บทที่ 18
การทำสไลด์ถาวรสัตว์ทั้งตัว

เค้าโครงเรื่อง

18.1. การทำสไลด์ถาวรโปรโตซัว

18.1.1. โปรโตซัวในลำไส้

18.1.2. โปรโตซัวในเลือด

18.1.3. โปรโตซัวในเนื้อเยื่อและอวัยวะ

18.2. การทำสไลด์ถาวรสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

18.2.1. พยาธิตัวกลมและพยาธิตัวแบน

18.2.2. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดเล็กทั่วไป

สาระสำคัญ

1. โปรโตซัวเป็นสัตว์เซลล์เดียวที่มีลักษณะโครงสร้างและที่อยู่อาศัยต่างกัน การจะนำมาทำเป็นสไลด์ถาวรทั้งตัว จึงต้องพิจารณาข้อมูลเหล่านี้ แล้วหาสิ่งที่ดีที่สุดมาปฏิบัติ โดยมีหลักการพื้นฐานเช่นเดียวกับการทำสไลด์ถาวรของเนื้อเยื่อเฉียดเฉียนแผ่นบาง ต่างกันที่ขั้นตอนแรกของการเก็บตัวอย่างเพื่อให้ได้สัตว์เหล่านี้มาอยู่บนสไลด์
2. การทำสไลด์ถาวรสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดเล็ก ซึ่งรวมตั้งแต่พวกที่อยู่อิสระ และพวกปรสิต หลักการพื้นฐานของการทำให้คงสภาพ มาจนถึงขั้นเมาท์บนสไลด์ ก็เช่นเดียวกับเนื้อเยื่อ การรวบรวมตัวอย่างและระเบียบวิธีต้องเฉพาะชนิดหรือกลุ่ม เพราะมีความหลากหลายมาก ผู้ปฏิบัติต้องรู้จักดัดแปลงและใช้ประสบการณ์ของตนเอง

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาจบบทนี้แล้ว

1. นักศึกษาสามารถบอกได้ว่า โปรโตซัวที่เป็นปรสิตอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายมีวิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อการทำสไลด์ถาวรได้อย่างไร
2. นักศึกษาสามารถบอกวิธีการรวบรวมตัวอย่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิดเพื่อการทำสไลด์ถาวรสัตว์เหล่านั้นทั้งตัว
3. นักศึกษาสามารถทำสไลด์ถาวรสัตว์ทั้งตัวบางชนิดเช่น โรติเฟอร์และไรน้ำได้
4. นักศึกษาสามารถตอบคำถามในแบบฝึกหัดท้ายบทได้ ภายในหนึ่งสัปดาห์

การทำสไลด์ถาวรสัตว์ทั้งตัวนั้น มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาลักษณะทั่วไปทั้งภายนอกและภายในของสัตว์ สัตว์ที่จะนำมาศึกษาต้องมีขนาดเล็กพอที่จะไม่ล้นขอบกระจกปิดสไลด์ออกมา ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง แต่เนื่องจากสัตว์กลุ่มนี้มีจำนวนมากและมีความหลากหลายทั้งขนาดและโครงสร้าง จึงนำมาเรียบเรียงไว้พอสังเขป เพื่อให้ผู้ปฏิบัติสามารถนำเทคนิคที่เสนอไว้ในตำราเล่มนี้ไปดัดแปลงใช้ต่อไป

18.1 การทำสไลด์ถาวรโปรโตซัว

ในกลุ่มของโปรโตซัวมีความหลากหลายทั้งรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างถึงแม้ว่าจะเป็นสัตว์เซลล์เดียวขนาดเล็กก็ตาม การรวบรวมตัวอย่างโปรโตซัวต้องพิจารณาถิ่นที่อยู่ของโปรโตซัวด้วยว่าดำรงชีวิตแบบอิสระ หรือปรสิตอยู่ที่ใดของอวัยวะ หรือร่างกาย ในที่นี้จะเสนอวิธีสำหรับโปรโตซัวที่เป็นปรสิตคือ

18.1.1. โปรโตซัวในลำไส้ โดยวิธีสเมียร์

การทำสเมียร์ของโปรโตซัวในลำไส้ ต้องนำตัวอย่างมาทำให้มีปริมาณของโปรโตซัวมากขึ้น แหล่งที่จะเก็บตัวอย่างคืออุจจาระ ให้ปฏิบัติตามระเบียบวิธีต่อไปนี้

ระเบียบวิธี:

1. นำอุจจาระมาประมาณ 1 กรัม (หรือ 1 มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับสภาพของอุจจาระ) เติมน้ำประปาลงไป 10-15 เท่า ใช้ไม้คนให้เข้ากัน กรองผ่านผ้ากรอง 2 ชั้น ผ่านกรวย รวบรวมไว้ในหลอดเซนตริฟิวจ์ เติมอีเทอร์ลงไป 1-2 มิลลิลิตร ใช้หัวแม่มือหรือจุกยางปิดหลอด เขย่า พลิกจุกยางเล็กน้อยเพื่อไล่แรงดันอากาศจากการระเหยของอีเทอร์ ปิดไว้ดังเดิม
2. นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 2500 รอบต่อนาที ประมาณ 1 นาที เปิดจุกยางใช้ไม้คนปาดรอบก้อนวัตถุหยาบของอุจจาระที่ลอยอยู่ในชั้นของอีเทอร์ แล้วเทออก รวมทั้งน้ำใสที่อยู่ในหลอดด้วย
3. เติมสารละลายนอร์แมลเซไลน์ลงไป 2-3 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนที่อยู่ก้นหลอดให้ละลาย เติมนอร์แมลเซไลน์ลงไปจนเหลืออีก 1 เซนติเมตรจากขอบหลอด แล้วจึงนำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้ง
4. เทน้ำใสทิ้ง ใช้ไม้คนป้ายตะกอนไปสเมียร์บนกระจกสไลด์ หรือ กระจกปิดสไลด์ที่สะอาด ควรสเมียร์บาง ๆ บนสไลด์ด้วยสารยึดติดที่ทำจากไข่ขาว (ดูภาคผนวก 2.3) ก่อนการทำสเมียร์ตัวอย่าง

5. ระวังมิให้สเมียร์แห้ง นำไปทำให้คงสภาพทันทีด้วย เซาดินน์'ส ฟลูอิด

6. นำไปย้อมสีตามต้องการ ดังต่อไปนี้

(1) วิธีของโกลด์แมน (Goldman method)

การทำให้คงสภาพ: เซาดินน์'ส ฟลูอิด 40 วินาทีเซลเซียส 5-15 นาที

สารละลาย:

สารละลายสต๊อก A:

สีมาทอกซิลิน 10 เปอร์เซนต์ ใน 95เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์

(10 กรัม/100 มิลลิกรัม 95 เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์)

	1.00	มิลลิลิตร
95 เปอร์เซนต์ เอทิลแอลกอฮอล์	99.00	มิลลิลิตร

สารละลายสต๊อก B:

เฟอร์ริก แอมโมเนียมซัลเฟต	4.00	กรัม
กรดแอซีติกเข้มข้น	1.00	มิลลิลิตร
กรดซัลฟิวริกเข้มข้น	0.12	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

สารละลายที่จะใช้จริง:

ผสมสารละลาย A และ B อย่างละเท่า ๆ กัน จะได้สีม่วง แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลภายใน 2-3 ชั่วโมง กรอง พร้อมที่จะนำมาใช้ ถ้าสารละลายเป็นสีดำปนเขียว แสดงว่าถูกออกซิไดซ์มากไป ไม่เหมาะจะนำมาใช้

ระเบียบวิธี:

1. ล้างสไลด์ด้วย 70 เปอร์เซนต์ แอลกอฮอล์ แล้วล้างด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ผสมไอโอดีน
2. ล้างหลาย ๆ ครั้งใน 50 เปอร์เซนต์ แอลกอฮอล์ จนสีน้ำตาลของไอโอดีนหมดไป
3. ย้อมสีแบบก้าวหน้าในสารละลายฮีมาทอกซิลินที่เตรียมไว้ 3-5 นาที
4. ล้างด้วยน้ำไหล 15 - 30 นาที
5. ดึงน้ำออก ทำให้ใส แล้วเมาท์

ผลที่ได้รับ:

โปรโตซัว - นิวเคลียสติดสีดำ

(2) วิธีของเคสเซิลและเชน (Kessel and Chen, modified method)

การทำให้คงสภาพ: เซาดิน'ส ฟลูอิด 40 องศาเซลเซียส 10-15 นาที

สารละลาย:

ไอออนอะลัม:

เฟอร์ริก แอมโมเนียมซัลเฟต	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

สีมาเทอกซิลิน:

สารละลายสต๊อก:

สีมาทอกซิลิน	1.0	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์	10.0	มิลลิลิตร

ใช้เวลาบ่ม 2-3 เดือน ถ้าจะใช้เติม 0.24 กรัม โซเดียมไอโอเดต

สารละลายที่จะใช้จริง:

สีมาทอกซิลิน (สารละลายสต๊อก)	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	99.5	มิลลิลิตร

เติมสารละลาย ลิเทียมคาร์บอเนตลงไปตัวในน้ำลงไป 3 หยด สามารถนำไปใช้ย้อมสีได้ ถ้าสารละลายที่ได้มีสีน้ำตาลโคลน ไม่ควรใช้ ควรทำใหม่

ระเบียบวิธี:

1. นำสไลด์จากสารละลายทำให้คงสภาพมาแช่ใน 70 เปอร์เซนต์ แอลกอฮอล์ 2-3 นาที
2. แช่ในสารละลาย ลูกอล 2-3 นาที
3. ล้างด้วยน้ำไหล 3 นาที
4. ดึงไอโอดีนออกด้วยสารละลาย 5 เปอร์เซนต์ โซเดียมไทโอซัลเฟต 2 นาที
5. ล้างด้วยน้ำไหล 3-5 นาที
6. แช่ในสารช่วยสีติดไอออนอะลัม (4เปอร์เซนต์) ที่ 40 องศาเซลเซียส 15 นาที
7. ล้างด้วยน้ำไหล 5 นาที
8. ย้อมสีในสารละลาย สีมาทอกซิลินที่เตรียมไว้แล้วที่ 40 องศา-

เซลเซียส 15 นาที

9. ล้างด้วยน้ำไหล

10. ล้างสีย้อมออก ด้วยสารละลาย 2 เปอร์เซนต์ ไอออนอะลัม (นำสารละลายสต๊อก 4 เปอร์เซ็นต์มาทำให้เจือจาง 1 : 1) นำสไลด์มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทัศน์จนเห็นนิวเคลียสและโครมาทอยด์บอดีเด่นชัดเจนจากไซโทพลาซึม ซึ่งติดสีจางกว่าจนถึงไม่มีสี จึงจะใช้ได้

11. ล้างด้วยน้ำไหล 15-30 นาที

12. ดึงน้ำออก ทำให้ใส แล้ว เมาท์

ผลที่ได้รับ:

นิวเคลียส โครมาทอยด์บอดี - สีฟ้าปนสีน้ำเงินเข้ม

ข้อสังเกตุ:

อาจใช้สารละลายกรดพิกริกอิ่มตัวในน้ำ ทำหน้าที่ล้างสีออก ต่อจากนั้นล้างด้วยน้ำแอมโมเนียเจือจาง (2-3 หยด/น้ำ 100 มิลลิลิตร) แล้วล้างด้วยน้ำไหล ก่อนนำไปดึงน้ำออก วิธีนี้สามารถประยุกต์ใช้กับละมีบาที่อยู่ในเนื้อเยื่อได้

18.1.2. โปรโตซัวในเลือด โปรโตซัวที่อยู่ในเลือด ไม่ว่าจะอยู่ในเม็ดเลือด เช่น พลาสโมเดียม (*Plasmodium*), ไลช์เมเนีย (*Leishmania*) หรืออยู่ในน้ำเลือด เช่น ทริพาโนโซม (*Trypanosome*) สามารถนำมาสาธิตโดยการทำสเมียร์หนา หรือสเมียร์บาง แล้วย้อมสีด้วยวิธีของไรท์ หรือ เจมซา ได้เช่นเดียวกับการย้อมสี เลือดและชิ้นส่วนของเลือด ในบทที่ 14

18.1.3. โปรโตซัวในเนื้อเยื่อและอวัยวะ โปรโตซัวที่เป็นปรสิตหลายชนิดมีวงชีวิตอยู่ในเซลล์ หรือในอวัยวะหลายแห่งของร่างกาย เช่น *Entamoeba histolytica* เข้าไปทำลายเซลล์บุผิวลำไส้ของคน แล้วยังอาจติดไปกับกระแสโลหิตจนถึงตับ แล้วทำลายตับ ทำให้เกิดการอักเสบ ระยะภายนอกเม็ดเลือดแดงของ *Plasmodium* เข้าไปอยู่ในเซลล์ตับและเซลล์ของม้าม การสาธิตโปรโตซัวเหล่านี้ ทำโดยตัดชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างบริเวณที่มีพยาธิสภาพที่เห็นด้วยตาเปล่า แล้วมาทำตามระเบียบวิธีปกติทางไมโครเทคนิก ก็สามารถสาธิตปรสิตเหล่านี้ได้

กิจกรรม 18.1

ให้นักศึกษา นำอุจจาระของตนเองมาทดลองทำให้เข้มข้นเพื่อหาโปรโตซัวในลำไส้ตามวิธีในข้อ 18.1.1 แล้วทำการเตรียมสารละลาย เพื่อใช้ย้อมสีโปรโตซัวตามวิธีของเคสเซิลและเซน จากนั้นจึงทำสเมียร์อุจจาระที่ทำให้เข้มข้นไว้แล้ว นำมาย้อมสีตามวิธีของเคสเซิลและเซนในข้อ 18.1.1 บันทึกผลที่ได้ว่าตนเองมีโปรโตซัวชนิดใดหรือไม่ โดยนำสไลด์ถาวรที่ทำได้ ไปปรึกษาอาจารย์ทางด้านโปรโตซัว หรือปรสิตวิทยา

18.2 การทำสไลด์ถาวรสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังทุกชนิดที่จะนำมาทำสไลด์ ควรมีการเตรียมการที่ถูกต้องเหมาะสม เริ่มตั้งแต่การทำให้สลบ ซึ่งสามารถเลือกสารดมสลบตามต้องการ (บทที่ 2) แล้วจึงนำมาจัดวางให้อยู่ในที่ที่ถูกต้องสวยงามและง่ายต่อการศึกษาส่วนต่างๆ โดยมีหลักการให้คงลักษณะรูปร่างเดิมของสัตว์แต่ละชนิดให้มากที่สุด

18.2.1 พยาธิตัวกลมและพยาธิตัวแบน สัตว์ทั้งสองกลุ่ม มีผิวนอกลื่นการเตรียมการก่อนการทำให้คงสภาพควรทำดังนี้

(1) พยาธิตัวกลม ทำให้สลบด้วยสารดมสลบ (อาจใช้คลอโรฟอร์ม) ถ้าขนาดใหญ่ (ยาว) นำมาตรึงบนแผ่นที่ผึ้งพาราฟินโดย ปักหัวท้ายด้วยเข็มหมุดขนาดเล็ก แล้วค่อยๆ หยดสารทำให้คงสภาพเพิ่มลงไปแทนสารละลายดมสลบที่มีอยู่เดิม เมื่อสัตว์เริ่มแข็งแล้วเปลี่ยนสารละลายทำให้คงสภาพใหม่อีก 2 ครั้ง เพิ่มเวลาในการทำให้คงสภาพเป็นอีกอย่างน้อย 1 เท่า และควรเลือกสารละลายทำให้คงสภาพที่มีการชอนลึกเร็ว เช่น บัวแลง'ส ฟลูอิด หรือ เมอร์คิวริกคลอไรด์

(2) พยาธิตัวแบน หลังจากสลบแล้วควรหากระดาษซับสีขาวมาตัดให้ใหญ่มากกว่าตัวอย่างสัตว์ อาจแบ่งเป็น ส่วนหัว(สโคเลกซ์)พร้อมทั้งปล้องต้นๆ 2-3 ปล้อง ปล้องกำลังเจริญ 2-3 ปล้อง และปล้องแก่ ถ้าเป็นพยาธิใบไม้ ทำทั้งตัว วางปล้องสัตว์ตัวอย่างลงบนกระดาษซับซึ่งอยู่ในเปตริดิช ทับปล้องสัตว์ตัวอย่างด้วยแท่งพาราฟิน แล้วจิงค่อยๆใส่สารทำให้คงสภาพเช่นเดียวกับข้อ(1) ทำให้คงสภาพเพื่อความพร้อมสำหรับการย้อมสีต่อไป

การย้อมสีสัตว์ตัวอย่างที่ได้รับการทำให้คงสภาพแล้ว นำมาล้างให้หมดสารทำให้คงสภาพ (และถ้ามีเมอร์คิวริกคลอไรด์ ควรดึงออกให้หมด ตามวิธีปกติ) ควรใส่สัตว์ลงในเปตริดิชขนาดเล็ก เพื่อประหยัดสารละลาย และสะดวกในการปฏิบัติ สีที่นิยมใช้ย้อม คือ คาร์มีน และ ฮีมาเทอิน ตามวิธีของ เกรเนเชอร์ และคอร์ทเสาเชลร์ ดังนี้

(1) วิธีเกรเนเชอร์'สบอแรกซ์คาร์มีน(Grenacher's borax carmine)

สารละลาย:

คาร์มีน (C.I. 75470)	3.0	กรัม
บอแร็กซ์	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ต้ม 30 นาที หรือจนกระทั่งคาร์มีนละลายหมด แล้วเติม 70 เปอร์เซนต์เอทิลแอลกอฮอล์ 100.0 มิลลิลิตร ตั้งไว้ 1-2 วัน กรอง พร้อมที่จะใช้ได้

ระเทียบวิธี:

1. เปลี่ยนสัตว์ตัวอย่างมาแช่ใน 50 เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ แล้วย้อมสีด้วยสารละลาย บอแรกซ์คาร์มีน 3-4 ชั่วโมง หรือตลอดคืน
2. หยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไปทีละหยด เขย่า จนคาร์มีนตกตะกอนเป็นสีแดงอิฐ ตั้งไว้ 6-8 ชั่วโมง หรือตลอดคืน
3. เติมสารละลายผสม 3 เปอร์เซนต์กรดไฮโดรคลอริกใน 70 เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ ให้มีสัดส่วน 1:1 กับสารละลายสีย้อมที่มีอยู่เดิม ใช้ปิเปตดูดตะกอนสีออก แล้วเติมแอซิดแอลกอฮอล์ลงไปใหม่ ทำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนเห็นว่าสีย้อมคาร์มีนถูกดูดออกจนหมด
4. เติมแอซิด-แอลกอฮอล์ลงไปใหม่ ตั้งไว้ให้สีย้อมถูกล้างออกจากตัวสัตว์ ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทัศน์ชนิดดูแมลง การล้างสีออกใช้เวลาต่างกันในสัตว์แต่ละชนิดแต่ละขนาด ดูดสีที่ถูกล้างออกทิ้ง แล้วเติมแอซิด-แอลกอฮอล์ใหม่ลงไป ทำต่อไปจนเห็นอวัยวะภายในติดสีแดง และเนื้อเยื่อภายนอกติดสีชมพูอ่อน
5. แทนที่แอซิด-แอลกอฮอล์ด้วย 80 เปอร์เซนต์ เอทิลแอลกอฮอล์ ทำหลาย ๆ ครั้ง ประมาณ 1 ชั่วโมง จนเชื่อแน่ว่า แอซิด-แอลกอฮอล์ถูกล้างออกจนหมด
6. ดึงน้ำออก ด้วย 90 เปอร์เซนต์ และ 100 เปอร์เซนต์ แอลกอฮอล์ตามลำดับ ระยะเวลาแต่ละขั้นตอนขึ้นอยู่กับขนาดของสัตว์ แต่ไม่ควรต่ำกว่า 30 นาที
7. ทำให้ใส สำหรับตัวอย่างที่เปราะบางควรค่อย ๆเพิ่มความเข้มข้นของสารทำให้ใสด้วยสัดส่วนดังนี้

แอลกอฮอล์สัมบูรณ์	ครีโอโซท (แคนิลีนหรือคาร์บอล) ไซลีน
80 ส่วน	20 ส่วน
60	40
50	50
40	60
20	80
0	100

8. การเมาท์ พยาธิตัวกลมและตัวแบน ต้องใช้เวลาในการให้เมาแทนท์ซึมซาบเข้าไปในตัว จึงควรให้สัตว์ตัวอย่างทั้งสองชนิดอยู่ในส่วนผสมของสารทำให้ใสและเมาแทนท์ก่อน จึงทำการเมาท์ถาวรภายหลัง

(2) ฮีมาเทอิน (วิธีของ Kornhauser)

สารละลาย:

สารละลายสต๊อก:

ผด 0.5 กรัมฮีมาเทอินกับ 10 มิลลิลิตรของ 95เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ แล้วทำให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย 5 เปอร์เซนต์พอแทสเซียมอะลูมิเนียมซัลเฟตในน้ำ

สารละลายที่จะใช้จริง:

นำสารละลายสต๊อกมาทำให้เจือจางด้วยน้ำสัดส่วน 1:10

ระเบียบวิธี:

1. ย้อมด้วยสี ฮีมาเทอิน ตลอดคืน
2. เปลี่ยนมาแช่ใน 70 เปอร์เซนต์ แอลกอฮอล์
3. ล้างสีออกด้วยแอซิดแอลกอฮอล์(5 เปอร์เซนต์กรดไฮโดรคลอริกในสารละลาย 70 เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์) ตรวจสอบผลการล้างสีออก สังเกตหลักที่ว่าอวัยวะภายในติดสีเข้ม เนื้อเยื่อภายนอกจางจนเกือบไม่ติดสี
4. ทำให้เป็นสีน้ำเงินใน แอลคาไลน์แอลกอฮอล์ แอมโมเนีย หรือโซเดียมไบคาร์บอเนตใน 70 เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์
5. ดึงน้ำออก ทำให้ใส แล้วเมาท์

วิธีนี้เหมาะสำหรับพยาธิตัวแบน

18.2.2. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดเล็กทั่วไป เช่น ไฮดรา โรติเฟอร์ สัตว์พวกกุ้งขนาดเล็ก ตัวอ่อนของพวกสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังระยะต่าง ๆ และ หนอนทะเลขนาดเล็ก สัตว์พวกนี้มักมีผิวนอกอ่อนนุ่ม และเปราะบาง จึงต้องทำด้วยความระมัดระวังเป็นพิเศษ เมื่อรวบรวมได้ควรนำมาทำให้เข้มข้นในสารละลายที่สัตว์เหล่านั้นเคยอาศัยอยู่ด้วยการเซนตริฟิวจ์ ดมสลบ แล้วใช้สารทำให้คงสภาพชนิดซึมซาบเร็วเช่นเดียวกับพยาธิตัวกลมและพยาธิตัวแบน เนื่องจากขนาดเล็กและน้ำหนักเบาอาจหลุดหายในระหว่างการเปลี่ยนสารละลาย จึงควรทำทุกขั้นตอนภายใต้กล้องจุลทัศน์ชนิดส่องแมลง ภาชนะที่ใช้ควรเป็นหลุมแก้ว มีกระจกปิด การเปลี่ยนสารละลายใช้หลอดดูดสารละลายออกโดยให้สัตว์อยู่ในหลุมแก้ว แล้วใช้หลอดดูด หยดสารละลายใหม่ลงไปแทนที่ ขั้นตอนการย้อมสี การล้าง การดึงน้ำออก และการทำให้ใส เช่นเดียวกับวิธีปกติทั่วไป นอกจากสีย้อมคาร์มีน และฮีมาเทอินแล้ว อาจใช้วิธีของเมเยอร์'สคาร์มาลัม(Mayer's carmalum) ก็ได้ผลดีดังนี้

สารละลาย:

สารละลายสต๊อก:

กรดคาร์มินิก(C.P.คาร์มีน) C.I. 75470	1.0	กรัม
แอมโมเนียมอะลัม	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร
เมื่อละลายดีแล้ว กรอง เติม		
ฟอร์มาลิน	1.0	มิลลิลิตร

สารละลายที่จะใช้จริง:

สารละลายสต๊อก คาร์มาลัม	5.0	มิลลิลิตร
กรดแอซิติกเข้มข้น	0.4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี:

ย้อมสีด้วย คาร์มาลัม 48 ชั่วโมง ทำตามระเบียบวิธีการย้อมสีด้วย บอแรกซ์คาร์มีนจนถึงขั้นตอนที่ 3 ไม่ต้องล้างสีออก สามารถทำการดึงน้ำออก ทำให้ใส แล้วเมาท์ได้

ข้อสังเกต:

ระยะเวลาการย้อมสี และขั้นตอนอื่น ขึ้นอยู่กับความชำนาญและประสบการณ์ในการย้อมสีสัตว์แต่ละชนิด ข้อพึงระวัง คือไม่เผลอดูดสัตว์ที่ต้องการย้อมสีติดหลอดดูดออกไประหว่างการเปลี่ยนสารละลายแต่ละครั้ง

กิจกรรม 18.2.

ให้นักศึกษาเตรียมสารละลายสีย้อม เมเยอร์'ส คาร์มาลัม ตามวิธีในทัล 18.2.2. แล้วใช้ถุงลากแพลงตอนตาถี่ ลากแพลงตอนจากสระน้ำสะอาดที่อยู่ใกล้เคียง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ว่า มีโรติเฟอร์และไรน้ำ(*Daphnia*)อยู่ด้วย นำแพลงตอนดังกล่าวมาเซนตริฟิวจ์ ล้างสิ่งสกปรกออกแล้วใช้หลอดดูด ดูดแพลงตอนที่ก้นหลอดเซนตริฟิวจ์ มาใส่ในหลุมแก้ว หยดสารละลายนอร์แมลเซไลส์ ลงไป 5 หยด แล้วหยดสารละลายคลอโรฟอร์ม หรือ 50 เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ลงไป 1 หยด สังเกตการหยุดเคลื่อนที่ของแพลงตอน แล้วจึงหยด เซาดินน์'ส ฟลูอิดลงไปเพื่อทำให้คงสภาพ ย้อมสีตามระเบียบวิธีของเมเยอร์ คาร์มาลัม แล้วเมาท์ทำเป็นสไลด์ถาวร ตามวิธีปกติ

สรุป:

การทำสไลด์ถาวรสัตว์ทั้งตัว มีข้อแตกต่าง และรายละเอียด ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสัตว์แต่ละชนิด นอกจากจะใช้หลักเกณฑ์ที่มีอยู่ในตำราแล้ว ผู้ปฏิบัติต้องใช้ประสบการณ์และความชำนาญส่วนบุคคลในการบรรลุสู่เป้าหมาย

แบบฝึกหัดที่ 18

1. โปรโตซัวที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด เช่น อะมีบา พารามีเซียม สามารถนำมาทำสไลด์ถาวรทั้งตัวโดยใช้หลักการรวบรวมแบบเดียวกับโปรโตซัวในลำไส้ได้หรือไม่และอย่างไร
(ตอบ: ดู ข้อ 18.1.1. โดยละเอียดแล้วใช้ดุลยพินิจว่าจะตอบอย่างไร พร้อมทั้งให้เหตุผลประกอบด้วย)
2. จงอธิบายและให้เหตุผลที่เหมาะสมว่า ทำไมจึงต้องเลือกใช้สารละลายทำให้คงสภาพที่มีคุณสมบัติในการชื่มชาบเร็ว เพื่อใช้ในการทำให้คงสภาพโปรโตซัว และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดเล็กชนิดอื่น

(ตอบ: ต้องใช้ความรู้พื้นฐานทางชีววิทยาว่าด้วยถึงโครงสร้างของสัตว์มาตอบ)

3. โปรโตซัวเป็นสัตว์ขนาดเล็ก ลักษณะของ _____จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ใช้จำแนกชนิด รวมทั้งใช้ออร์แกเนลล์อื่นประกอบด้วย การที่ใช้สีย้อม _____เช่น สีมาทอกซิลิน หรือไอออนอะลัมสีมาทอกซิลีน แทนที่จะใช้สีย้อม _____ก็เพื่อให้เห็นความแตกต่างของสี _____จำเป็นเพราะ _____

(ตอบ: ดู ข้อ 18.1.โดยละเอียด และนำความรู้จากข้อ 16.1.2. มาตอบด้วย)

4. การทำสไลด์ทั้งตัวของพยาธิใบไม้ในตับไม่จำเป็นต้อง _____มาเป็นส่วนๆ เพราะขนาดไม่ใหญ่เกินกว่ากระจกปิดสไลด์ ก่อนทำให้คงสภาพ (หลังจากสลบแล้ว) ควรทำให้ _____โดยยังคงรักษารูปทรงเดิมเอาไว้อาจใช้ _____ทับหรือวัสดุอื่นที่ไม่ถูกกัดกร่อนด้วยสารละลายทำให้คงสภาพ

(ตอบ: ดูข้อ 18.2.1.)

5. การย้อมสีสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดเล็ก นิยมใช้สี _____และ _____ เพราะสามารถย้อมสีเห็นชัดได้ทั้งอวัยวะภายนอกและภายใน โดยการ _____ แล้ว _____ด้วยแอซิด-แอลกอฮอล์ หรือสารละลายที่ทำหน้าที่ _____ ชนิดอื่น ถ้าจะทำการ _____ก็สามารถทำได้ โดยใช้สีย้อม _____ แต่ไม่จำเป็น

(ตอบ: ดูข้อ 18.2.1. และ 18.2.2. พร้อมทั้งนำความรู้เรื่องทฤษฎีการย้อมสีมาตอบด้วย)