

### บทที่ 3

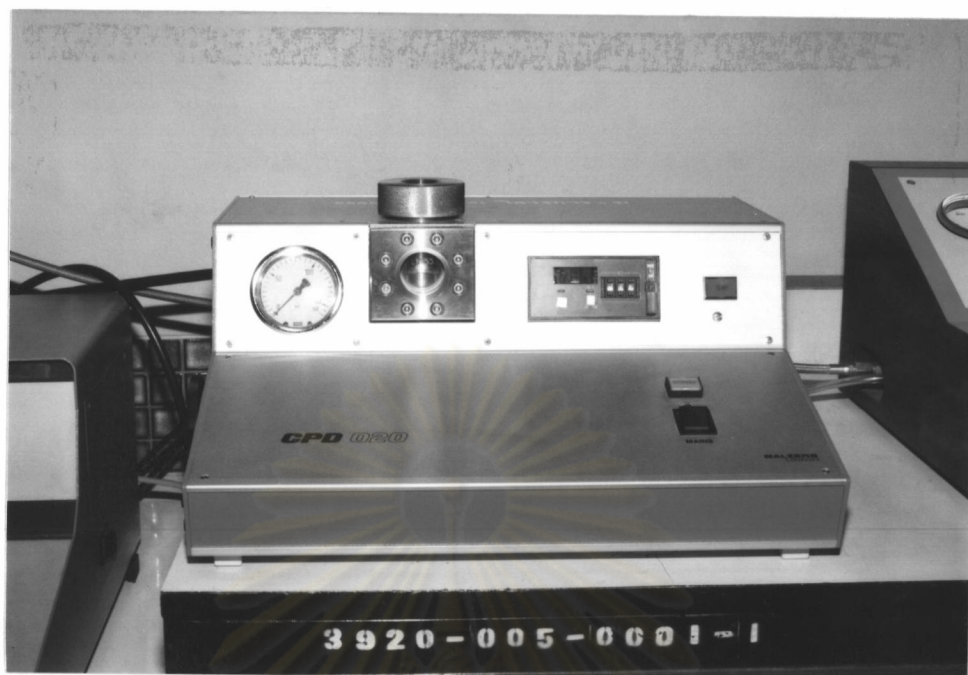
#### อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

##### สารเคมี

1. กลีเซอรอล
2. 3% paraformaldehyde ผสม 2% glutaraldehyde ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1M sodium phosphate pH 7.4
3. 2% osmium tetroxide ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1M sodium phosphate pH 7.4
4. ethanal 35%, 50%, 70%, 95%, 100 %
5. คาร์บอนไดออกไซด์เหลว
6. กาวนำไฟฟ้า silver electroconductive paint
7. ทองฉาบผิวหน้าตัวอย่าง

##### อุปกรณ์

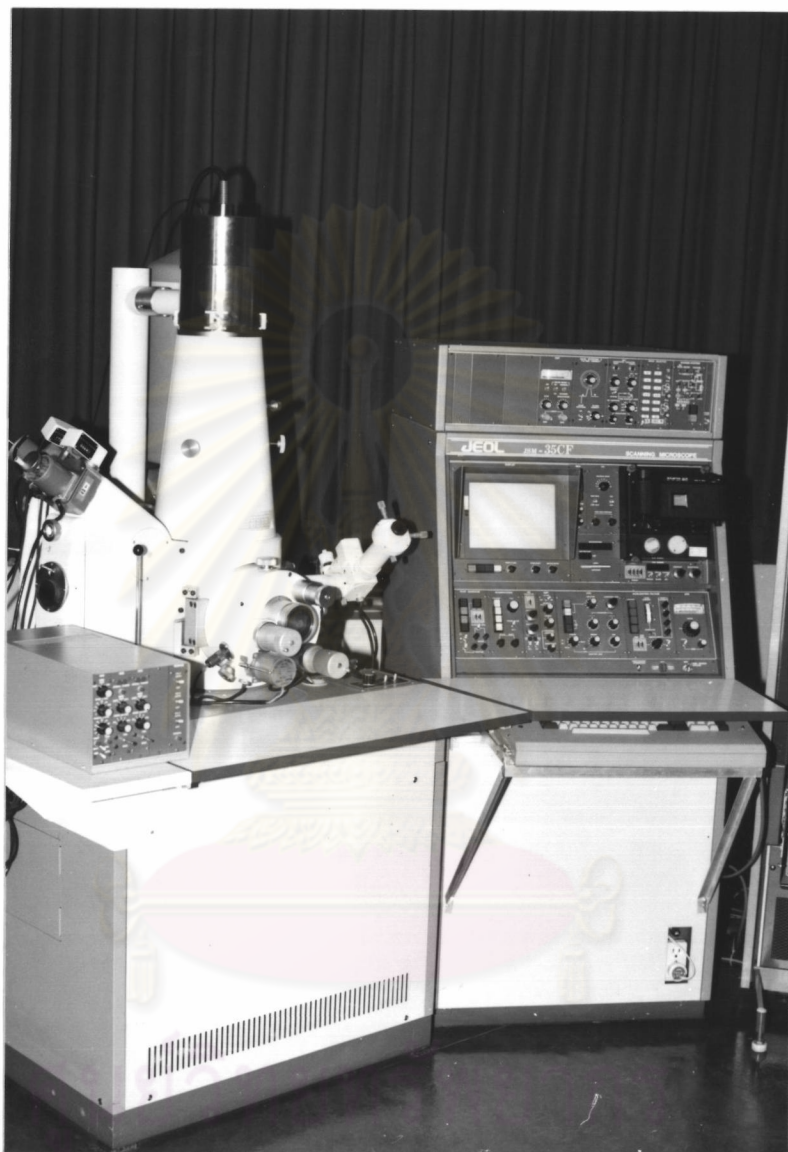
1. เครื่องมือผ่าตัด
2. coverglass
3. แท่นทองเหลืองสำหรับติดตั้งตัวอย่าง (stub หรือ specimen holder)
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
5. เครื่องมือทำตัวอย่างให้แห้ง ณ.จุดวิกฤต (critical point dryer : BALZERS UNION CPD 020; รูปที่ 4 หน้า 10)
6. เครื่องฉาบผิวหน้าตัวอย่างให้เป็นสื่อไฟฟ้า (ion sputter : BALZERS UNION SCD 040; รูปที่ 5 หน้า 10)
7. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope)
8. กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท (inverted microscope)
9. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope หรือ SEM : JEOL JSM-35CF; รูปที่ 6 หน้า 11)
10. ฟิล์มบันทึกภาพ Kodak verichrome pan VP-120 และ panatomic-X



รูปที่ 4 เครื่องมือทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point dryer : BALZERS UNION CPD 020)



รูปที่ 5 เครื่องฉาบผิวหน้าตัวอย่างให้เป็นสื่อไฟฟ้า (ion sputter : BALZERS UNION SCD 040)



รูปที่ 6 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope  
:JEOL JSM-35CF)

## วิธีดำเนินการศึกษา

### 1. การเก็บตัวอย่างหอยกาน้ำจืด

ทำการเก็บตัวอย่างหอยกาน้ำจืด *Pilsbryconcha exilis exilis* (Lea, 1839) *Pseudodon combodiensis combodiensis* (Petit, 1865) *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856) *Scabies crispata* (Gould, 1843) *Ensidens ingallsianus ingallsianus* (Lea, 1852) *Uniandra contradens tumidula* (Lea, 1856) *Physunio superbus* (Lea, 1856) จากคลองชลประทาน เขตอำเภอบ้านหม้อ จังหวัดสระบุรี และ *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* Brandt, 1974 จากคลองรพีพัฒน์ เขตอำเภอนครหลวง จังหวัดอยุธยา ตั้งแต่ เดือน มิถุนายน 2532 ถึง เดือนมกราคม 2534 (แผนที่ที่ 1 หน้า 13 และ แผนที่ที่ 2 หน้า 14)

และนำตัวอย่างหอยกาน้ำจืดที่ได้จากการเก็บระหว่างทำวิจัยของ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา ได้แก่ *Chamberlainia hainesiana* (Lea, 1856) จากแม่น้ำแควน้อย จังหวัดกาญจนบุรี *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900 *Physunio eximius* (Lea, 1856) และ *Trapezoideus exolescens exolescens* (Gould, 1843) เก็บจาก แม่น้ำมูล เขตอำเภอท่าตูม จังหวัดสุรินทร์ ตั้งแต่เดือน มกราคม 2534 ถึงเดือน มิถุนายน 2534 (แผนที่ที่ 1 หน้า 13 ; แผนที่ที่ 3 หน้า 15 และแผนที่ที่ 4 หน้า 16)

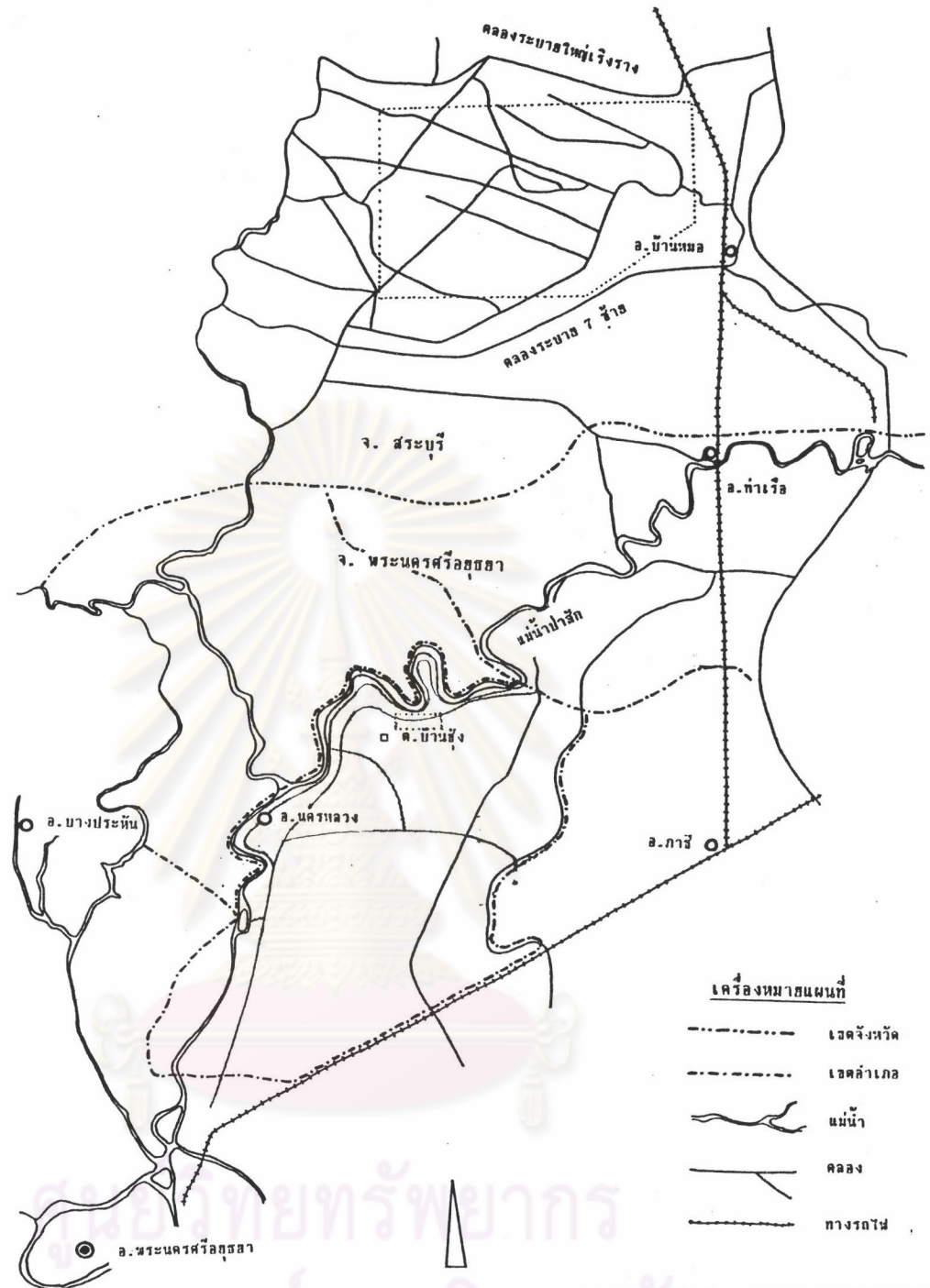
รวบรวมตัวอย่างหอยกาน้ำจืดวงศ์ Amblemidae ได้จำนวน 10 สกุล 12 ชนิด ซึ่ง จำแนกชนิดตามแนวการศึกษาของ Brandt (1974) ทำตารางรายชื่อ สถานที่เก็บ ช่วงเวลาที่เก็บ ช่วงเวลาที่พบโกลจิเดียม สภาพน้ำ เช่น ความลึก อุณหภูมิ pH ในตารางที่ 1 หน้า 17

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





แผนที่ที่ 1 แสดงตำแหน่งจังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่างหอยทากน้ำจืดในประเทศไทย ได้แก่ สระบุรี พระนครศรีอยุธยา กาญจนบุรี และ สุรินทร์

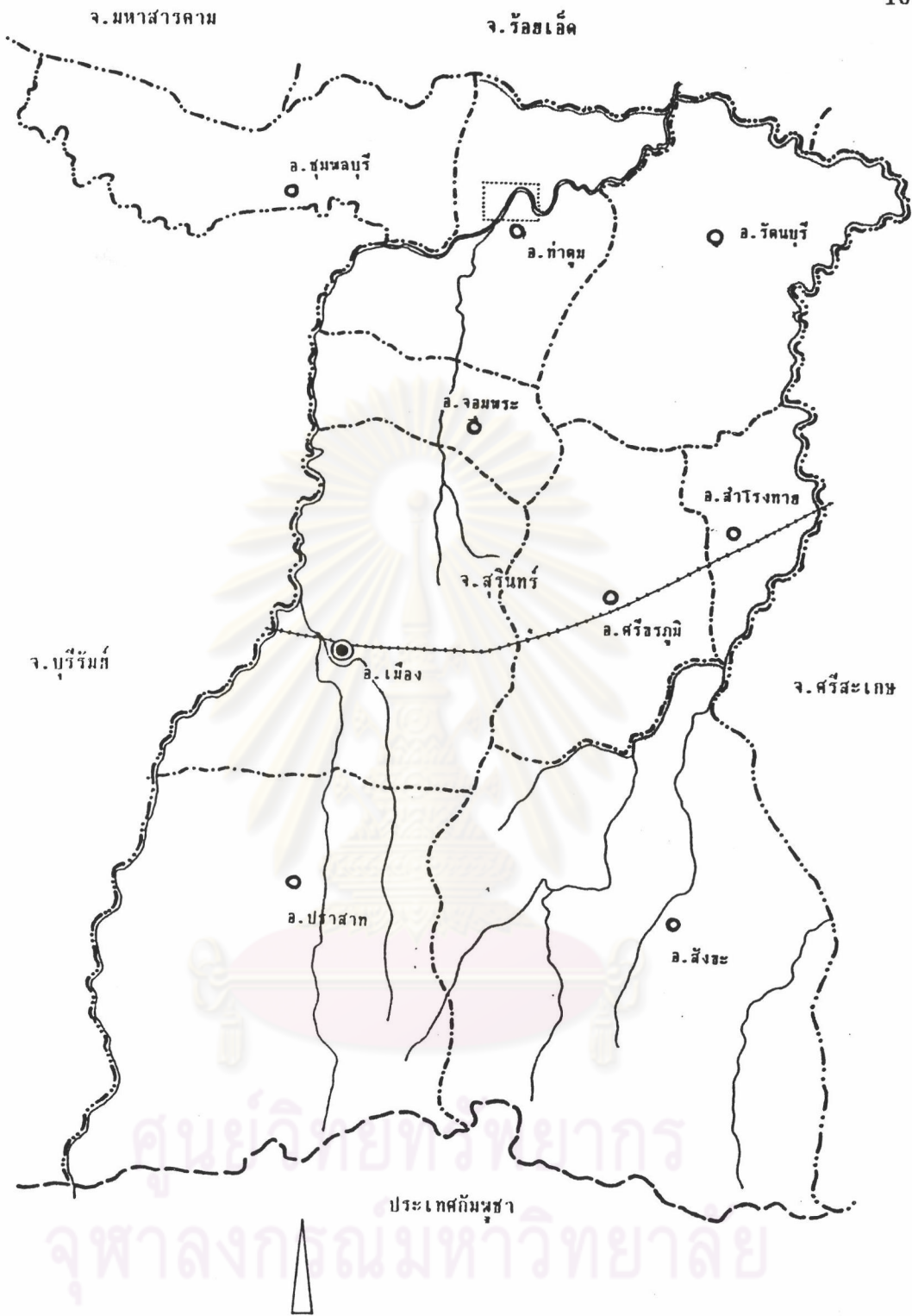


แผนที่ที่ 2 แผนที่คลองชลประทานในบริเวณจังหวัดสระบุรี และจังหวัดพระนครศรีอยุธยา แสดงแหล่งน้ำที่เก็บตัวอย่าง *Pilsbryconcha exilis exilis* (Lea, 1839) *Pseudodon cambodiensis cambodiensis* (Petit, 1865) *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856) *Scabies crispata* (Gould, 1843) *Ensidents ingallsianus ingallsianus* (Lea, 1852) *Uniandra contradens tumidula* (Lea, 1856) *Physunio superbus* (Lea, 1856) และ *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* Brandt, 1974



แผนที่ที่ 3 แผนที่แม่น้ำแควน้อย จังหวัดกาญจนบุรี แสดง แหล่งที่เก็บตัวอย่าง *Chamberlainia hainesiana* (Lea, 1856)

019199



แผนที่ที่ 4 แผนที่แม่น้ำมูล เขตอำเภอท่าตม จังหวัดสุรินทร์ แสดง แหล่งที่เก็บตัวอย่าง *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900 *Physunio eximius* (Lea, 1856) และ *Trapezoideus exolescens exolescens* (Gould, 1843)



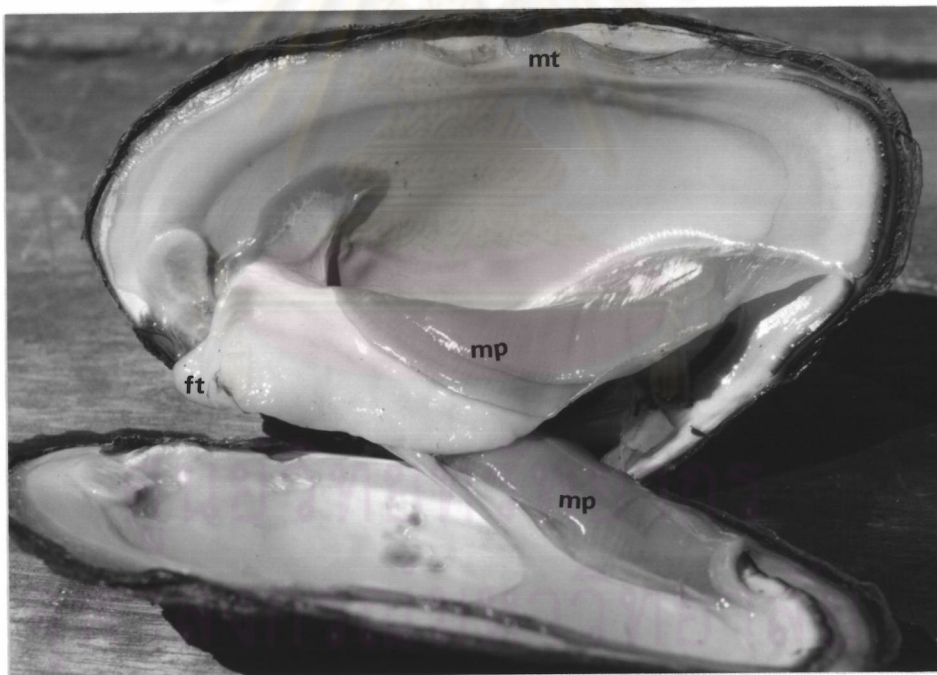
ตารางที่ 1 แสดงชื่อชนิดหอยกายน้ำจืด สถานที่เก็บ ช่วงเวลาที่เก็บ ช่วงเวลาที่พบโกลคีเดียมในหอยกายน้ำจืด สภาพน้ำ เช่น ความลึก อุณหภูมิ pH

ชนิดหอยกายน้ำจืด	สถานที่เก็บ	ช่วงเวลาที่เก็บ	ช่วงเวลาที่พบโกลคีเดียม	สภาพน้ำ		
				ความลึก (เมตร)	อุณหภูมิ °C	pH
<i>Pilsbryoconcha exilis</i> <i>exilis</i> (Lea, 1839)	สระบุรี	มิ.ย. 32-ม.ค. 34	ก.พ. 33-มิ.ย. 33 ธ.ค. 33-ม.ค. 34	1.5	29	7.43
<i>Pseudodon cambodiensis</i> <i>cambodiensis</i> (Petit, 1865)	สระบุรี	ส.ค. 32-พ.ค. 33	ธ.ค. 33-ม.ค. 34	1.5	29	7.43
<i>Hyriopsis (Limnoscapha)</i> <i>desowitzi</i> n. sp.	อยุธยา	ธ.ค. 33	ธ.ค. 33	1.7	29	7.54
<i>Hyriopsis (Limnoscapha)</i> <i>myersiana</i> (Lea, 1856)	สระบุรี	ก.ค. 32	ก.ค. 32	1.5	29	7.43
<i>Hyriopsis (Hyriopsis)</i> <i>bialatus</i> Simpson, 1900	สุรินทร์	ต.ค. 34	ต.ค. 34	-	-	-
<i>Chamberlainia hainesiana</i> (Lea, 1856)	กาญจนบุรี	ม.ค. 33	ม.ค. 33	2.5	-	-
<i>Scabies crispata</i> (Gould, 1843)	สระบุรี	ส.ค. 32-มิ.ย. 33 ธ.ค. 33-ม.ค. 34	ส.ค. 32-พ.ค. 33	1.5	29	7.43
<i>Ensidens ingallsianus</i> <i>ingallsianus</i> (Lea, 1852)	สระบุรี	ก.ค. 32-มิ.ย. 33 ธ.ค. 33-ม.ค. 34	ก.ค. 32-มิ.ย. 33 ธ.ค. 33-ม.ค. 34	1.5	29	7.43
<i>Uniandra contradens</i> <i>tumidula</i> (Lea, 1856)	สระบุรี	ก.ค. 32-ม.ค. 34 ธ.ค. 33-ม.ค. 34	ก.ค. 32-มิ.ย. 33	1.5	29	7.43
<i>Physunio superbus</i> (Lea, 1843)	สระบุรี	ก.ค. 32-พ.ค. 33		1.5	29	7.43
<i>Physunio eximius</i> (Lea, 1856)	อยุธยา	ก.ค. 33-ม.ค. 34	ธ.ค. 33-ม.ค. 34	1.5	29	7.54
<i>Physunio eximius</i> (Lea, 1856)	สุรินทร์	ต.ค. 34	ต.ค. 34	1.5	-	-
<i>Trapezoideus exolescens</i> <i>exolescens</i> (Gould, 1843)	สุรินทร์	ต.ค. 34	ต.ค. 34	1.5	-	-

## 2. การเตรียมตัวอย่างโกลดิเดียมสำหรับการศึกษาในระดับอัลตราสตรัคเจอร์

### 2.1 วิธีคัดเลือกโกลดิเดียมจากหอยกาน้ำจืด

นำหอยกาน้ำจืดที่เก็บได้ไปยังห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดตัวอย่างหอยแล้วทำการผ่าตัดเลือกเอาเฉพาะมาร์ซูเปียม ซึ่งมีลักษณะโป่งพองมีสีน้ำตาลเข้ม (รูปที่ 7 หน้า 18) ตัดมาร์ซูเปียมออกไปแช่ในน้ำกลั่น ทั้งไว้สักกระยะหนึ่งเพื่อให้โกลดิเดียมกระจายออกมา (รูปที่ 8 หน้า 19) ตรวจสอบเลือกโกลดิเดียมที่มีลักษณะเจริญเต็มที่ซึ่งเชื่อมเอ็มบริโอ (embryonic membrane) หลุดออกแล้ว ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสแตอริโอ เก็บโกลดิเดียมใน 3% para-formaldehyde ผสม 2% glutaraldehyde ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1M sodium phosphate pH 7.4

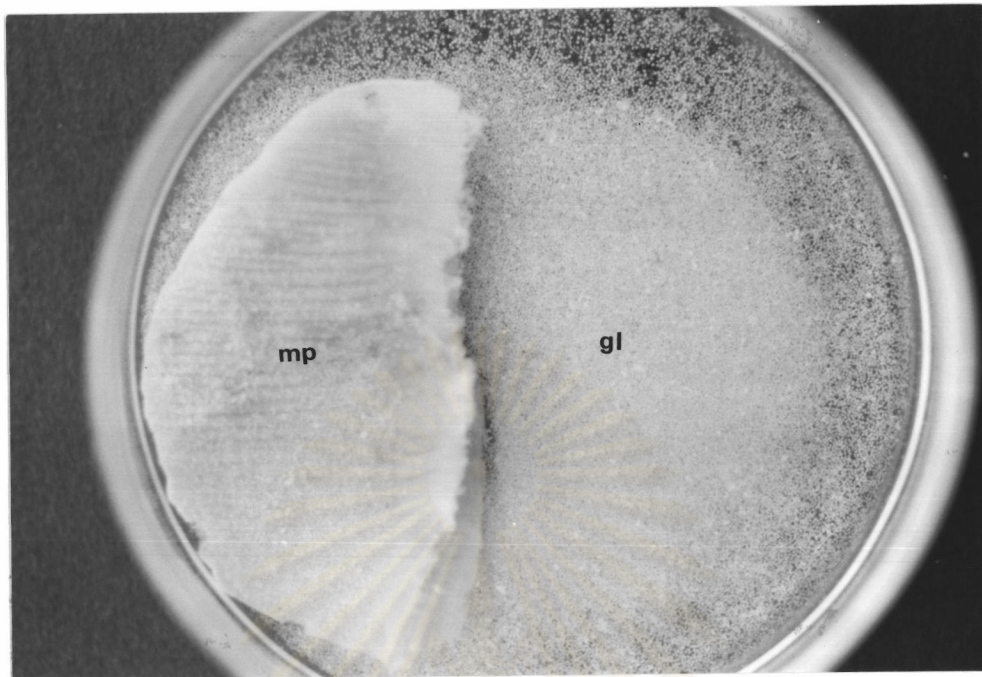


รูปที่ 7 แสดง marsupium ของ *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana*

mp = มาร์ซูเปียม (marsupium)

ft = เท้า (foot)

mt = แมนเทิล (mantle)



รูปที่ 8 โกลดิเดียมกระจายออกมาจาก marsupium

gl = โกลดิเดียม (glocidium)

mp = มาร์ซูเปียม (marsupium)

## 2.2 การเตรียมตัวอย่างโกลดิเดียมเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

นำโกลดิเดียมใน 3% paraformaldehyde ผสม 2% glutaraldehyde ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1M sodium phosphate ล้างตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1M sodium phosphate หลายครั้งๆ ในเครื่องเขย่าเพื่อให้ส่วนของเนื้อเยื่อหลุดออกจากเปลือกของโกลดิเดียม คัดเอาสารละลายบัฟเฟอร์รวมทั้งเศษเนื้อเยื่อทิ้ง ตรวจสอบเปลือกของโกลดิเดียมที่ถูกล้างให้สะอาด แล้วนำตัวอย่างโกลดิเดียมไปเก็บแช่ในกลีเซอรอล นำมาศึกษาลักษณะทั่วไป เช่น รูปทรง ขนาด เนื้อเยื่ออ่อน เป็นต้น ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท ใช้กำลังขยาย 200 เท่า บันทึกภาพด้วยฟิล์ม Kodak panatomic-X



## 2.3 การเตรียมตัวอย่างโกลดิเดียมเพื่อศึกษาดัวยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ตัวอย่างโกลดิเดียมก่อนทำการศึกษาดัวย SEM นั้น จะต้องผ่านการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม เพื่อให้ตัวอย่างมีสภาพเหมือนธรรมชาติมากที่สุด และรักษาสีฐานวิทยาที่แท้จริงให้ได้สมบูรณ์ที่สุด เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยการวัดหรือการนับ จึงจะได้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำที่สุด

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมีดังนี้ :

ขั้นตอนที่ 1 คลองตัวอย่างครั้งแรก

ใช้ 3% paraformaldehyde ผสมกับ 2% glutaraldehyde ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1M sodium phosphate ไม่น้อยกว่า 4 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 ล้างตัวอย่าง

ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1M sodium phosphate 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

ขั้นตอนที่ 3 คลองตัวอย่างครั้งที่สอง

ใน 2% OsO<sub>4</sub> ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1M sodium phosphate 1 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 4 ล้างตัวอย่าง

ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1M sodium phosphate 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

ขั้นตอนที่ 5 เหนือออกจากตัวอย่าง

แช่ตัวอย่างในเอธานอลที่มีความเข้มข้นจาก 35%, 50%, 70%, 95%, 100%, 100% ตามลำดับ ๆ ละ 10 นาที จาก 35% - 95% เฉพาะใน 100% ใช้เวลา 15 นาที

ขั้นตอนที่ 6 ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ. จุดวิกฤต

เพื่อให้ตัวอย่างมีสีฐานวิทยาตามธรรมชาติ ไม่ยุบและเหี่ยวแห้ง โดยใช้เครื่องทำตัวอย่างให้แห้ง ณ. จุดวิกฤต (critical point dryer) และใช้ 100% เอธานอล หรือ 100 % อะซีโตน เป็นสารละลายตัวกลาง (intermediate fluid) ระหว่างสารละลายลดน้ำ (dehydrant) กับ สารละลายตัวเปลี่ยน (transitional fluid) คือ คาร์บอนไดออกไซด์เหลว ซึ่งเปลี่ยนจากสถานะของเหลวไปเป็นก๊าซ

ขั้นตอนที่ 7 ติดตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่แห้ง และ เลือกตัวอย่างที่มีโครงสร้างสมบูรณ์ที่สุดภายใต้กล้องจุลทรรศน์สแตอริโอ วางบนแท่นทองเหลืองนำไฟฟ้า (stub) ติดด้วยกาวนำไฟฟ้า (electro conductive paint) เช่น กาว silver หรือ carbon colloidal



### ขั้นตอนที่ 8 ฉาบผิวตัวอย่าง

นำแท่งที่วางตัวอย่างติดแล้ว ฉาบทองด้วยเครื่องทำโลหะให้เป็นไอออน (ion sputter) เมื่อตัวอย่างสามารถเป็นสื่อไฟฟ้าแล้ว จึงนำเข้าศึกษาในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดได้

### ขั้นตอนที่ 9 ตรวจสอบตัวอย่าง

การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จะใช้กำลังไฟฟ้า (accelerating voltage) ช่วง 10-20 KV บันทึกภาพด้วยฟิล์ม Kodak Verichrome pan VP-120

## 3. การวิเคราะห์ตัวอย่างที่ศึกษาในระดับอัลตราสตรัคเจอร์

จำแนกลักษณะโกลคิเดียม จากการตรวจสอบตัวอย่างโกลคิเดียมไม่ต่ำกว่า 10 ตัวต่อชนิด ในการนำมาวิเคราะห์อัลตราสตรัคเจอร์ของเปลือกโกลคิเดียม ได้แก่ ลักษณะรูปร่างเปลือก ขนาดเปลือก ผิวเปลือก และชั้นเปลือก ซึ่งใช้เป็นหลักสำคัญในการจำแนกชนิดหอยกาน้ำจืดครั้งนี้

**ลักษณะรูปร่างเปลือก** วิเคราะห์จากโครงสร้างของโกลคิเดียมในมิติ (dimension) ต่าง ๆ กัน ระบุเครื่องหมายวัดขนาดเป็นไมครอน ( $\mu\text{m}$ ) ดังรูปที่ 9 หน้า 23

**ขนาดเปลือก** วิเคราะห์จากความยาวและความสูงของโครงร่างเปลือก โดยใช้วิธีของ David & Full (1981) เป็นหลักในการวัดขนาดของโกลคิเดียม โดยคำนวณได้จาก Glochidial Index (Gln) = ความยาว X ความสูง ของเปลือกโกลคิเดียม ใช้หน่วยเป็นมิลลิเมตร

ถ้า	Gln	<	0.0036	จัดว่ามีขนาดเล็ก
	Gln	-	0.047	จัดว่ามีขนาดกลาง
	Gln	-	0.1000	จัดว่ามีขนาดใหญ่

ความยาวของเปลือกโกลคิเดียม หมายถึง ระยะกว้างที่สุดระหว่างขอบด้านหน้า และด้านท้าย หรือเป็นด้านที่ขนานกับแนวบานพับ

ความสูงของเปลือกโกลคิเดียม หมายถึง ระยะตั้งฉากซึ่งวัดจากจุดสูงที่สุดของบานพับมายังขอบเปลือกด้านล่าง

การศึกษาครั้งนี้การวัดขนาดเปลือกใช้หน่วยวัดเป็น ไมครอน ( $\mu\text{m}$ ) แล้วนำเสนอเป็น ค่าเฉลี่ย (mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD ; n=10) ของโกลคิเดียมแต่ละชนิด ส่วนค่า Glochidial Index (Gln) คำนวณจากหน่วยมิลลิเมตร

ผิวเปลือก แสดงตำแหน่ง ขนาด และรูปแบบของโครงสร้างบนผิวเปลือกที่มีขนาดเล็กมาก เช่น รูพรุน หลุม หนาม เป็นต้น ซึ่งเป็นโครงสร้างเฉพาะตัวของโกลคิเดียมแต่ละชนิด จากภาพที่มีกำลังขยายสูงมาก ( ประมาณ 7,500 X - 15,000 X )

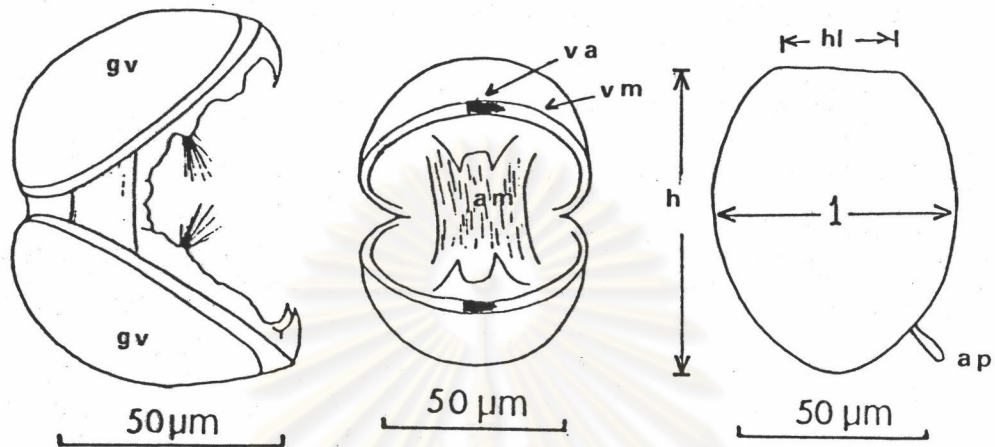
ชั้นเปลือก ศึกษาโครงสร้างของชั้นเปลือกนอก (external shell layer, E) และชั้นเปลือกใน (internal layer, I)

#### 4. บรรยายลักษณะอัลตราสตรักเจอร์ของเปลือกโกลคิเดียมหอยกาบน้ำจืดแต่ละชนิด

5. จัดทำกุญแจ (key) จำแนกหอยกาบน้ำจืดโดยวิเคราะห์จากลักษณะอัลตราสตรักเจอร์ของเปลือกโกลคิเดียมเป็นหลักการจำแนก

นำโกลคิเดียมที่มีโครงร่างของเปลือกที่มีลักษณะเดียวกัน มาจัดไว้ในกลุ่มเดียวกันแล้ว ตรวจสอบความแตกต่างภายในกลุ่ม โดยการวิเคราะห์จากขนาดเปลือกและผิวเปลือก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ด้านข้าง

ด้านล่าง

โครงร่างของเปลือก

(lateral view)

(ventral view)

(outline of the shell valves)

รูปที่ 9 แสดงภาพวาดลักษณะรูปร่างเปลือกของโกลดิเดียมในมิติต่าง ๆ กัน

am = กล้ามเนื้อยึดฝา (adductor muscle)

ap = คีบ (appendage)

gv = เปลือกของโกลดิเดียม (glochidial valve)

h = ความสูง (height)

hl = แนวบานพับ (hinge line)

l = ความยาว (length)

va = ปลายยอดหรือบริเวณตรงกลางของขอบเปลือกด้านล่าง  
(ventral apex of shell valve)

vm = ขอบเปลือก (valve margin)