

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

อุปกรณ์

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 อุปกรณ์จับสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำและสัตว์เลื้อยคลาน

1.1.1 กระสอบปุย

1.1.2 กล่องโฟมใส่ตัวอย่างสัตว์

1.1.3 เครื่องกำเนิดไฟฟ้าขนาด 1 กิโลวัตต์

1.1.4 ไซดักปลา

1.1.5 แหะเล็ก

1.1.6 ถังน้ำพลาสติก

1.1.7 ตาข่ายดักสัตว์

1.1.8 รองเท้าบูตยาง

1.1.9 สวิง

1.1.10 สายไฟ

1.1.11 สุ่มขนาดเล็ก

1.2 อุปกรณ์ตรวจและเก็บตัวอย่าง

1.2.1 กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (compound microscope)

- กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ Olympus system microscope - model BHA พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพและวาดรูป (drawing tube)
- Ocular และ Stage micrometer

1.2.2 กล้องจุลทรรศน์สองตากำลังขยายต่ำ (Stereo) Olympus system model X-Tr

1.2.3 กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์

1.2.4 ขวดเล็ก (Vial) เก็บตัวอย่างพยาธิ

1.2.5 ขวดใหญ่ใช้ตองสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำและสัตว์เลื้อยคลานพร้อมฝาปิด

1.2.6 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการผ่าตัด

1.2.7 ตูปลา

1.2.8 ออกซิเจนผง

1.2.9 อุปกรณ์เครื่องแก้ว : Petri - dish , beaker, dropper, Stender dish, standing jar

1.2.10 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถังมือ หน้ากาก เข็มเขี่ย พู่กัน ถังพลาสติก กระดาษเคลือบ กระดาษชำระ

1.2.11 แอร์บีม

1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาด้วย SEM

1.3.1 กล้องสแกนอิเลคตรอน (Olympus system model X-TrX)

- 1.3.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope, SEM) รุ่น JEOL-JSM 840A
- 1.3.3 เครื่อง Critical Point Dryer (CPD) รุ่น POLARON CPD 7501
- 1.3.4 เครื่อง Coater รุ่น JEOL-JFC 1100E
- 1.3.5 เครื่อง Dryer film และภาพถ่าย Omega Arkay รุ่น CD 40
- 1.3.6 Stub, เทปทองแดงติดกาว 2 หน้า
- 1.4 อุปกรณ์ถ่ายภาพรูปและวาดรูป
 - 1.4.1 กล้องถ่ายรูป Nikon MF-20
 - 1.4.2 กระดาษลอกลาย (Tracing paper)
 - 1.4.3 กระดาษอัดรูปขนาด 3 1/2" x 5 1/2" เบอร์ FMR 2
 - 1.4.4 ดินสอ 2B
 - 1.4.5 ยางลบดินสอ
 - 1.4.6 ปากกา rotting หัวขนาด 0.3, 0.5, 0.8 และ 1.0 mm
 - 1.4.7 ปากกา staedtler หัวขนาด 0.3 และ 0.5 mm

2. สารเคมี

- 2.1 น้ำยาคงสภาพเซลล์ (Fixative) (ภาคผนวก ข)
 - 2.1.1 Alcohol 70 %
 - 2.1.2 Boulin' s fixative
 - 2.1.3 Glutaraldehyde 2.5 %
 - 2.1.4 Formalin 4 %
 - 2.1.5 Osmium tetroxide 1 %
- 2.2 น้ำยาล้างตัวอย่าง
 - 2.2.1 Phosphate buffer 0.1 M
 - 2.2.2 Sodium chloride 0.85%
- 2.3 สารเคมีที่ใช้ทำสไลด์ถาวร
 - 2.3.1 Ethyl alcohol 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 85% และ 95 %
 - 2.3.2 Butyl alcohol
 - 2.3.3 Xylene
 - 2.3.4 Permout
- 2.4 สีย้อม (ภาคผนวก ข)
 - 2.4.1 Borex carmine
 - 2.4.2 Eosin
 - 2.4.3 Fast green
 - 2.4.4 Haematoxyline

2.5 สารเคมีที่ใช้การศึกษาด้วย SEM

2.5.1 ทองคำ (Gold)

2.5.2 Acetone

2.5.3 Ethyl alcohol 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 85% และ 95 %

2.5.4 Transitional Fluid; CO₂ เหลว

2.6 น้ำยาล้างฟิล์มขาว - คำ (ภาคผนวก ข)

2.6.1 น้ำยาล้างฟิล์มขาวรูป สูตร Kodak D - 72

2.6.2 Developer D - 76

2.6.3 Hypo clearing agent

2.6.4 Hypo - Fixer

2.6.5 Photo flo

2.6.6 Stop - bath (1 % acetic acid)

วิธีการศึกษา

1. สำรวจพื้นที่และกำหนดจุดเพื่อสุ่มเก็บตัวอย่างสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำและสัตว์เลื้อยคลานตามลำน้ำแม่สา อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ - ปุย อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่ แบ่งออกเป็น 4 จุด (รูป 13) มีดังนี้
 - 1.1 สะพานทางเข้าหมู่บ้านกองแหะ ตำบลโป่งแยง มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,000 เมตร
 - 1.2 หน่วยจัดการต้นน้ำห้วยคันทิมี ศูนย์จัดการต้นน้ำที่ 6
มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 700 เมตร
 - 1.3 สะพานประปาสุขาภิบาลแมริม (ห้วยใจ) ตำบลแมริมใต้
มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 340 เมตร
 - 1.4 สะพานชลประทาน มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 330 เมตร
2. สำรวจชนิดของหนอนพยาธิในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำและสัตว์เลื้อยคลาน จากลำน้ำแม่สา อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ - ปุย จังหวัดเชียงใหม่ ตามจุดที่กำหนดไว้เดือนเว้นเดือน ในระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2541 - เมษายน 2542
3. การเก็บตัวอย่างสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำและสัตว์เลื้อยคลาน แบ่งเป็นจับสัตว์ที่อยู่ในน้ำโดยการช้อนด้วยไฟฟ้าที่มีกำลังไฟต่ำเพียงพอให้สัตว์สลบและฟื้นตัวขึ้นมาได้อีกครั้ง ระยะทางในการช้อนด้วยไฟฟ้ายาวประมาณ 100 เมตร เป็นเวลา 30 นาที ทำการเก็บตัวอย่างสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำและสัตว์เลื้อยคลานเดือนละครั้ง พยายามรักษาสภาพตัวอย่างสัตว์ให้มีชีวิตโดยการโรยออกซิเจนผงเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในภาชนะที่ใส่ตัวอย่างสัตว์ เพื่อนำมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ ส่วนการจับสัตว์ที่อยู่บนบกสองข้างลำน้ำ ระยะทางประมาณ 20 เมตร ทำโดยการจับด้วยมือหรือส้อมขนาดเล็ก พยายามรักษาสภาพตัวอย่างสัตว์ให้มีชีวิต โดยไม่ทำให้สัตว์ตาย เพื่อนำมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการเช่นกัน
4. นำตัวอย่างสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำมาพักไว้ในตู้ปลาที่มีเครื่องปั๊มอากาศ ส่วนสัตว์เลื้อยคลานนำมาขังไว้ในภาชนะที่มีฝาปิด ณ ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และตรวจหาปรสิตให้เสร็จสิ้นภายใน 7 วัน

5. นำสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำและสัตว์เลื้อยคลานมาตรวจสอบชนิดโดยอ้างอิงจากหนังสือ Taylor (1926) และ Cox (1992) และตรวจสอบโดยผู้เชี่ยวชาญคือ ดร.จารุจินต์ นกิตะภักดิ์ ผู้อำนวยการกองวิจัยธรรมชาติวิทยาและคร.ธัญญา จันอาจ องค์การพิพิธภัณฑสถานแห่งชาติ กรุงเทพฯ โดยในการศึกษาได้ทำการศึกษาดูอย่างสัตว์ทีละตัว นำมาทำให้ตายด้วยการแช่ในตู้แช่แข็ง หรือถ้าตัวอย่างสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำและสัตว์เลื้อยคลานตายขณะทำการเก็บตัวอย่าง ก็ทำการแช่ในน้ำแข็ง และเมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการ ก็ทำการตรวจสอบโดยทันที โดยทำการแยกชนิดสัตว์ ชั่งน้ำหนัก (weight) และวัดความยาว (length) โดยในกบวัดตั้งแต่ส่วนงอยปาก (snout) ถึง ส่วนท้ายสุดของลำตัว ในสัตว์เลื้อยคลานวัดตั้งแต่ส่วนงอยปากถึง สุดปลายหาง จัดบันทึกข้อมูล
6. ทำการตรวจหาหนอนพยาธิจากภายนอกตัวสัตว์ บริเวณผิวหนัง โดยใช้แผ่นสไลด์ขีดเมื่อกบบริเวณผิวหนังหยดน้ำเกลือ NaCl 0.85 % ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound microscope) บริเวณใต้ผิวหนังทำการดึงหนังออกจากส่วนของกล้ามเนื้อต่างๆ คลายเป็นการถอดเสื้อให้กับหรือดู นำหนังที่ได้มาศึกษาภายใต้กล้องกำลังขยายต่ำ (Stereo microscope) ในส่วนของช่องปาก และช่องทวารหนักทำการตรวจโดยการนำหลอดหยด (dropper) ดูดน้ำเกลือแล้วหยดลงในช่องปากจากนั้นก็ดูดน้ำที่ได้ในช่องปากหรือช่องทวารหนักมาหยดลงบนสไลด์ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบเช่นเดียวกับผิวหนัง และในส่วนของเบ้าตานั้นนำมาแช่ใน NaCl 0.85 % ศึกษาภายใต้กล้อง สเตอริโอ ทำการตรวจหาหนอนพยาธิอย่างละเอียด บันทึกข้อมูล และนำพยาธิมาศึกษาต่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ
7. ทำการตรวจหาหนอนพยาธิ ภายในตัวสัตว์ โดยนำกล้ามเนื้อ ระบบทางเดินอาหาร หัวใจ ตับ ม้าม ไต ถุง น้ำดี กระเพาะปัสสาวะ มาแช่ใน NaCl 0.85 % ศึกษาและนับจำนวนหนอนพยาธิภายใต้กล้องสเตอริโอ แล้วนำพยาธิที่ได้ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ จำแนกชนิด นับจำนวนหนอนพยาธิแต่ละชนิดบันทึกเป็นข้อมูล
8. นำหนอนพยาธิที่ได้จากข้อ 7 และ 8 ไปทำเป็นสไลด์ถาวร คือ พยาธิใบไม้ พยาธิตัวติดและพยาธิหัวหนาม และกิ้งถาวร คือ พยาธิตัวกลม (ภาคผนวก ข.) แล้วนำไปถ่ายรูปเพื่อศึกษาฐานันฐานวิทยา ตรวจสอบชนิด และเก็บไว้เป็นหลักฐานต่อไป โดยมีเอกสารอ้างอิงคือ Yamaguti (1958), Yorke and Mapleston (1969), Wardler and Mcloed (1952), Petrochenko (1971) รวมถึง journal ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง เพื่อช่วยในการจัดจำแนก
9. นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบในข้อที่ 8 ไปคำนวณหาค่า prevalence และ ค่า intensity
10. ในการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยนำหนอนพยาธิบางชนิดมาล้างด้วย NaCl 0.85 % มา fixed ด้วย 2.5 % glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 เป็นเวลา 15 นาที จึง post fixed ด้วย 1 % osmium tetroxide ใน buffer ชนิดเดียวกัน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากตัวพยาธิด้วย ethyl alcohol ความเข้มข้น 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 85% และ 95% นานช่วงละ 2 ชั่วโมง ต่อมานำไปแช่ใน absolute ethyl alcohol และ acetone นาน อย่างละ 1 ชั่วโมง แล้วทำตัวอย่างให้แห้งด้วยการทำ critical point drying (CPD) ประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำพยาธิมาติดบน stub ที่ทำจากทองเหลืองโดยใช้แผ่นทองแดงที่ติดกาวสองหน้าติดด้านบน stub ภายใต้กล้องสเตอริโอ แล้วนำไปทำการ coat ด้วยทองคำ (Gold) เป็นเวลา 8 นาที แล้วนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน พร้อมบันทึกรายละเอียดของพยาธิแต่ละชนิดดังนี้

- พยาธิใบไม้ ศึกษาถึง tegumental surface อย่างละเอียด โดยดูทางด้าน ventral เพื่อดู oral sucker, hook, circumoral spine, acetabulum, genital pore, tegumental surface, papillae, spine ทางด้าน dorsal ดู tegumental surface, papillae, spine และทางด้าน posterior เพื่อดู tegumental surface, papillae และ excretory pore เป็นต้น

- พยาธิหัวหนาม ศึกษาถึงลักษณะลำตัว, proboscis, ลักษณะและการเรียงตัวของ proboscis spines, neck และลักษณะพื้นผิวบริเวณ presoma กับ metasoma หลังจากนั้นก็นำผลที่ได้ไปประมวล สรุป และรายงานผลที่ได้ต่อไป

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการศึกษา และรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. หน่วยจุลทรรศน์อิเล็กทรอนิกส์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พื้นที่ในการศึกษา

ลำน้ำแม่สาจัดเป็นต้นกำเนิดของแม่น้ำปิง มีต้นกำเนิดจากคอยขุนน้ำสาและคอยแดน บริเวณเขตติดต่อระหว่าง 3 อำเภอคือ อำเภอแมริม อำเภอหางดง และอำเภอสะเมิง ไหลไปบรรจบกับแม่น้ำปิงบริเวณบ้านแม่สาหลวง อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่ ความยาวลำน้ำมีทั้งสิ้น 26 กิโลเมตร มีความสูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 300 - 1,200 เมตร การศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสัตว์เลื้อยคลานจากจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 4 จุดจากลำน้ำแม่สาและสองฝั่งลำน้ำแม่สาข้างละ 20 เมตร ดังแผนที่ (รูป 13)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 สะพานทางเข้าหมู่บ้านกองแหะ ต.โป่งแยง มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,000 เมตร

เป็นแหล่งต้นน้ำ น้ำส่วนใหญ่ใช้ในการเกษตรกรรม และในครัวเรือน

จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 หน่วยจัดการต้นน้ำแม่สา ศูนย์จัดการต้นน้ำที่ 6 มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 700

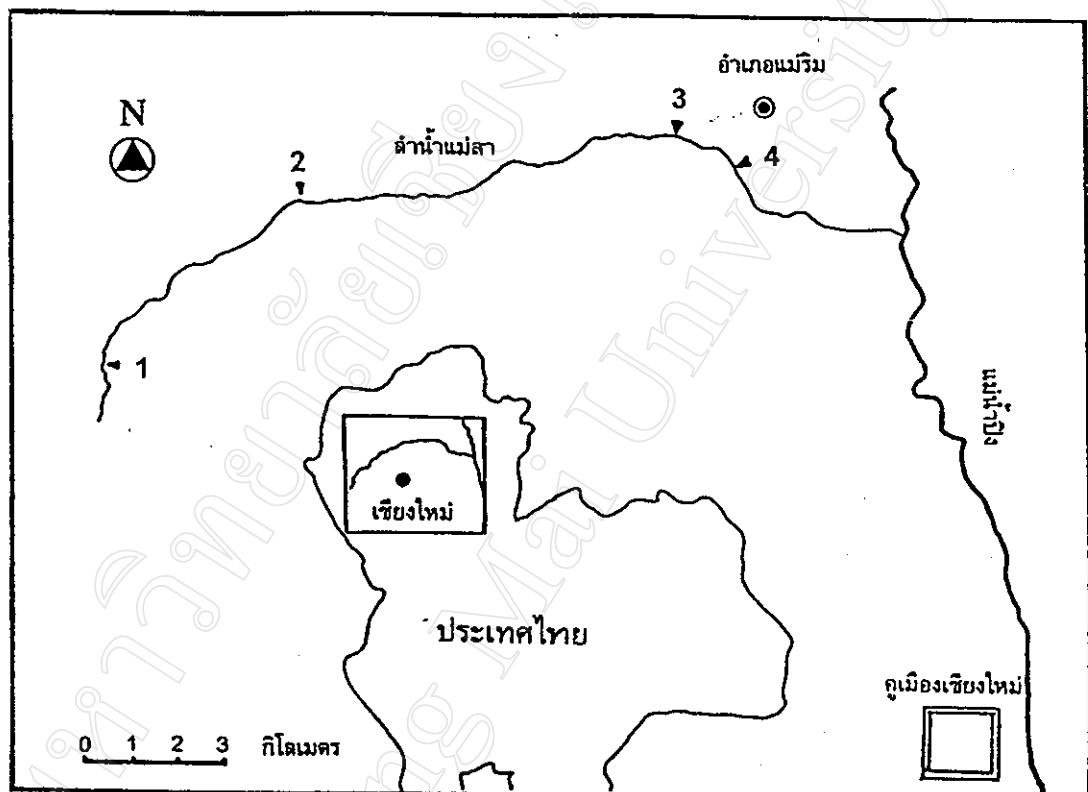
เมตร น้ำส่วนใหญ่ผ่านการใช้จากแหล่งท่องเที่ยว เช่น รีสอร์ทและปางช้าง เป็นต้น

จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 สะพานประปาสุขาภิบาลแมริม (ห้วยใจ) ต.แมริมใต้ มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 340

เมตร น้ำส่วนใหญ่ผ่านการใช้ในครัวเรือน และเป็นแหล่งอาหาร

จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 สะพานชลประทาน อ.แมริม มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 330 เมตร น้ำส่วนใหญ่ผ่าน

การใช้ประโยชน์ทั้งทางเกษตร อุตสาหกรรม และจากครัวเรือน ระบายลงสู่ลำน้ำโดยขาดการบำบัดคุณภาพ



รูป 13 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างจากลำน้ำแม่สา (กานดา, 2543)

- จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 สะพานทางเข้าหมู่บ้านกองแหะ ต.โป่งแยง
 จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 หน่วยจัดการต้นน้ำแม่สา ศูนย์จัดการต้นน้ำที่ 6
 จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 สะพานประปาสุขาภิบาลแมริม (ห้วยใจ) ต.แมริมใต้
 จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 สะพานชลประทาน อ.แมริม



1



2



3



4

รูป 14 จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 สะพานเข้าหมู่บ้านกองแหะ ต.โป่งแยง
จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 หน่วยจัดการต้นน้ำแม่สา ศูนย์จัดการต้นน้ำที่ 6
จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 สะพานประปาสุขาภิบาลแมริม (ห้วยใจ) ต.แมริมใต้
จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 สะพานชลประทาน อ.แมริม