

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

อุปกรณ์การศึกษา

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 อุปกรณ์จับสัตว์น้ำ

1.1.1 แหะเล็ก

1.1.2 สวิง

1.1.3 ตาข่ายดักสัตว์น้ำ

1.1.4 กุ้งฝอยน้ำแข็งใส่สัตว์น้ำ

1.1.5 แอร์ปั๊ม

1.1.6 ตู้ปลา

1.1.7 เครื่องกำเนิดไฟฟ้าขนาด 1 กิโลวัตต์

1.1.8 กระชอนอลูมิเนียมใช้ต่อกับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า

1.1.9 สายไฟ

1.1.10 มีดพร้า

1.1.11 รองเท้าบูตยาง

1.1.12 ถังน้ำพลาสติก

1.2 อุปกรณ์ตรวจและเก็บตัวอย่าง

1.2.1 กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (compound microscope)

- กล้องจุลทรรศน์สองตากล้องขยายสูง Olympus system microscope-model BHA พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพและวาดรูปด้วย drawing tube

- Ocular และ Stage micrometer

1.2.2 กล้องจุลทรรศน์สองตากล้องขยายต่ำ (stereo) Olympus system model X-Tr

1.2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการผ่าตัด

1.2.4 อุปกรณ์เครื่องแก้ว : Petri-dish, beaker, dropper, Stender dish, staining jar

1.2.5 กระชกสไลด์และกระชกปิดสไลด์

1.2.6 ขวดเล็ก (vial) เก็บตัวอย่างพยาธิ

1.2.7 ขวดใหญ่ใช้ดองตัวอย่างสัตว์น้ำพร้อมฝาปิด

1.2.8 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น เข็มเขี่ย พู่กัน ถังมือ กระดาษเลเบล กระดาษชำระ
ถุงพลาสติก

1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาด้วย SEM

1.3.1 กล้องสเตอริโอ Olympus system model X-Tr

1.3.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกวาด (Scanning Electron
Microscope, SEM) รุ่น JEOL-JSM 840A

1.3.3 เครื่อง Critical Point Dryer (CPD) รุ่น POLARON CPD7501

1.3.4 เครื่อง Coater รุ่น JEOL-JFC 1100E

1.3.5 stub และแผ่นทองแดง

1.3.6 เครื่อง Dryer film และภาพถ่าย Omega Arkay รุ่น CD40

1.4 อุปกรณ์ถ่ายรูปและวาดรูป

1.4.1 กล้องถ่ายรูป Nikon MF-20

1.4.2 ฟิล์มถ่ายรูปสี, ขาวดำ

1.4.3 ฟิล์มขาวดำสำหรับ SEM (ฟิล์ม 120)

1.4.4 กระดาษอัดรูปขนาด 3½" x 5½" เบอร์ FMR3

1.4.5 กระดาษลอกลาย (Tracing Paper)

1.4.6 ปากกา rotting

2. สารเคมี

2.1 น้ำยาคงสภาพเซลล์ (fixative) (ภาคผนวก ข)

2.1.1 Glutaraldehyde 2.5%

2.1.2 Osmium tetroxide 1%

2.1.3 Formalin 4% และ 10%

2.1.4 Bouin's fixative

2.1.5 Alcohol 70%

2.2 น้ำยาล้างตัวอย่าง (rinsing solution) (ภาคผนวก ข)

2.2.1 Phosphate buffer 0.1M

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 Haematoxylin

2.4.2 Eosin

2.4.3 Fast green

2.4.4 Borax carmine

2.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาด้วย SEM

2.5.1 Ethyl alcohol 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 85%, 95% และ 100%

2.5.2 Acetone

2.5.3 Transitional fluid ; CO₂ เหลว

2.5.4 ทองคำผสมทองคำขาว (platinum glod)

2.6 น้ำยาล้างฟิล์มขาว-ดำ (ภาคผนวก ข)

2.6.1 Developer D-76

2.6.2 Hypo-Fixer

2.6.3 Stop-bath (1% acetic acid)

2.6.4 Photoflo

2.6.5 Hypo clearing agent

2.6.6 น้ำยาล้างฟิล์มรูป สสูตร Kodak D-72

วิธีการศึกษา

- สำรวจพื้นที่และกำหนดจุดเพื่อสุ่มจับตัวอย่างปลาตามลำน้ำแม่สา อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่ ตลอดระยะทาง 26 กิโลเมตร แบ่งออกเป็น 12 จุด (รูป 3) มีดังนี้

1.1 หมู่บ้านกองแหะ ต.โป่งแยง มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,075 เมตร

1.2 สะพานทางเข้าหมู่บ้านกองแหะ มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,000 เมตร

1.3 ปางช้าง บ้านโป่งแยง มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 960 เมตร

1.4 สะพานทางเข้าบ้านผานกกก (โป่งแยงนอก-แม่ขนินเหนือ)

มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 790 เมตร

1.5 หน่วยจัดการต้นน้ำแม่สา ศูนย์จัดการต้นน้ำที่ 6

มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 700 เมตร

1.6 สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์

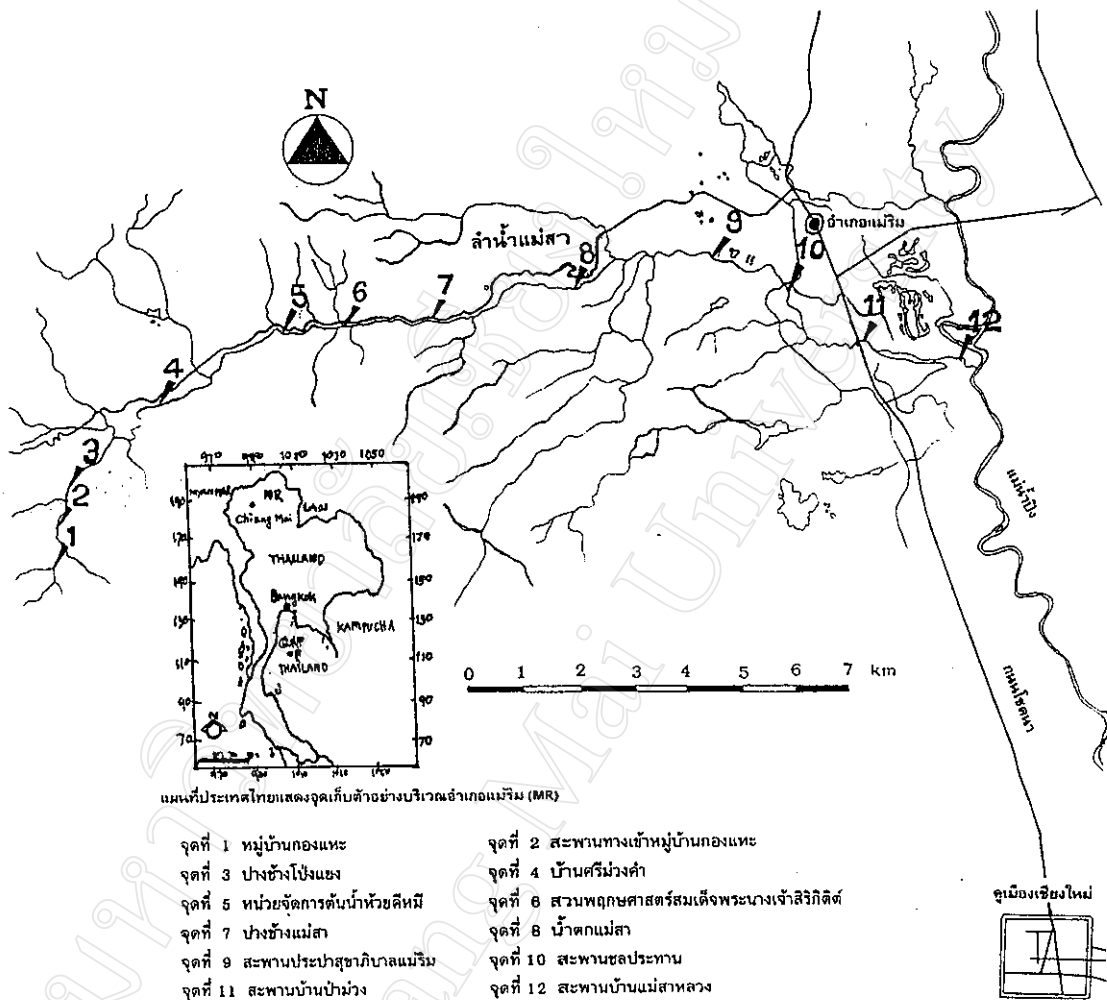
มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 650 เมตร

- 1.7 บ้านแม่เมะ (ปางช้างแม่สา) ต.แม่แรม
มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 550 เมตร
- 1.8 น้ำตกแม่สา มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 390 เมตร
- 1.9 สะพานประปาสุขาภิบาลแมริม (ห้วยโจ้) ต.แมริมใต้
มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 340 เมตร
- 1.10 สะพานชลประทาน มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 330 เมตร
- 1.11 สะพานบ้านป่าม่วงริมถนนไป อ.แมริม
มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 330 เมตร
- 1.12 สะพานสถานพินิจ (ปากน้ำแม่สา) มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 340 เมตร
2. สํารวจชนิดของพยาธิใบไม้ในปลานํ้าจืดจากลํานํ้าแม่สาอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ ตามจุดที่กำหนดไว้ ทั้ง 3 ฤดูกาลในระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่เดือนมกราคม-ธันวาคม 2540
3. การเก็บตัวอย่างปลา ใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างตามจุดที่กำหนด โดยช้อนด้วยไฟฟ้า ระยะทางในการช้อนด้วยไฟฟ้ายาวประมาณ 100 เมตร เป็นเวลา 30 นาที ทำการเก็บตัวอย่างปลา ฤดูกาลละ 1 ครั้ง พยายามรักษาสภาพตัวอย่างให้มีชีวิต โดยการเพิ่มออกซิเจนในภาชนะที่ใส่ตัวอย่างปลา เพื่อนํามาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ
4. ทำการตรวจวัดคุณภาพนํ้า คือ อุณหภูมิ (Temperature), ออกซิเจนที่ละลายในนํ้า (DO) ค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity) และความเป็นกรดเป็นด่างของนํ้า (pH) ในแต่ละจุดที่เก็บตัวอย่าง ควบลู่ไปด้วย เพื่อนํามาวิเคราะห์ผลและหาความสัมพันธ์กัน
5. นําดตัวอย่างปลามาพักไว้ในตู้เลี้ยงปลาที่มีเครื่องปั๊มอากาศ ณ ห้องปฏิบัติการประสิดวิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และตรวจหาปรสิตให้เสร็จสิ้นภายใน 1 สัปดาห์
6. นํ้าปลามาตรวจสอบชนิดโดยอ้างอิงจากหนังสือ Smith (1945) และ กรมประมง (2535) ทำการศึกษาปลาที่ละตัว โดยนํ้าปลามาทำให้ตาย หรือถ้าตัวอย่างปลาตายในขณะที่ทำการเก็บตัวอย่าง ก็ทำการแช่ในนํ้าแข็ง และเมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการ ทำการตรวจสอบทันทีโดยทำการแยกชนิดของปลา ชั่งนํ้าหนักและวัดความยาวทั้งหมด (total length) จดบันทึกข้อมูล
7. ทำการตรวจหาหนอนพยาธิจากภายนอกตัวปลา บริเวณครีบก้น, เกล็ด, เหงือก และเบ้าตา โดยใช้กรรไกรตัดครีบก้น, เหงือก และเบ้าตา ออกจากตัวปลา นํ้าแต่ละส่วนแช่ในนํ้าเกลือ ที่มีความเข้มข้น 0.85% ใน Petri-dish ส่วนเกล็ดปลานั้นใช้มีดผ่าตัดขูดเกล็ดจากตัวปลา แล้วนํ้ามาแช่ใน 0.85% NaCl แล้วนํ้าไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ทำการตรวจหาหนอนพยาธิอย่างละเอียด โดยใช้เข็มเข็ม ช่วยเขี่ยและขูดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย

- ต่ำ (stereo microscope) ทำการจดบันทึกข้อมูล นำพยาธิมาศึกษาอย่างละเอียดที่กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (compound microscope)
8. ทำการตรวจหาหนอนพยาธิ ภายในตัวปลา โดยนำกล้ามเนื้อ ระบบทางเดินอาหาร หัวใจ ตับ ม้าม ไต ถุงน้ำดี แช่ใน 0.85% NaCl ศึกษาและนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ แล้วนำอวัยวะภายในเหล่านี้ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) ศึกษาชนิดของพยาธิใบไม้ที่พบ บันทึกข้อมูลไว้อย่างละเอียด
 9. นำพยาธิใบไม้ที่ได้จากข้อ 7 และ 8 ไปทำเป็นสไลด์ถาวร (ภาคผนวก ข) แล้วนำไปวาดรูปและถ่ายรูปเพื่อศึกษาฐานวิชา และตรวจสอบชนิด พร้อมทั้งเก็บไว้เป็นหลักฐานต่อไป โดยใช้เอกสารอ้างอิงคือ Bykhovskaya-Pavlovskaya *et al.* (1964), Schell (1970), Yamaguti (1958) และ Journal ต่างๆที่เกี่ยวข้อง
 10. นับจำนวนพยาธิใบไม้แต่ละชนิดที่พบ แหล่งที่พบ (site) แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า prevalence และค่า intensity
 11. นำพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยบางชนิดที่ได้จากข้อ 9 มาศึกษาด้วย SEM (ภาคผนวก ข) โดยนำพยาธิใบไม้ที่ล้างด้วย 0.85% NaCl 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 จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากพยาธิด้วย ethyl alcohol ความเข้มข้น 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 85% และ 95% นานช่วงละ 2 ชั่วโมง ต่อมานำไปแช่ใน absolute ethyl alcohol และ acetone นาน อย่างละ 1 ชั่วโมง แล้วทำให้ตัวอย่างแห้งด้วยการทำ critical point drying (CPD) (รูป 4) 2 ชั่วโมง จากนั้นนำพยาธิมาติดบน stub ที่ทำจากทองเหลืองโดยใช้แผ่นทองแดงรองไว้ภายใต้กล้องสเตอริโอ แล้วนำไปทำการ coat (รูป 5) ด้วยทองคำผสมทองคำขาว (platinum - gold) เป็นเวลา 8 นาที แล้วนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกวาด (รูป 6) พร้อมบันทึกภาพ
 12. ศึกษา tegumental surface อย่างละเอียด โดยดูทางด้าน ventral เพื่อดู oral sucker, acetabulum, genital pore, tegumental surface, papillae, spine ทางด้าน dorsal ดู tegumental surface, papillae, spine และทางด้าน posterior เพื่อดู tegumental surface และ excretory pore เป็นต้น หลังจากนั้นก็นำผลที่ได้ไปประมวลผล สรุป และรายงานผลต่อไป

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการศึกษา และรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. หน่วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



รูป 3 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างในลำน้ำแม่สา ทั้ง 12 จุด

ที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของลำน้ำแม่สา อุทยานแห่งชาติ ดอยสุเทพ-ปุย

ลำน้ำแม่สาตั้งอยู่ที่ละติจูด 18° องศา 52 ลิปดา ถึง $18^{\circ} 50$ ลิปดาเหนือ และลองจิจูด 98° องศา 47 ลิปดา ถึง 98° องศา 58 ลิปดา ตะวันออก มีความสูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 300-1,200 เมตร



รูป 4 เครื่อง Critical Point
Dryer (CPD) รุ่น
POLARON 7501



รูป 5 เครื่อง Coater
รุ่น JEOL-JFC 1100E



รูป 6 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
แบบส่องกวาด
รุ่น JEOL-JSM 840A