

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

อุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง

ปลาหัวตะกั่วที่ใช้ในการทดลองเป็นปลาน้ำจืด อยู่ใน Class Pisces, Subclass Teleostomi, Order Cyprinodontes, Family Cyprinodontidae Genus *Oryzias* Jordan and Snyder มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oryzias minutillus* (Smith, 1945) พบพันธุ์และแม่พันธุ์นำมาจากอำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ นำมาเลี้ยงไว้ในห้องทดลอง แผนกชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และปล่อยให้ปลาผสมพันธุ์กัน

ลักษณะสำคัญของปลาหัวตะกั่วซึ่งรายงานไว้โดย Smith (1945) คือลำตัวแบนคานข้าง บริเวณหัวและส่วนหน้าของคานหลังแบนลง (แผนภาพที่ 1) ลำตัวโปร่งใส เยื่อของท้องมีสีน้ำตาลอมเหลืองเห็นทะลุผนังลำตัวออกมา คานหลังมีจุดสีดำเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป แต่จะพบมีมากที่สุดบริเวณกลางหลังเห็นเป็นแถบจากหัวจรดครีบทหาง มีเส้นตรงสีดำเริ่มจากบริเวณคานหน้าของลำตัวคอนขึ้นไปทางคานบน (dorsal side) พาดไปตามคานข้างของลำตัวยาวไปจรดครีบทหาง จากโคนครีบทองมีเส้นสีดำทอดยาวไปจรดปลายสุดของฐานครีบทอง ตัวโตเต็มวัยมีความยาวประมาณ 1.7 ซม. ตัวผู้มีลำตัวยาวและเรียวกว่าตัวเมีย ในระยะวางไข่ส่วนท้องของปลาตัวเมียจะนูนเบ่งกว่าปกติ เมื่อไข่อยู่ในระยะโตเต็มที่ จะเห็นคอกอยู่ที่ส่วนท้องของแม่ชัดเจน

ปลาหัวตะกั่วเป็นปลาน้ำจืดอาศัยอยู่ในแม่น้ำ ลำคลอง ในประเทศไทยพบได้ทั่วไปในภาคกลาง สามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้ตลอดปี โดยมีการผสมพันธุ์แบบภายใน (internal fertilization) ไข่เป็นแบบไข่ติด (eggs attached to vegetation) แม่ปลาวางไข่ติดกับพื้นน้ำ เช่น สาหร่าย ไข่ซึ่งถูกผสมแล้วมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.020

- 1.054 มม. ตัวอ่อนที่ออกจากไข่ภายใน 8 - 11 วัน ลูกปลาที่ฟักออกเป็นตัวใหม่ ๆ มีความยาวประมาณ 3.06 มม. และว่ายน้ำมาอยู่บนผิวน้ำ อาหารในระยะแรกของลูกปลา คือ ตะไคร่น้ำ ลูกปลาเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 25 - 27 °c ในที่ ๆ มีแสงสว่าง และจะเจริญเติบโตเป็นตัวโตเต็มวัยภายในเวลาประมาณ 45 วัน อาหารของลูกปลาที่โตแล้วคือ ไรน้ำ (Daphnia)

2. วัสดุที่ใช้เลี้ยงปลา

- 2.1 ตู้ปลาขนาด 12 x 20 x 12 นิ้ว จำนวน 8 ตู้
- 2.2 เครื่องปั๊มอากาศ (air pump)
- 2.3 สวิงเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 นิ้ว และ 2.5 นิ้ว
- 2.4 อาหารปลา ไคแก ไรน้ำ (Daphnia)
- 2.5 พืชน้ำสำหรับ ใส่ ในตู้ปลา ไคแก สาหร่ายพวงกะโหลก (*Ceratophyllum demersum*)

3. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

- 3.1 ตู้พลาสติกใส ขนาด 8 x 12 x 6 นิ้ว จำนวน 2 ตู้
- 3.2 ตู้พลาสติกใส ขนาด 1.5 x 9 x 6 นิ้ว จำนวน 3 ตู้
- 3.3 ตู้พลาสติกใส ขนาด 6 x 40 x 7 นิ้ว จำนวน 1 ตู้
- 3.4 เทอร์โมมิเตอร์
- 3.5 กระจกเงาขนาด 3 x 7 นิ้ว 1 แผ่น
- 3.6 ปลาเข็ม (*Hemirhamphus* sp.)
- 3.7 หนูนูปลา และหนูนูปกตามอย่างละ 1 อัน
- 3.8 นาฬิกาจับเวลา
- 3.9 เวอร์เนีย
- 3.10 กลองถายรูป
- 3.11 กลองถายรูปที่ใช้กับกล้องจุลทรรศน์

- 3.12 กลองจุดทัศน
- 3.13 Microtome
- 3.14 Decalcifier
- 3.15 pH - meter
- 3.16 สไลด์ และกระจกปิดสไลด์

4. สารเคมี

- 4.1 Bouin fixative
- 4.2 Haematoxylin
- 4.3 Eosin

วิธีดำเนินงาน

1. การเพาะพันธุ์ปลา

ใส่สาหร่ายพวงกะโศ (Ceratophyllum demersum) ในตู้เลี้ยงปลา เพื่อให้แม่ปลาวางไข่ หลังจากไข่ถูกผสมแล้วจะฟักเป็นตัวประมาณ 8 - 11 วัน จากนั้นแยกลูกปลามาเลี้ยงในคชขนาด 12x 20x 12 นิ้ว ที่มีระดับสูง 10 นิ้ว คุ้ละ 100 คุ้ คุ้ หมึน้ำในตู้ปลาประมาณ 25 - 27 องศาเซนติเกรด pH ประมาณ 7 - 8 ปลาได้รับแสงสว่างจากหลอดไฟที่อยูเหนือคชปลาประมาณ 2 เมตร วันละ 10 ช.ม. และแต่ละคชได้รักษาออกซิเจนตลอดเวลาจากเครื่องปั้มอากาศ อาหารที่ใส่เลี้ยงคือ ไรน้ำ เลี้ยงวันละ 1 ครั้ง เวลาเช้าประมาณ 8.00 - 9.00 น. เปลี่ยนน้ำในตู้ปลาทุก ๆ สัปดาห์ ๆ ละครั้งควยน้ำประปาที่ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 วัน

2. วิธีวัดความยาวมาตรฐาน (Standard Length) ของปลาทดลอง

วางปลาดลงบนฟองน้ำเปียก ไซ เวอร์เนียร์วัดความยาวจากปลายจมูกถึงรอยคอคของหาง จากนั้นแยกปลาขนาดต่าง ๆ ไ้คนละคช การวัดความยาวมาตรฐานของปลาเหล่านี้กระทำ 1 ช.ม. ก่อนการทดลองทุกครั้ง และเมื่อเริ่มการทดลองก็จะสุ่มปลาขนาดต่าง ๆ ที่วัดไว้แล้วจากคชมาทดลอง

3. การศึกษา แยกออกเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

1. หาความยาวมาตรฐาน (standard length) ของปลาหัวตะกั่วที่ เริ่มรวมกันเป็นฝูง

จากการสังเกตในหองปฏิบัติการพบว่าปลาที่มีความยาวน้อยกว่า 6.0 มม. ยังไม่รวมกันเป็นฝูง ฉะนั้นการทดสอบจึงใช้ปลาขนาดต่าง ๆ ตั้งแต่ 6.0 - 15.9 มม. ขนาดละ 30 ตัว

เครื่องมือที่ใช้ทดลอง คัดแปลงมาจาก Shaw (1960) Shaw ใช้อ่างแก้วกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 นิ้ว มีหลอดแก้วยาว 6 x เส้นผ่าศูนย์กลาง $\frac{3}{8}$ นิ้ว สำหรับใส่สิ่งเรา ลอยอยู่ในอ่างแก้ว

การทดลองนี้ใช้พลาสติกใสขนาดใหญ่ 8 x 12 x 6 นิ้ว ที่มีพลาสติกใสขนาดเล็ก 1.5 x 9 x 6 นิ้ว ใส่สิ่งเรา วางอยู่กลางตู้ใหญ่ ใส่ในตู้ทั้งสองใหม่ระดับสูงเท่ากัน ประมาณ 3.5 นิ้ว (แผนภาพที่ 3)

วิธีทดลอง สุ่มปลาหัวตะกั่วจากตู้เลี้ยง ปลอยปลานี้ลงในตู้พลาสติกใสขนาดใหญ่ที่มีตู้เล็ก (ตู้ control) วางอยู่กลางตู้ใหญ่ตั้งกวางแล้ว เริ่มสังเกตและบันทึกผลหลังจากใส่ปลาลงในตู้ใหญ่นาน 10 นาที โดยบันทึกจำนวนครั้งที่ปลาวายเข้าใกล้และ/หรือว่ายชนกับตู้ control ในช่วงระยะเวลา 10 นาที จากนั้นชอนปลาทดลองออก เปลี่ยนตู้ control เป็นตู้ทดลองที่มีปลาหัวตะกั่วขนาดเท่ากับปลาที่จะทดสอบ (ซึ่งคือปลาตัวเดิม) พัก 10 นาที แล้วจึงปลอยปลาทดลองลงในตู้ใหญ่ เริ่มบันทึกผลเช่นเดียวกับที่ทำกับตู้ control การทดลองนี้ทำซ้ำกัน 30 ครั้ง

2. ทดลอง เพื่อศึกษาปัจจัยบางประการที่ก่อให้เกิดการรวมฝูงของปลา หัวตะกั่ว

2.1 การมองเห็น

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ปลาที่ใช้ศึกษา

ขนาด 6.0 - 15.9 มม. กลุ่มละ 30 ตัว และในแต่ละการทดลองย่อยใช้ปลากลุ่มเดิมทดสอบสิ่งเราทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองนี้บรรจุไว้ในตู้ทดลองเล็ก

2.1.1 ทดสอบการตอบสนองของปลาหัวตะกั่วที่มีต่อสิ่งเราที่เคลื่อนไหวได้

แบ่งสิ่งเราออกเป็น

- ก. เพื่อนร่วม species (ปลาหัวตะกั่วจำนวน 5 ตัว มีขนาดเท่ากับปลาที่จะทดสอบ)
- ข. ภาพตัวเองจากกระจกเงา (ซึ่งวางพิงด้านในของตู้ทดลอง)
- ค. เพื่อนต่าง species (ปลาเข็มจำนวน 5 ตัว มีขนาดเท่ากับปลาที่จะทดสอบ)

วิธีทดลอง นำปลาหัวตะกั่วที่ผ่านการทดสอบและวัดความยาวมาตรฐานแล้ว มาทำการทดลอง เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบจำนวนตัวและจำนวนครั้งที่ปลารายเขาโกลและว่ายน้ำชานกับสิ่งเรา ทั้ง 3 ชนิด กับ control

2.1.2 ทดสอบการตอบสนองของปลาหัวตะกั่วที่มีต่อสิ่งเราซึ่งไม่เคลื่อนไหว

แบ่งสิ่งเราออกเป็น

- ก. หนูปลาสติกรูปปลาขนาด 10 มม.
- ข. หนูปลาสติกรูปกลมขนาด 10 มม.

วิธีทดลอง ใช้ค้ายผูกหนูปปลา หย่อนลงกลางตู้ทดลองเล็ก ในหอยต่ำกว่าระดับน้ำ 1 นิ้ว หนูน้อยกับที่ไม่เคลื่อนไหว (แผนภาพที่ 3) ใช้ปลากลุ่มเดิมกับที่ทำการทดลองใน 2.1.1 ทดสอบ เริ่มสังเกตและบันทึกผลหลังจากใส่ปลาลงในตู้ใหญ่นาน 10 นาที ใช้เวลาสังเกตนาน 10 นาที จากนั้นเปลี่ยนหนูปปลาเป็นหนูปกลม สังเกตและบันทึกผลแต่ละครั้งควยวิธีการเกี่ยวกับที่ทำใน 2.1.1 แลวนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกลม control

2.2 การโคกดิน

ทดสอบปลาขนาด 6.0 - 15.9 มม. ขนาดละ 10 ตัว

เครื่องมือที่ใช้ทดลอง คัดแปลงมาจาก Hemmings (1966)

คัท Hemmings ใช้ฉีดน้ำใหม่ทางหน้าเขาคาง 2 ด้านของคัททดลองขนาด 180 x 28 ซม. และมีทางน้ำออกตรงกลางคัททดลอง แต่ในการทดลองนี้ฉีดน้ำใหม่ทางหน้าเขาคางด้านหนึ่งของคัททดลอง ขนาด 15 x 100 x 18 ซม. และอีกด้านหนึ่งเป็นทางน้ำออก (แผนภาพที่ 4) เพื่อรักษาระดับน้ำในตู้ทดลองที่ตลอดการทดลอง พื้นคัททดลองทำเป็นตารางสี่เหลี่ยมขนาด 5 x 5 ตร. ซม. จำนวน 3 แถว ๆ ละ 20 ช่อง หุ้มคัททดลองด้วยกระดาษดำเพื่อป้องกันมิให้ปลาเห็นเงาตัวเอง

วิธีทดลอง เตรียมคัททดลอง 2 คัท คือ คัทขนาดเล็กขนาด 15 x 25 x 15 ซม. คัททดลองขนาดใหญ่ขนาด 15 x 100 x 18 ซม. ซึ่งคัททั้งสองบรรจุน้ำประปาถึงไว้อย่างน้อย 2 วันก่อนการทดลอง สูง 15 และ 12 ซม. ตามลำดับ ปล่อยปลาทดลองซึ่งวัดความยาวมาตรฐานแล้วครั้งละ 1 ตัว ลงในบริเวณกลางคัททดลองใหญ่ หลังจากนั้น 10 นาที เปิดให้น้ำจากคัททดลองเล็ก (คัท control) ไหลลงสู่ใหญ่ ในอัตราเร็ว 70 cc/นาที บันทึกตำแหน่งของปลาหลังจากเปิดน้ำ 2 นาที ทุก ๆ 10 วินาที เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นชอนปลาออก พัก 30 นาที เปลี่ยนคัท control เป็นคัทซึ่งมีน้ำที่มีปลาชนิดเดียวกันและขนาดเท่ากับกับปลาที่นำมาทดสอบ จำนวน 10 ตัว ซึ่งถูกขังไว้ในคัทนาน 1 ชม. ก่อนจะนำมาทดลอง และเปลี่ยนน้ำในคัททดลองใหญ่ทั้งหมดก่อนจะดำเนินการทดลองต่อไป วิธีดำเนินการและบันทึกผลในชวงนี้ ใช้วิธีการเดียวกันกับที่ใช้กับคัท control และใช้ปลาตัวเดิมทดสอบ

3. ศึกษาแบบแผนการ เข้าใกล้และการวางตัวของปลาหัวตะกั่วก่อนที่จะรวมกันเป็นฝูง

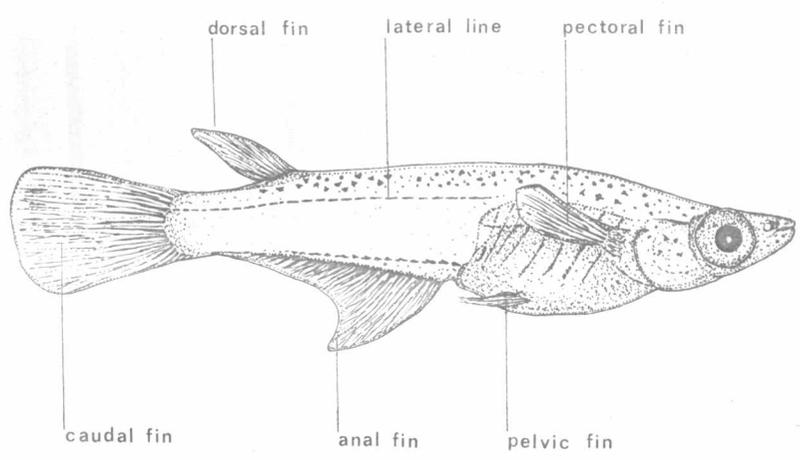
ทดสอบกับปลาหัวตะกั่วความยาวต่าง ๆ ตั้งแต่ 6.0 - 15.9 มม.

โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มทำการทดสอบ 30 ครั้ง

วิธีทดสอบ จากการสังเกตในห้องปฏิบัติการ พบว่าปลาเริ่มรวมกันเป็นฝูง เมื่อมีความยาวประมาณ 6.0 มม. ขึ้นไป ถ้านับรวมกันในธรรมชาติ ดังเห็นในการทดลองนี้จึงเลือกปลาขนาดที่เริ่มรวมฝูงแล้วมาทดลอง โดยนำปลาขนาดเดียวกัน จำนวน 3 ตัว ใส่ในคพลาสติกลึบ ขนาด 8x12x6 นิ้ว มีน้ำบรรจุสูง 4 นิ้ว ตทดลองนี้หมิวคอยกระซิบคำเพื่อป้องกันมิให้ปลาเห็นเงาตัวเอง เริ่มสังเกตผลหลังจากใส่ปลาลงในคทดลองนาน 10 นาที บันทึกผลว่าปลาแสดงท่าทางอย่างไรก่อนที่จะว่ายชนกันและรวมกันเป็นฝูง (แผนภาพที่ 5,6,7) จากผลที่ได้จึงนำมาประมวลเป็นแบบแผนในการเคลื่อนที่ของปลาหัวตะกั่ว โดยใช้หลักการทางสถิติเป็นบรรทัดฐานในการจัดขั้นตอนของพฤติกรรมเหล่านี้ และคำที่ใช้อธิบายแบบแผนต่าง ๆ คัดแปลงมาจาก Shaw (1960)

4. การศึกษาเกี่ยวกับ Histology

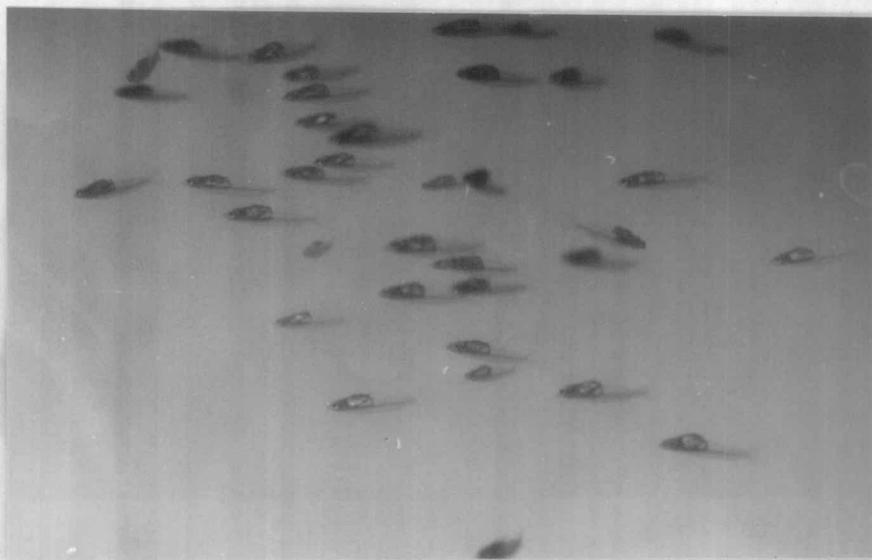
วิธีการศึกษา นำปลาหัวตะกั่วที่ได้ทำการทดสอบเกี่ยวกับการมองเห็น ขนาดตั้งแต่ 6.0 - 15.9 มม. ขนาดละ 3 ตัว มา fix ด้วย Bouin fixative ปลาขนาด 10 มม. ขึ้นไป นำมา decalcified เสียก่อน หลังจากนั้นจึงนำมาตัด serial section หนา 8 ไมครอนด้วย microtome ย้อมด้วยสี Haematoxylin และ Eosin ตรวจ, ศึกษา และถ่ายรูปปลั๊กขณะนัยน์ตาภายใต้กล้องจุลทรรศน์



แผนภาพที่ 1

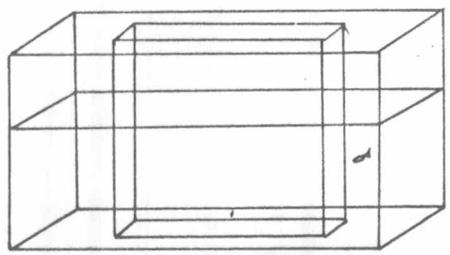
แสดงลักษณะปลาหัวตะกั่ว

000693

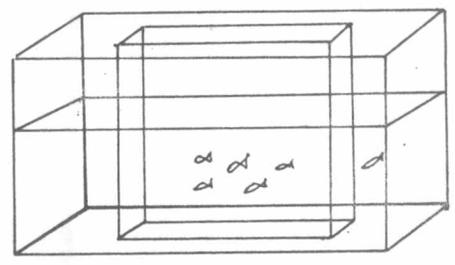


แผนภาพที่ 2

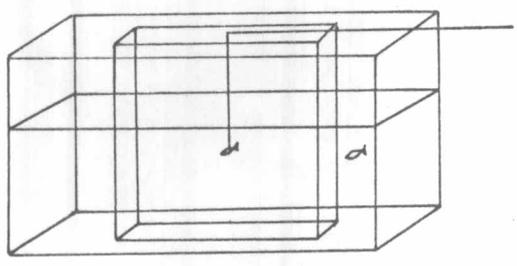
แสดงลักษณะการรวมฝูงของปลาหัวตะกั่ว



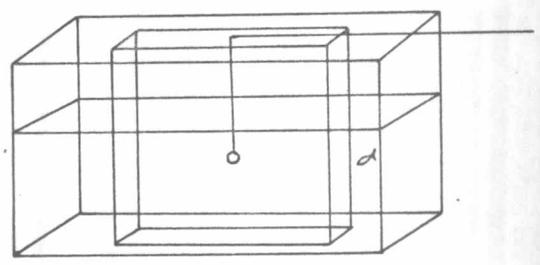
ก



ข



ค

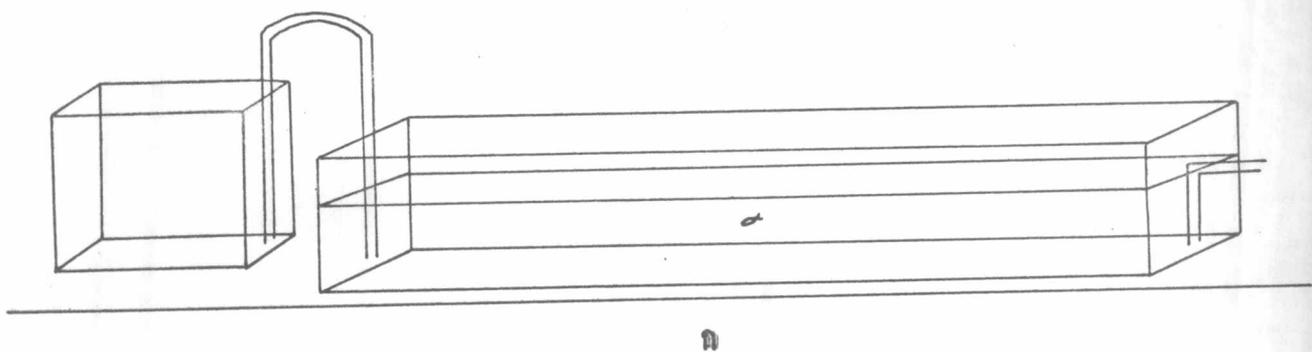


ง

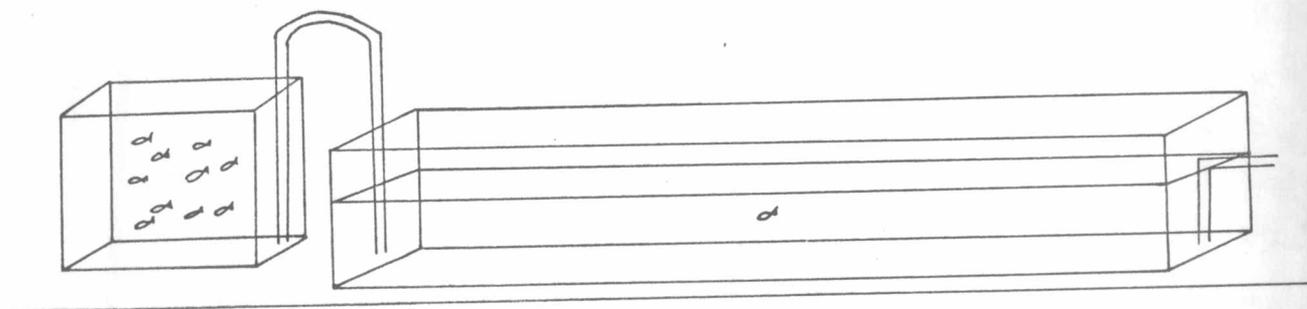
แผนภาพที่ 3

แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบที่ 1,2.1.1 และ 2.1.2

- ก. ทุ control
- ข. ทุทดสอบมีปลาอยู่แล้ว
- ค. ทุทดสอบมีทุรูปปลา
- ง. ทุทดสอบมีทุรูปกลม



ก



ข

แผนภาพที่ 4

แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองที่ 2.2

ก. ตู้ control

ข. ตู้ทดลองที่มีปลาหมึกเดียวกันอยู่