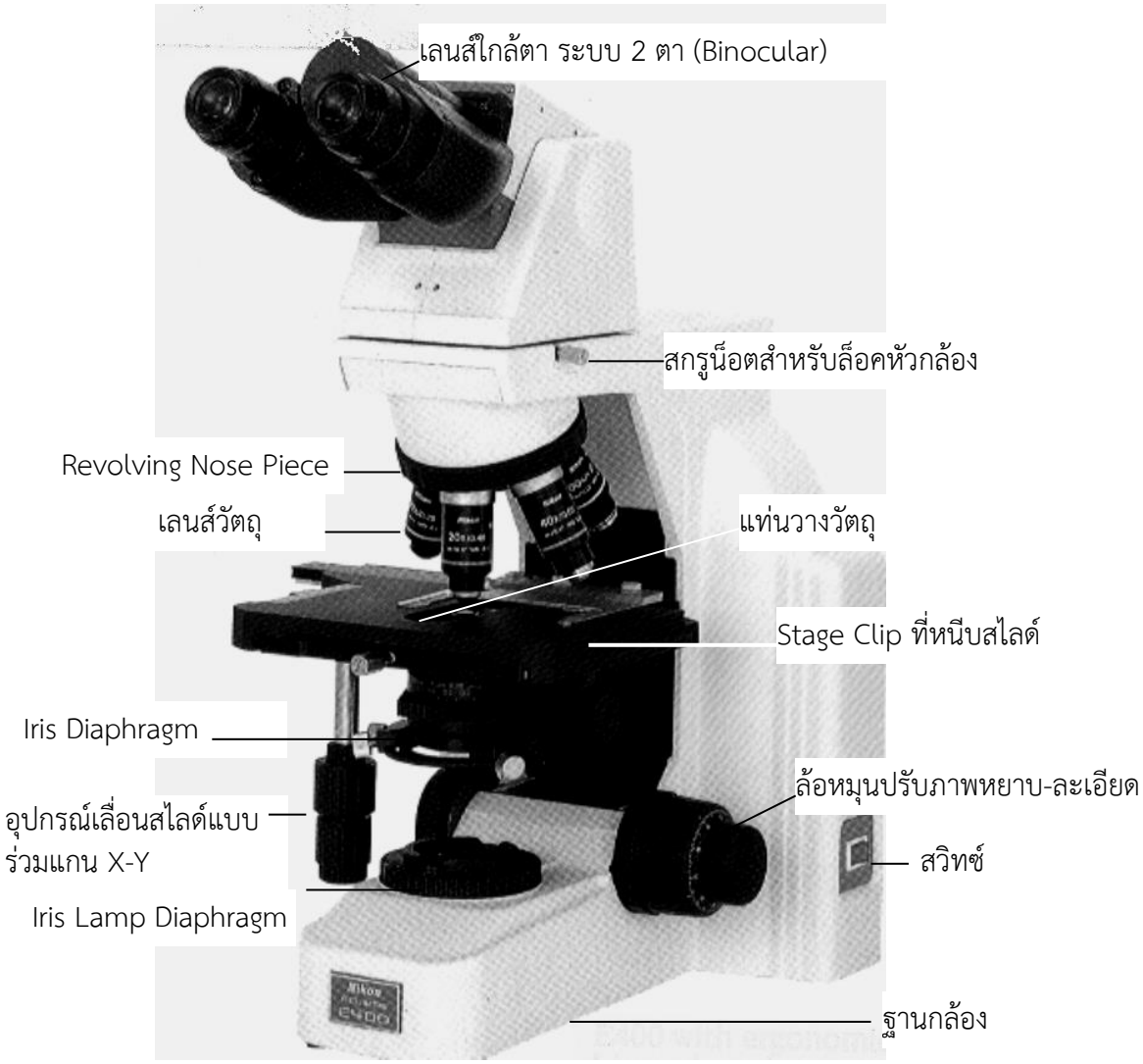
บทปฏิบัติการเรื่องส่วนประกอบและการใช้กล้องจุลทรรศน์

บทนำ

กล้องจุลทรรศน์เป็นอุปกรณ์ที่จำเป็นและสำคัญสำหรับการศึกษาทางชีววิทยา เพราะกล้องจุลทรรศน์ช่วยให้เห็นและทราบรายละเอียดต่าง ๆ ของวัตถุตัวอย่างที่ไม่สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า ภาพที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Compound Microscope) ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการสามารถขยายภาพได้ 10-1,000 เท่า กล้องจุลทรรศน์โดยทั่วไปประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังภาพ



ภาพที่ 1 ภาพแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ของกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา
ที่มา: ดัดแปลงจาก San Diego Miramar College (2011)

ส่วนประกอบและหน้าที่ของกล้องจุลทรรศน์

1. ฐาน (Base) ฐานของกล้องจุลทรรศน์มีลักษณะแตกต่างกันไปในแต่ละรุ่นและ Model เช่น อาจจะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ลักษณะคล้ายเกือกม้า เป็นต้น

2. กระจกสะท้อนแสง (Mirror) เป็นกระจกสองหน้า หน้าหนึ่งแบนราบอีกหน้าหนึ่งเว้าเล็กน้อยทำหน้าที่สะท้อนแสงให้ผ่านวัตถุตัวอย่างเข้าสู่เลนส์วัตถุ กล้องจุลทรรศน์รุ่นใหม่ ๆ มีหลอดไฟฟ้าแทนกระจก เมื่อเปิดไฟของกล้องแสงจะส่องผ่านวัตถุตัวอย่างสู่เลนส์วัตถุได้โดยตรง

3. เลนส์รวมแสง (Condenser) เป็นชุดเลนส์รวมแสงเพื่อให้เกิดความเข้มของแสงมาก สามารถปรับ Condenser ได้โดยหมุน Adjustment Knob ให้เคลื่อนขึ้นลงเพื่อให้แสงเข้าไปได้พอเหมาะกับวัตถุตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

4. ไอริสไดอะแฟรม (Iris Diaphragm) ใช้สำหรับเปิด - ปิดเพื่อให้แสงเข้าได้มากน้อยตามความเหมาะสม โดยใช้ก้านเล็ก ๆ ทางด้านข้างของชุดไดอะแฟรม

5. แท่นวางวัตถุตัวอย่าง (Stage) ลักษณะเป็นแท่นสี่เหลี่ยม ตรงกลางมีช่องสำหรับให้แสงผ่านขึ้นมาจาก Condenser เข้าสู่เลนส์วัตถุ

6. ที่หนีบแผ่นสไลด์ (Stage Clip) มี 2 แบบ แบบหนึ่งเป็นแผ่นโลหะบาง 2 แผ่นมีก้านสำหรับยึดกับแท่น ทำหน้าที่กดแผ่นสไลด์ให้อยู่กับที่ อีกแบบหนึ่งเป็นชุดมีที่จับสไลด์ และมีอุปกรณ์สำหรับเคลื่อนสไลด์ไปทางด้านซ้าย ขวา หน้า หลัง โดยมีล้อหมุน (Adjustment for Mechanical Stage Clip) ทำให้สามารถเคลื่อนสไลด์ดูภาพตัวอย่างได้อย่างสะดวก

7. แขน (Arm) เป็นส่วนของกล้องที่อยู่ระหว่างแท่นวางวัตถุกับส่วน ลำกล้อง ของกล้อง

8. เลนส์วัตถุ (Objective Lens) เลนส์วัตถุมีเป็นชุดประกอบด้วย 3 - 4 อัน แต่ละอันมีกำลังขยายต่างกัน ซึ่งเขียนไว้ด้านข้างของเลนส์แต่ละอัน เช่น 4x 10x 40x และ100x หมายถึงเลนส์ดังกล่าวมีกำลังขยายเป็น 4 เท่า 10 เท่า 40 เท่า และ 100 เท่า ตามลำดับ

เฉพาะเลนส์กำลังขยาย 100 เท่า เมื่อใช้จะต้องหยด Immersion Oil ลงบนสไลด์ตรงตำแหน่งที่ต้องการจะดูแล้วทำการปรับโฟกัสให้เห็นภาพต่อไป

ข้อพึงระวัง: ก่อนใช้หัว x100 ควรปรับความชัดถึงหัว x40 ก่อน แล้วเลื่อนหัว x40 เล็กน้อย แต่ให้หัว x100 ยังไม่เข้าตำแหน่ง แล้วหยด Immersion Oil เพื่อดูภาพต่อไป หลังจากเสร็จสิ้นการดูที่หัว x100 แล้ว ควรจะปรับไปที่หัว x4 ห้ามไม่ให้หมุนย้อนกลับ เพราะจะทำให้ Immersion Oil ติดหรือเลอะที่หัว x40 ได้ หลังการใช้ให้เช็ด Immersion Oil ที่หัว x100 ออกให้หมด

9. รีโวลวิงโนสพีซ (Revolving Nose Piece) ลักษณะเป็นแผ่นกลมมีเลนส์วัตถุติดอยู่สามารถหมุนได้รอบเพื่อเปลี่ยนเลนส์วัตถุกำลังขยายต่าง ๆ ตามความต้องการ

10. ลำกล้อง (Body Tube) เป็นท่อตรงอยู่ระหว่าง Revolving Nose Piece กับเลนส์ใกล้ตาหรือ Ocular ความยาวลำกล้องแต่ละรุ่นยาวไม่เท่ากันบางรุ่นอาจจะอยู่ในแนวตั้งบางรุ่นอยู่ในแนวเอียง

11. เลนส์ใกล้ตา (Ocular หรือ Eye Piece) เป็นส่วนที่ดูภาพจากกล้องจุลทรรศน์ สวมอยู่ที่ปลายด้านบนของ ลำกล้อง ถอดเปลี่ยนได้ การใช้จึงต้องระวังหลุดหล่น โดยเฉพาะถ้าถือกล้องเอียงจะทำให้หลุดหล่นเกิดการเสียหายได้ กล้องบางรุ่นมีเลนส์ใกล้ตา 2 อันเรียกว่า Binocular สามารถปรับความห่างของเลนส์ทั้งสองอันให้เหมาะกับความห่างของตาแต่ละคนได้

12. ล้อหมุนปรับโฟกัส (Adjustment Knob) มี 2 ชุด อาจจะอยู่แกนเดียวกันหรือต่างแกนกัน ประกอบด้วย

12.1 ล้อปรับโฟกัสหยาบ (Course Adjustment Knob) เมื่อหมุนล้อชุดนี้ ทำให้การปรับโฟกัสได้เร็ว อาจจะเกิดโดยแท่นวางวัตถุเคลื่อนแต่บางรุ่นชุดเลนส์วัตถุเคลื่อน

12.2 ล้อปรับโฟกัสละเอียด (Fine Adjustment Knob) เมื่อหมุนล้อโฟกัสชุดนี้แท่นวางวัตถุหรือชุดเลนส์วัตถุเคลื่อนที่ได้ช้ามาก ปกติจะใช้ปรับเพื่อให้เห็นภาพคมชัดหรือในขณะที่ใช้เลนส์กำลังขยาย 4x 10x

วัตถุประสงค์

1. บอกชื่อและอธิบายการทำงานของส่วนประกอบต่าง ๆ ของกล้องจุลทรรศน์ได้ถูกต้อง
2. สามารถใช้หรือแสดงการใช้ส่วนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ได้ถูกต้อง
   - การปรับโฟกัส
   - การเตรียมสไลด์สดเพื่อใช้สำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์
   - คำนวณกำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ได้ถูกต้อง
   - สามารถสรุปและเขียนภาพ 3 มิติจากภาพที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์
   - เปลี่ยนขนาดและลักษณะของวัตถุที่เห็นเมื่อใช้กำลังขยายต่างกัน
   - ทำความสะอาดกล้องจุลทรรศน์และจัดเก็บรักษาได้ถูกวิธี

สื่อประกอการเรียนบทปฏิบัติการเรื่องส่วนประกอบและการใช้กล้องจุลทรรศน์

https://drive.google.com/file/d/1Evpp2tNuaIzFsL_0WTGoIJAFZMOqlG4H/view?usp=sharing

วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. ตัวอย่างวัตถุที่ต้องการศึกษา
3. พู่กันเบอร์ 3 เข็มเขี่ย ใบมีดโกน
4. ตัวอย่างสไลด์ถาวรต่าง ๆ ที่ต้องการให้ศึกษา
5. สไลด์และ กระจกปิดสไลด์
6. หลอดหยดสาร
7. สีย้อม

วิธีการปฏิบัติ

1. ศึกษาชื่อและหน้าที่ส่วนต่าง ๆ ของกล้องจุลทรรศน์โดยเปรียบเทียบจากกล้องจุลทรรศน์ที่จัดให้กับภาพแสดงส่วนต่าง ๆ ของกล้องจุลทรรศน์ ดังต่อไปนี้

1.1 วางกล้องจุลทรรศน์ให้ตรงห่างจากขอบโต๊ะพอประมาณหมุนกระจกให้รับแสงและสะท้อนเข้าสู่ช่องที่แท่นวางวัตถุตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์บางรุ่นใช้แสงจากหลอดไฟฟ้าเมื่อเปิดสวิทช์ไฟแสงจะผ่านเข้าสู่ช่องของแท่นวางวัตถุได้โดยตรง

1.2 หมุน Revolving Nose Piece ให้เลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำที่สุดอยู่ในตำแหน่งใกล้วัตถุตัวอย่างที่สุด (เมื่อหมุนตรงกับตำแหน่งพอดี จะมีปุ่มเล็ก ๆ กดลงในร่องรองรับที่บริเวณฐานของเลนส์วัตถุ)

1.3 ให้ลองหมุน Condenser ขึ้นจนอยู่ในตำแหน่งสูงสุด แล้วค่อย ๆ หมุนให้เลื่อนลงช้า ๆ ประมาณ 3 มิลลิเมตร หรือเลื่อนให้ได้ตำแหน่งที่รวมอยู่ที่วัตถุตัวอย่างมากที่สุด

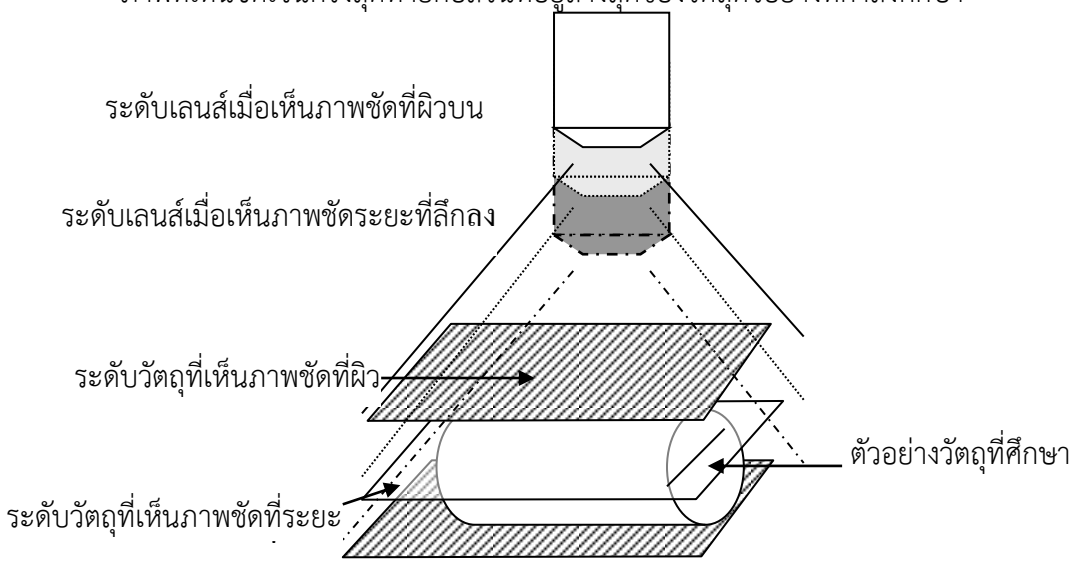
1.4 ให้ลองปรับ Iris Diaphragm โดยเปิดให้กว้างที่สุดก่อน สังเกตปริมาณที่ผ่านเข้าทาง Ocular แล้วค่อย ๆ ปิดลงช้า ๆ จนเหลือประมาณ 3 ใน 4 ให้สังเกตว่าปิดลงขนาดใดจึงมีสภาพแสงเหมาะสมโดยสังเกตได้ว่าเมื่อดูจาก Ocular แล้วไม่รู้สึกเคืองตา

1.5 นำสไลด์ถาวรที่จัดเตรียมให้วางลงบนแท่นวางวัตถุจับด้วยคลิปให้เรียบร้อยเลื่อนให้สไลด์ตัวอย่างที่จะศึกษาอยู่ตรงที่แสงส่องขึ้นมาจาก Condenser

1.6 ให้มองด้านข้างของเลนส์วัตถุ หมุนล้อโฟกัสหยาบจนเลนส์วัตถุอยู่ห่างจากสไลด์ 1 - 2 มิลลิเมตร

1.7 เปลี่ยนมาดูผ่านทาง Ocular (ให้พยายามฝึกมองโดยลืมตาทั้งสองข้างเพื่อป้องกันไม่ให้เกร็งกล้ามเนื้อใบหน้า กล้ามเนื้อตา ไม่เช่นนั้นแล้วจะปวดเมื่อยลูกนัยน์ตา) ค่อย ๆ หมุนล้อโฟกัสหยาบให้เลนส์วัตถุห่างออกจากสไลด์ช้า ๆ จนเห็นภาพ แล้วเปลี่ยนมาหมุนโฟกัสละเอียดจนเห็นภาพชัดเจนและให้ลองหมุนต่อไปอีกเล็กน้อย จะเห็นภาพคมชัดอีกลักษณะหนึ่งและเห็นได้หลายระยะ

- ภาพที่เห็นชัดเจนครั้งแรกคือผิวด้านบนสุดของวัตถุตัวอย่าง
- ภาพที่คมชัดครั้งต่อมาคือตำแหน่งที่ลึกลงไป
- ภาพที่เห็นชัดเจนครั้งสุดท้ายคือส่วนที่อยู่ล่างสุดของวัตถุตัวอย่างที่กำลังศึกษา



ภาพที่ 2 ระยะที่เห็นภาพชัดในระดับต่าง ๆ จากกล้องจุลทรรศน์

1.8 เมื่อเห็นภาพคมชัดแล้ว ให้ลองเลื่อนสไลด์ไปทางซ้าย ให้สังเกตภาพเคลื่อนไปทางทิศใด แล้วลองเลื่อนสไลด์ไปทางขวา ให้สังเกตอีกครั้งว่าภาพเคลื่อนไปทางทิศใด

1.9 ขนาดของภาพที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ เป็นภาพที่ขยายขึ้นจากขนาดวัตถุคำนวณได้จากค่า **กำลังขยายของเลนส์วัตถุ x กำลังขยายของเลนส์ใกล์ตา** ดังตัวอย่างต่อไปนี้

กำลังขยายของเลนส์วัตถุ	กำลังขยายของเลนส์ใกล์ตา	ขนาดของภาพที่ขยาย
4x	10x	40x
10x	10x	100x
40x	10x	400x
100x	10x	1000x

1.9.1 ให้นักศึกษาวาดภาพที่เห็นจากใช้เลนส์ 10x

1.9.2 ให้ลองเปลี่ยนใช้เลนส์วัตถุที่กำลังขยาย 10x เป็น 40x ทำได้โดยการหมุน Revolving Nose Piece ให้เลนส์อยู่ในตำแหน่งแทนที่เลนส์กำลังขยาย 4x ให้สังเกตภาพทาง Ocular โดย

ไม่ต้องปรับโฟกัส แล้วให้ลองปรับโฟกัสจนเห็นภาพคมชัดโดยการหมุนปรับละเอียด เปิด Iris Diaphragm ให้กว้างขึ้นและปิดลงให้สังเกตความชัดของภาพว่าแตกต่างกันหรือไม่ ภาพในขณะที่เปิด Iris Diaphragm เปิด Diaphragm ให้กว้างขึ้นกับปิดให้แคบลงอย่างไหนชัดกว่ากัน

1.9.3 ให้นักศึกษาเปรียบเทียบขนาดของภาพ ขอบเขตของภาพที่เห็นภายในวงกลม (Diameter of Field) เมื่อใช้เลนส์วัตถุกำลังขยายต่าง ๆ กันและให้สังเกตระยะระหว่างเลนส์วัตถุกับสไลด์ ระยะที่สั้นที่สุดเมื่อใช้เลนส์วัตถุกำลังขยายใดและกำลังขยายเท่าใดที่ระยะยาวที่สุด

1.10 ทดลองใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100x โดยเริ่มจากใช้เลนส์วัตถุ 10x ปรับโฟกัสให้เห็นภาพคมชัด หมุน Revolving Nose Piece เลื่อนเลนส์กำลังขยาย 10x ออกจากตำแหน่งที่รับแสงหรือตำแหน่งที่ดูภาพหยด Immersion Oil ลงบนตำแหน่งที่ต้องการศึกษา 1-2 หยดแล้วเปลี่ยนเป็นเลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 100x เข้าสู่ตำแหน่งรับแสง ดูภาพทาง Ocular ปรับโฟกัสโดยใช้ล้อปรับละเอียดเท่านั้นจนเห็นภาพชัดเจน ให้สังเกตเปรียบเทียบความละเอียดขนาดของภาพที่เห็นกับภาพที่เห็นในขณะที่ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40x

2. การเตรียมสไลด์ตัวอย่างสดสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Wet Mount Slide)

วัสดุและอุปกรณ์

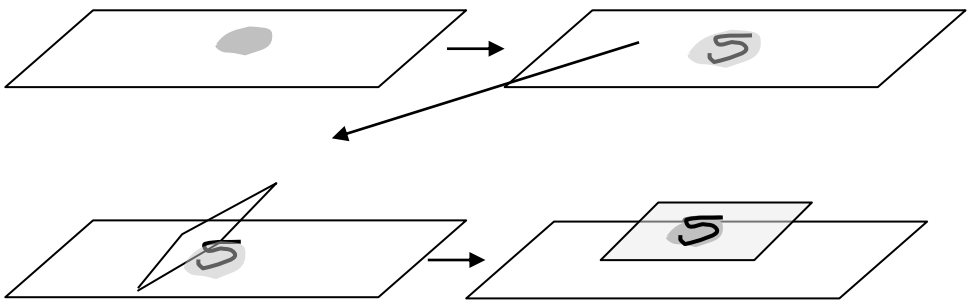
1. แผ่นสไลด์ที่สะอาด
2. หลอดหยดสาร
3. วัสดุตัวอย่างที่ต้องการศึกษา เช่น กระดาษหมายเลข 5 หัวหอม ใบสาหร่ายหางกระรอก
4. กระจกปิดสไลด์
5. ภาชนะใส่น้ำ เช่น Petri Dish

วิธีการเตรียมสไลด์สด

วัสดุตัวอย่างที่ต้องการศึกษาต้องบางพอที่แสงผ่านได้ดีและวางบนสไลด์ปิดด้วย กระจกปิดสไลด์ก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ให้เช็ดด้านล่างสไลด์ให้แห้งและสะอาดไม่เช่นนั้นจะทำให้สไลด์ติดกับแท่นวางสไลด์ เคลื่อนที่ได้ยากและยังทำให้กล้องสกปรก ราเจริญได้ง่ายทำให้กล้องเสียหายได้

ตัวอย่างที่เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น สาหร่าย ใบสาหร่ายหางกระรอก โพรโทซัว สามารถใช้ทั้งหมดโดยไม่ต้องตัดออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ เรียกว่าทำ Whole Mount เตรียมได้ดังต่อไปนี้

1. หยดน้ำที่มีตัวอย่างสาหร่าย หรือ โพรโทซัวลงบนสไลด์ที่สะอาด ถ้าตัวอย่างมีขนาดใหญ่พอที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า ให้หยดน้ำลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันหรือเข็มเขี่ยตัวอย่างลงบนหยดน้ำ
2. ปิดด้วย กระจกปิดสไลด์ ทำตามลำดับ

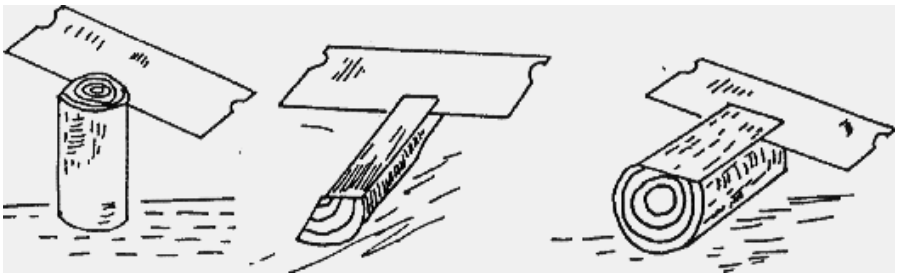


ภาพที่ 3 ภาพแสดงลำดับการเตรียมสไลด์

จับขอบ กระจกปิดสไลด์ วางให้ขอบด้านหนึ่งแตะกับหยดน้ำ สังเกตว่าเมื่อน้ำแผ่ไปตลอดความยาวของขอบ กระจกปิดสไลด์ แล้วค่อย ๆ เอียงลงเล็กน้อย ใช้เข็มเขี่ยหรือพู่กันประคอง กระจกปิดสไลด์ ไว้ค่อย ๆ หย่อนลงจนปิดสนิท ถ้าทำได้ถูกต้องและดีจะปิดสนิทไม่มีฟองอากาศอยู่ภายใต้ กระจกปิดสไลด์

วิธีเตรียมตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะเตรียมแบบ Whole Mount จะต้องตัดให้มีขนาดเล็กและบางให้แสงผ่านได้ ดังนี้

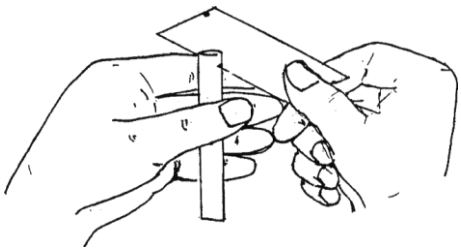
- เนื้อเยื่อผิวใบ ใช้ใบมีดโกนกรีดส่วนผิวหรือใช้วิธีลอก เช่น เยื่อหัวหอม ผิวใบ เมื่อได้แล้วให้แช่ในน้ำสะอาดทันที ตัดให้มีขนาดพอเหมาะวางลงบนสไลด์ หยดน้ำลง 1 หยด ปิดด้วย กระจกปิดสไลด์
- เนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่อยู่ในตำแหน่งลึกกว่าเนื้อเยื่อผิว ตัดส่วนที่ต้องการศึกษาให้เป็นชิ้นบาง ๆ เรียกว่ากว่าการ Section การตัดมีหลายแบบดังนี้
  - ตัดตามยาว (Longitudinal Section, L - S)
  - ตัดขวางหรือในแนวตั้งฉากกับแนวแกนตามยาว (Cross Section, X - S)
  - ตัดตามยาวลักษณะเส้นสัมผัส (Tangential Section, T - S)
  - ตัดตามยาวในแนวรัศมี (Radial Section)



ภาพที่ 4 ภาพการตัด Section แบบต่าง ๆ

- ตัดตัวอย่างที่ต้องการศึกษาให้มีขนาดพอเหมาะที่จับถือสะดวก (ประมาณ 2 - 4 เซนติเมตร) ถือตัวอย่างที่ต้องการตัดด้วยหัวแม่มือกับนิ้วชี้ในมือซ้าย ใช้นิ้วชี้ประคองใบมีดเพื่อบังคับให้ได้ความหนาตามต้องการจัดให้ชิ้นส่วนที่ Section อยู่ในแนวดิ่ง
- ตัดตัวอย่างที่ต้องการศึกษาให้มีขนาดพอเหมาะที่จะจับถือได้สะดวก (ประมาณ 2 - 4 เซนติเมตร) จับตัวอย่างที่ต้องการ Section ด้วยนิ้วหัวแม่มือกับนิ้วกลางมือซ้าย ใช้นิ้วชี้ประคองใบมีดเพื่อบังคับให้ได้ความหนาตามต้องการ จัดชิ้นส่วนที่จะ Section อยู่ในแนวดิ่ง

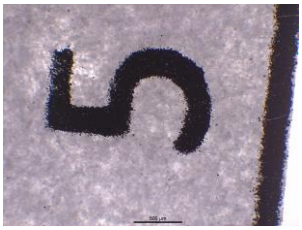
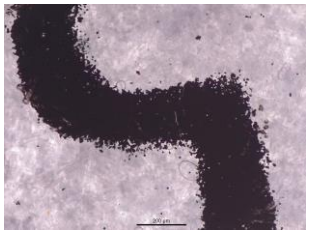
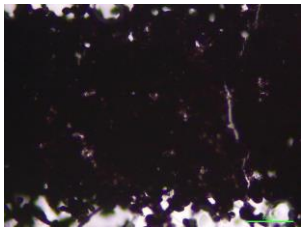
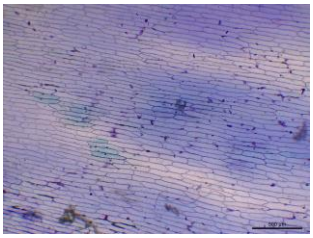
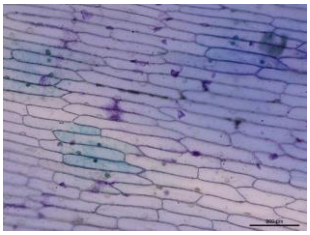
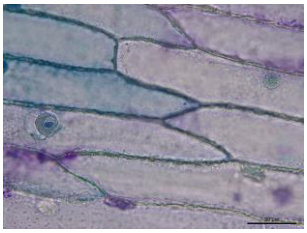
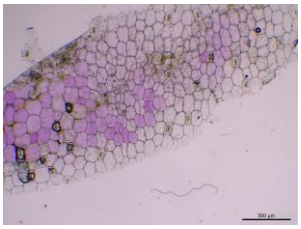
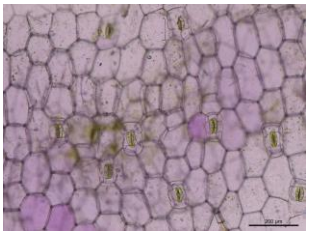
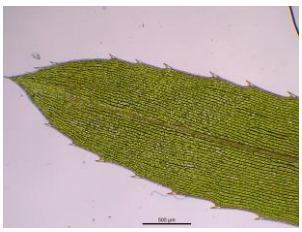
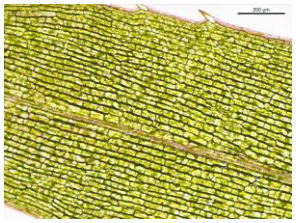
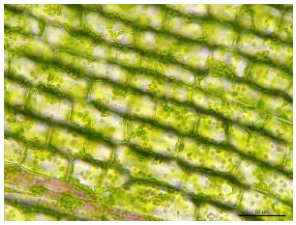
ถือใบมีดด้วยมือขวาหรือมือที่ถนัดให้ใบมีดอยู่ระหว่างนิ้วชี้กับหัวแม่มือและวางอยู่ในแนวราบคมมีดตั้งฉากกับวัตถุที่จะตัด จรดใบมีดเข้ากับชิ้นส่วนที่จะตัดให้ใบมีดวางพาดบนนิ้วชี้มือที่จับวัตถุที่จะตัดการเคลื่อนนิ้วขึ้น-ลงทำให้สามารถบังคับความหนาของ Section ได้ตามต้องการดึงใบมีดเข้าหาตัวเองครั้งเดียวให้ตัด Section ออกมาได้ 1 ชิ้นหรือ 1 แผ่นบาง ๆ แช่น้ำไว้ (อย่างตัดแบบเฉือน) ตัดให้ได้จำนวนมากตามที่ต้องการแล้วเลือกแผ่นที่บางมากและสมบูรณ์ไปศึกษาต่อไป

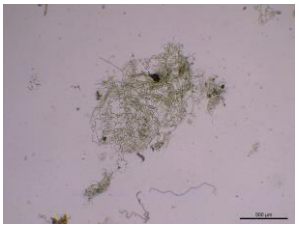
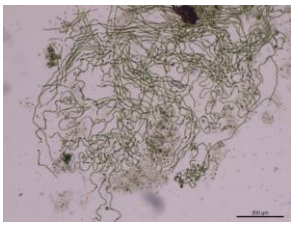
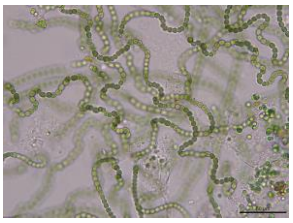


ภาพที่ 5 แสดงการจับและตัด Section

- หยดน้ำลงบนสไลด์1หยด
- ใช้พู่กันเบอร์ 2 หรือเบอร์ 3 เขี่ย Section ที่บางวางที่หยดน้ำ
- ปิดด้วย กระจกปิดสไลด์
- เช็ดด้านล่างสไลด์ให้แห้งทำความสะอาดส่วนที่เลอะนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์
- วาดภาพตามที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์พร้อมกับบอกกำลังขยายของภาพ

ตัวอย่างภาพตามที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่าง ๆ

ชื่อตัวอย่าง	กำลังขยาย		
	40x	100x	400x
หมายเลข 5			
เยื่อหอม			
ว่านกาบหอย			
สาหร่ายหางกระรอก			

สาหร่าย เซลล์เดียว			

ผลการศึกษา

ชื่อภาพ..... กำลังขยาย.....	ชื่อภาพ..... กำลังขยาย.....
ชื่อภาพ..... กำลังขยาย.....	ชื่อภาพ..... กำลังขยาย.....
ชื่อภาพ..... กำลังขยาย.....	ชื่อภาพ..... กำลังขยาย.....

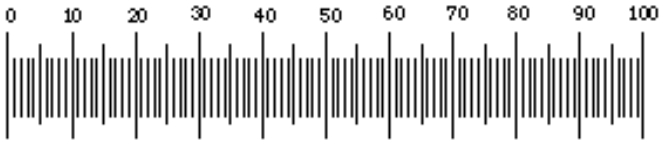
การวัดขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Measurement with the Microscope)

การใช้กล้องจุลทรรศน์เพื่อการศึกษาสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ในด้านโครงสร้างของเซลล์ สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และกิจกรรมต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ตลอดจนการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต จำเป็นที่จะต้องมีการวัดขนาดตัวอย่างที่ทำการศึกษา เพื่อให้ทราบถึงรายละเอียดของตัวอย่างนั้น ๆ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะบางอย่างคล้ายคลึงกัน แต่อาจจะมีขนาดที่แตกต่างกันออกไป อย่างเช่น พารามีเซียม 2 ชนิด ที่มีโครงสร้างคล้ายกัน แต่ขนาดแตกต่างกัน นั่นคือ *Paramecium aurella* จะมีขนาดเพียง 120 – 180 ไมครอน แต่ *Paramecium multimicronucleatum* มีขนาดถึง 200 – 350 ไมครอน เป็นต้น การวัดขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงสิ่งสำคัญในการศึกษาทางชีววิทยา ซึ่งอุปกรณ์และเครื่องมือที่สำคัญในการวัดขนาดสิ่งมีชีวิตด้วยกล้องจุลทรรศน์มีดังนี้

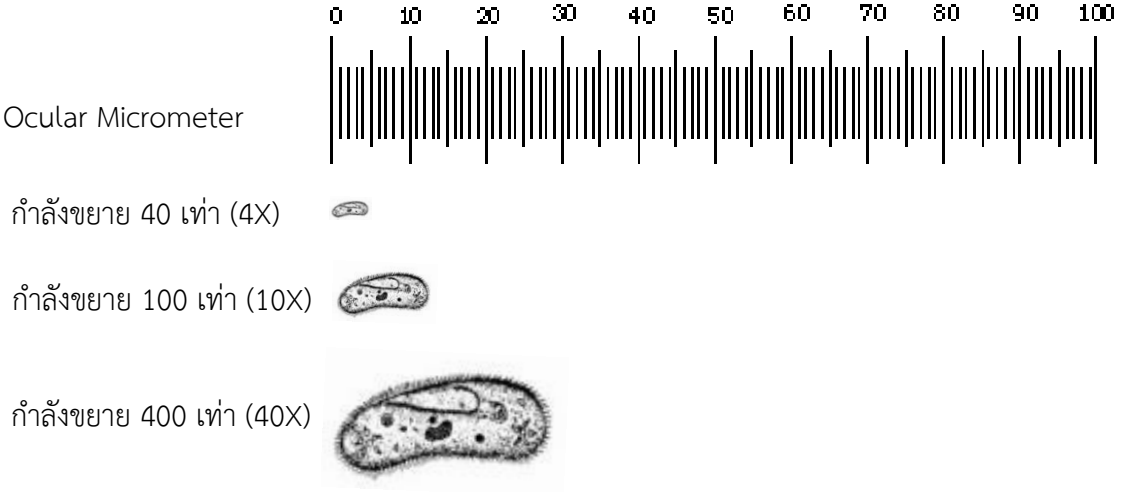
Stage Micrometer หรือ Objective Micrometer เพื่อแทนตัวอย่างสิ่งมีชีวิต และ Ocular Micrometer หรือ Eyepiece Micrometer

Ocular Micrometer

Ocular Micrometer เป็นอุปกรณ์ที่ติดอยู่ใกล้กับเลนส์วัตถุ มีลักษณะเป็นแผ่นแก้วกลมแต่ไม่ใช่เลนส์ และมีสเกลเพื่อใช้ในการวัดขนาดตัวอย่าง ซึ่งในกล้องที่นักศึกษาใช้ Ocular Micrometer ในกล้องจะมีสเกลบอกจำนวนช่องอยู่ในด้านใดด้านหนึ่งของเลนส์ตา ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายภาพด้านล่าง

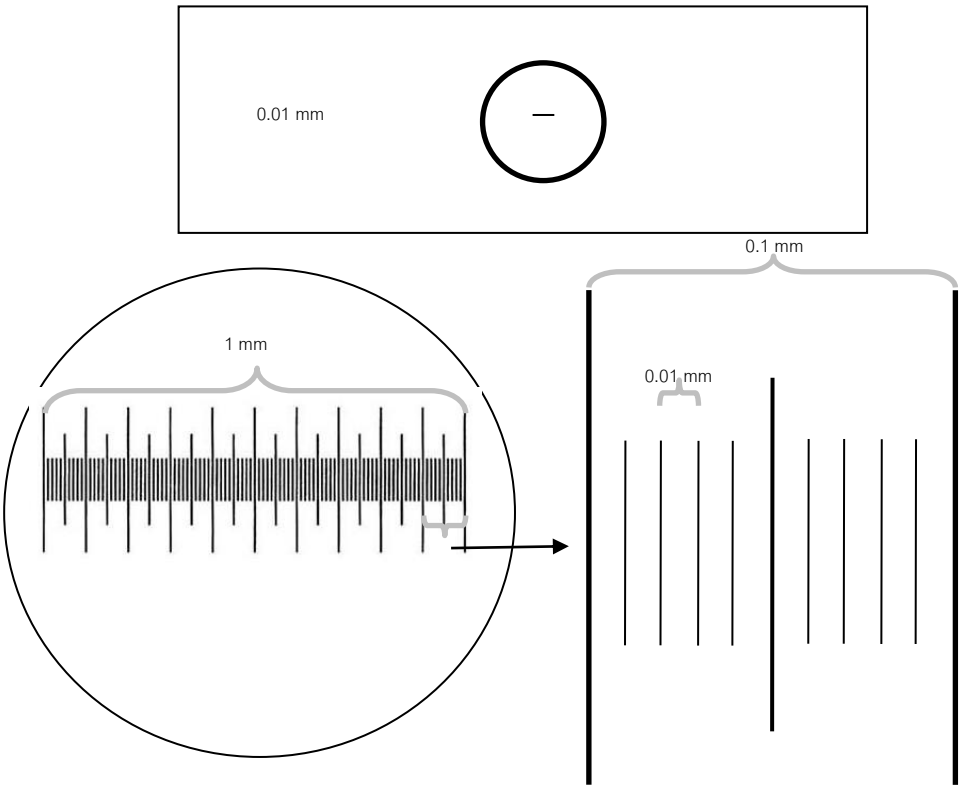


ซึ่งนักศึกษาต้องทำการสอบเทียบความยาวในแต่ละช่องของ Ocular Micrometer ในทุก ๆ กำลังขยายของเลนส์วัตถุ สำหรับการวัดตัวอย่างโดยใช้ Ocular Micrometer นั่น นักศึกษาจำเป็นที่จะต้องเลือกการวัดในช่วงที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ศึกษาให้มากที่สุด ยกตัวอย่างเช่น นักศึกษาต้องการวัดขนาด พารามีเซียมที่มีขนาดประมาณ 120 ไมครอน นักศึกษาควรใช้กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อทำให้เกิดค่าความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด ดังภาพที่แสดงด้านล่าง



Stage Micrometer

Stage Micrometer เป็นอุปกรณ์ที่มีความยาวที่แน่นอน ซึ่งมีความยาวทั้งสเกลคือ 1 มิลลิเมตร แบ่งออกเป็น 100 ช่องดังนั้นแต่ละช่องจะมีระยะห่าง 0.01มิลลิเมตร หรือ10 ไมครอน ดังภาพด้านล่าง



การสอบเทียบ Ocular Micrometer

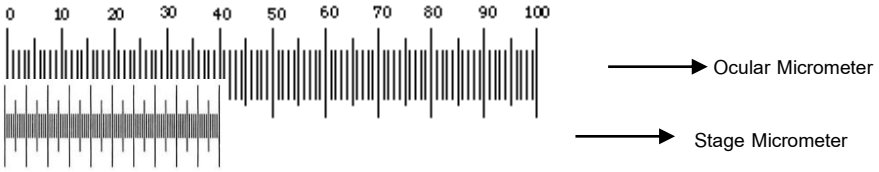
หากนักศึกษาทราบค่าที่ผ่านการสอบเทียบความเที่ยงตรงของ Ocular Micrometer มาแล้ว อาจจะนำค่าความยาวของกำลังขยายนั้น ๆ มาใช้เพื่อคำนวณความขนาดของตัวอย่างได้ แต่หากกล้องที่นักศึกษาจะใช้เพื่อการวัดขนาดตัวอย่างไม่ได้ผ่านการสอบเทียบ หรือผ่านการสอบเทียบมานานแล้ว ซึ่งกล้องจุลทรรศน์อาจเกิดการชำรุดหรือมีความผิดปกติจากการใช้งาน นักศึกษาอาจจะต้องทำการสอบเทียบใหม่เพื่อให้ได้ค่าความยาวที่แน่นอนของ Ocular Micrometer ในกำลังขยายนั้น ๆ และหากนักศึกษาเปลี่ยนกล้องจุลทรรศน์จากตัวหนึ่งไปใช้อีกตัวหนึ่ง นักศึกษาจะต้องทำการสอบเทียบใหม่ เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์แต่ละกล้องจะมีความถูกต้องของ Ocular Micrometer ไม่เท่ากัน แม้จะเป็นกล้องยี่ห้อเดียวกัน รุ่นเดียวกัน และกำลังขยายเท่ากันค่าความถูกต้องของแต่ละกล้องยังไม่สามารถนำมาใช้แทนกันได้ โดยการสอบเทียบมีวิธีการดังนี้

1. นำ Stage Micrometer มาวางลงบนแท่นวางวัตถุ
2. ปรับเลื่อนสเกลของ Micrometer ทั้งสองมาขนานกันและเลื่อนทับซ้อนกันพอดีให้จุดเริ่มต้นของทั้งสองสเกลตรงกันหลังจากนั้นนับจำนวนช่องที่ Ocular Micrometer ตรงหรือทับพอดีกับ Stage Micrometer และนับจำนวนช่องด้วยนำมาเปรียบเทียบกัน คำนวณหาความยาวของ 1 ช่องของ Ocular Micrometer โดยใช้สูตรดังนี้

$$1 \text{ ช่องของ Ocular Micrometer} = \frac{\text{จำนวนช่องของ Stage Micrometer}}{\text{จำนวนช่องของ Ocular Micrometer}} \times \text{ค่าความยาว 1 ช่องของ Stage Micrometer}$$

กำลังขยาย 40 เท่า

เมื่อเทียบ Stage Micrometer กับ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 40 เท่า จะเห็นดังภาพด้านล้าง



จากภาพที่เห็นในกล้อง เมื่อเปรียบเทียบกับความยาวของ Stage Micrometer ที่นักศึกษาทราบความยาวที่แน่นอนแล้ว นักศึกษาสามารถนำค่าดังกล่าวมาคำนวณหาความยาวใน 1 ช่องของ Ocular Micrometer ได้ดังนี้

Stage Micrometer มีความยาว = 1 มิลลิเมตร ซึ่งมีจำนวนช่องทั้งหมด 100 ช่อง นำความยาวของ Stage Micrometer มาหารจำนวนช่องเพื่อให้ทราบความยาวใน 1 ช่องของ Stage Micrometer (หน้าที่ 2)

ความยาวของ Stage Micrometer 1 ช่อง = 1 ÷ 100

= 0.01 มิลลิเมตร

นั่นคือความยาวของ Stage Micrometer 1 ช่องมีความยาว 0.01 มิลลิเมตร หรือคิดเป็น 10 ไมครอน

หลังจากที่รู้ความยาวในแต่ละช่องของ Stage Micrometer แล้ว นำ Stage Micrometer มาวางบนแท่นวางวัตถุแล้วส่องดูด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย 4x (หากนักศึกษาไม่ทราบเกี่ยวกับกำลังขยายของภาพที่มองจากกล้องจุลทรรศน์ ให้ดูเลขกำลังขยายที่เลนส์วัตถุ แล้วนำมาคูณกับกำลังขยายที่เลนส์ใกล้ตา จะได้กำลังขยายของกล้องที่มองเห็น ยกตัวอย่างเช่น เลนส์วัตถุมีกำลังขยาย 10x และเลนส์ใกล้ตามีกำลังขยาย 10x ภาพที่นักศึกษามองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์จะมีกำลังขยาย 100 เท่า)

นับจำนวนสเกลของ Ocular Micrometer ที่วางพอดีกับ Stage Micrometer แล้วนำมาคำนวณหาความยาว 1 ช่องของ Ocular Micrometer

1 ช่องของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 40 เท่า $= \frac{\text{จำนวนช่องของ Stage Micrometer}}{\text{จำนวนช่องของ Ocular Micrometer}} \times$ ค่าความยาว 1 ช่องของ Stage Micrometer

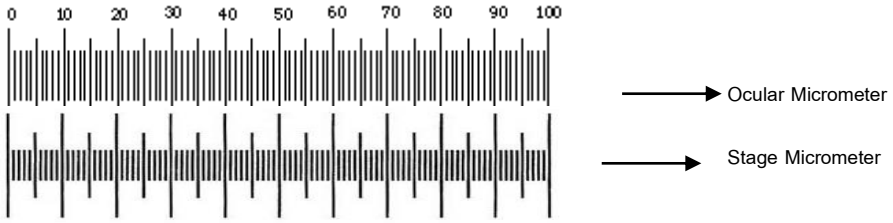
$$\textbf{1 ช่องของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 40 เท่า} = \frac{\textbf{100 ช่อง}}{\textbf{40 ช่อง}} \times \textbf{0.01 มิลลิเมตร}$$

1 ช่องของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 40 เท่า = 0.025 มิลลิเมตร

แปลงค่าความยาวที่มีหน่วยเป็นมิลลิเมตรให้เป็นไมครอน โดยคูณ 1000 ดังนั้นค่าความยาวของ 1 ช่อง ของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 40 เท่า จึงมีค่า 25 ไมครอน

กำลังขยาย 100 เท่า

เมื่อเทียบ Stage Micrometer กับ Ocular Micrometer ที่มีกำลังขยาย 100 เท่า จะเห็นดังภาพด้านล่าง



นับจำนวนสเกลของ Ocular Micrometer ที่วางพอดีกับ Stage Micrometer แล้วนำมาคำนวณหาความยาว 1 ช่องของ Ocular Micrometer แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตร

1 ช่องของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 100 เท่า $= \frac{\text{จำนวนช่องของ Stage Micrometer}}{\text{จำนวนช่องของ Ocular Micrometer}}$ **x ค่าความยาว 1 ช่องของ Stage Micrometer**

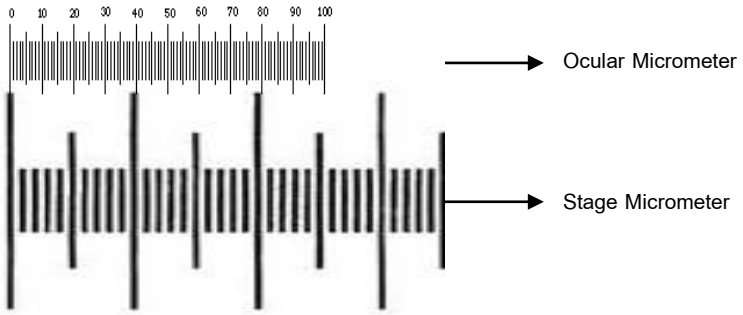
1 ช่องของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 100 เท่า $= \frac{100 \text{ ช่อง}}{100 \text{ ช่อง}} \times 0.01$ มิลลิเมตร

1 ช่องของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 100 เท่า = 0.01 มิลลิเมตร(อย่าลืมแปลงค่าให้เป็นไมครอน)

ดังนั้นค่าความยาวของ 1 ช่อง ของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 100 เท่า จึงมีค่า 10 ไมครอน

กำลังขยาย 400 เท่า

เมื่อเทียบ Stage Micrometer กับ Ocular Micrometer ที่มีกำลังขยาย 400 เท่า จะเห็นดังภาพด้านล่าง



นับจำนวนสเกลของ Ocular Micrometer ที่วางพอดีกับ Stage Micrometer แล้วนำมาคำนวณหาความยาว 1 ช่องของ Ocular Micrometer แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตร

1 ช่องของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 400 เท่า $= \frac{\text{จำนวนช่องของ Stage Micrometer}}{\text{จำนวนช่องของ Ocular Micrometer}}$ **x ค่าความยาว 1 ช่องของ Stage Micrometer**

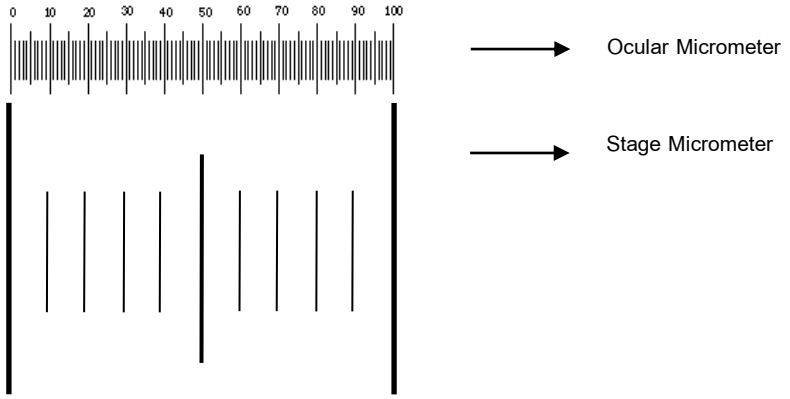
1 ช่องของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 400 เท่า $= \frac{25 \text{ ช่อง}}{100 \text{ ช่อง}} \times 0.01$ มิลลิเมตร

1 ช่องของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 400 เท่า = 0.0025 มิลลิเมตร (อย่าลืมแปลงค่าให้เป็นไมครอน)

ดังนั้นค่าความยาวของ 1 ช่อง ของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 400 เท่า จึงมีค่า 2.5 ไมครอน

กำลังขยาย 1000 เท่า (*ใช้กับ immersion oil)

เมื่อเทียบ Stage Micrometer กับ Ocular Micrometer ที่มีกำลังขยาย 1000 เท่า จะเห็นดังภาพด้านล่าง



นับจำนวนสเกลของ Ocular Micrometer ที่วางพอดีกับ Stage Micrometer แล้วนำมาคำนวณหาความยาว 1 ช่องของ Ocular Micrometer แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตร

$$\text{1 ช่องของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 1000 เท่า} = \frac{\text{จำนวนช่องของ Stage Micrometer}}{\text{จำนวนช่องของ Ocular Micrometer}} \times \text{ค่าความยาว 1 ช่องของ Stage Micrometer}$$

$$\text{1 ช่องของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 1000 เท่า} = \frac{\text{10 ช่อง}}{\text{100 ช่อง}} \times 0.01 \text{ มิลลิเมตร}$$

1 ช่องของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 1000 เท่า = 0.001 มิลลิเมตร (อย่าลืมแปลงค่าให้เป็นไมครอน)

ดังนั้นค่าความยาวของ 1 ช่อง ของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยาย 1000 เท่า จึงมีค่า 1 ไมครอน

***หมายเหตุ** เรายังสามารถประเมินขนาดตัวอย่างได้เมื่อเราทราบค่าที่ได้จากกำลังขยายที่ 40 100 และ 400 เท่า คือ 25 ไมครอน 10 ไมครอน และ 2.5 ไมครอน ตามลำดับ กำลังขยาย 1000 เท่า ซึ่งมีกำลังขยายมากกว่ากำลังขยาย 100 ถึง 10 เท่า เราก็นำค่าความยาวของ Ocular Micrometer ของกำลังขยาย 100 มาหารด้วย 10 คือ $10 \div 10 = 1$ ไมครอน นั่นหมายถึงที่กำลังขยาย 1000 เท่า Ocular Micrometer จะมีความยาว 1 ช่องเท่ากับ 1 ไมครอน

การวัดขนาดตัวอย่าง

เมื่อนักศึกษาทราบความยาวของ Ocular Micrometer ในแต่ละกำลังขยายแล้ว (ดังตารางที่ 1) เมื่อนักศึกษาต้องการวัดขนาดตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ Ocular Micrometer ให้นักศึกษานำจำนวนช่องของ Ocular Micrometer ที่ทาบลงในตัวอย่างที่ต้องการศึกษา แล้วมาคูณกับความยาวของ Ocular Micrometer ที่กำลังขยายนั้น ๆ

กำลังขยาย	กำลังขยาย เลนส์วัตถุ x เลนส์ใกล้ตา	ความยาวของ Ocular Micrometer 1 ช่อง
40 เท่า	4 x 10	25 ไมครอน
100 เท่า	10 x 10	10 ไมครอน
400 เท่า	40 x 10	2.5 ไมครอน
1000 เท่า	100 x 100	1 ไมครอน

ตัวอย่าง วัดขนาดของพารามีเซียมโดยใช้กำลังขยาย 400 เท่า นับจำนวนช่องของ Ocular Micrometer ที่ทาบลงบนพารามีเซียมได้ 48 ช่อง ต้องการทราบว่าพารามีเซียมมีความยาวเท่าไร

วิธีคิด วัดพารามีเซียมได้จำนวนช่อง 48 ช่อง

Ocular Micrometer 1 ช่องที่ กำลังขยาย 400 เท่า มีความยาว 2.5 ไมครอน

พารามีเซียมมีความยาว 48 x 2.5 = 120 ไมครอน

ตารางการเปรียบเทียบหน่วยความยาว

หน่วยวัด	m	1 cm	1 mm	1 µ	1 mµ	1 A
Meter (m)	1	0.01	0.001	0.001	0.000.000.001	0.000.000.000.1
Centimeter (cm)	100	1	0.1	0.000.1	0.000.000.1	0.000.000.01
Millimeter (mm)	1000	10	1	0.001	0.000.001	0.000.000.1
Micron **(µ)**	1,000,000	10,000	1,000	1	0.001	0.000.1
Millimicron **(mµ)**	1,000,000,000	10,000,000	1,000,000	1,000	1	0.1
Angstrom (A)	1×10^{10}	100,000,000	10,000,000	10,000	10	1
Inches	39.37	0.394	0.0394	0.000.039.4	0.000.000.039.4	0.000.000.003.94

คำถามท้ายกิจกรรม

1. เหตุใดเวลาที่นักศึกษาเปลี่ยนกล้องตัวใหม่เพื่อทำการวัดขนาดตัวอย่างจะต้องมีการสอบเทียบความยาวของ Ocular Micrometer ทุกครั้ง

ตอบ.....

.....

.....

2. การวัดขนาดสิ่งมีชีวิตด้วยกล้องจุลทรรศน์มีความสำคัญอย่างไร

ตอบ.....

.....

.....

3. ที่กำลังขยาย 200 เท่า นับจำนวนช่อง Stage Micrometer ได้ 50 ช่อง และ Ocular Micrometer ได้ 100 ช่อง ต้องการทราบค่าความยาวของ Ocular Micrometer 1 ช่อง (แสดงวิธีคิด)

ตอบ.....

.....

.....

.....

4. ต้องการวัดขนาดของยูกลีนา โดยที่กำลังขยาย 100 เท่า นับ Ocular Micrometer ได้ 25 ช่อง ยูกลีนามีความยาวเท่าไร (แสดงวิธีคิด)

ตอบ.....

.....

.....

.....

5. สาหร่ายเกลียวทองมีความยาว 400 ไมครอน ถ้านักศึกษาส่องดูด้วยกำลังขยาย 400 เท่านักศึกษาจะนับจำนวน Ocular Micrometer ได้จำนวนกี่ช่อง (แสดงวิธีคิด)

ตอบ.....

.....

.....

.....

วิธีการดูแลรักษากล้องจุลทรรศน์

เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์มีค่อนข้างสูง การดูแลรักษาและการใช้จึงต้องทำอย่างระมัดระวังและทำให้ถูกวิธีดังข้อแนะนำต่อไปนี้

1. การเคลื่อนย้ายกล้องจุลทรรศน์ ให้ใช้มือหนึ่งจับที่ส่วน แขน ของกล้อง อีกมือหนึ่งรองใต้ฐานของกล้องให้ตัวกล้องตั้งตรงและนำเข้าชิดลำตัวและถืออย่างระมัดระวังอย่าให้กล้องเอียง เพราะหากเอียงมากจะทำให้ Ocular หลุดล่วงแตกเสียหายได้

2. การรักษาความสะอาดกล้องจุลทรรศน์ หลังจากใช้กล้องแล้วทุกครั้ง ก่อนนำไปเก็บจะต้องทำความสะอาด เช็ดให้แห้ง การทำความสะอาดเลนส์ให้ใช้เฉพาะกระดาษเช็ดเลนส์และน้ำยาทำความสะอาดเลนส์ที่เตรียมไว้ให้เท่านั้น โดยใช้กระดาษเช็ดเลนส์แผ่นหนึ่งชุบน้ำยาล้างเลนส์ เช็ดเลนส์ให้ทั่วทุกอัน แล้วใช้กระดาษเช็ดเลนส์แผ่นใหม่เช็ดที่เลนส์เพื่อทำความสะอาดน้ำยาเช็ดเลนส์ออกอีกครั้งหนึ่งจึงนำไปเก็บตามที่กำหนด

3. การระวังในขณะที่ปรับโฟกัส ถ้าเป็นเลนส์ที่กำลังขยาย 4x และ10x ก่อนจะหมุนล้อปรับโฟกัสให้ดูทางด้านข้าง (ยังไม่ดูทาง Ocular) หมุนล้อโฟกัสละเอียดช้า ๆ จนเลนส์เคลื่อนเข้าใกล้กับสไลด์จึงเปลี่ยนไปดูผ่านทาง Ocular และหมุนล้อปรับละเอียดจนเห็นภาพคมชัดเจน

4. ข้อควรระวังก่อนที่จะวางสไลด์ลงบนแท่นให้ตรวจสอบให้แน่ใจว่าได้เช็ดทำความสะอาดด้านล่างจนแห้งแล้วและวางสไลด์โดยให้แผ่น กระจกปิดสไลด์ อยู่ด้านบนเสมอ

5. การเก็บกล้องจุลทรรศน์หลังที่ทำความสะอาดเรียบร้อยแล้วก่อนนำเข้าเก็บให้หมุน Revolving Nose Piece เปลี่ยนให้เลนส์ที่กำลังขยายต่ำสุดไปอยู่ในตำแหน่งที่ใช้ดูภาพปิด Iris Diaphragm หมุนล้อโฟกัสให้แท่นวางสไลด์ลงมาอยู่ในตำแหน่งต่ำสุด นำเข้าเก็บในที่กำหนด ใช้ถุงพลาสติกคลุมกล้องเพื่อป้องกันฝุ่นละอองให้เรียบร้อย

6. กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้หลอดไฟฟ้าเป็นต้นกำเนิดแสง เมื่อหยุดดูหรือหยุดส่องทุกครั้งให้ปิดสวิทช์เพื่อรักษาอายุหลอดให้สามารถใช้ได้นานและยังเป็นการประหยัดไฟฟ้าอีกด้วย

คำถามท้ายการศึกษา

1. เมื่อเปิด Iris Diaphragm กว้างที่สุดกับเมื่อปิดให้เล็กลง แสงที่ผ่านเข้าสู่ภาพมีปริมาณหรือความเข้มต่างกันหรือไม่อย่างไร

ตอบ.....

.....

.....

.....

2. เมื่อใช้เลนส์กำลังขยาย 4x ภาพที่เห็นชัดเจนดีแล้ว เมื่อเปลี่ยนเป็นเลนส์กำลังขยาย 10x โดยยังไม่ปรับโฟกัสภาพยังคงคมชัดเช่นเดิมหรือไม่อย่างไร

ตอบ.....

.....

.....

.....

3. เมื่อเปลี่ยนเลนส์กำลังขยายมากขึ้นขอบเขตและรายละเอียดของภาพเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างไรบ้าง

ตอบ.....

.....

.....

.....

4. ตัวอย่างที่นำมาศึกษาจะต้องหยดน้ำด้วยเพราะเหตุใด

ตอบ.....

.....

.....

.....

5. ให้อธิบายความหมายของคำต่อไปนี้

Ocular คือ.....

Body Tube คือ.....

Revolving Nose Piece คือ.....

Coarse Adjustment knob คือ.....

Fine Adjustment knob คือ.....

Condenser คือ.....

Iris Diaphragm คือ.....

6. เมื่อดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์ใกล้ตาที่มีกำลังขยาย 10 เท่า และเลนส์ใกล้วัตถุที่มีกำลังขยาย 40 เท่า สามารถมองเห็นภาพเซลล์ขนาด 100 ไมครอน ขนาดจริงของเซลล์เป็นเท่าใด (แสดงวิธีคิด)

ตอบ.....

.....

.....

.....