

ผลการทดลอง

1. การศึกษาเบื้องต้น

1.1 การทดลองวิธีการหาปริมาณสาร ไคฟลูเบนซูรอน

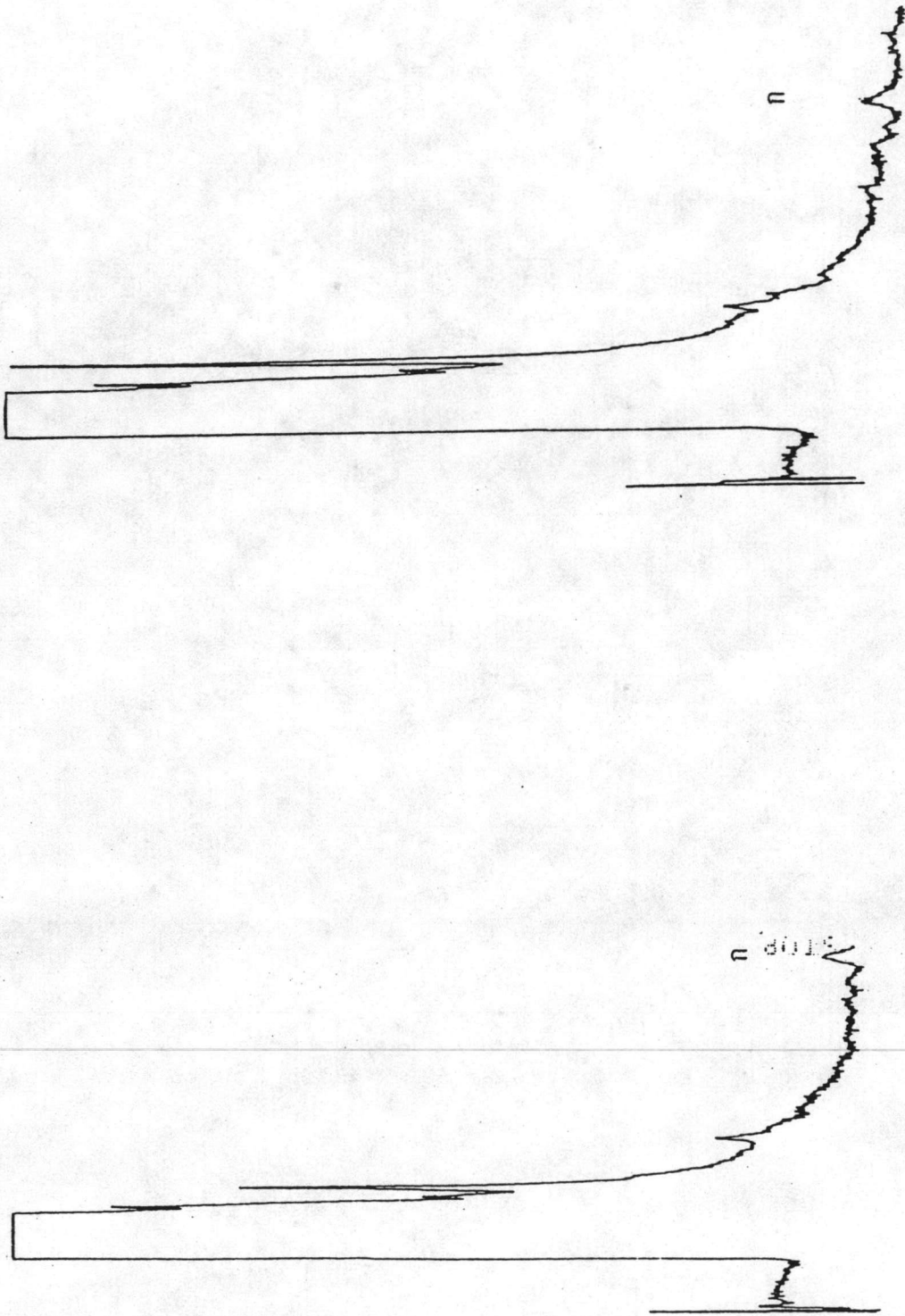
1.1.1 การหาปริมาณสารไคฟลูเบนซูรอน โดยผสมสารไคฟลูเบนซูรอนให้ได้ระดับความเข้มข้น 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับการทดลองผลของสารไคฟลูเบนซูรอนต่อการลอกคราบของกุ้งแช่บ๊วยแช่อ่อน นำมาหาปริมาณสารไคฟลูเบนซูรอนตามวิธีของ Nimmo et al. (1979) พบว่าโครมาโตแกรมของสารไคฟลูเบนซูรอนที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้นไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 3, 4, 5, 6 และ 7)

1.1.2 การตรวจหาระดับความเข้มข้นของสารไคฟลูเบนซูรอนที่เครื่อง HPLC ที่มี UV - absorption detector สามารถวัดหาปริมาณได้ โดยฉีดสารต่าง ๆ ดังต่อไปนี้สารละ 3 ครั้ง ๆ ละ 10 ไมโครลิตร

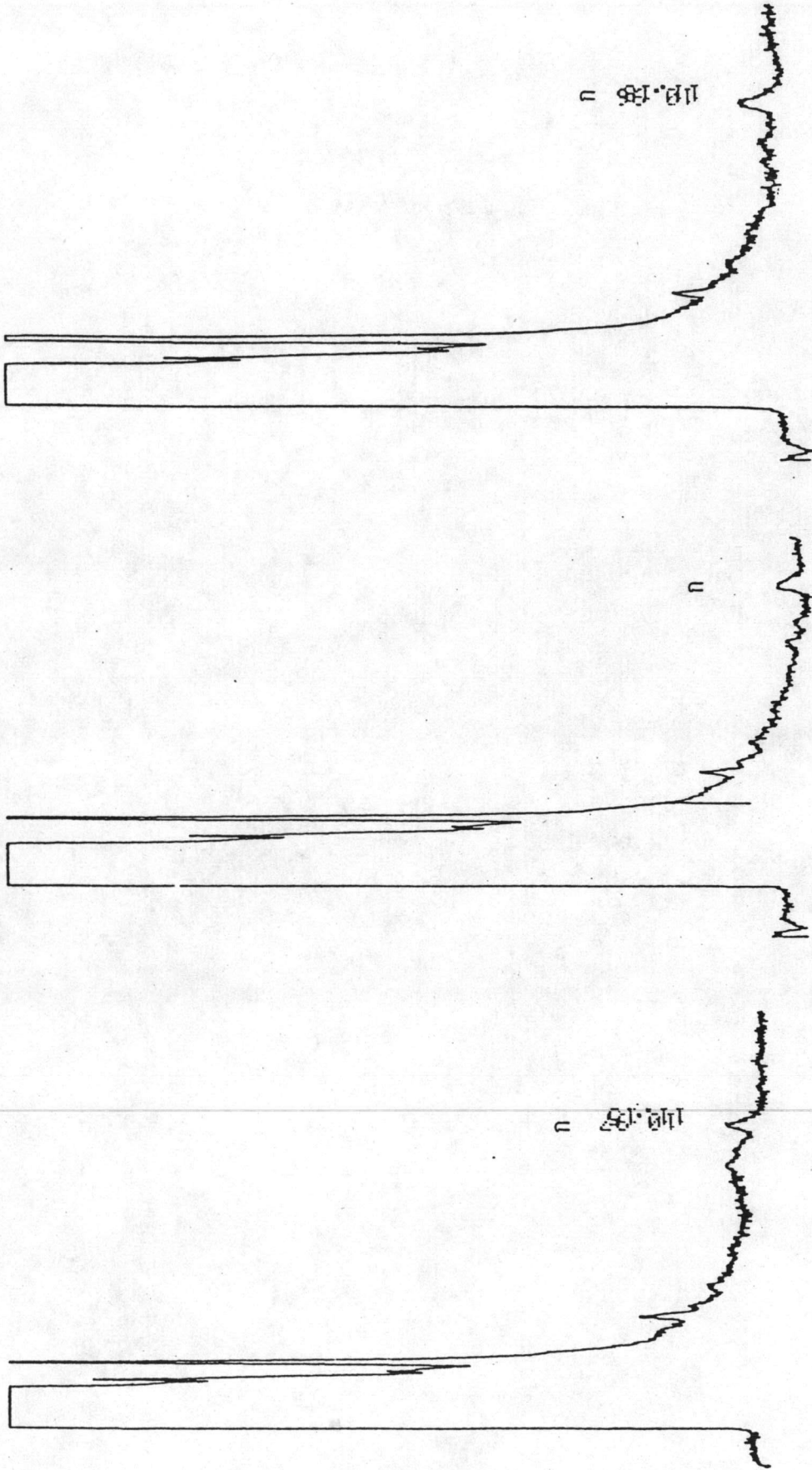
ก. สารที่ใช้เป็น mobile phase (iso-octane ที่มี 2-propanol 10 เปอร์เซ็นต์) จะได้โครมาโตแกรม (chromatogram) มีลักษณะเป็นเส้นราบ (รูปที่ 8)

ข. สารที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารไคฟลูเบนซูรอนในการตรวจหาระดับความเข้มข้นครั้งนี้คือ diethyl ether : petroleum ether ในอัตราส่วน 1 : 1 ปรากฏว่า diethyl ether และ petroleum ether มีโครมาโตแกรมดังแสดงตามรูป 9 และ 10 ตามลำดับ เมื่อสารทั้งสองตัวมารวมกันในสัดส่วน 1 : 1 จะได้โครมาโตแกรม ตามรูปที่ 11

ค. สารไคฟลูเบนซูรอนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เครื่อง HPLC ที่มี UV absorption detector ไม่สามารถวัดหาปริมาณได้ดังแสดงจากโครมาโตแกรมทั้ง 3 รูปที่อยู่ในลักษณะเป็นเส้นแนวราบ (รูป 12) ส่วนของพีก (peak) A ที่ปรากฏอยู่นั้นเป็นโครมาโตแกรมของตัวทำละลายดังกล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามจากรูปที่ 12 ข. เริ่มมีพีก B เริ่มปรากฏขึ้นมาจากเส้นฐานที่เวลา 7.72 นาที หลังจากฉีดสารไคฟลูเบนซูรอน และโครมาโตแกรมที่ตรงช่วงเวลานี้แสดงความชัดเจนมากขึ้น



รูปที่ 3 และ 4 โคโรมาโตแกรมของสารไดคลูเบนทรอน (ก) ที่ระดับความเข้มข้น ๑.๓ และ ๑.๕ ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ

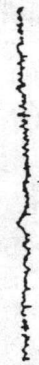


รูปที่ 5, 6, และ 7 โคโรมาโตแกรมของสารไดฟลูออโรน (ก) ที่ระดับความเข้มข้น 0.7, 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ

รูปที่ 5, 6, และ 7



ก

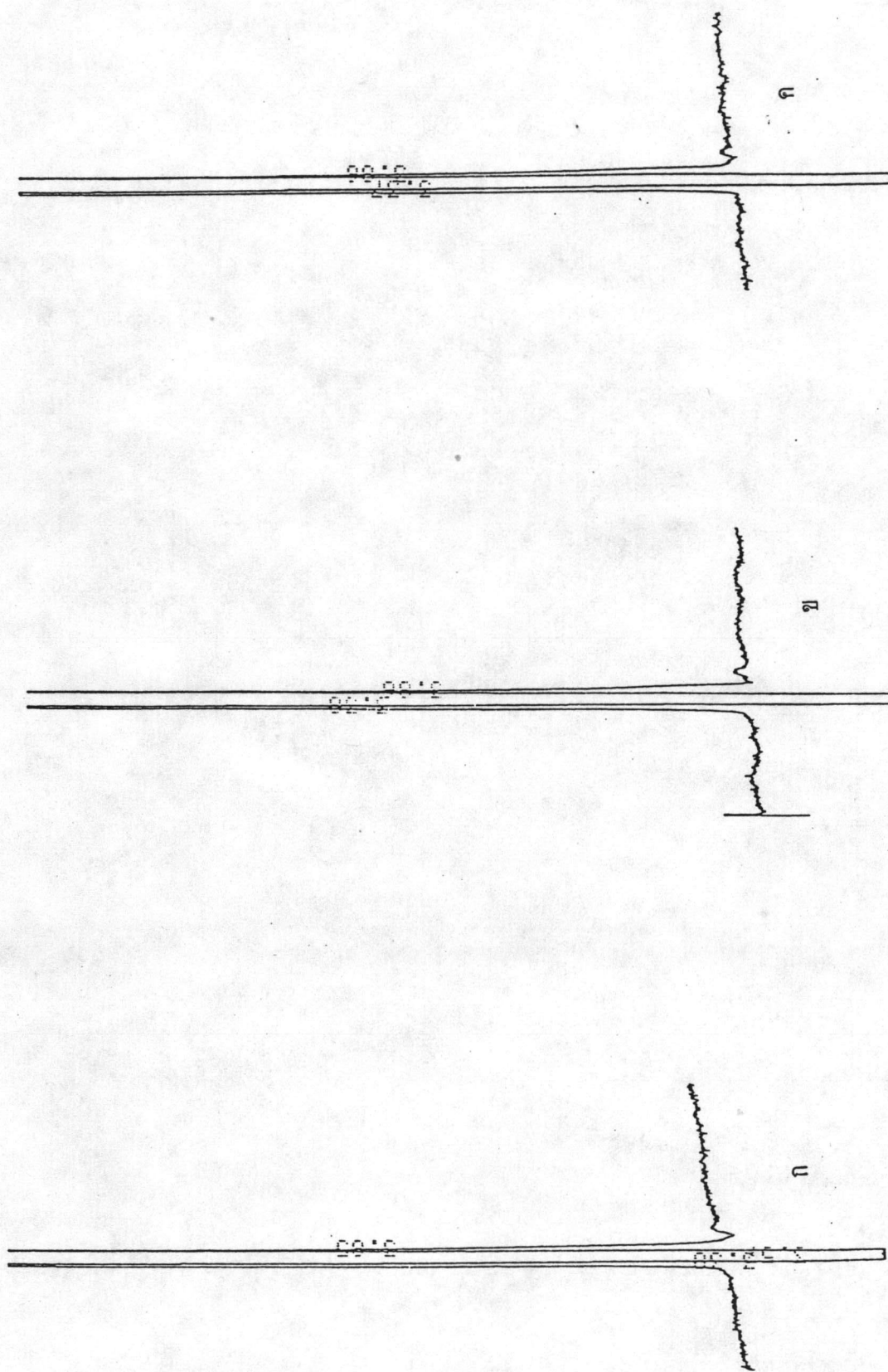


ข

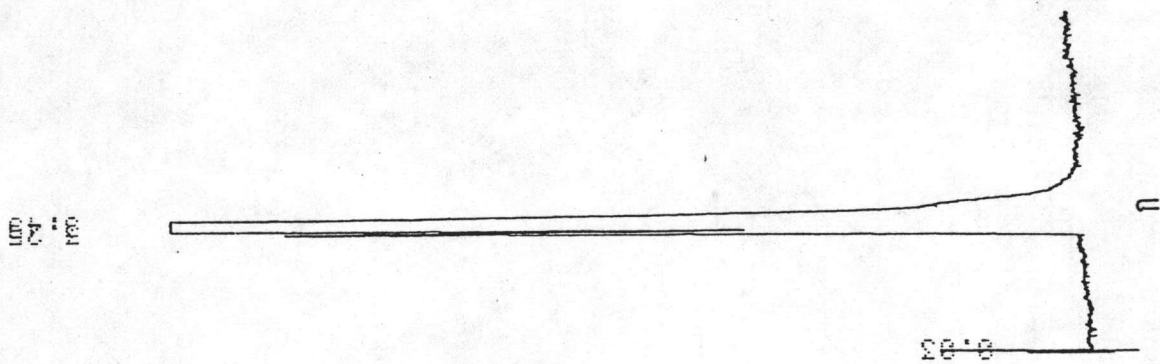
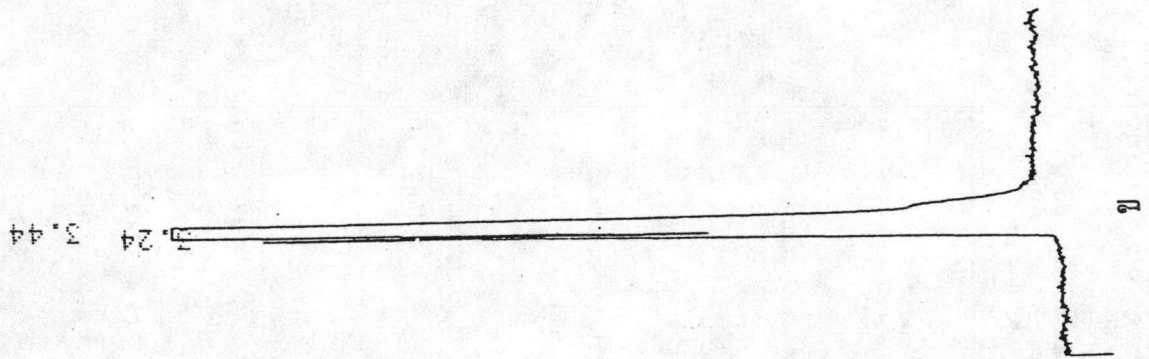
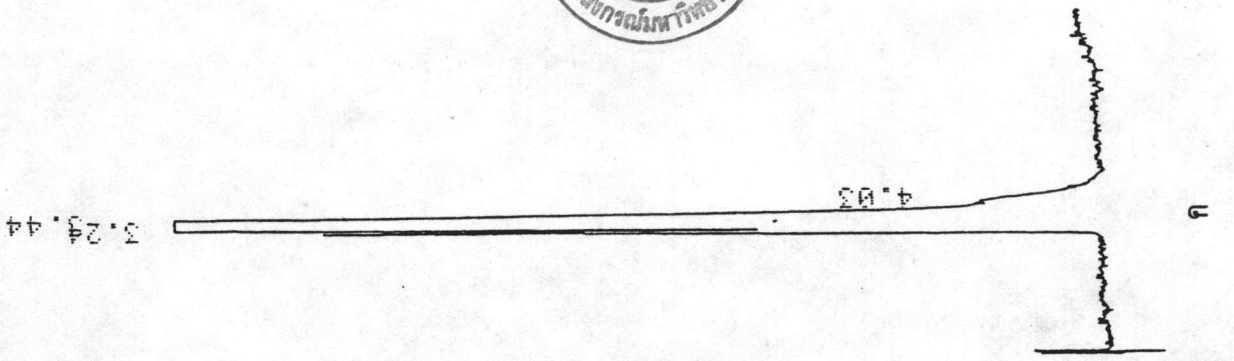


ค

รูปที่ 8 โครมาโตแกรมของ mobile phase (iso-octane ที่มี 2-propanol 10 เปอร์เซ็นต์)
 3 ครั้ง (ก, ข และ ค)

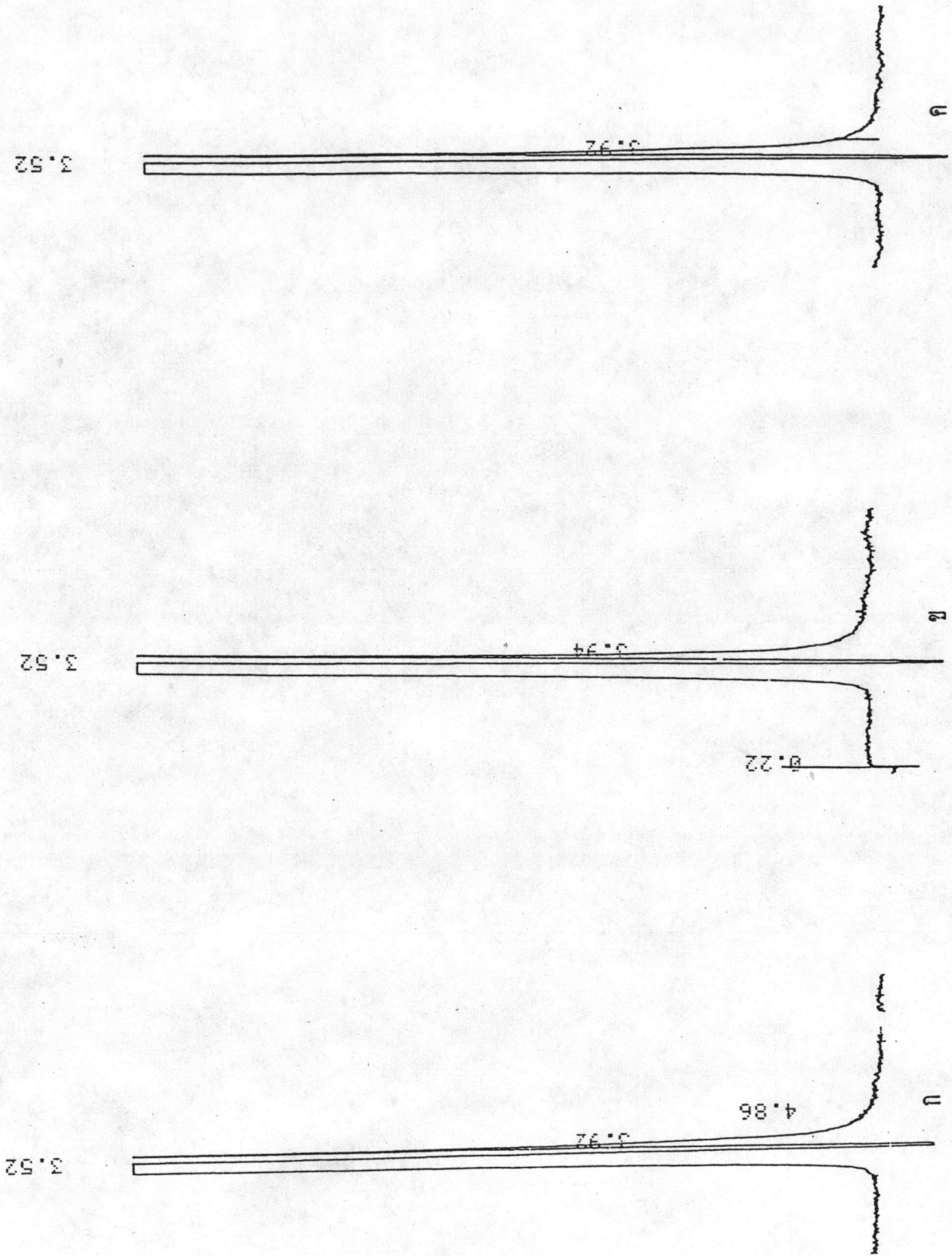


รูปที่ 9 โคอมาโตแกรมของ diethyl ether 3 ครั้ง (ก, ข และ ค)

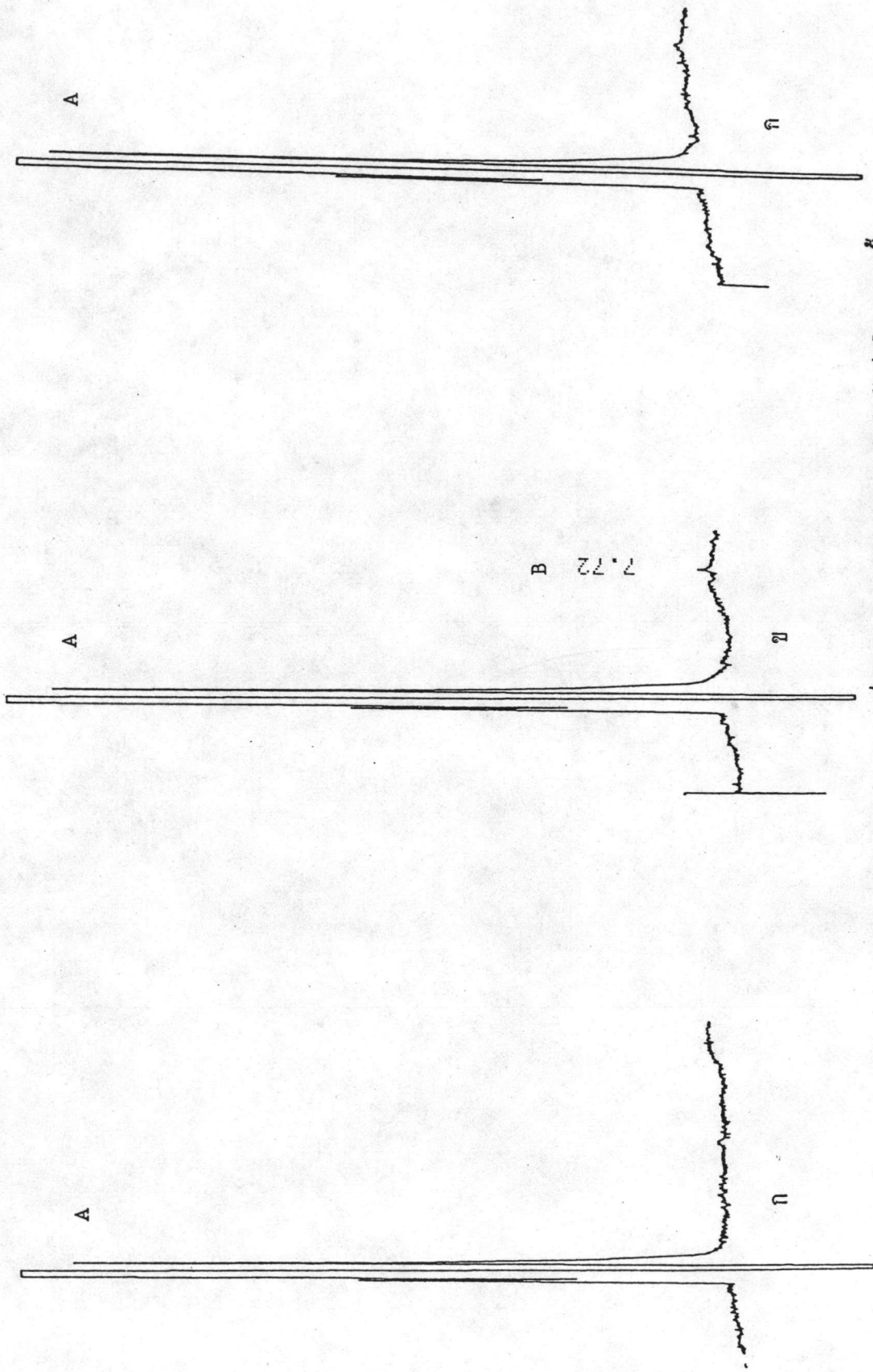


รูปที่ 10 โคโรมาโตแกรมของ petroleum ether 3 ครั้ง (ก, ข และ ค)

๓ : ๓๓



รูปที่ 11 โคโมมิโตแกรมของ diethyl ether : petroleum ether (1 : 1) 3 ครั้ง (ก, ข และ ค)

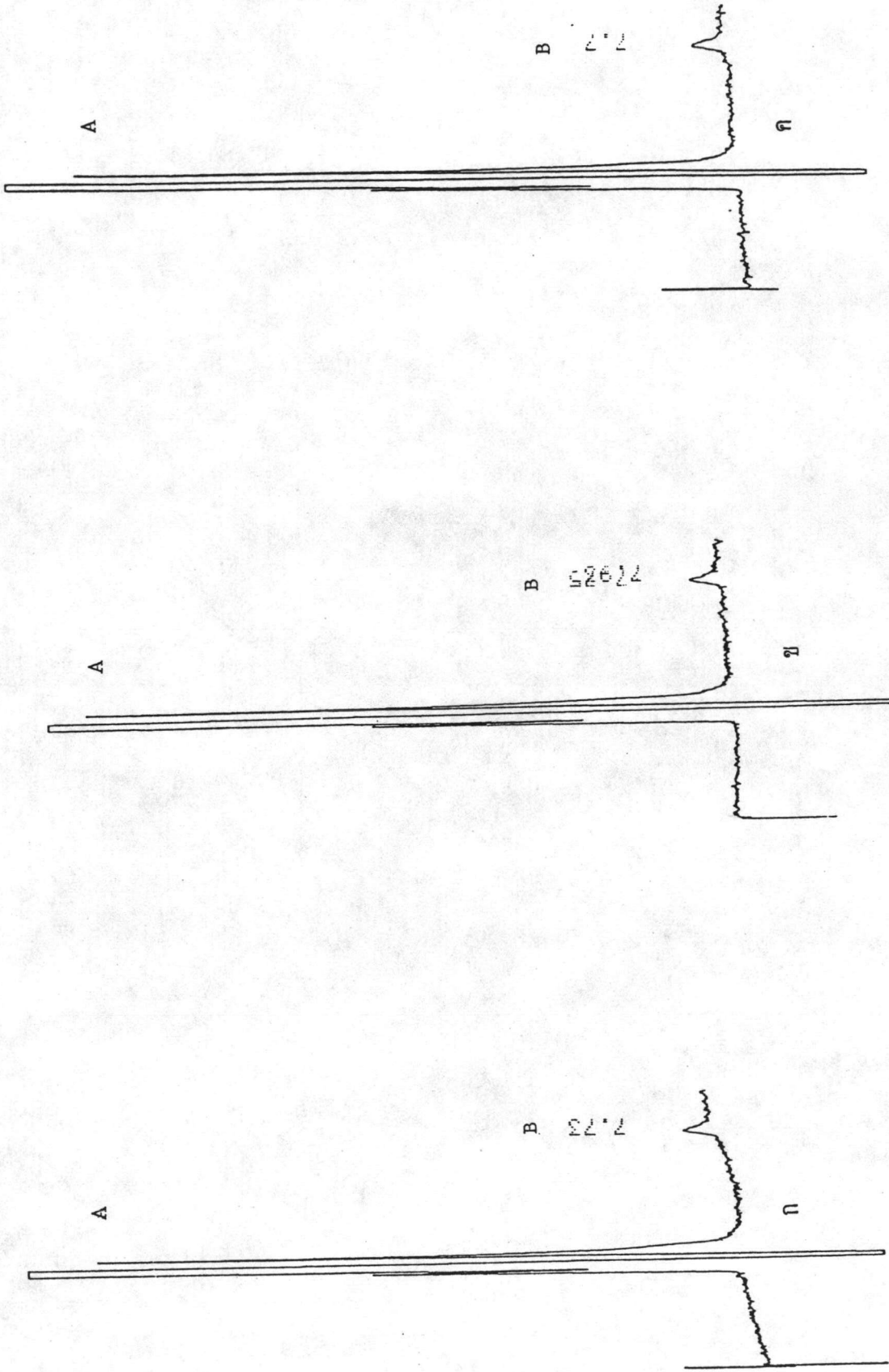


รูปที่ 12 โคโรมาโตแกรมของสารไดลูปเนซอร์นที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 ครั้ง

(ก, ข และ ค)

A เป็นโคโรมาโตแกรมของ diethyl ether : petroleum ether (1 : 1),

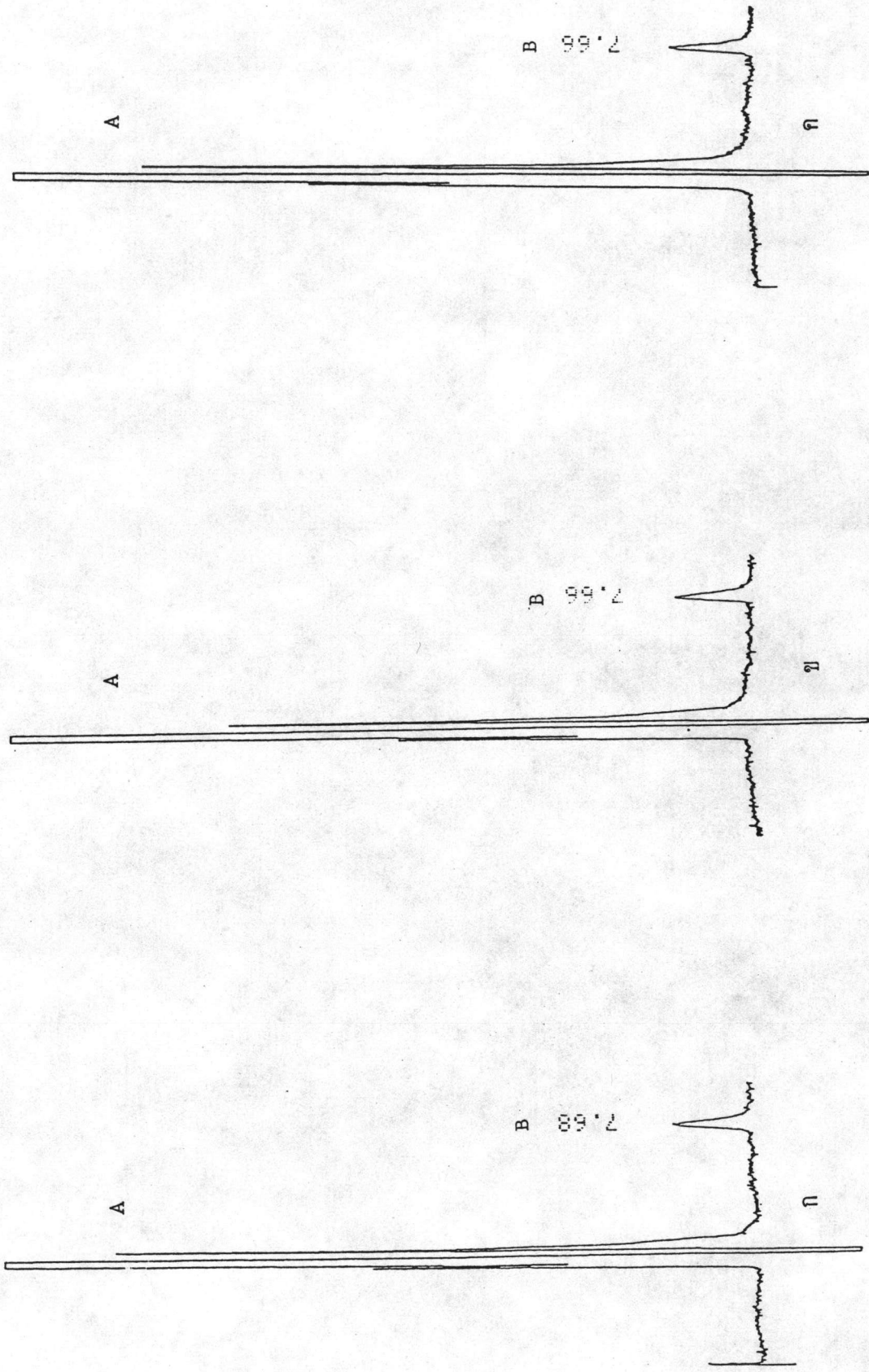
B เป็นโคโรมาโตแกรมของสารไดลูปเนซอร์น



รูปที่ 13 โคโรมาโตแกรมของสารไดโพลเบนซีนที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 ครั้ง (ก, ข และ ค)

A เป็นโคโรมาโตแกรมของ diethyl ether : petroleum ether (1 : 1),

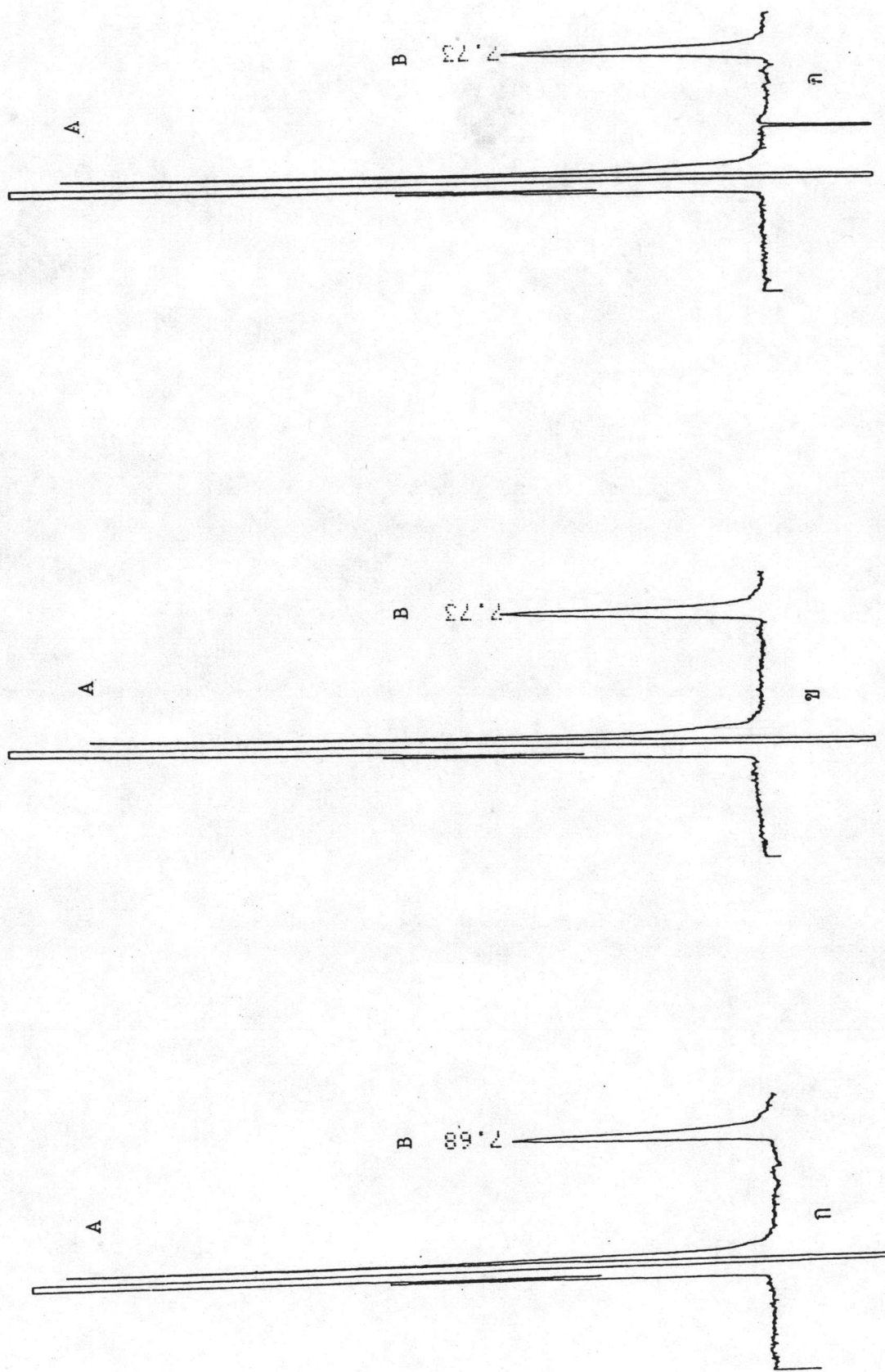
B เป็นโคโรมาโตแกรมของสารไดโพลเบนซีน



รูปที่ 14 โคโรมาโตแกรมของสารไดลยูเบนซีนที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 ครั้ง (ก, ข และ ค)

A เป็นโคโรมาโตแกรมของ diethyl ether : petroleum ether (1 : 1),

B เป็นโคโรมาโตแกรมของสารไดลยูเบนซีน

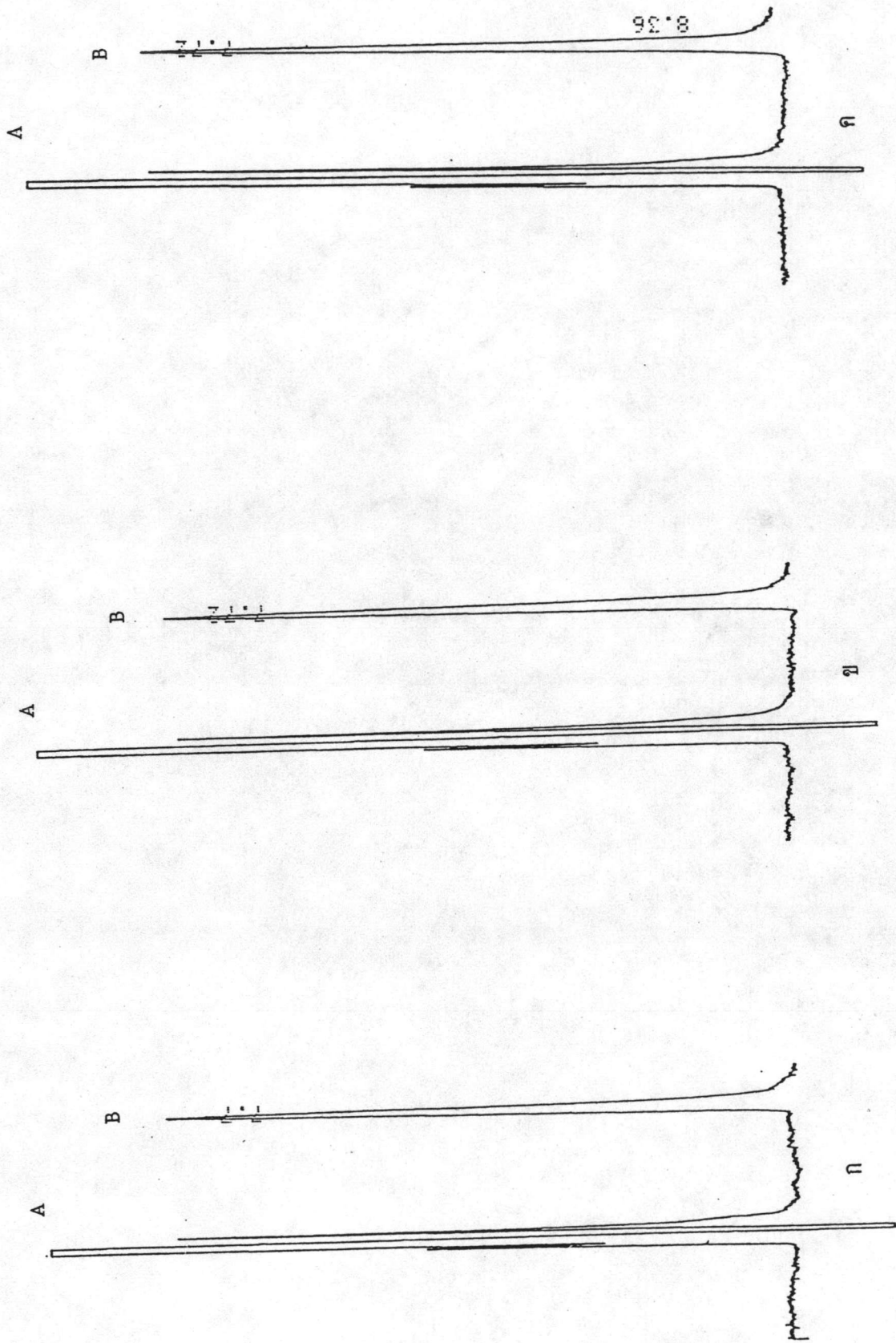


รูปที่ 15 โคโรมา โดแกรมของสาร ไดลู่เบนซอรอนที่ระดับความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 ครั้ง

(ก, ข และ ค)

A เป็นโคโรมา โดแกรมของ diethyl ether : petroleum ether (1 : 1),

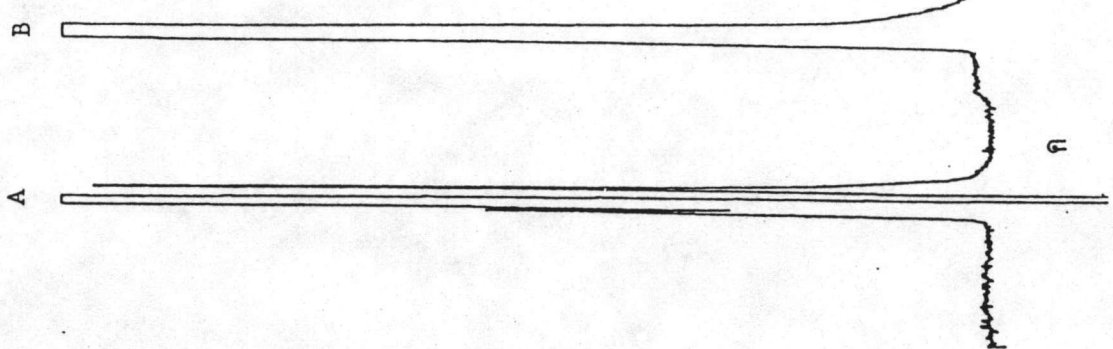
B เป็นโคโรมา โดแกรมของสาร ไดลู่เบนซอรอน



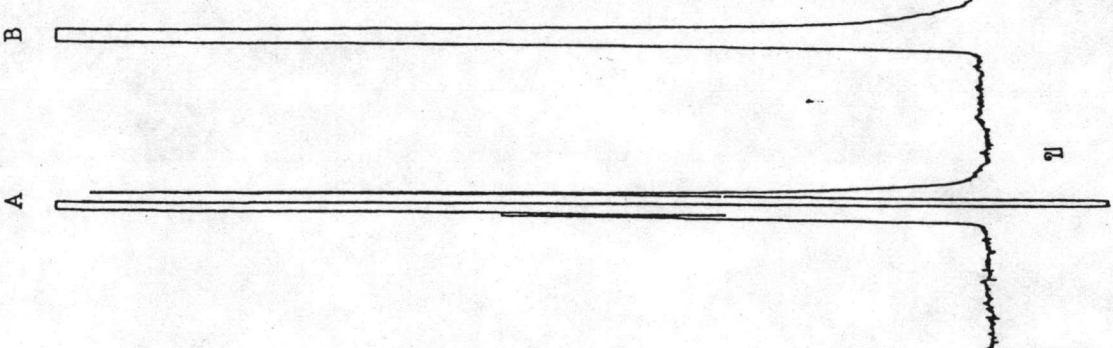
รูปที่ 16 โครมาโตแกรมของสาร ไดฟลูออโรเบนซีนที่ระดับความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 ครั้ง (ก, ข และ ค)

A เป็นโครมาโตแกรมของ diethyl ether : petroleum ether (1 : 1),
 B เป็นโครมาโตแกรมของสาร ไดฟลูออโรเบนซีน

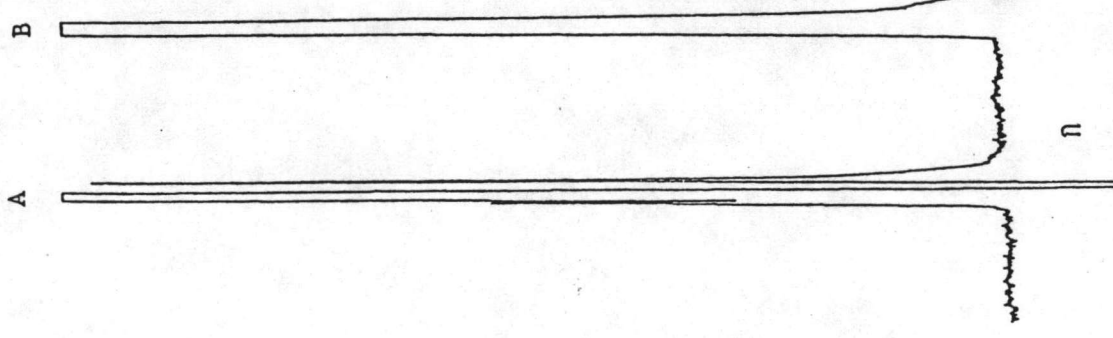
28.2



88.2



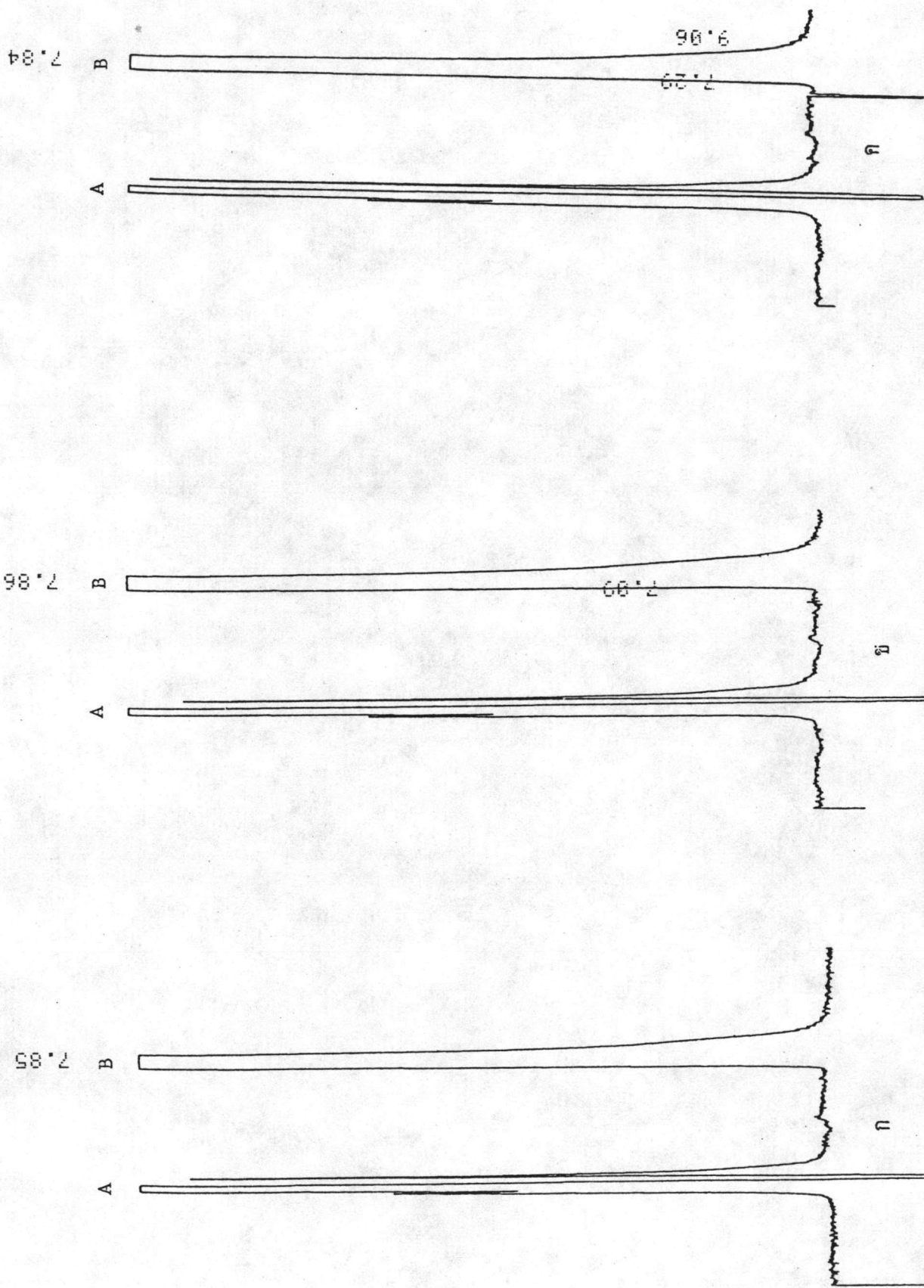
7.89



รูปที่ 17 โคโรมาโตแกรมของสาร ไดฟลูออโรเบนซีนที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 ครั้ง
(ก, ข และ ค)

A เป็นโคโรมาโตแกรมของ diethyl ether : petroleum ether (1 : 1),

B เป็นโคโรมาโตแกรมของสาร ไดฟลูออโรเบนซีน



รูปที่ 18 โคโรมาโตแกรมของสาร ไดลยูเบนซอเอทีระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 ครั้ง

(ก, ข และ ค)

A เป็นโคโรมาโตแกรมของ diethyl ether : petroleum ether (1 : 1),

B เป็นโคโรมาโตแกรมของสาร ไดลยูเบนซอเอที

เมื่อนิดสารไดฟลูเบนซูรอนที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 13) ซึ่งปรากฏ นิด B มีเวลาใกล้เคียงกันคือที่เวลา 7.73, 7.75 และ 7.77 นาที สำหรับความเข้มข้น ที่สูงขึ้นมาคือ 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น (รูปที่ 14, 15, 16, 17 และ 18) จะมีนิต B ของสารไดฟลูเบนซูรอนสูงขึ้นและมีพื้นที่นิตมากขึ้นตามระดับความเข้มข้น

1.2 การหาเวลาของรอบการลอกคราบในกึ่งแซบิวยัยอ่อน

กึ่งแซบิวยัยอ่อนขนาดความยาวประมาณ 10 มิลลิเมตรที่มีอายุระหว่าง P_{10} ถึง P_{15} จะมีเวลาของรอบการลอกคราบ 2 - 5 วัน โดยมีเวลาของรอบการลอกคราบ 2, 3, 4 และ 5 วัน คิดเป็น 36, 36, 16 และ 1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กึ่งแซบิวยัยอ่อนมีเวลาของรอบการลอกคราบ 2 และ 3 วันมีจำนวนเท่ากัน และมีกึ่งแซบิวยัยอ่อนที่ตายก่อนการลอกคราบ 11 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์กึ่งแซบิวยัยอ่อนที่เวลาของรอบการลอกคราบต่าง ๆ

เวลาของรอบการลอกคราบ (วัน)	เปอร์เซ็นต์กึ่งแซบิวยัยอ่อน*
2	36
3	36
4	16
5	1

* มีกึ่งแซบิวยัยอ่อนตายก่อนการลอกคราบ 11 เปอร์เซ็นต์



1.3 การทดลองหาระดับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่มีผลต่อการลอกคราบของ กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน

จากผลการทดลองในข้อ 1.2 กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีเวลาของรอบการลอกคราบ 2 - 3 วัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการทดลองเป็นเวลา 6 วันเพื่อให้กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนผ่านการลอกคราบอย่างน้อย 1 ครั้ง ข้อมูลของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนทุกกลุ่มการทดลองตั้งแต่วันที่ 1 - 6 ได้สรุปไว้ในตารางที่ 9 ในการทดลอง 6 วันกลุ่มระดับความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตรมีการตายมากที่สุดคือกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนตายหมดทั้ง 3 ซ้ำ รองลงมาคือระดับความเข้มข้น 0.7, 0.5, 0.1 และ 0.3 ไมโครกรัมต่อลิตรซึ่งมีจำนวนการตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนเป็น 11 - 18, 6 - 10, 3 - 6 และ 3 - 5 ตัวตามลำดับ สำหรับหน่วยควบคุมน้ำทะเลมีจำนวนการตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน 2 - 4 ตัวและกลุ่มควบคุมอะซิโตนมีการตายน้อยที่สุดคือ 0 - 3 ตัว เมื่อนำข้อมูลการตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนทุกกลุ่ม (ตารางที่ 10) มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนการตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนของแต่ละกลุ่มการทดลองและแต่ละวันของการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 11) และจากการเปรียบเทียบเป็นคู่ ๆ โดยใช้ Duncan's new multiple range test พบว่าสารไดฟลูเบนซูรอนที่ความเข้มข้น 0.7 ไมโครกรัมต่อลิตรเป็นระดับที่เริ่มมีค่าเฉลี่ยจำนวนกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่ตายแตกต่างจากหน่วยควบคุมน้ำทะเลและกลุ่มอะซิโตนอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ที่ระดับ 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอะซิโตนอย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมน้ำทะเล) โดยระดับความเข้มข้น 0.7 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตรจะแตกต่างจากกลุ่มอื่น ๆ ทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 12) นอกจากนี้เมื่อนำค่าเฉลี่ยการตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในวันที่ทำการทดลองต่าง ๆ มาเปรียบเทียบกันพบว่าวันที่ 4 มีการตายมากที่สุด ถัดมาเป็นวันที่ 3, 5, 6, 2 และ 1 ตามลำดับ โดยวันที่ 4 มีค่าเฉลี่ยการตายมากกว่าวันที่ 6, 2 และ 1 อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 13)

ในระยะ 6 วันที่ทำการทดลองปรากฏว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีการลอกคราบ 1 - 2 ครั้ง มีเวลาการตายต่าง ๆ กันคือ ตายก่อนการลอกคราบ ตายขณะลอกคราบรอบที่ 1 ตายหลังการลอกคราบรอบที่ 1 และตายในขณะลอกคราบรอบที่ 2 กลุ่มการทดลองต่าง ๆ มีเปอร์เซ็นต์กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่ตายตามเวลาดังกล่าวแตกต่างกัน (ตารางที่ 14 รูปที่ 19) จากกราฟที่นำเอาเปอร์เซ็นต์การตายมารวมกันทั้ง 6 วัน (รวมวันที่ 1 - 6) พบว่าขณะลอกคราบรอบที่ 1 ในกลุ่มควบคุมน้ำทะเล กลุ่มควบคุมอะซิโตน กลุ่มระดับความเข้มข้นสารไดฟลูเบนซูรอน 0.1 และ 0.3 ไมโครกรัมต่อลิตรมีการตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนอยู่ในช่วง 5 - 30 เปอร์เซ็นต์ และการ

ตารางที่ 9 ข้อมูลของกิ่งแซบวัยอ่อนในกลุ่มการทดลองต่าง ๆ

วันที่ ทดลอง	OR ₁				OR ₂				OR ₃			
	ลอกกราบ		ไม่ลอกกราบ		ลอกกราบ		ไม่ลอกกราบ		ลอกกราบ		ไม่ลอกกราบ	
	ตาย	ไม่ตาย	ตาย	ไม่ตาย	ตาย	ไม่ตาย	ตาย	ไม่ตาย	ตาย	ไม่ตาย	ตาย	ไม่ตาย
1	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	20
2	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	1	19
3	-	9	1	10	1	6	2	11	-	5	-	14
4	-	6	-	13	-	7	1	9	-	8	2	9
5	-	4 + 4	-	11	-	4	-	12	-	4	-	13
6	1	2	-	16	-	3	-	13	-	2	-	15
รวม	ตาย 2		เหลือ 18		ตาย 4		เหลือ 16		ตาย 3		เหลือ 17	
	AR ₁				AR ₂				AR ₃			
1	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	20
2	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	20
3	-	8	2	10	-	8	-	12	-	7	-	13
4	-	6	1	11	-	10	-	10	-	11	1	8
5	-	3 + 1	-	13	-	2 + 1	-	17	-	3	-	16
6	-	3	-	14	-	3	-	17	-	1	1	17
รวม	ตาย 3		เหลือ 17		ตาย 0		เหลือ 20		ตาย 2		เหลือ 18	
	0.1 R ₁				0.1 R ₂				0.1 R ₃			
1	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	20
2	-	-	1	19	-	-	-	20	-	-	1	19
3	1	6	-	12	-	8	-	12	-	6	-	13
4	-	5	-	13	-	5	1	14	3	8	-	7
5	2	5 + 1	-	10	-	5 + 2	-	12	1	2 + 2	-	11
6	-	3	-	13	2	1 + 4	-	12	1	2	-	12
รวม	ตาย 4		เหลือ 16		ตาย 3		เหลือ 17		ตาย 6		เหลือ 14	
	0.3 R ₁				0.3 R ₂				0.3 R ₃			
1	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	20
2	-	-	-	20	-	-	2	18	-	-	1	19
3	-	9	-	11	-	4	-	14	-	8	-	11
4	-	6	1	13	-	11	-	7	1	3	2	13
5	1 + 1	3 + 5	-	9	1	2 + 2	-	14	-	5 + 3	1	7
6	-	3	-	14	-	1 + 2	-	14	-	1	-	14
รวม	ตาย 3		เหลือ 17		ตาย 3		เหลือ 17		ตาย 5		เหลือ 15	

ตารางที่ 9 (ต่อ)

วันที่ ทดลอง	0.5 R ₁				0.5 R ₂				0.5 R ₃			
	ลอกคราบ		ไม่ลอกคราบ		ลอกคราบ		ไม่ลอกคราบ		ลอกคราบ		ไม่ลอกคราบ	
	ตาย	ไม่ตาย	ตาย	ไม่ตาย	ตาย	ไม่ตาย	ตาย	ไม่ตาย	ตาย	ไม่ตาย	ตาย	ไม่ตาย
1	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	20
2	-	-	1	19	-	-	-	20	-	-	-	20
3	1	9	-	9	1	4	-	15	2	6	-	12
4	2	5	-	11	3	8	-	8	6	6	-	6
5	1	1+3	-	11	2	2+2	-	10	-	3	1	8
6	3	1	1	10	-	-	-	14	1	-	-	10
รวม	ตาย 9		เหลือ 11		ตาย 6		เหลือ 14		ตาย 10		เหลือ 10	
0.7 R ₁				0.7 R ₂				0.7 R ₃				
1	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	20
2	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	20
3	6	4	-	10	5	7	-	8	7	4	-	9
4	4	4	-	6	3	4	-	8	2	1	-	10
5	2+4	-	-	4	-	1+4	-	7	1+1	-	-	9
6	-	-	2	1	2	-	1	9	4+1	-	1+1	2
รวม	ตาย 18		เหลือ 2		ตาย 11		เหลือ 9		ตาย 18		เหลือ 2	
1.0 R ₁				1.0 R ₂				1.0 R ₃				
1	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	20
2	-	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	-
3	3	1	-	16	7	-	-	13	2	4	-	13
4	7	2	-	8	7	-	-	6	6	1	2	8
5	4	-	-	6	5	-	1	-	6	-	3	-
6	1	-	2+3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
รวม	ตาย 20		เหลือ 0		ตาย 20		เหลือ 0		ตาย 20		เหลือ 0	

R₁, R₂, R₃ : ชั้นที่ 1, 2, 3 ; 0 : กลุ่มควบคุมน้ำทะเล ; A : กลุ่มควบคุมอะซิโตน (ในปริมาณที่เตรียมความเข้มข้นของสารโคพอลิเมอร์ 1 ไมโครกรัมต่อลิตร) ; 0.1 - 1.0 ระดับความเข้มข้นของสารโคพอลิเมอร์ (ไมโครกรัมต่อลิตร) ; จำนวนทั้งหมดด้วยตัวเลขอื่น : กู้แซบวัยอ่อนที่ผ่านการลอกคราบมาแล้ว 1 ครั้ง

ตารางที่ 10 จำนวนการตายของกุ้งแช่บ้วยอ่อนในกลุ่มต่าง ๆ ตั้งแต่วันที่ 1 - 6 ของการทดลอง

วันที่ ของการทดลอง	1			2			3			4			5			6			
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	
0	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-	1	2	-	-	-	1	-	-	-
A	-	-	-	-	-	-	2	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1
0.1	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	1	3	-	-	2	-	-	2	1
0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-	2	-	-	1	-
0.5	-	-	-	1	-	-	1	1	2	-	2	6	-	-	1	4	-	1	1
0.7	-	-	-	-	-	-	6	5	7	-	4	3	2	-	2	2	3	7	-
1.0	-	-	-	-	-	1	3	7	2	-	7	7	8	6	9	6	-	-	-

R₁, R₂ และ R₃ : ซ้ำที่ 1, 2 และ 3 ; 0 : กลุ่มควบคุมน้ำทะเล ; A : กลุ่มควบคุมอะซิโตน (ใบปริมาณที่เตรียมความเข้มข้นของสารโคพอลูเบนซูรอน 1 ไมโครกรัมต่อลิตร) ; 0.1 - 1.0 : ระดับความเข้มข้นของสารโคพอลูเบนซูรอน (ไมโครกรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยจำนวนการตายของกุ้งแช่บ๊วยวัยอ่อน

source of variation	df	SS	MS	F (คำนวณ)	F (ตาราง)	
					0.05	0.01
groups	6	152.651	25.442	15.951**	2.206	3.030
days	5	103.881	20.776	13.026**	2.324	3.240
interaction	30	164.397	5.480	3.436**	1.930	1.594
error	84	134.000	1.595			
total	125	554.929				

** : มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการตายของกุ้งแช่บ๊วยวัยอ่อนในกลุ่มการทดลองต่าง ๆ
โดยวิธี Duncan's new multiple range test

อันดับ	1	2	3	4	5	6	7
ค่าเฉลี่ย	3.333	2.667	1.389	0.722	0.611	0.5	0.278
กลุ่ม	1.0	0.7	0.5	0.1	0.3	0	A

กลุ่มที่ขีดเส้นใต้ไม่ต่อเนื่องกัน : มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

กลุ่มที่ขีดเส้นใต้ต่อเนื่องกัน : ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการตายของกุ้งแช่บ๊วยวัยอ่อนในวันที่การทดลองต่าง ๆ
โดยวิธี Duncan's new multiple range test

อันดับ	1	2	3	4	5	6
ค่าเฉลี่ย	2.619	1.952	1.810	1.381	0.381	0
วันที่	4	3	5	6	2	1

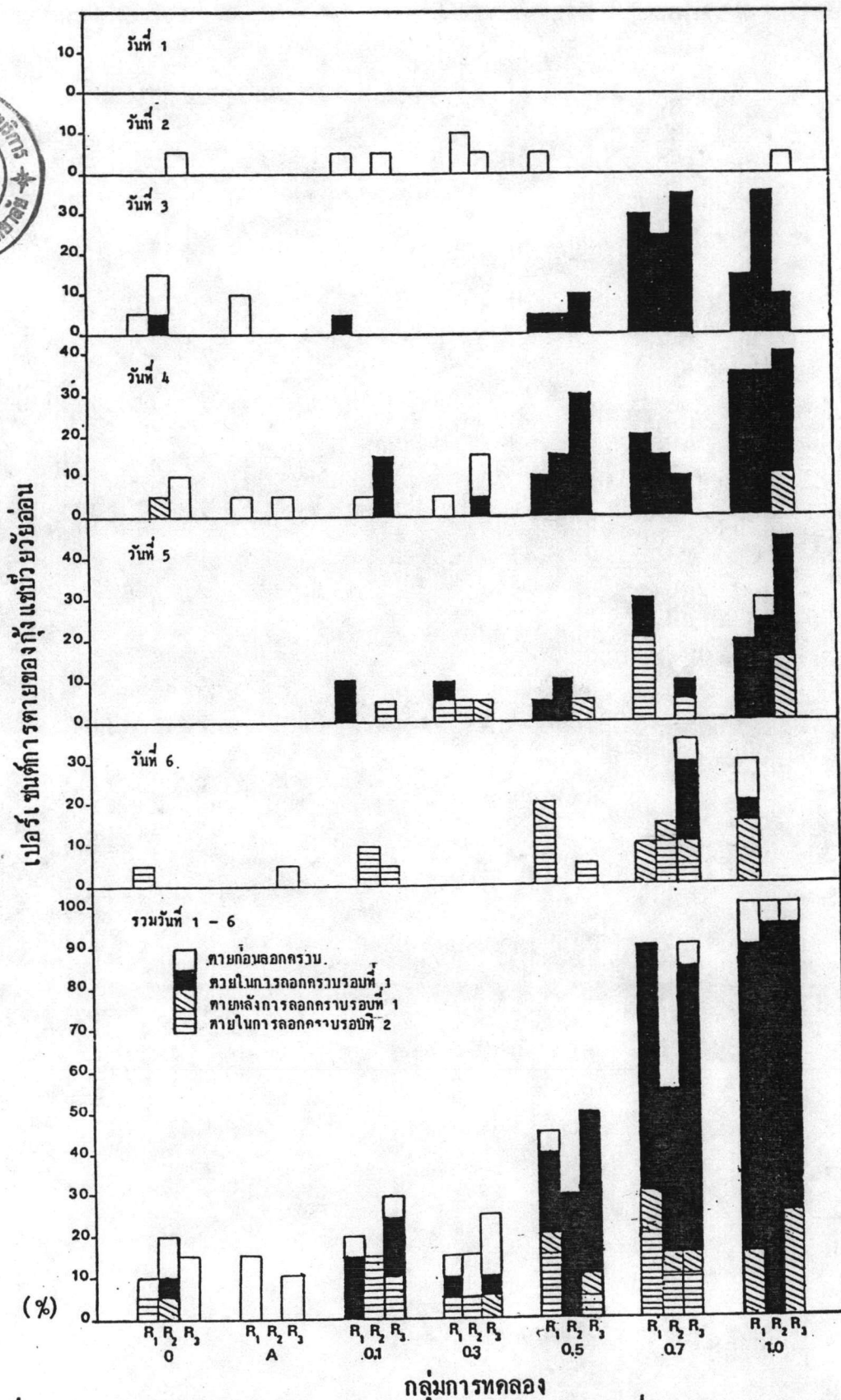
กลุ่มที่ขีดเส้นใต้ไม่ต่อเนื่องกัน : มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

กลุ่มที่ขีดเส้นใต้ต่อเนื่องกัน : ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 14 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของกึ่งแซบวีย้อย่อนเปรียบเทียบกับอัตราการตายและ การตายขณะไม่ได้ลอกคราบที่เวลาต่าง ๆ

กลุ่ม	จำนวน (20 ตัว)									เปอร์เซ็นต์		
	ลอกคราบตาย			การตายขณะไม่ได้ลอกคราบ			ลอกคราบตาย			การตายขณะไม่ได้ลอกคราบ		
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃
0	1	1	-	1	2 + 1	3	5	5	-	5	10 + 5	15
A	-	-	-	3	-	2	-	-	-	15	-	10
0.1	3	2	3 + 2	1	1	1	15	10	15 + 10	5	5	15
0.3	1 + 1	1	1	1	2	3 + 1	5 + 5	5	5	5	10	15 + 5
0.5	4 + 3	6	8 + 1	1 + 1	-	1	20 + 15	30	40 + 5	5 + 5	-	5
0.7	12 + 4	8 + 2	14 + 2	2	1	1 + 1	60 + 20	40 + 10	70 + 10	10	5	5 + 5
1.0	15	19	14	2 + 3	1	1 + 5	75	95	70	10 + 15	5	5 + 25

R₁, R₂ และ R₃ : หน้าที่ 1, 2 และ 3 ; 0 : กลุ่มควบคุมน้ำทะเล; A : กลุ่มควบคุมอะซิโตน ; 0.1 - 1.0 : ความเข้มข้นของสารโคเลสเตอรอล (ไมโครกรัมต่อลิตร) ; เลขอารบิกในช่องการตายขณะไม่ได้ลอกคราบ : การตายก่อนการลอกคราบ ; เลขอารบิกในช่องลอกคราบคือการตายในขณะลอกคราบรอบที่ 1 ; ตัวเลขเอนในช่องการตายขณะไม่ได้ลอกคราบคือการตายหลังการลอกคราบรอบที่ 1 ; เลขตัวเอนในช่องลอกคราบตาย : การตายในขณะลอกคราบรอบที่ 2 ; เลขตัวเอนทุกช่อง : กึ่งแซบวีย้อย่อนผ่านการลอกคราบมาแล้ว 1 ครั้ง



รูปที่ 19 กราฟแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งแช่บ๊วยวัยอ่อนที่เวลาต่าง ๆ (สัมพันธ์กับรอบการลอกคราบ) ตั้งแต่วันที่ 1 - 6 ของการทดลอง ; % : เปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งแช่บ๊วยวัยอ่อน ; R_1, R_2 และ R_3 : ข้ำของการทดลอง ; 0 : กลุ่มควบคุมน้ำทะเล ; A : กลุ่มควบคุมอะซิโตน ; 0.1 - 1.0 : ระดับความเข้มข้นของสารไคฟลูเบนซูรอน (ไมโครกรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 15 จำนวนการตายของกึ่งแซบวัยย่อยอันจากการลอกคราบรอบที่ 1 ในกลุ่มต่าง ๆ ตั้งแต่วันที่ 1 - 6 ของการทดลอง

วันที่ ของการทดลอง	1			2			3			4			5			6		
	วันที่			วันที่			วันที่			วันที่			วันที่			วันที่		
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
0.5	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2	3	6	1	1	2	0	0
0.7	0	0	0	0	0	0	6	5	7	4	3	3	2	2	0	0	0	4
1.0	0	0	0	0	0	0	3	7	2	7	7	6	4	5	6	1	0	0

R₁, R₂ และ R₃ วันที่ 1, 2 และ 3 ; 0 : กลุ่มควบคุมน้ำทะเล ; A : กลุ่มควบคุมอะซิโตน (ในปริมาณที่เตรียม
 ความเข้มข้นของสารไทฟลูเบนซูรอน ; ไมโครกรัมต่อลิตร) ; 0.1 - 1.0 : ระดับความเข้มข้นของสารไทฟลูเบนซูรอน
 (ไมโครกรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยจำนวนการตายในการลอกคราบครั้งที่ 1 ของกิ้งแกบวัยอ่อน

source of variation	df	SS	MS	F (คำนวณ)	F (ตาราง)	
					0.05	0.01
groups	6	120.524	20.087	3.348**	2.206	3.030
days	5	83.468	16.694	3.339**	2.324	3.240
interaction	30	156.81	5.227	0.174 ^{non}	1.930	1.594
errors	84	51.333	0.611			
total	125	412.135				

** : แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ, non : ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 17 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการตายของกิ้งแกบวัยอ่อนในการลอกคราบครั้งที่ 1 ในกลุ่มการทดลองต่าง ๆ โดยวิธี Duncan's new multiple range test

อันดับ	1	2	3	4	5	6	7
ค่าเฉลี่ย	2.667	1.889	1.000	0.222	0.111	0.056	0
กลุ่ม	1.0	0.7	0.5	0.1	0.3	0	A

กลุ่มที่ขีดเส้นใต้ไม่ต่อเนื่องกัน : มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
กลุ่มที่ขีดเส้นใต้ต่อเนื่องกัน : ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 18 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการตายของกิ้งแกบวัยอ่อนในการลอกคราบครั้งที่ 1 ในวันที่การทดลองต่าง ๆ โดยวิธี Duncan's new multiple range test

อันดับ	1	2	3	4	5	6
ค่าเฉลี่ย	2	1.714	1.143	0.238	0	0
วันที่	4	3	5	6	2	1

กลุ่มที่ขีดเส้นใต้ไม่ต่อเนื่องกัน : มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
กลุ่มที่ขีดเส้นใต้ต่อเนื่องกัน : ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยจำนวนการตายก่อนการลอกคราบ
รอบที่ 1, การตายหลังการลอกคราบรอบที่ 1 และการตายในการลอกคราบ
รอบที่ 2 ของกุ้งแช่บ๊วยวัยอ่อนในกลุ่มการทดลองต่าง ๆ

เวลา การตาย	source of variation	df	SS	MS	F (จำนวน)	F (ตาราง)	
						0.05	0.01
การตาย ก่อนการลอกคราบรอบที่ 1	groups	6	1.556	0.259	1.020 ^{non}	2.206	3.030
	days	5	3.588	0.718	2.827 [*]	2.324	3.240
	interaction	30	9.299	0.310	1.220 ^{non}	1.930	1.594
	errors	84	21.335	0.254			
	total	125					
การตาย หลังการลอกคราบรอบที่ 1	groups	6	2.984	0.497	2.088 ^{non}		
	days	5	3.182	0.636	2.672 ^{**}		
	interaction	30	8.540	0.285	1.197 ^{non}		
	errors	84	20.000	0.238			
	total	125	34.746				
การตาย ในการลอกคราบรอบที่ 2	groups	6	2.746	0.458	1.991 ^{non}		
	days	5	5.945	1.189	5.170 ^{**}		
	interaction	30	10.111	0.337	1.465 ^{non}		
	errors	84	19.333	0.230			
	total	125	38.135				

** : แยกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง, * : แยกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

non : ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 20 จำนวนของกุ้งแช่บ๊วยวัยอ่อนที่ตายในลักษณะต่าง ๆ

กลุ่ม	ลอกคราบไม่ออก เปลือกคิก carapace	ลอกคราบไม่ออก เปลือกคิกอยู่ทั้งตัว	ตายสัปดาห์ในน้ำที่ พยายามลอกคราบ	ลอกคราบออกตาย	ลอกคราบลอกตาย ลักษณะคังอ
0	R ₁	1	-	-	-
	R ₂	-	-	1	-
	R ₃	-	-	-	-
A	R ₁	-	-	-	-
	R ₂	-	-	-	-
	R ₃	-	-	-	-
0.1	R ₁	1	-	1	-
	R ₂	1	-	-	1
	R ₃	4	-	-	-
0.3	R ₁	1	-	1	-
	R ₂	-	-	1	-
	R ₃	1	-	-	-
0.5	R ₁	4	1	1	-
	R ₂	2	-	2	-
	R ₃	4	-	3	-
0.7	R ₁	9	4	1	-
	R ₂	5	-	4	-
	R ₃	11	1	3	-
1.0	R ₁	7	2	6	-
	R ₂	7	-	10	1
	R ₃	7	-	6	-

0 : กลุ่มควบคุมน้ำทะเล ; A : กลุ่มควบคุมอะซิโตน ; 0.1 - 1.0 : ระดับความเข้มข้นของสารโคพอลิเมอร์ (ไมโครกรัมต่อลิตร) ; R₁, R₂ และ R₃ : ซ้ำของการทดลอง

ตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนขณะลอกคราบครั้งที่ 1 เพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับจากกลุ่มระดับความเข้มข้นสารไดฟลูเบนซูรอน 0.5 - 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อนำข้อมูลการตายจากการลอกคราบครั้งที่ 1 ของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในกลุ่มการทดลองต่าง ๆ (ตารางที่ 15) มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งในระหว่างกลุ่มทดลองต่าง ๆ และแต่ละวันของการทดลอง (ตารางที่ 16) และจากการนำมาเปรียบเทียบเป็นคู่ ๆ โดยใช้ Duncan's new multiple range test พบว่าในกลุ่มควบคุมน้ำทะเล กลุ่มควบคุมอะซิโตน กลุ่มของสารไดฟลูเบนซูรอนที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 ไมโครกรัมต่อลิตรมีเปอร์เซ็นต์การตายในการลอกคราบครั้งที่ 1 ไม่แตกต่างกัน แต่จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกลุ่มของสารไดฟลูเบนซูรอนที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 0.7 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 17) นอกจากนี้เมื่อนำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในการลอกคราบครั้งที่ 1 มาแยกตามวันที่ทำการทดลอง พบว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีการตายมากที่สุดในวันที่ 4 ซึ่งเป็นวันที่กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีรอบของการลอกคราบเป็น 3 วัน รองลงมาคือ วันที่ 3, 5, 6, 2 และ 1 ตามลำดับ โดยวันที่ 4 แตกต่างจากวันที่ 5, 6, 2 และ 1 อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง สำหรับวันที่ 3 จะแตกต่างจากวันที่ 5 อย่างมีนัยสำคัญและแตกต่างจากวันที่ 6, 2 และ 1 อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 18) ส่วนการตายก่อนการลอกคราบรอบที่ 1 การตายหลังการลอกคราบรอบที่ 1 และการตายในการลอกคราบรอบที่ 2 ในกลุ่มการทดลองทั้ง 7 กลุ่มไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 19)

ผลของสารไดฟลูเบนซูรอนนอกจากทำให้กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนตายสัมพันธ์กับการลอกคราบในเวลาต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว ยังทำให้กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนตายขณะลอกคราบในลักษณะต่าง ๆ กันด้วย เช่น การตายเพราะลอกคราบไม่ออกเปลือกติดอยู่บริเวณ carapace ลอกคราบไม่ออกเปลือกติดอยู่ที่ทั้งตัว ตายตัวบิดในท่าที่พยายามลอกคราบ ลอกคราบออกแล้วตาย และลอกคราบออกตายในลักษณะบิดตัว โดยส่วนใหญ่ในกลุ่มระดับความเข้มข้น 0.5, 0.7 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร จะเป็นการตายเพราะลอกคราบไม่ออกพบเปลือกติดอยู่ที่ carapace (ตารางที่ 20)

1.4 การศึกษาเบื้องต้นโครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในระยะต่าง ๆ ของรอบการลอกคราบ

1.4.1 การศึกษาโครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในระดับกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา จากผลการทดลองในข้อ 1.2 กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีเวลาของรอบการลอกคราบ 2 - 5 วัน โดยมีเวลาของรอบการลอกคราบมากที่สุดที่ 2 และ 3 วัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกเวลาของการลอกคราบ 3 วันมากำหนดระยะต่าง ๆ ของรอบการลอกคราบ เริ่มจากกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่

เฟื่องลอกคราบนำมากำหนดช่วงเวลาให้ห่างกัน 6 ชั่วโมงจะได้ 13 ระยะได้แก่ระยะ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 และ 72 จากผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์ธรรมดาปรากฏว่าทั้ง 13 ระยะมีโครงสร้างเหมือนกันคือมีชั้น epicuticle, exocuticle และ endocuticle และจากการสังเกตขณะทำการเก็บตัวอย่างพบว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจะลอกคราบระหว่างช่วงเวลา 24.00 น. ถึง 06.00 น. เท่านั้น ดังนั้นในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งจะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในสารไดฟลูเบนซอรอนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อศึกษาผลของสารไดฟลูเบนซอรอนต่อโครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อ 2.0 จึงได้แบ่งระยะระหว่างเวลา 24.00 ถึง 06.00 น. ให้ละเอียดยิ่งขึ้นและตัดบางระยะที่มีโครงสร้างเหมือนกันออกไปได้เป็นระยะ 24, 48, 67.5, 68.0, 68.5, 69.0, 69.5, 70.0, 70.5 และ 71 (รายละเอียดการแบ่งระยะอยู่ในหัวข้อ 1.4 ของบทที่ 2) จากผลการศึกษาตามระยะดังกล่าวพบว่าโครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีความแตกต่างกันอยู่ 3 แบบด้วยกันคือ

ก. ระยะหลังการลอกคราบ ระยะที่เปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนบางที่สุดเนื่องจากเนื่องจากการลอกคราบมาใหม่ ๆ ในระยะนี้จะเห็นชั้น epicuticle, exocuticle และ endocuticle ครบทุกชั้น อย่างไรก็ตามความหนาของเปลือกในระยะนี้มีความแตกต่างกันบ้างเพราะกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนลอกคราบไม่พร้อมกันทำให้ระยะเวลาหลังการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยแต่ละตัวไม่เท่ากัน (ภาพที่ 1)

ข. ระยะระหว่างการลอกคราบ ระยะที่เปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีความหนามากที่สุดและมีชั้นต่าง ๆ ได้แก่ ชั้น epicuticle exocuticle และ endocuticle ครบทุกชั้น (ภาพที่ 3)

ค. ระยะก่อนการลอกคราบ ระยะที่เปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนซ้อนกันเนื่องจากมีการสร้างเปลือกใหม่อยู่ที่เปลือกเก่า โดยเปลือกเก่าจะมีชั้น epicuticle, exocuticle และ endocuticle ครบทุกชั้นแต่ชั้น endocuticle ของเปลือกเก่าจะหนาน้อยลงกว่าระยะในข้อ ข. สำหรับเปลือกใหม่ในระดับกล้องจุลทัศน์ธรรมดานี้จะเห็นเฉพาะชั้น epicuticle และชั้น exocuticle เท่านั้น (ภาพที่ 2)

สำหรับคุณสมบัติการติดสีในเทคนิคการย้อมต่าง ๆ ได้แก่ hematoxylin & eosin, การทดสอบด้วย PAS, Mallory triple stain และ Masson trichrome stain นั้น ปรากฏว่าการย้อมด้วย hematoxylin & eosin ติดสีคล้ายกับการทดสอบด้วย PAS แต่ PAS จะให้สีชมพูปนแดงชัดเจน (PAS⁺) ในบริเวณที่มี polysaccharides เป็นส่วนประกอบ และการย้อมด้วย Mallory triple stain ติดสีคล้ายกับการย้อมด้วย Masson trichrome

stain ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดของการย้อมสี (ตารางที่ 21 และภาพที่ 3) และความหนาของชั้นต่าง ๆ (ตารางที่ 22) ดังต่อไปนี้

ชั้น epicuticle เมื่อย้อมด้วย H & E และทดสอบด้วย PAS จะมีสีม่วงอมชมพูและชมพูปนแดงตามลำดับ ถ้าย้อมด้วย Mallory triple stain และ Masson trichrome stain epicuticle จะติดสีน้ำเงิน ในระยะหลังการลอกคราบไม่สามารถแยกความแตกต่างของชั้น epicuticle จากชั้น exocuticle ได้เนื่องจากเปลือกในระยะนี้บางมาก โดยมี ความหนาเฉลี่ยของชั้นทั้งสองรวมกันเท่ากับ 0.446 ไมโครเมตร เมื่อเข้าสู่ระยะระหว่างการลอกคราบความหนาของเปลือกกุ้งแซบวัยอ่อนเพิ่มขึ้นทำให้สามารถแยกความแตกต่างของชั้น epicuticle และชั้น exocuticle ได้ ชั้น epicuticle ในระยะนี้มีความหนาเท่ากับ 0.572 ไมโครเมตร ในระยะก่อนการลอกคราบจะมีการซ้อนกันของเปลือกโดยเปลือกใหม่จะ สร้างอยู่ใต้เปลือกเก่า และทั้งเปลือกใหม่และเปลือกเก่าก็ไม่สามารถเห็นความแตกต่างของชั้น epicuticle เช่นเดียวกัน

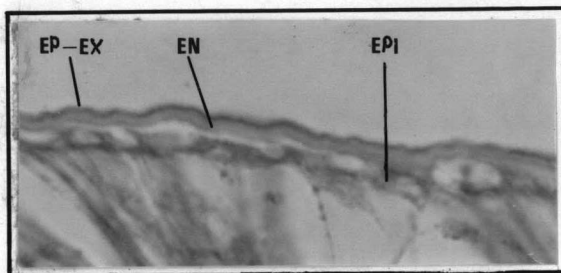
ชั้น exocuticle เป็นชั้นที่อยู่ถัดจากชั้น epicuticle เมื่อย้อมด้วย H & E และทดสอบด้วย PAS จะมีสีน้ำเงินเข้ม ถ้าย้อมด้วย Mallory triple stain และ Masson trichrome stain จะติดสีฟ้าเข้ม ชั้น exocuticle มีความหนามากกว่าชั้น epicuticle ในระยะหลังการลอกคราบและก่อนการลอกคราบจะไม่สามารถแยกความแตกต่างออกจากชั้น epicuticle ได้ ส่วนในระยะระหว่างการลอกคราบชั้น exocuticle มีความหนา 1.336 ไมโครเมตร ส่วนในระยะก่อนการลอกคราบเปลือกเก่าจะมีความหนาของชั้น epicuticle และชั้น exocuticle รวมกันเท่ากับ 0.822 ไมโครเมตร และเปลือกใหม่หนา 0.680 ไมโครเมตร

ชั้น endocuticle อยู่ใต้ชั้น exocuticle เมื่อย้อมด้วย H & E และทดสอบด้วย PAS จะติดสีชมพูจางและชมพู ถ้าย้อมด้วย Mallory triple stain และ Masson trichrome stain จะติดสีฟ้าอ่อน ชั้น endocuticle มีความหนามากกว่าชั้นอื่น ๆ ในระยะ หลังการลอกคราบใหม่ ๆ ชั้น endocuticle มีความหนาน้อยกว่าระยะอื่นคือมีความหนา 0.893 ไมโครเมตร เมื่อเข้าสู่ระยะระหว่างการลอกคราบชั้น endocuticle มีความหนามากขึ้นเป็น 2.223 ไมโครเมตร ส่วนในระยะก่อนการลอกคราบเปลือกเก่ามีชั้น endocuticle ที่มีความหนา 1.446 ไมโครเมตร ซึ่งหนาน้อยกว่าระยะระหว่างการลอกคราบ

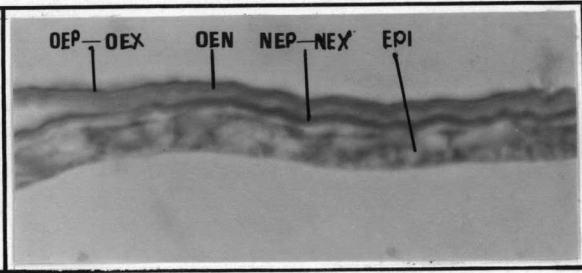
สำหรับชั้นของเซลล์เยื่อผิว (epidermis) เมื่อย้อมด้วย H & E และทดสอบด้วย PAS nucleus จะติดสีน้ำเงินเข้มและสีน้ำเงิน cytoplasm จะติดสีชมพู ถ้าย้อมด้วย

- ภาพที่ 1 โครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บิวย้วยอ่อนในระยะหลังการลอกคราบ ทำปฏิกิริยากับ Periodic Acid/Schiff (PAS) กำลังขยาย X 100
- ภาพที่ 2 โครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บิวย้วยอ่อนในระยะก่อนการลอกคราบ ทำปฏิกิริยากับ Periodic Acid/Schiff (PAS) กำลังขยาย X 100
- ภาพที่ 3 โครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บิวย้วยอ่อนในระยะระหว่างการลอกคราบ กำลังขยาย X 100
- 3.1 ย้อมด้วย hematoxylin & eosin
 - 3.2 ทำปฏิกิริยากับ Periodic Acid/Schiff (PAS)
 - 3.3 ย้อมด้วย Mallory triple stain
 - 3.4 ย้อมด้วย Masson trichrome stain
- ภาพที่ 4, 5 และ 6 ภาพโครงสร้างเปลือกในระยะหลังการลอกคราบ ระยะระหว่างการลอกคราบและระยะก่อนการลอกคราบของกุ้งแช่บิวย้วยอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซอรอน ทำปฏิกิริยากับ Periodic Acid/Schiff (PAS) กำลังขยาย X 100

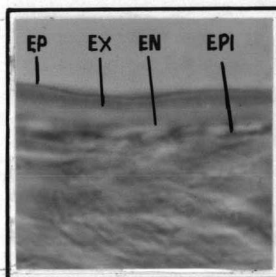
หมายเหตุ :- EP-EX : ชั้น epicuticle และชั้น exocuticle ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ; EN : ชั้น endocuticle ; EPI : ชั้นของเซลล์เยื่อผิว ; OEP-OEX : ชั้น epicuticle และชั้น exocuticle ของเปลือกเก่าที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ; NEP-NEX : ชั้น epicuticle และชั้น exocuticle ของเปลือกใหม่ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ; EP : ชั้น epicuticle ; EX : ชั้น exocuticle



1



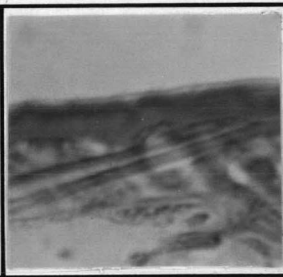
2



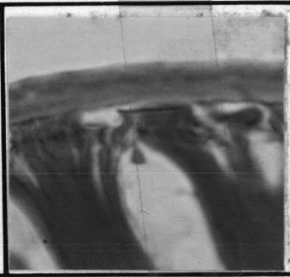
31



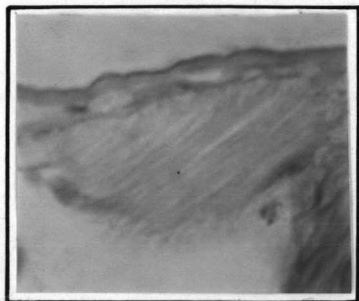
32



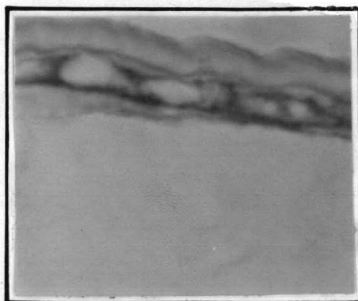
33



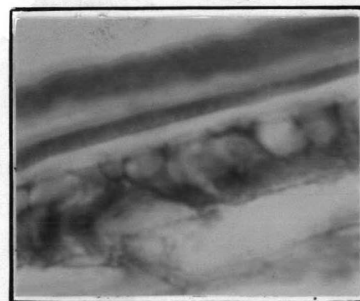
34



4



5



6

ตารางที่ 21

คุณสมบัติในการย้อมสีของ เปลือกกุ้งแช่บ๊วยวัยอ่อนที่ย้อมด้วยวิธีต่าง ๆ

ชนิดของการย้อมสี	ชั้น				
	epicuticle	exocuticle	endocuticle	epidermis	
				nucleus	cytoplasm
H & E	ม่วงเข้มปนชมพู	น้ำเงินเข้ม	ชมพูจาง	น้ำเงินเข้ม	ชมพู
PAS	ชมพูปนแดง	น้ำเงินเข้ม	ชมพู	น้ำเงิน	ชมพู
Mallory triple stain	น้ำเงิน	ฟ้าเข้ม	ฟ้าอ่อน	แดง	ชมพู
Masson trichrome stain	น้ำเงิน	ฟ้าเข้ม	ฟ้าอ่อน	ม่วงอมน้ำเงิน	ชมพูอมม่วง

ตารางที่ 22 ความหนาของชั้นต่าง ๆ ในเปลือกและชั้นของเซลล์ผิวหนังในกุ้งแช่บ๊วยวัยอ่อน

ระยะ	ค่าเฉลี่ยความหนาของชั้นต่าง ๆ (ไมโครเมตร)			
	epicuticle	exocuticle	endocuticle	epidermins
ก	0.446		0.893	2.083
ข	0.572	1.336	2.223	2.211
ค	เก่า 0.822 ใหม่ 0.680		เก่า 1.446	3.954

ก : ระยะหลังการลอกคราบ

ข : ระยะระหว่างการลอกคราบ

ค : ระยะก่อนการลอกคราบ

Mallory triple stain และ Masson trichrome stain nucleus จะติดสีแดงและม่วง
 อมน้ำเงิน cytoplasm จะติดสีชมพูอมม่วง ในระยะหลังการลอกคราบเซลล์เยื่อผิว หนา 2.083
 ไมโครเมตร เมื่อเข้าสู่ระยะระหว่างการลอกคราบความหนาไม่เปลี่ยนแปลงมากนักคือเท่ากับ
 2.211 ไมโครเมตร และในระยะก่อนการลอกคราบความหนาของเซลล์เยื่อผิวมากขึ้นเป็น
 3.954 ไมโครเมตร

1.4.2 การศึกษาโครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บิวยัยอ่อนในระดับกล้องจุลทัศน์อิเล็กตรอน
 ได้เก็บตัวอย่างกุ้งแช่บิวยัยอ่อนในระยะต่าง ๆ เหมือนกับการศึกษาภายใต้กล้องจุลทัศน์ธรรมดา
 แต่แตกต่างกันในระยะสุดท้ายคือการศึกษาภายใต้กล้องจุลทัศน์ธรรมดาเก็บถึงระยะ 71 แต่ใน
 ตัวอย่างของกล้องจุลทัศน์อิเล็กตรอนเปลี่ยนเป็นระยะ 72 เนื่องจากต้องการภาพโครงสร้างเปลือก
 หลังการลอกคราบแล้วเป็นเวลานานขึ้น เพื่อจะได้เห็นความแตกต่างของโครงสร้างเปลือก
 เนื่องจากผลของสารไดฟลูเบนซอรอนในระยะต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน สำหรับจำนวนที่เก็บตัวอย่าง
 ของกลุ่มควบคุมในการศึกษาโครงสร้างเปลือกเก็บระยะละ 10 ตัว (ซึ่งเป็นจำนวนน้อยกว่า
 ที่กำหนดไว้ คือ 20 ตัว เนื่องจากกุ้งแช่บิวยัยอ่อนมีจำนวนตัวที่ลอกคราบต่ำในวันที่เริ่มการ
 ทดลอง) สำหรับการเก็บตัวอย่างกุ้งแช่บิวยัยที่เป็นกลุ่มควบคุมในแต่ละระยะจะมีจำนวนกุ้งแช่บิวยัย
 ยัยอ่อนที่ลอกคราบแล้วและกุ้งแช่บิวยัยอ่อนที่ยังไม่ได้ลอกคราบต่างกันคือในระยะแรก ๆ 67.5 C -
 69.5C แต่ละระยะมีกุ้งแช่บิวยัยอ่อนที่ลอกคราบแล้ว 2 - 4 ตัว แต่ในระยะหลัง ๆ 70 C -
 72 C แต่ละระยะมีกุ้งแช่บิวยัยอ่อนที่ลอกคราบแล้วมากขึ้นคือ 5 - 7 ตัว (ตารางที่ 23)
 นอกจากนี้ในการเก็บตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมพบว่ากุ้งแช่บิวยัยอ่อนว่ายน้ำได้รวดเร็วจับมาเตรียม
 ตัวอย่างค่อนข้างยาก

ตารางที่ 23 จำนวนกุ้งแช่บิวยัยอ่อนที่ลอกคราบแล้วและยังไม่ได้ลอกคราบที่ระยะต่าง ๆ

ระยะ	67.5 C	68 C	68.5 C	69 C	69.5 C	70 C	70.5 C	72 C
ลอกคราบแล้ว	4	2	4	4	3	5	6	7
ไม่ลอกคราบ	6	8	6	6	7	5	4	3

C : กุ้งแช่บิวยัยอ่อนในกลุ่มควบคุม (control)

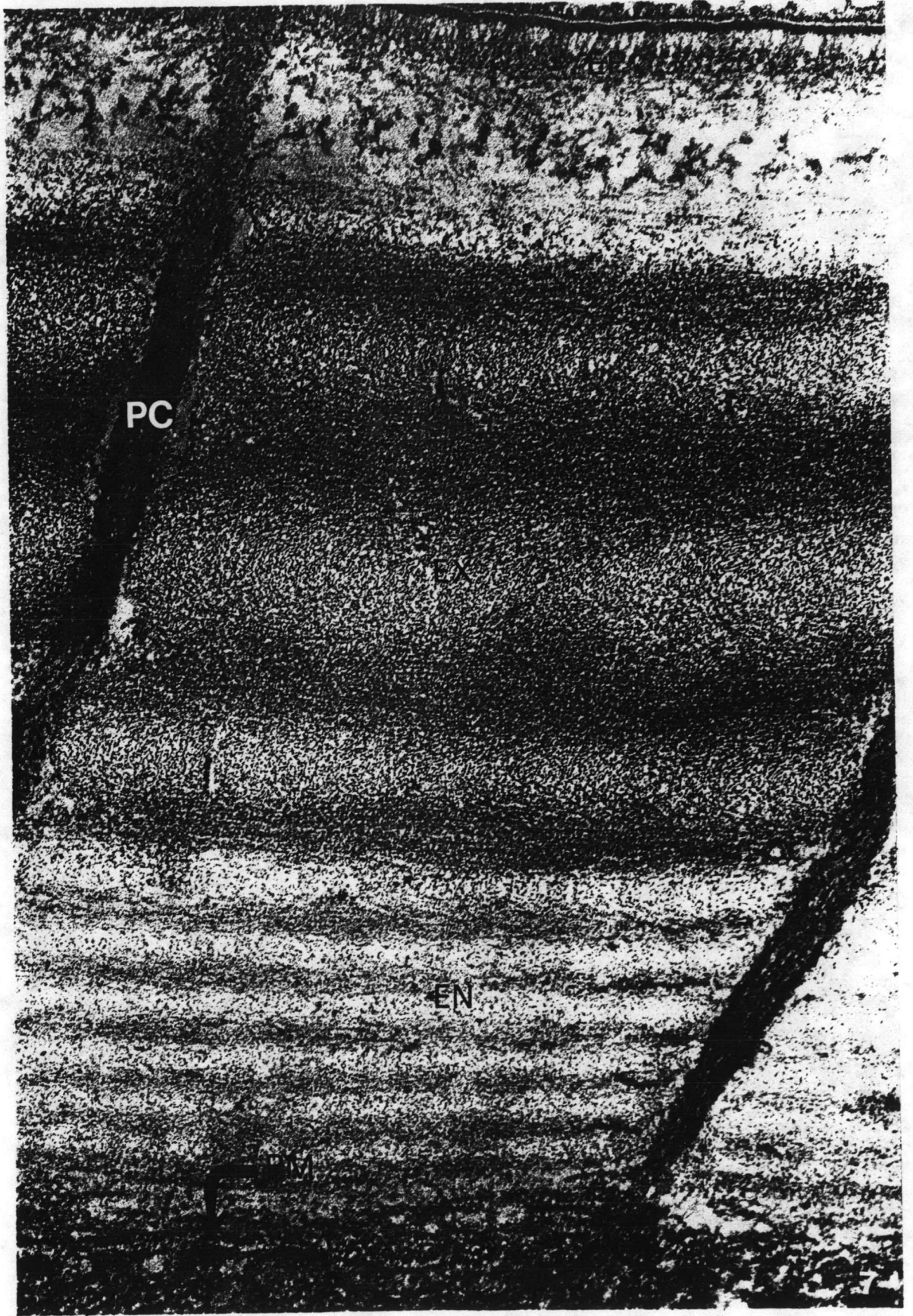
และเนื่องจากกิ่งแซบวัยอ่อนแต่ละตัวมีรอบการลอกคราบต่างกัน ทำให้โครงสร้างของเปลือกแตกต่างกันไปด้วยถึงแม้ว่าจะอยู่ในช่วงเวลาเดียวกัน โครงสร้างเปลือกจึงไม่สัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาที่ได้กำหนดไว้ตั้งแต่ต้น จึงจะรายงานโครงสร้างของเปลือกเป็นระยะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ก. ระยะหลังการลอกคราบ (ภาพ 7) ในระยะนี้มีชั้น epicuticle, exocuticle และ endocuticle เปลือกทั้งหมดมีความหนา 1.946 ไมโครเมตร epicuticle หนา 0.30 ไมโครเมตร (ภาพ 9) โดยชั้นย่อยในชั้น epicuticle มี 6 ชั้น ชั้นนอกสุดเป็นชั้นที่บางที่สุดมีลักษณะไม่เรียบเนื่องจากมี electron dense กลุ่มเล็ก ๆ ทำให้เห็นเป็นสีเข้มมาเชื่อมกันตลอด ชั้นต่อมามีสีจางเกือบขาว (electron lucent) ชั้นที่สามมีสีเข้ม (electron dense) เป็นแถบและมีความหนาค่อนข้างจะคงที่ ชั้นที่ 4 เป็นสีจาง (electron lucent) และมีเส้นใยจากชั้นที่ 3 และชั้นที่ 5 ยื่นเข้ามาในบางบริเวณ ชั้นที่ 5 มีเส้นใยเรียงกันอย่างไม่เป็นระเบียบ มีความหนาแน่นของเส้นใยมากกว่าชั้นที่ 6 โดยชั้นที่ 6 จะหนาที่สุดและมีกลุ่ม electron dense กระจายอยู่ทั่วไป ต่อจากชั้นย่อยที่ 6 ของชั้น epicuticle เป็นชั้น exocuticle มีความหนา 0.946 ไมโครเมตร ซึ่งปรากฏเป็นสีเข้มและจางสลับกันโดยวางตัวขนานกันและมีลักษณะเป็นชั้นย่อยตามแนวนอน (lamellar) จำนวน 8 ชั้น ความหนาของชั้นย่อยช่วงกลางจะหนากว่าชั้นย่อยที่อยู่ด้านนอก และเมื่อใช้กำลังขยายสูง (ภาพ 10) ในชั้นย่อยซึ่งมีสีจางจะพบ microfibrils ที่ ถูกตัดตามขวางเห็นเป็นจุดเล็ก ๆ มองดูคล้ายกับการเรียงตัวในลักษณะโค้ง โดยปลายทั้งสองมาเชื่อมกับชั้นย่อยสีเข้มที่ขนานอยู่ทั้ง 2 ข้าง ต่อมาเป็นชั้น endocuticle มีความหนา 0.595 ไมโครเมตร (ภาพ 7 และ 8) จะเห็นความแตกต่างของชั้น exocuticle และชั้น endocuticle อย่างชัดเจนเนื่องจากชั้น exocuticle มีสีเข้มกว่าและมีชั้นย่อยที่หนากว่า โดยชั้นย่อยของชั้น endocuticle จะมีความหนาใกล้เคียงกันแต่มีจำนวนชั้นย่อยมากกว่าคือมีประมาณ 10 ชั้น (ภาพ 7)

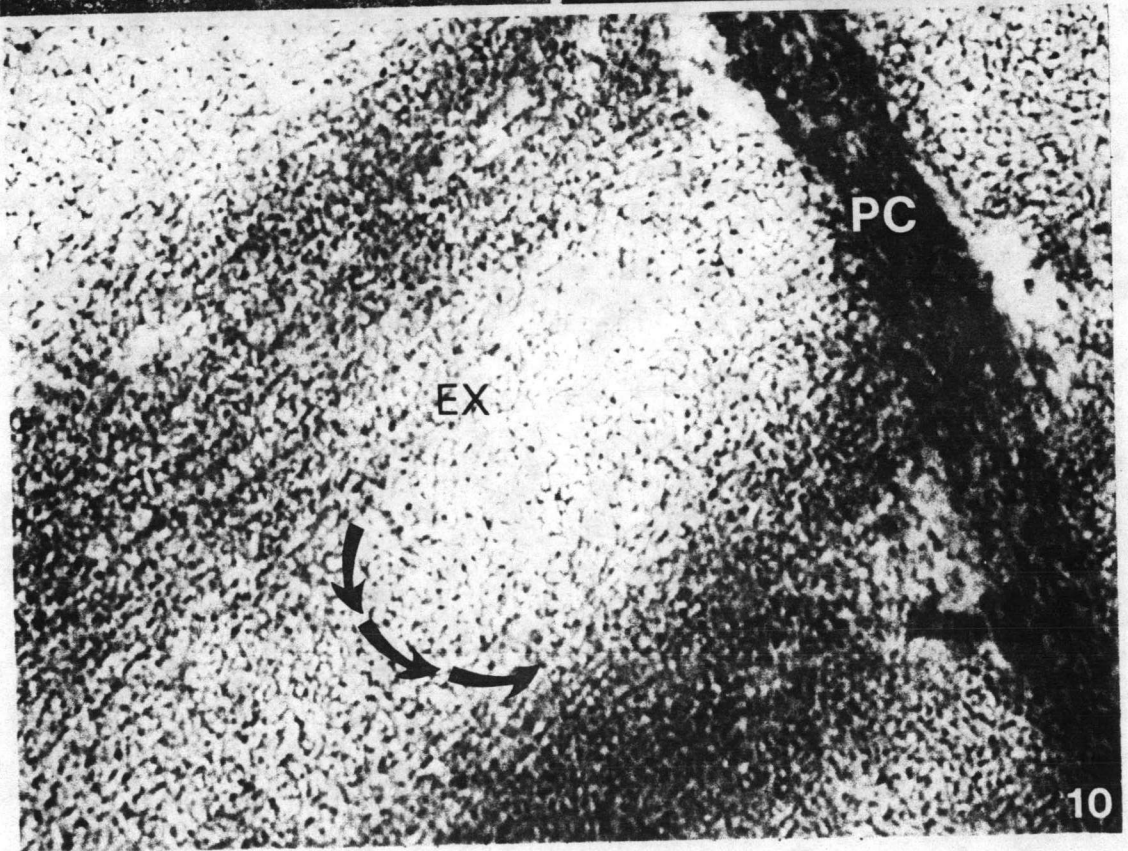
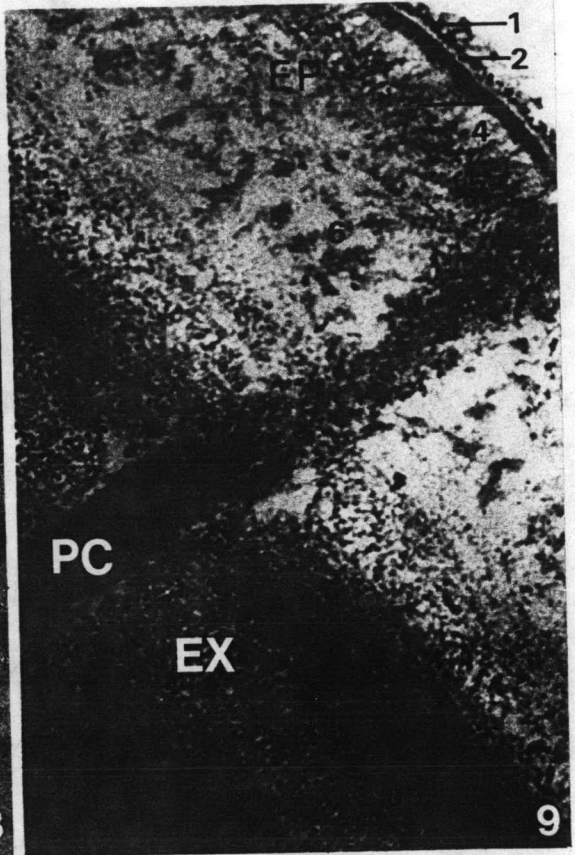
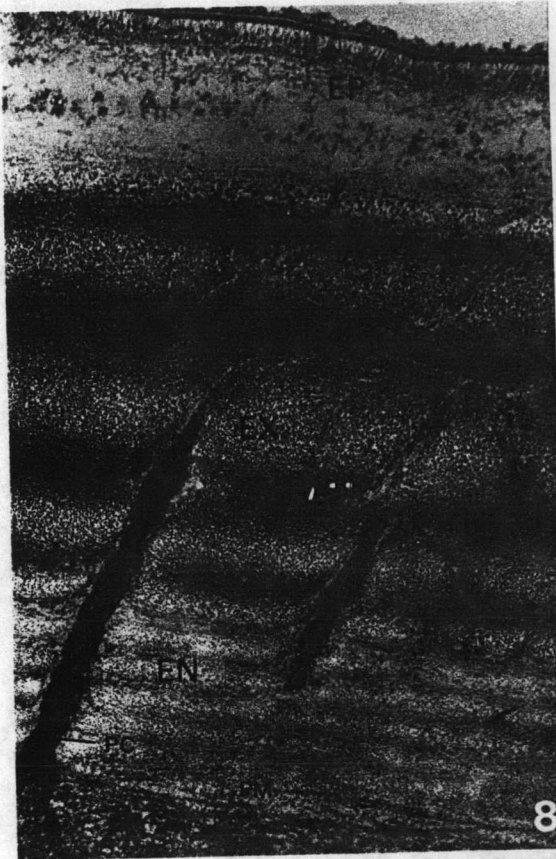
ข. ระยะระหว่างการลอกคราบ เป็นระยะโครงสร้างเปลือกที่มีชั้น endocuticle หนามากขึ้น เริ่มสร้างชั้น membranous layer แต่ยังไม่มีย molting fluid (ภาพ 11) ในระยะนี้เปลือกจะหนาตัวขึ้นมากเป็น 3.0 ไมโครเมตร

ค. ระยะก่อนการลอกคราบ เป็นระยะที่มีโครงสร้างเปลือกครบสมบูรณ์และมีการแยกของเปลือกออกจากเซลล์เยื่อผิว (epidermal cell) ในระยะนี้จะมีโครงสร้างเปลือกครบทุกชั้นคือ epicuticle, exocuticle, endocuticle และ membranous layer ซึ่งมีความหนา

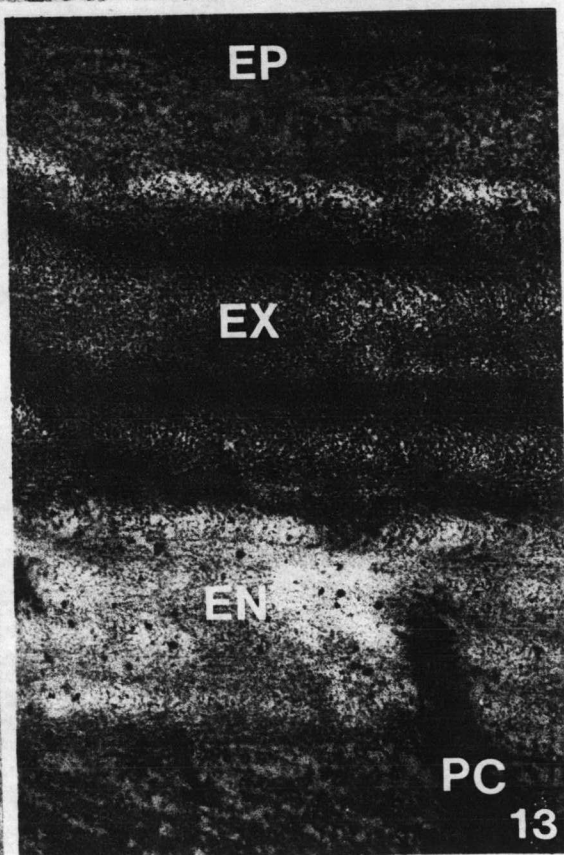
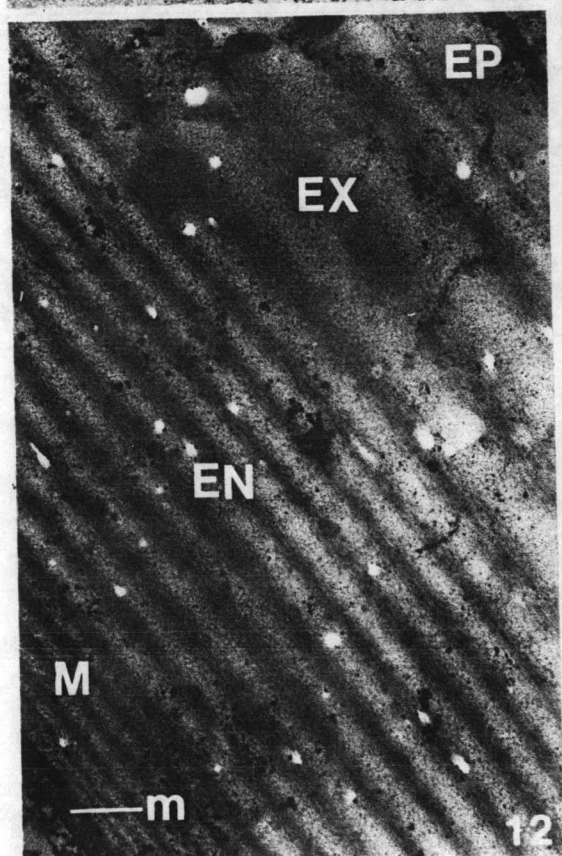
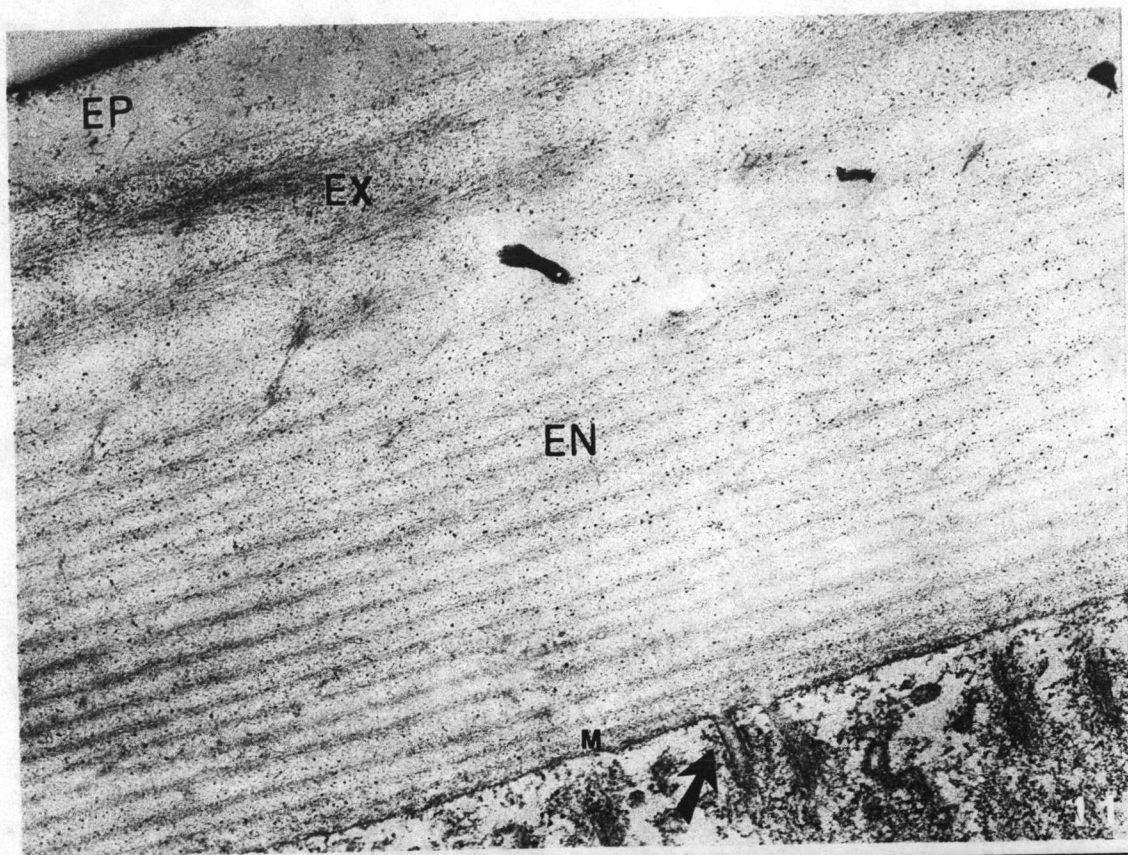
ภาพ 7 ภาพโครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บ๊วยวัยอ่อนระยะหลังการลอกคราบ ชั้น epicuticle
อยู่นอกสุดมีชั้นย่อย 6 ชั้น ถัดมาเป็นชั้น exocuticle และ endocuticle ซึ่งมี
ชั้นย่อยสลับกันระหว่างสีเข้มและสีจาง มี pore canal ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์
เยื่อผิวหนังชั้น endocuticle และชั้น exocuticle ไปเปิดที่ epicuticle
ชั้นย่อยที่ 3 (EP : epicuticle; EX : exocuticle; EN : endocuticle;
PC : pore canal และ PM : plasma membrane plaques) กำลังขยาย
114,000 เท่า



- ภาพที่ 8 ภาพโครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บ๊วยอ่อนระยะหลังการลอกคราบ มีชั้น epicuticle, exocuticle และชั้น endocuticle ภาพนี้แสดงลักษณะที่ pore canal มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เยื่อผิว (EP : epicuticle ; EN : endocuticle ; PC : pore canal ; PM : plasma membrane plaques) กำลังขยาย 59,000 เท่า
- ภาพที่ 9 ภาพแสดงชั้นย่อยของชั้น epicuticle 6 ชั้น ชั้นย่อยที่ 1 อยู่นอกสุดมีลักษณะไม่เรียบ เนื่องจากมี electron dense กลุ่มเล็ก ๆ มาเชื่อมกันตลอด ชั้นย่อยที่ 2 มีสีจางเกือบขาว ชั้นย่อยที่ 3 มีสีเข้มเป็นแถบและมีความหนาของชั้นค่อนข้างคงที่ ชั้นย่อยที่ 4 มีสีจางและมีเส้นใยจากชั้นที่ 3 และชั้นที่ 5 ยื่นเข้ามาในบางบริเวณ ชั้นย่อยที่ 5 มีเส้นใยเรียงกันอย่างไม่เป็นระเบียบ ชั้นที่ 6 หนาที่สุด และมีกลุ่มสารสีเข้มกระจายอยู่ทั่วไป (EP : epicuticle ; EX : exocuticle ; EN : endocuticle ; PC : pore canal ; PM : plasma membrane plaques) กำลังขยาย 200,000 เท่า
- ภาพที่ 10 ภาพกำลังขยายสูงในชั้น exocuticle เห็นภาพตัดตามขวางของ microfibrils มีลักษณะเป็นจุดสีเข้มที่มีแนวโน้มมาเรียงตัวกันในลักษณะโค้ง โดยมีปลายทั้งสองมาเชื่อมกับชั้นย่อยสีเข้มที่อยู่ทั้ง 2 ข้าง (: ลักษณะโค้งของ microfibrils ; EX : exocuticle ; PC : pore canal) กำลังขยาย 220,000 เท่า



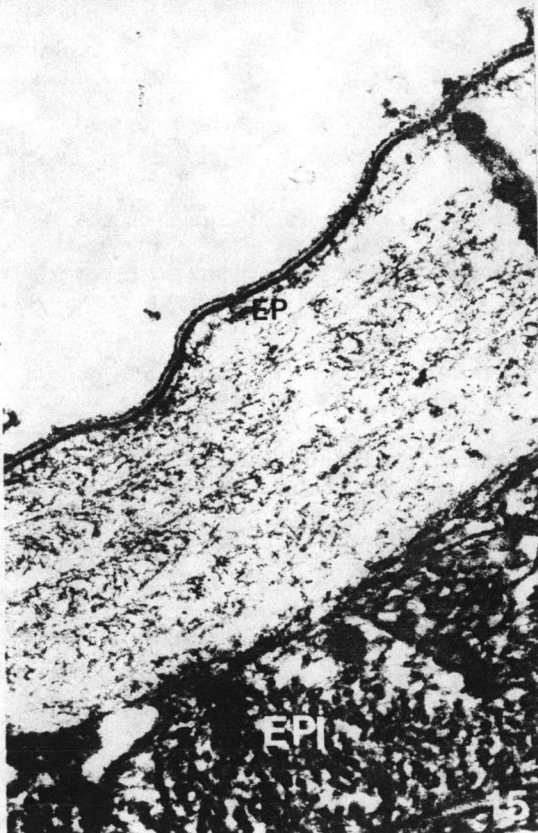
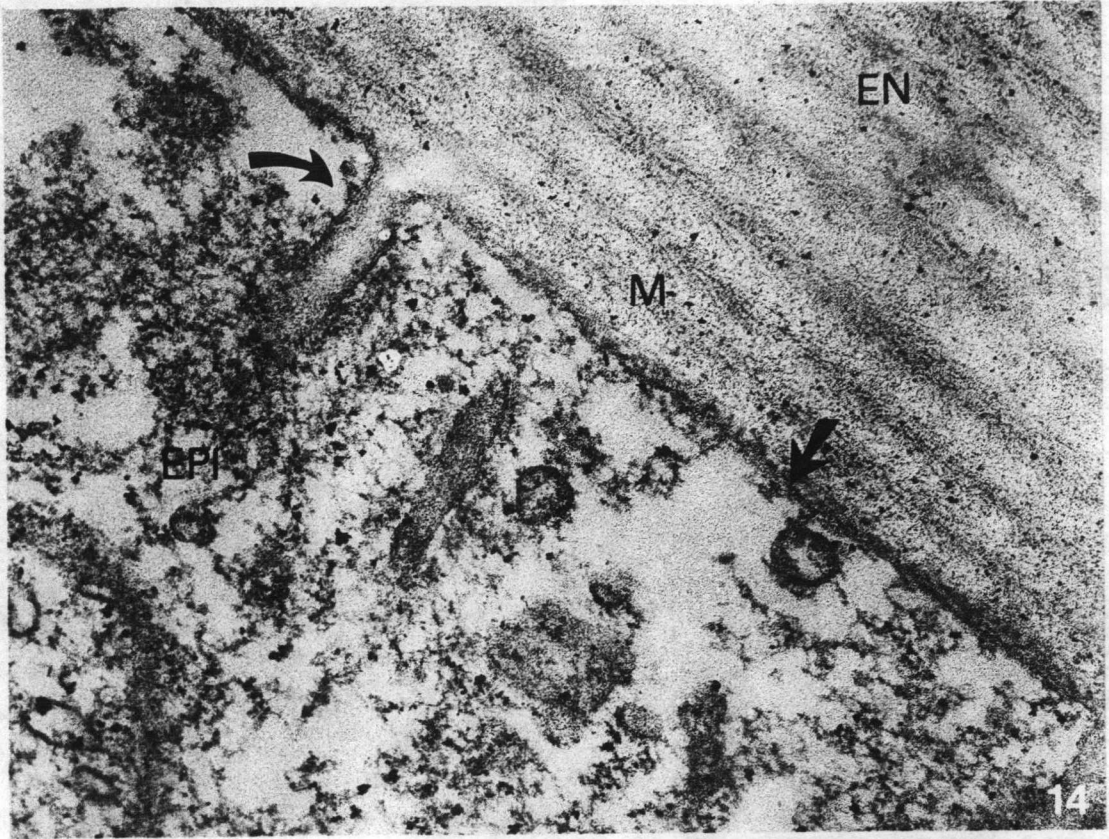
- ภาพที่ 11 โครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บิวย้วยอ่อนในระยะระหว่างการลอกคราบ มีชั้น endocuticle หนามากขึ้น และเริ่มสร้าง membranous layer แต่ยังไม่มีการสร้าง molting fluid ในภาพนี้พบลักษณะโครงสร้างเปลือกที่ยื่นเข้าไปแทรกอยู่ในชั้น เซลเยื่อบุผิวซึ่งจะเรียกว่า cuticular Projections และแต่ละ cuticular projection จะมี microfibrils กระจายอยู่โดยรอบ (EP : epicuticle ; EX : exocuticle ; EN : endocuticle ; M : membranous layer ; ลูกร : cuticular projection) กำลังขยาย 37,000 เท่า
- ภาพที่ 12 โครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บิวย้วยอ่อนในระยะก่อนการลอกคราบ ภายใต้นี้มีโครงสร้างเปลือกครบทุกชั้นคือ epicuticle, exocuticle, endocuticle และ membranous layer เปลือกในระยะนี้จะแยกออกจากชั้นของเซลล์เยื่อบุผิวโดยมีช่องเหลวที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบ (molting fluid) อยู่ตรงรอยแยก (EP : epicuticle ; EX : exocuticle ; EN endocuticle ; M : membranous layer ; m : molting fluid) กำลังขยาย 32,000 เท่า
- ภาพที่ 13 โครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บิวย้วยอ่อนในระยะหลังการลอกคราบ แสดงลักษณะของ microfibrils ที่ยังไม่จัดตัวเป็นระเบียบ (EP : epicuticle ; EX : exocuticle ; EN : endocuticle ; PC : pore canal ; ลูกร : microfibrils ที่ยังไม่จัดตัวเป็นระเบียบ) กำลังขยาย 94,000 เท่า



0.5, 1.1, 1.45 และ 0.55 ไมโครเมตรตามลำดับ ลักษณะของชั้น membranous layer คล้ายกับชั้น endocuticle คือชั้นย่อยจะปรากฏเป็นแนวสีเข้มสลับขาว แต่ชั้นย่อยของ membranous layer จะมีความหนาน้อยกว่าชั้นย่อยของ endocuticle โดยมีการเปลี่ยนแปลงกันที่มองเห็นได้ค่อนข้างชัดเจน ความหนาของแต่ละชั้นย่อยภายในชั้น membranous layer จะใกล้เคียงกัน ในระยะนี้จะเห็นการแยกของเซลล์เยื่อผิวหนังออกจากเปลือกซึ่งเรียกลักษณะนี้ว่า "apolysis" โดยพื้นที่ระหว่างเปลือกและเซลล์เยื่อผิวหนังจะมีของเหลว (molting fluid) แทรกอยู่ (ภาพที่ 12)

นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเปลือกหลังการลอกคราบโดยแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้ว ยังพบลักษณะอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเปลือกรวมอยู่ด้วย ได้แก่ plasma membrane plaques และ pore canal plasma membrane plaques ในระยะหลังการลอกคราบมีลักษณะเป็นกลุ่มสารที่ติดสีเข้ม (electron dense) อยู่บริเวณปลายยอดของผนังเซลล์เยื่อผิวหนังที่มีลักษณะเหมือนนิ้วมือยื่นออกมา (microvilli) (ภาพ 7 และ 8) และตรงเปลือกบริเวณที่ติดกับ plasma membrane plaques จะมีลักษณะของสาร ติดสีเข้มมาก มีลักษณะคล้าย microfibrils เชื่อมอยู่บน plasma membrane plaques โดย microfibrils นี้ยังไม่จัดตัวเป็นระเบียบและยังไม่เรียงตัวเป็นชั้นย่อยของชั้น endocuticle (ภาพ 13) เมื่อเข้าสู่ระยะระหว่างการลอกคราบลักษณะผิว (apical surface) ของเซลล์เยื่อผิวหนังจะค่อนข้างเรียบโดยมีรอยหยักขนาดเล็กและน้อยกว่าระยะหลังการลอกคราบมาก (ภาพ 14) ในระยะนี้จะไม่เห็นลักษณะสีเข้มของ plasma membrane plaques แต่ยังมีโครงสร้างชั้นย่อยของ membranous layer ต่อไป ดังจะเห็นได้จากภาพ 14 เป็นการสร้างชั้นย่อยสีที่ตรงผิวของเซลล์เยื่อผิวหนังที่ ซึ่งต่างจากรยะหลังการลอกคราบใหม่ ๆ ที่มี plasma membrane plaques และมีลักษณะของ microfibrils ที่ยังไม่เรียงเป็นชั้นย่อยอยู่ติดกับผิวของเซลล์เยื่อผิวหนัง สำหรับในระยะก่อนการลอกคราบเป็นระยะที่โครงสร้างเปลือกสมบูรณ์และมีการแยกของเปลือกออกจากเซลล์เยื่อผิวหนัง (ภาพ 12) ผิวของเซลล์เยื่อผิวหนังจะเรียบกว่าระยะหลังการลอกคราบ หรือระยะระหว่างการลอกคราบ นอกจาก plasma membrane plaques แล้ว ยังมีโครงสร้างเปลือกอีกอย่างหนึ่งเรียกว่า pore canal ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เยื่อผิวหนังผ่านเปลือกชั้นต่าง ๆ มาสิ้นสุดที่ epicuticle ชั้นย่อยที่ 3 (ภาพ 8 และ 9) ภายใน pore canal มีสารที่สีเข้มไม่เป็นที่เดียวกัน

- ภาพที่ 14 ผิวของเซลเยื่อผิวในระยะระหว่างการลอกคราบ มีลักษณะการสร้างชั้นย่อยสีทึบของ membranous layer ทันทีที่บริเวณผิวของเซล (EN : endocuticle ; M : membranous layer ; ลูกศรโค้ง : cuticular projection ; ลูกศรตรง : ชั้นย่อยสีทึบ ; EPI : epidermis) กำลังขยาย 115,000 เท่า
- ภาพที่ 15 โครงสร้างเปลือกกระยะหลังการลอกคราบของกิ้งชิววัยอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซuron เห็นลักษณะ microfibrils ที่มาเรียงเป็นชั้นย่อย (lamellar) ไม่เป็นระเบียบโดยไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชั้น exocuticle และชั้น endocuticle ได้ และเปลือกจะหนาน้อยกว่ากิ้งชิววัยอ่อนในหน่วยควบคุม (EP : epicuticle ; EPI : epidermis) กำลังขยาย 92,000 เท่า
- ภาพที่ 16 โครงสร้างเปลือกกระยะระหว่างการลอกคราบของกิ้งชิววัยอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซuron ความหนาจะลดลง ไม่สามารถบอกความแตกต่างของชั้น exocuticle, endocuticle และ membranous layer ได้อย่างชัดเจน microfibrils บางลง และในบางบริเวณมีรูพรุน (EP : epicuticle ; ลูกศร : บริเวณที่มีรูพรุน) กำลังขยาย 32,000 เท่า



นอกจากนี้ยังพบโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นส่วนยื่นออกไปจากเปลือกเข้าไปแทรกอยู่ในชั้นเซลเยื่อผิวหนังซึ่งจะเรียกว่า cuticular projection (ลูกศรโค้ง) จากภาพขยายใหญ่ของเปลือกกุ้งแช่บิวยวียอ่อน (ภาพ 14) จะพบ cuticular projections ยื่นออกมาจากเปลือกเข้ามาแทรกอยู่ในเซลเยื่อผิวหนัง แต่ละ cuticular projection จะมี microfibrils มายึดอยู่โดยรอบ

2. ผลของสารไดฟลูเบนซูรอนต่อโครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บิวยวียอ่อนในรอบการลอกคราบ

2.1 ผลของสาร ไดฟลูเบนซูรอนต่อโครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บิวยวียอ่อนในระดับกล้องจุลทัศน์ธรรมดา จากการใช้สารไดฟลูเบนซูรอนความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตรเลี้ยงกุ้งแช่บิวยวียอ่อนแล้วจึงเก็บตัวอย่างหลังจากให้สารไดฟลูเบนซูรอนที่ระยะ 24, 48, 67.5, 68.0, 68.5, 69, 69.5, 70, 70.5 และ 71 พบว่าโครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บิวยวียอ่อนมีความแตกต่างกันอยู่ 3 แบบเหมือนกับในหน่วยควบคุมทุกประการคือ

ก. ระยะหลังการลอกคราบ เปลือกกุ้งแช่บิวยวียอ่อนจะบางที่สุดเนื่องจากเพิ่งผ่านการลอกคราบมาใหม่ ๆ (ภาพ 3.1)

ข. ระยะระหว่างการลอกคราบ เป็นระยะที่เปลือกกุ้งแช่บิวยวียอ่อนมีความหนามากที่สุดและมีชั้นต่าง ๆ ได้แก่ชั้น epicuticle, exocuticle และ endocuticle ครบทุกชั้น (ภาพ 3.2)

ค. ระยะก่อนการลอกคราบ ระยะที่เปลือกกุ้งแช่บิวยวียอ่อนซ้อนกัน (ภาพที่ 3.3)

จากการศึกษาพบว่าในระดับกล้องจุลทัศน์ธรรมดาไม่สามารถบอกความแตกต่างของโครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บิวยวียอ่อนที่อาจเกิดขึ้นจากการเลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอนได้ ความแตกต่างที่พบคือความหนาของชั้นต่าง ๆ (ตารางที่ 24) ในชั้น endocuticle ของกุ้งแช่บิวยวียอ่อนที่เลี้ยงในไดฟลูเบนซูรอนทุกระยะ จะหนาน้อยกว่ากุ้งแช่บิวยวียอ่อนในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 22 และ 24) สำหรับเปลือกชั้น exocuticle ของกุ้งแช่บิวยวียอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอนในระยะระหว่างการลอกคราบ จะมีความหนาน้อยกว่าเปลือกกุ้งแช่บิวยวียอ่อนในหน่วยควบคุม ส่วนระยะหลังการลอกคราบ และระยะก่อนการลอกคราบ ซึ่งต้องวัดความหนาของชั้น epicuticle และ exocuticle มารวมกันปรากฏว่าเปลือกกุ้งแช่บิวยวียอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอน

ตาราง 24 ความหนาของชั้นต่าง ๆ ในเปลือกและชั้นของเซลล์เยื่อใยในกิ่งแช่บิวยวันอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอน

ระยะ	ค่าเฉลี่ยความหนาของชั้นต่าง ๆ (ไมโครเมตร)			
	epicuticle	exocuticle	endocuticle	epidermis
ก	0.536		0.510	1.786
ข	0.577	0.754	2.041	2.466
ค	เก่า 1.136 ใหม่ 0.868		เก่า 1.292	5.102

มีความหนามากกว่ากลุ่มควบคุม ข้อแตกต่างของความหนาของเปลือกชั้นต่าง ๆ จะสรุปได้ชัดเจนยิ่งขึ้นในหัวข้อผลของสารไดฟลูเบนซูรอนต่อโครงสร้างเปลือกกิ่งแช่บิวยวันอ่อนในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.2 ผลของสารไดฟลูเบนซูรอนต่อโครงสร้างเปลือกกิ่งแช่บิวยวันอ่อนในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การเก็บตัวอย่างกิ่งแช่บิวยวันอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอนมีลักษณะที่แตกต่างจากหน่วยควบคุมคือสามารถจับกิ่งแช่บิวยวันอ่อนมาเตรียมตัวอย่างได้ง่ายกว่า เนื่องจากกิ่งแช่บิวยวันอ่อนจากกลุ่มที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอนจะว่ายน้ำได้ช้าทั้งตัวที่ลอกคราบแล้วและตัวที่ยังไม่ได้ลอกคราบ นอกจากนี้จำนวนกิ่งแช่บิวยวันอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอนที่ลอกคราบในระยะต่าง ๆ (ตารางที่ 25) จะแตกต่างจากกิ่งแช่บิวยวันอ่อนในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 23) คือกิ่งแช่บิวยวันอ่อนจากกลุ่มควบคุมจะเริ่มลอกคราบตั้งแต่ระยะ 67.5 C และมีการลอกคราบทุกระยะไปจนถึงระยะ 72 C โดยจำนวนกิ่งแช่บิวยวันอ่อนที่ลอกคราบแล้วจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามเวลา

ตารางที่ 25 จำนวนการลอกคราบและไม่ลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอนในระยะต่าง ๆ หลังการลอกคราบ

ระยะ			67.5t	68t	68.5t	69t	69.5t	70t	70.5t	72t
ไม่ลอกคราบ (ตัว)			10	10	10	10	5	5	8	10
ลอก คราบ (ตัว)	ตาย	A ⁻	-	-	-	-	-	-	-	2
		B	-	-	-	-	-	-	3	5
	ไม่ตาย	C	-	-	-	-	-	-	-	2
		D	-	-	-	-	-	-	7	3
รวม (ตัว)			10	10	10	10	5	5	18	20

- t : กลุ่มของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอน (treatment groups)
 A : ตายในลักษณะเปลือกติดอยู่บริเวณ carapace
 B : ตายในท่าตัวบิดพยายามจะลอกคราบเปลือกออก
 C : นำมาเตรียมตัวอย่างที่กำลังลอกคราบไม่ออกเนื่องจากเปลือกติดอยู่ที่ carapace
 D : ลอกคราบออกได้แต่ค่อนข้างจะอ่อนแอ

ที่เพิ่มขึ้น สำหรับกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอนจะไม่ลอกคราบเลยในระยะแรก ๆ (67.5t - 70t) แต่จะเริ่มลอกคราบในระยะ 70.5t ซึ่งกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนบางตัวจะตายเนื่องจากมีปัญหาในการลอกคราบ ในการทดลองนี้เก็บตัวอย่างกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในแต่ละระยะไม่เท่ากันเช่นในระยะ 67.5t - 69t เก็บตัวอย่างละ 10 ตัว แต่เมื่อพบว่าที่ระยะ 69.5t ไม่มีกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนลอกคราบเลยจึงเก็บตัวอย่างเพียง 5 ตัวในระยะ 69.5t และระยะ 70t เพื่อหาทางแก้ปัญหาเฉพาะหน้าเนื่องจากไม่แน่ใจว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจะไปลอกคราบระยะใด จึงลดจำนวนการเก็บตัวอย่างลงเพื่อให้มีกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนเหลือพอหากจำเป็นต้องเพิ่มระยะหลังระยะ

72t ออกไปอีก (ในกรณีที่ถูกแช่บิวรี่อ่อนยังไม่ได้ออกคราบที่ระยะ 72t) เมื่อถึงระยะ 7๘.5t ปรากฏว่ามีกึ่งแช่บิวรี่อ่อนบางตัวเริ่มลอกคราบจึงเพิ่มการเก็บตัวอย่างในระยะนี้เป็น 18 ตัว และเพิ่มตัวอย่างในระยะ 72t เป็น 2๐ ตัว ตามลำดับ ปัญหาการเพิ่มระยะหลังระยะ 72t จึงตกไป

เมื่อนำตัวอย่างกึ่งแช่บิวรี่อ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซuronดังกล่าวมาเตรียม ตัวอย่างแล้วศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเล็กตรอนพบว่าที่โครงสร้างเปลือกบางบริเวณมีการเปลี่ยนแปลงต่างไปจากกึ่งแช่บิวรี่อ่อนในกลุ่มควบคุมดังต่อไปนี้

ก. ระยะหลังการลอกคราบ จากภาพ 15 จะเห็นได้ชัดว่าโครงสร้างเปลือกมี microfibrils ที่มาเรียงเป็นชั้นย่อย (lamellar) ในลักษณะที่ไม่เป็นระเบียบโดยไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชั้น exocuticle และ endocuticle ได้ นอกจากนี้ความหนาของเปลือกในระยะนี้จะเท่ากับ ๘.541 ไมโครเมตร ซึ่งมีความหนาน้อยกว่าเปลือกของกึ่งแช่บิวรี่อ่อนจากกลุ่มควบคุมในระยะเดียวกัน (ภาพ 7, 8 และ 13) ส่วนในภาพ 19 เป็นภาพโครงสร้างเปลือกกึ่งแช่บิวรี่อ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซuronหลังการลอกคราบใหม่ ๆ เช่นเดียวกันแต่มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างออกไป คือจะเห็นชั้น exocuticle แตกต่างจากชั้น endocuticle ชัดเจน แต่ปรากฏความผิดปกติในชั้น exocuticle โดยพบการเรียงตัวของ microfibrils ของชั้นย่อยมีความหนาไม่สม่ำเสมอ และ microfibrils บางบริเวณจะขาดหายไป (ลูกศรชี้) สำหรับในชั้น endocuticle ของเปลือกกึ่งแช่บิวรี่อ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซuronจะต่างกับกับชั้น endocuticle ของกึ่งแช่บิวรี่อ่อนจากกลุ่มควบคุมคือชั้น endocuticle จากกลุ่มควบคุมจะมีชั้นย่อยจางแซมแยกเป็นชั้นสลับกันไปอย่างชัดเจน (ภาพ 7, 8 และ 13) แต่ endocuticle ของเปลือกกึ่งแช่บิวรี่อ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซuron (ภาพ 19) จะไม่สามารถแยกชั้นย่อยจางและชั้นย่อยแซมได้อย่างชัดเจนเนื่องจาก microfibrils จัดตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ อย่างไรก็ตามยังคงพบ plasma membrane plaques เหมือนกับโครงสร้างเปลือกของกึ่งแช่บิวรี่อ่อนจากกลุ่มควบคุม (ภาพ 19)

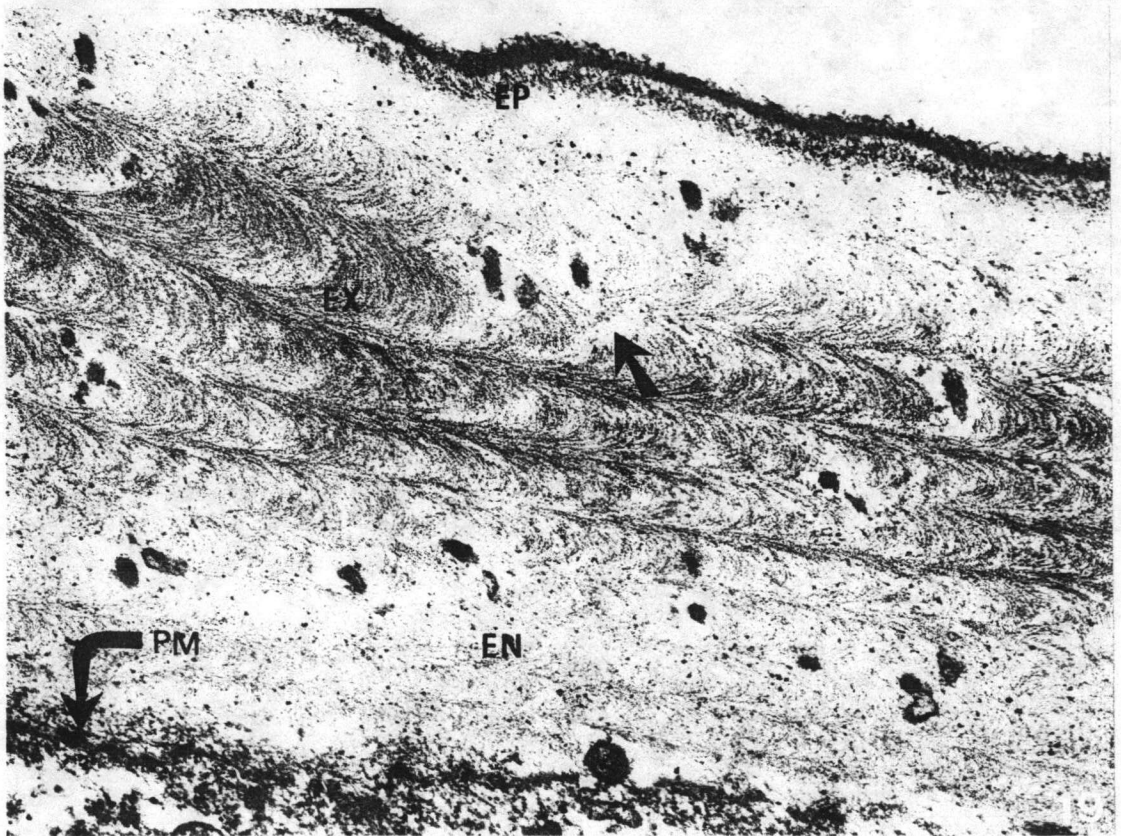
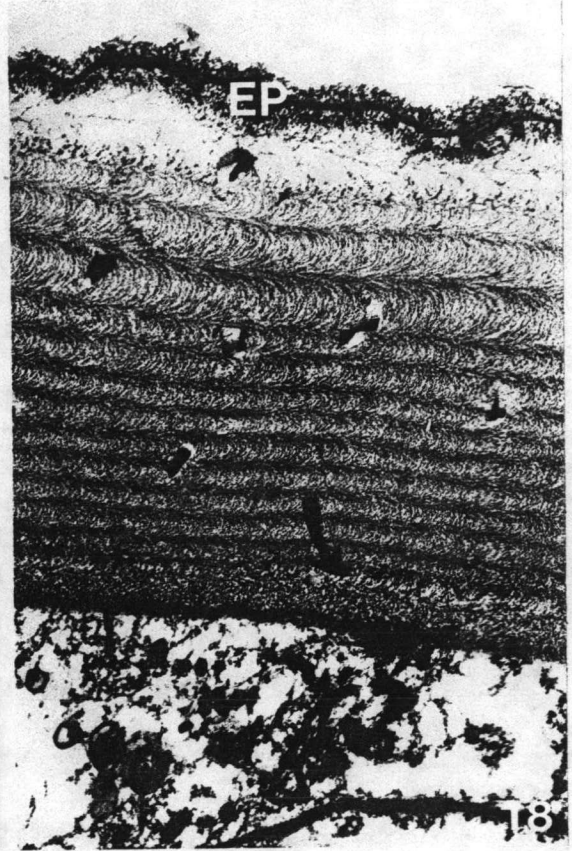
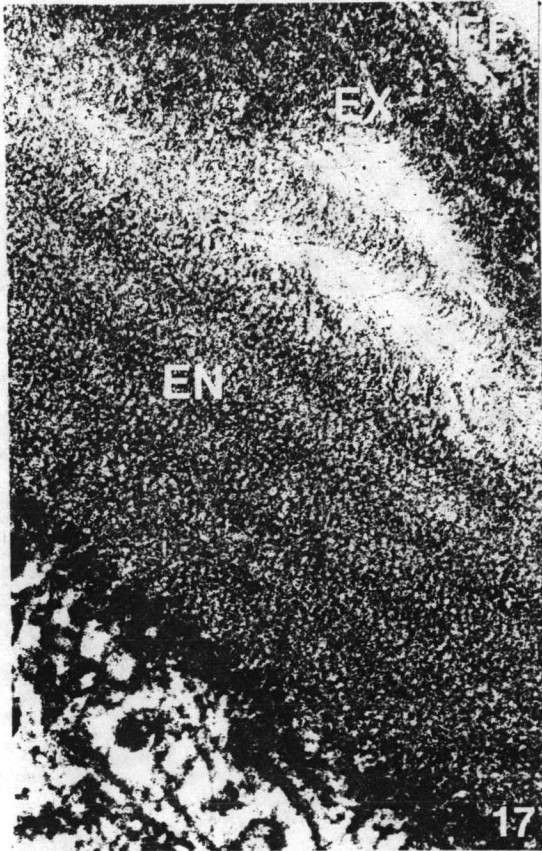
ข. ระยะระหว่างการลอกคราบ เปลือกที่อยู่ในระยะนี้มีชั้น endocuticle หนากว่าระยะหลังลอกคราบ แต่ความหนาของเปลือกกึ่งแช่บิวรี่ที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซuronจะลดลง (ภาพ 16) เหลือเพียง 2.๘5๘ ไมโครเมตร (เปลือกกึ่งแช่บิวรี่อ่อนจากกลุ่มควบคุมในระยะเดียวกัน (ภาพ 11) มีความหนา 3.๘๘๘ ไมโครเมตร) นอกจากนี้ยังไม่สามารถบอกความแตกต่างของชั้น exocuticle endocuticle และชั้น membranous layer ในเปลือกของกึ่ง

ที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซอรอนได้อย่างชัดเจน และ microfibrils จะบางลงและในบางบริเวณจะมีรูพรุน (ภาพ 16) จากภาพ 17 จะเห็นผลของสารไดฟลูเบนซอรอนที่เกิดกับโครงสร้างเปลือกกุ้งแซบิววัยอ่อนอย่างชัดเจนนั่นคือในบริเวณที่เป็นชั้น exocuticle จะมี microfibrils ที่เรียงตัวผิดไปมากโดยมีลักษณะเป็นคลื่นและไม่เป็นระเบียบทำให้ไม่สามารถแยกชั้นย่อยของ exocuticle ได้ ความหนาของเปลือกก็ลดลงเหลือเพียง 1.467 ไมโครเมตร ในบริเวณใกล้เคียงกันจะพบลักษณะโครงสร้างเปลือกที่เกือบปกติเห็นชั้นย่อยของ exocuticle และ endocuticle (ภาพ 18) แต่ไม่สามารถแยกชั้น exocuticle กับชั้น endocuticle ออกจากกันได้อย่างเด่นชัด และตรงชั้นย่อยของ endocuticle บริเวณที่ติดกับเซลล์เยื่อผิวหนังจะพบ microfibrils เรียงตัวอยู่อย่างไม่เป็นระเบียบ

สำหรับชั้น epicuticle ไม่พบโครงสร้างที่แตกต่างไปจากชั้น epicuticle ของกุ้งแซบิววัยอ่อนในกลุ่มควบคุม

อย่างไรก็ตามจากตัวอย่างของกุ้งแซบิววัยอ่อนกลุ่มที่เลี้ยงด้วยสารไดฟลูเบนซอรอนยังพบลักษณะที่มีเปลือกซ้อนกัน (ภาพ 20 และ 21) และมีโครงสร้างเปลือกที่ปกติ ชั้น endocuticle ของเปลือกเก่าจะบางเหลือน้อยลงกว่าระยะระหว่างการลอกคราบเนื่องจากอาจมีการย่อยสลายเพื่อนำกลับไปสร้างเปลือกใหม่ และในระยะนี้ยังเห็น plasma membrane plaques (ภาพ 21) ชัดเจนเช่นเดียวกับในระยะที่กุ้งแซบิววัยอ่อนเพิ่งลอกคราบใหม่ ๆ

- ภาพที่ 17 โครงสร้างเปลือกในระยะระหว่างการลอกคราบของกิ้งแกบวัยอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอน มีชั้น exocuticle ที่ microfibrils เรียงตัวผิดไปมาก โดย มีลักษณะเป็นคลื่น และไม่เป็นระเบียบทำให้ไม่สามารถแยกชั้นย่อยของชั้น exocuticle ได้ ความหนาของเปลือกลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเปลือกระยะเดียวกันในกิ้งแกบวัยอ่อนของกลุ่มควบคุม (EP : epicuticle ; EX : exocuticle ; EN : endocuticle) กำลังขยาย 63,000 เท่า
- ภาพที่ 18 โครงสร้างเปลือกระยะระหว่างการลอกคราบของกิ้งแกบวัยอ่อนบริเวณใกล้เคียงกับภาพที่ 17 ลักษณะโครงสร้างเปลือกเกือบปกติเห็นชั้นย่อยของชั้น exocuticle และชั้น endocuticle แต่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจนและตรงชั้นย่อยของ endocuticle บริเวณที่ติดกับเซลล์ผิวหนังจะพบ microfibrils เรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ (EP : epicuticle ; ลูกศร : บริเวณที่ microfibrils เรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ) กำลังขยาย 45,000 เท่า
- ภาพที่ 19 โครงสร้างเปลือกระยะหลังการลอกคราบของกิ้งแกบวัยอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอน ในภาพนี้เห็นชั้น exocuticle แตกต่างจากชั้น endocuticle อย่างชัดเจน แต่มีความผิดปกติในชั้น exocuticle คือมีการเรียงตัวของ microfibrils ในชั้นย่อยไม่สม่ำเสมอและ microfibrils ในบางบริเวณจะขาดหายไป (EP : epicuticle ; EXO : exocuticle ; EN : endocuticle ; PM : plasma membrane plaques ; ลูกศร : บริเวณที่ microfibrils ขาดหายไป) กำลังขยาย 48,000 เท่า



- ภาพที่ 20 โครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บิวย้วยอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอนในระยะก่อนการลอกคราบ เห็นลักษณะเปลือกใหม่และเก่าซ้อนกัน มีโครงสร้างเปลือกปกติ ชั้น endocuticle ของเปลือกเก่าจะบางกว่าระยะระหว่างการลอกคราบเนื่องจากอาจมีการย่อยสลายเพื่อนำไปสร้างเปลือกใหม่ (OEP : old epicuticle ; OEX : old exocuticle ; OEN : old endocuticle ; NEP : new epicuticle ; NEX : new exocuticle ; EPI : epidermis) กำลังขยาย 48,000 เท่า
- ภาพที่ 21 โครงสร้างเปลือกกุ้งแช่บิวย้วยอ่อนที่เลี้ยงในสารไดฟลูเบนซูรอนในบริเวณใกล้เคียงกับภาพที่ 20 จะเห็น plasma membrane plaque อยู่บนผิวของเซลล์เยื่อบุผิว (OC : old cuticle ; NC : new cuticle ; PM : plasma membrane plaque) กำลังขยาย 69,000 เท่า

