วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงราเมือก

1.1 การเพาะสปอร์

การเตรียมสปอร์ของราเมือก ได้เตรียม 2 วิธีดังนี้

วิธีแรก นำฟรุตติงบอดีมาให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้แล้วเคาะสปอร์ให้ตกลงบนอาหารจานละ 1 ชนิด สำหรับอาหารที่มีวุ้นเป็นส่วนประกอบนั้นหลังจากเคาะสปอร์ลงไปแล้ว เติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปประมาณ 3-5 มิลลิลิตร หรือพอท่วมผิววุ้น ทั้งนี้เพื่อช่วยให้สปอร์ได้รับความชื้นมากพอที่จะงอกได้

วิธีที่สอง เคาะสปอร์ลงไปเพาะในขวดที่มีน้ำกลั่นซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อ 1-2 มิลลิลิตร ขวดละ 1 ชนิด แล้วทิ้งไว้ให้สปอร์งอกในน้ำกลั่นเสียก่อน โดยตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนซ์ประกอบ และแบบเฟส คอนทรัสต์ ซึ่งอาจใช้เวลาตั้งแต่ 15 นาที ถึง 11 วัน เมื่อสปอร์งอกแล้วจึงนำมาเทลงไปบนใบไม้ผุ ไม้ผุ และมูลม้าที่มีความชื้นพอควรจานละ 1 เชื้อ สำหรับอาหารที่มีวุ้นเป็นส่วนประกอบนั้นไม่เติมน้ำกลั่นลงไปอีก

การสังเกตการงอกของสปอร์

สังเกตโดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเฟส คอนทรัสต์ หรือแบบเลนซ์ประกอบ โดยการใช้หลอดดูดดูดเอาน้ำกลั่นที่เพาะสปอร์ไว้แล้วหยดลงบนสไลด์ดูด้วยกำลังขยาย 400 X หรือ 1000 X สังเกตดูว่าสปอร์มีร่องรอยของการแตกหรือไม่ ถ้ามีจะสังเกตเห็นว่าผนังสปอร์อาจจะเป็นรู หรือมีรอยเป็นรูปตัววี (V-shape) แล้วพยายามหรี่แสงเพื่อตรวจดูมิกซ์อะมีบา หรือสวอมเซล

นอกจากนี้ได้ใช้วิธีเคาะให้สปอร์หล่นลงบนสไลด์แล้วหยดน้ำกลั่นลงไปปิดกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 X และ 1000 X สังเกตการงอกของสปอร์เป็นระยะ ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 การเพาะบนอาหารชนิดต่าง ๆ

1.2.1 อาหารที่เป็นใบไม้ผุ และไม้ผุ

นำใบไม้ผุ และไม้ผุมาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วเทน้ำทิ้ง 2-3 ครั้ง หลังจากนั้นแช่ไว้ 1 คืน ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อให้อมน้ำจนอิ่มตัว

พับกระดาษทิชชูหนาประมาณ 2 ชั้น วางไว้ที่ก้นกล่องพลาสติก หรือจานเพาะเชื้อเพื่อช่วยในการดูดซับน้ำไว้ให้ชื้นพอดีและไม่ให้น้ำไหลไปมา หลังจากนั้นนำใบไม้ผุ หรือไม้ผุ ที่แช่น้ำกลั่นไว้แล้วนั้นมาวางเรียงบนกระดาษทิชชูอีกทีหนึ่ง แล้วเทน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปให้ชื้นพอสมควร ไม่แฉะ (ในการเตรียมอาหารนี้เตรียมไว้อย่างละ 2 ชุด อีกชุดหนึ่งเตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อเท่านั้น)

แบ่งจานเพาะเชื้อที่มีใบไม้ผุและไม้ผุ อีกชุดหนึ่งไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ 121°ซ ใช้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

นำสปอร์ลงไปเพาะบนอาหารเหล่านี้ตามวิธี 2 วิธีดังได้กล่าวแล้วในข้อ 1.1

1.2.2 อาหารที่เป็นมูลม้า

พับกระดาษทิชชูหนาประมาณ 2 ชั้น วางไว้ที่ก้นกล่องพลาสติก หรือจานเพาะเชื้อ แล้ววางมูลม้าไว้บนกระดาษทิชชูจำนวนพอสมควร เทน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปพอชื้นแต่ไม่แฉะ (ในการเตรียมอาหารเตรียมไว้ 2 ชุด)

นำอาหารอีกชุดหนึ่งที่เตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ ใช้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

นำสปอร์ลงไปเพาะในอาหารเหล่านี้ตามวิธี 2 วิธีดังได้กล่าวแล้วในข้อ 1.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.3 อาหารอื่น ๆ

อาหารอื่น ๆ อีก 5 ชนิดคือ Oat agar (OA) Corn meal agar (CMA) Hay infusion agar (HIA) Two-membered culture (TMC) และ Knop's agar (KA) ให้ดูการเตรียมอาหารเหล่านี้ในภาคผนวก

นำสปอร์ลงไปเพาะในอาหารเหล่านี้ตามวิธี 2 วิธีดังได้กล่าวแล้วในข้อ 1.1

1.2.4 อาหาร LIA และอาหารกึ่งสังเคราะห์

วิธีเพาะในอาหารชนิดนี้ดัดแปลงมาจากวิธีที่ใช้เพาะเลี้ยง Physarum polycephalum (Ashworth และ Dee, 1975) ซึ่งเป็นราเมือกที่รู้ความต้องการอาหาร และสภาวะต่าง ๆ ของมันค่อนข้างจะมากกว่าราเมือกชนิดอื่น ๆ และสามารถกระตุ้นให้อยู่ในระยะต่าง ๆ ได้ภายในเวลาที่ค่อนข้างจะแน่นอน วิธีการเพาะเลี้ยงนั้นมีดังนี้

ก. เพาะ E. coli บนอาหารวุ้นเอียง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทำ suspension โดยการเทน้ำกลั่นลงไปบนผิวของอาหารวุ้น พอให้ท่วมผิวหน้าแล้วเขย่าขวดจะได้ E. coli suspension ที่คล้ายน้ำนม

ข. หยด E. coli suspension 0.05 มิลลิลิตร และหยดน้ำ 0.1 มิลลิลิตร ที่มีสวอมเซล หรือมิกซ์อะมีบา ลงบนอาหารวุ้น LIA ในจานเพาะเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั้ง 2 ส่วนกระจายทั่วผิวหน้าของอาหาร นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25–26° ซ จนปรากฏบริเวณใส ซึ่งเป็นบริเวณที่มีโคโลนีของมิกซ์อะมีบา

หยดน้ำที่มีสวอมเซล หรือมิกซ์อะมีบานี้ ได้จากการเพาะสปอร์ในน้ำกลั่นที่ทำไร้เชื้อแล้ว จนงอกเป็นสวอมเซล หรือมิกซ์อะมีบา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค. หยด E. coli suspension อีก 0.05 มิลลิลิตร ลงบน LIA เกลี่ยให้ทั่วจานเพาะเชื้อแล้วใช้ห่วงลวดแตะโคโลนีของมิกซ์อะมีบาจากบริเวณใสในข้อ ข. ไปลากบนผิวของ LIA ที่มี E. coli อยู่ก่อนแล้ว

นำไปบ่มไว้ที่ 25-26°ซ ผิวหน้าของ LIA ต้องชื้นขณะบ่มเชื้อจนปรากฏโคโลนีของมิกซ์อะมีบา

ง. นำ E. coli suspension จากข้อ ก. มาหยดลงไปบน DMA ให้เป็นหยด ๆ ประมาณ 20-50 หยด ต่อ 1 จานเพาะเชื้อ แต่ละหยดมี 0.05 มิลลิลิตร แล้วใช้ห่วงลวดแตะโคโลนีของมิกซ์อะมีบา จากบริเวณใสในข้อ ค. อย่างน้อย 2 โคโลนี ซึ่งคาดว่าเป็น heterothallic strain มาผสมกันในหยดของ E. coli suspension แต่ละหยดนั้น นำไปบ่มไว้ที่ 25-26°ซ จนปรากฏพลาสโมเดียมขนาดเล็ก ๆ ขึ้น

จ. ถ่ายพลาสโมเดียมจากข้อ ง. ไปยัง Mc.Ardle medium ในจานเพาะเชื้อซึ่งผสม streptomycin 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงไปด้วยเพื่อฆ่า E. coli แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 25°ซ

ฉ. ถ่ายเชื้อไปสู่ Mc.Ardle medium จานใหม่บ่อย ๆ ประมาณ 3-5 วันต่อครั้ง จะทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์มากขึ้น

การบ่มเชื้อ

นำอาหารที่เพาะด้วยสปอร์ทั้ง 2 วิธีไปบ่มไว้ โดยเอาอาหารที่เป็นใบไม้ ไม้ผุ ไม้ผุ และมูลม้า บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ไม่ให้ถูกแสงสว่างด้วยการใช้กระดาษหนังสือพิมพ์หนาประมาณ 2-3 ชั้น คลุมภาชนะที่เพาะไว้ ถ้าถูกแสงสว่างจะสังเกตพลาสโมเดียมได้ยาก และเอาภาชนะที่เพาะวางไว้กับพื้นซีเมนต์เพื่อว่าอุณหภูมิจะได้ไม่สูงเกินไปในเวลากลางวัน ส่วนอาหารที่มีวุ้นเป็นส่วนประกอบนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อที่ปรับอุณหภูมิ 25°ซ ในที่มืด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสังเกตระยะที่สร้างสปอร์

พลาสโมเดียมของราเมือกเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญ หรือได้รับการกระตุ้น (วิธีกระตุ้นเขียนไว้ในข้อ 2.4) จะเปลี่ยนแปลงไปสู่ระยะการสร้างสปอร์ซึ่งจะสังเกตการเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนเหล่านี้ด้วยตาเปล่า แว่นขยาย หรือใช้กล้องสเตริโอ

1.3 การเพาะเลี้ยงพลาสโมเดียมที่ได้จากการเพาะสปอร์

การถ่ายพลาสโมเดียมไปเลี้ยงบนอาหารจานใหม่

เมื่อเพาะราเมือกจากสปอร์จนเจริญถึงระยะพลาสโมเดียมได้แล้วการถ่ายพลาสโมเดียมได้ใช้วิธีการ 2 อย่างคือ

ก. ใช้สปาทูลา หรือมีดอันเล็ก ๆ ที่ปลายมีดก่อนข้างป้าน จุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อเสียก่อน แล้วตัดลงบนอาหารวุ้นในบริเวณที่มีพลาสโมเดียมเจริญอยู่ นำก้อนวุ้นนี้ไปวางบนอาหารจานใหม่แล้วนำไปบ่มเชื้อไว้ในตู้บ่มเชื้อในที่มืด จนกระทั่งพลาสโมเดียมผละจากวุ้นอันเดิมเคลื่อนลงสู่อาหารจานใหม่

พลาสโมเดียมที่มีขนาดใหญ่ เวลาตัดได้เลือกตัดเฉพาะบริเวณด้านหน้า (anterior) ของพลาสโมเดียม ซึ่งเป็นด้านที่มีรูปร่างเป็นรูปพัด ไม่ตัดบริเวณกลาง ๆ หรือทางท้าย ๆ ที่เห็นมีเมือกเป็นสีชัด ๆ จาง ๆ หรือสีน้ำตาล เมื่อเทียบกับบริเวณที่มีรูปร่างคล้ายพัด เพราะจะเป็นบริเวณที่คงเหลือแต่เมือกเท่านั้น ส่วนโปรโตพลาสซึมเคลื่อนไปทางบริเวณด้านหน้าหมดแล้ว (Ashworth และ Dee, 1975)

ข. ใช้คีมคีบส่วนของใบไม้ผุ หรือไม้ผุที่มีพลาสโมเดียมเจริญอยู่นั้นวางลงบนอาหารวุ้นจานใหม่ แล้วนำไปบ่มไว้ในที่มืด จนกระทั่งพลาสโมเดียมผละจากใบไม้ผุ หรือไม้ผุ ลงสู่อาหารจานใหม่นั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสังเกตการเจริญของพลาสโมเดียม

สังเกตโดยการใช้แว่นขยาย หรือใช้กล้องสเตริโอตรวจดูในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ในระยะแรก ๆ ของการเกิดพลาสโมเดียมจะสังเกตพบยาก เพราะอาหารที่เป็นใบไม้ผุ ไม้ผุ และมูลม้า มักจะวางเรียงซ้อน ๆ กันจะตรวจดูได้เฉพาะบริเวณที่สามารถมองเห็นได้จากด้านบน โดยไม่ต้องดึงอาหารออกตรวจดูเป็นชั้น ๆ เพราะเกรงว่าจะเป็นอันตรายต่อพลาสโมเดียมขนาดเล็กที่อาจจะเกิดขึ้นบริเวณใต้ชั้นของใบไม้ผุก็ได้ จะสังเกตเห็นพลาสโมเดียมก็ต่อเมื่อพลาสโมเดียมได้คืบคลานออกมาพ้นที่กำบัง ขณะสังเกตต้องระวังไม่ให้ถูกแสงสว่างมากนักเพราะแสงสว่างเป็นปัจจัยที่กระตุ้นให้ราเมือกอยู่ในระยะสร้างสปอร์ หรือถ้าได้รับแสงสว่างมากไปจะตาย หรือเคลื่อนหนีเข้าไปในระหว่างชั้นของใบไม้ผุ และไม้ผุ ทำให้สังเกตยาก

2. การกระตุ้นให้ราเมือกอยู่ในระยะต่าง ๆ

2.1 การกระตุ้นจากระยะสปอร์ให้เข้าสู่ระยะสวอมเซล

นำฟรุตติงบอดีแห้งของราเมือก 24 ชนิด และมีฟรุตติงบอดีสดของราเมือก 5 ชนิด คือ Lamproderma scintillans, L. arcyrionema, Physarella oblonga, Stemonitis fusca และ S. nigrescens มาบดขยี้ จากนั้นเคาะให้สปอร์หล่นลงในน้ำกลั่น สปอร์เมื่อได้รับความชื้นมาก ๆ จะกระตุ้นให้สปอร์งอกออกมาเป็นมิกซ์อะมีบา หรือสวอมเซลได้ (Ashworth และ Dee, 1975 ; Alexopoulos และ Mims, 1979)

2.2 การกระตุ้นจากระยะพลาสโมเดียมให้เข้าสู่ระยะสเคลอโรเตียม

กระตุ้นโดยการทำให้พลาสโมเดียมอยู่ในสภาวะขาดแคลนอาหาร ซึ่งใช้ 2 วิธีคือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก. เลี้ยงพลาสโมเดียมไว้ในอาหารจานเดิมเป็นเวลานาน ๆ ไม่ย้ายไปเลี้ยงในอาหารจานใหม่ จนกระทั่งอาหารหมด

ข. ย้ายพลาสโมเดียมไปเลี้ยงในอาหารจานใหม่ที่ลดปริมาณข้าวโอ๊ตหรือ E. coli ลงให้น้อยที่สุด และเลี้ยงพลาสโมเดียมต่อไปจนกระทั่งอาหารหมด

เมื่อพบว่าราเมือกเริ่มอยู่ในสภาพขาดอาหารแล้วประมาณ 2–3 วัน นำภาชนะที่เพาะเชื้อนั้นออกมาจากที่มืด เปิดฝาจานเพาะเชื้อไว้ประมาณ $\frac{1}{5}$ ของจานเพาะเชื้อ เพื่อให้ความชื้นค่อย ๆ ลดลง

2.3 การกระตุ้นจากระยะสเคลอโรเตียมให้เข้าสู่ระยะพลาสโมเดียม กระตุ้นโดยใช้ 3 วิธีการดังนี้

ก. ใช้กระดาษทิชชูสีขาวที่เปียกน้ำกลั่นจนชุ่มวางไว้จนชิดกับสเคลอโรเตียม ซึ่งยังอยู่ในจานเพาะเชื้อ และมีอาหารวุ้นเก่า ๆ ที่แห้ง ๆ อยู่ด้วย

ข. เอาสเคลอโรเตียมวางลงบนกระดาษทิชชูที่เปียกน้ำกลั่นในจานเพาะเชื้อ

นำจานเพาะเชื้อทั้ง ก. และ ข. นี้ใส่ลงในภาชนะที่มีความชื้นอีกทีหนึ่ง แล้วนำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องใช้กระดาษหนังสือพิมพ์บังจานไว้เพื่อไม่ให้เชื้อถูกแสง หมั่นตรวจดูความชื้นในจานเพาะเชื้อให้ชื้นพอดี ไม่แห้งหรือแฉะจนเกินไป เมื่อพลาสโมเดียมเจริญจนมีขนาดใหญ่ขึ้นบ้างเล็กน้อย จะย้ายไปเลี้ยงไว้ในจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารสมบูรณ์ เพราะถ้าไม่เช่นนั้นแล้วมันจะเจริญได้ช้ามาก และอาจจะตายในที่สุด

ค. นำสเคลอโรเตียมมาวางบนสไลด์ หยดน้ำกลั่นลงไปแล้วปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ สังเกตดูการงอกของพลาสโมเดียมขนาดเล็กจากสปีรูล ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 X และ 1000 X

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 การกระตุ้นจากระยะพลาสโมเดียมให้เข้าสู่ระยะสร้างสปอร์

กระตุ้นโดยการทำให้พลาสโมเดียมอยู่ในสภาวะขาดแคลนอาหารระยะหนึ่งประมาณ 2-3 วัน (โดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 2.2) หลังจากนั้นนำพลาสโมเดียมที่อดอาหารในที่มืดแล้วนี้ให้ได้รับแสงสว่าง (แต่ไม่ใช่แสงแดด) โดยนำขึ้นมาวางบนหลังตู้ในห้องปฏิบัติการ ให้ได้รับแสงสว่างจากหลอดไฟฟ้าที่ติดอยู่บนเพดานห้องปฏิบัติการเท่านั้น (ถ้าหากจะใช้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์โดยตรง ก็ต้องระมัดระวังในเรื่องอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถควบคุมได้โดยใช้พัดลมช่วยระบายความร้อน) เมื่อวางภาชนะที่เพาะให้ได้รับแสงสว่างแล้ว เปิดฝาภาชนะให้แง้มไว้เพียงเล็กน้อยเพื่อให้ความชื้นค่อย ๆ ลดลง จะช่วยกระตุ้นให้พลาสโมเดียมเจริญไปสู่ระยะสร้างสปอร์

3. การบันทึกภาพ การวัดขนาด ระยะเวลาและสถานที่ทำการทดลอง

การบันทึกภาพ

ภาพพลาสโมเดียม สปอร์โรฟอร์ และสเคลอโรเทียม ถ่ายด้วยกล้องถ่ายรูปยี่ห้อ Nikon F.3 โดยใช้ไมโครเลนซ์ (Lens Micro) ส่วนภาพของสฟีรูล สปอร์ และสวอมเซล ใช้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนซ์ประกอบ ยี่ห้อ Olympus Model BH-DO ที่ติดกล้องถ่ายภาพยี่ห้อ Nikon ชนิด Photomicographic system camera Model PM-10-A ใช้ฟิล์มสี Kodak color II C 135-36

ในการถ่ายภาพพลาสโมเดียมนั้น ใช้แฟลชอีเลกโทรนิคช่วยในการถ่าย เพราะแสงไม่พอ เนื่องจากพลาสโมเดียมถูกแสงสว่างมากและนานไม่ได้ ดังได้กล่าวมาแล้ว

การวัดขนาด

ขนาดของสฟีรูล สวอมเซล วัดด้วย Filor micrometer ยี่ห้อ Olympus OSM R10C ส่วนขนาดของพลาสโมเดียมใช้วัดด้วยไม้บรรทัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระยะเวลา และสถานที่ทำการทดลอง

ได้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ของภาควิชาชีววิทยา ได้เริ่มทำการทดลองตั้งแต่วันที่ 20 มีนาคม 2525 ถึงวันที่ 10 มิถุนายน 2526

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved