หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาเบื้องต้น

1.1 การทดลองวิธีการหาปริมาณสารไดฟลูเบนซูรอน เมื่อใช้วิธีของ Nimmo et al. (1979) ทดลองวิเคราะห์หาปริมาณสารไดฟลูเบนซูรอนที่ระดับความเข้มข้น 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าไม่มีความแตกต่างของกราฟจากระดับความเข้มข้นสารไดฟลูเบนซูรอนดังกล่าว (รูปที่ 3, 4, 5, 6 และ 7) ดังนั้นจึงไม่สามารถวัดหาปริมาณที่แท้จริงของระดับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ (0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร) อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้ได้นำสารไดฟลูเบนซูรอนที่มีเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ถึง 99.5 % มาใช้ และในขณะทำการทดลองได้มีการเตรียมสารไดฟลูเบนซูรอนในระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดลองแล้วนำมาเปลี่ยนน้ำในขวดทดลองใหม่ทุกวัน ดังนั้นจึงคาดว่ามีการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนในการทดลองครั้งนี้น้อยมาก การเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดจากการสลายตัวของสารไดฟลูเบนซูรอนภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้นซึ่งน้อยกว่าครึ่งชีวิตของสารไดฟลูเบนซูรอนที่มีผู้รายงานไว้ว่าอยู่ในช่วง 0.5 สัปดาห์ถึง 1 เดือน (Verloop et al., 1975 อ้างตาม Verloop and Ferrell, 1977 และ Marx, 1977)

1.2 การหาเวลาของรอบการลอกคราบในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน

รอบการลอกคราบในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนขนาดความยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร ที่มีอายุระหว่าง P_{10} ถึง P_{15} จะมีเวลาอยู่ในช่วง 2 - 5 วัน โดยมีเวลารอบของการลอกคราบ 2, 3, 4 และ 5 วัน คิดเป็น 36, 36, 16 และ 1 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 8) เมื่อนำเวลาของรอบการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนไปเปรียบเทียบกับครัสเตเซียนชนิดอื่น ๆ (ตารางที่ 26) พบว่าเวลาของรอบการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนใกล้เคียงกับของปูวัยอ่อน Rhithropanopeus harrisii นั่นคือเวลาของรอบการลอกคราบในปูวัยอ่อนอยู่ในช่วง

(ตารางที่ 26) พบว่าเวลาของรอบการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนใกล้เคียงกับของปูวัยอ่อน Rhithropaneus harrisii นั่นคือเวลาของรอบการลอกคราบในปูวัยอ่อนอยู่ในช่วง

ตารางที่ 26 เวลาของรอบการลอกคราบในครัสเตเชียนชนิดต่าง ๆ

ชนิด	อายุ	ขนาด	เวลาของรอบของการลอกคราบ	เอกสารอ้างอิง
Rhithropanopeus harrisii	fourth instar	-	117 - 150 ชั่วโมง	Freeman and Costlow, 1980
Petrolisthes cinctipes	adult	(ความกว้างของ carapace) 1.2 ซ.ม.	115 - 130 วัน	Kurup, 1964
Gecarcinus lateralis	adult	(ความกว้างของ carapace) 3.5 - 5.0 ซ.ม.	4 - 6 เดือน	Skinner, 1962
Panolirus argus	adult	(ความกว้างของ carapace) 8.0 - 8.9 ซ.ม.	65 - 70 วัน	Travis, 1955

117 - 150 ชั่วโมง (ประมาณ 4 - 6 วัน) ส่วนครัสเตเชียนชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ปูเสฉวน Petrolithes cinctipes ปู Gecarcinus lateralis และกุ้งมังกร Panulirus argus ซึ่งเป็นชนิดที่โตเต็มวัยแล้ว (adult) มีเวลาของรอบการลอกคราบอยู่ในช่วง 2 - 6 เดือน จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่าครัสเตเชียนที่อยู่ในวัยอ่อนจะมีเวลาของรอบการลอกคราบน้อยกว่าครัสเตเชียนที่โตเต็มวัยแล้ว เมื่อสังเกตขนาดของครัสเตเชียนที่โตเต็มวัยแล้วทั้ง 3 ชนิดพบว่าแม้ปูเสฉวน Petrolisthes cinctipes มีขนาดเล็กกว่ากุ้งมังกร Panulirus argus แต่ปูเสฉวนมีรอบการลอกคราบนานกว่า ดังนั้นในครัสเตเชียนต่างชนิดกันจะมีเวลาของรอบการลอกคราบต่างกันไปโดยไม่สัมพันธ์กับขนาดลำตัว สำหรับในครัสเตเชียนชนิดเดียวกันขนาดลำตัวจะสัมพันธ์กับเวลาของรอบการลอกคราบ เช่นในปูเสฉวนเวลาของรอบการลอกคราบจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อมีอายุและขนาดของปูมากขึ้นซึ่งอาจเนื่องจากมีความสัมพันธ์กับปริมาณเนื้อเยื่อที่ปูต้องสร้างเพิ่มขึ้นในแต่ละครั้งของการลอกคราบ (Passano, 1960)

1.3 การทดลองหาระดับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่มีผลต่อการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน

จากการใช้ระดับความเข้มข้นสารไดฟลูเบนซูรอน ๐.1, ๐.3, ๐.5, ๐.7 และ 1.๐ ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าระดับความเข้มข้น ๐.7 ไมโครกรัมต่อลิตรเป็นระดับที่เริ่มมีผลต่อการตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนโดยมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอะซิโตนและกลุ่มควบคุมน้ำทะเลอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (สำหรับที่ระดับความเข้มข้น ๐.5 ไมโครกรัมต่อลิตรจะแตกต่างจากกลุ่มอะซิโตนอย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมน้ำทะเล) (ตารางที่ 12) ซึ่งค่าระดับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่มีผลต่อกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนนี้ใกล้เคียงกับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่มีผลต่อปูวัยอ่อน Menippe mercenaria (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่มีผลต่อกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนนี้จะต่ำกว่าระดับความเข้มข้นที่มีผลต่อครัสเตเชียนชนิดอื่น ๆ (ตารางที่ 4) ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 1 - 1๐ ไมโครกรัมต่อลิตร แสดงว่าสารไดฟลูเบนซูรอนมีผลต่อกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมากกว่าครัสเตเชียนชนิดอื่น ๆ

จากผลการทดลองพบว่าใน 6 วันที่ทำการทดลองมีจำนวนการตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนแตกต่างกัน นั่นคือ วันที่ 4 มีการตายมากที่สุดถัดมาเป็นวันที่ 3, 5, 6, 2 และ 1 ตามลำดับ โดยวันที่ 4 มีค่าเฉลี่ยการตายมากกว่าวันที่ 6, 2 และ 1 อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 13) จากข้อมูลนี้แสดงว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจะตายมากในวันที่ 3 และวันที่ 4 ของการทดลอง และจากการสังเกตขณะทำการทดลองพบว่าการตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีความสัมพันธ์กับการลอกคราบนั่นคือจากการทดลองตอนที่หนึ่งพบว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีเวลารอบของการลอกคราบมากเป็น 2 และ 3 วัน ดังนั้นเมื่อถึงวันที่กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนลอกคราบคือวันที่ 3 และวันที่ 4 จึงมีการตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมากกว่าวันอื่น ๆ และเป็นการตายขณะทำการลอกคราบในลักษณะต่าง ๆ ผลการทดลองนี้สัมพันธ์กับคุณสมบัติของสารไดฟลูเบนซูรอนนั่นคือสารนี้มีความเป็นพิษสัมพันธ์กับการลอกคราบในแมลงวัยอ่อนโดยที่ระดับความเข้มข้น ๐.๐1 มิลลิกรัมต่อลิตรจะไม่ทำให้แมลงตายทันทีแต่จะแสดงอาการเมื่อถึงเวลาลอกคราบ (Mulder and Gijswijt, 1973) ซึ่งระดับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่มีผลการลอกคราบของแมลงวัยอ่อนนี้ (๐.๐1 มิลลิกรัมต่อลิตร) สูงกว่าระดับความเข้มข้นที่มีผลต่อการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน (๐.7 ไมโครกรัมต่อลิตร) ถึง 14 เท่า ดังนั้นจึงควรนำผลการทดลองนี้มาเป็นข้อควรระวังในการนำสารไดฟลูเบนซูรอนมาใช้เป็นยาฆ่าแมลงเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดผลกระทบต่อกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน นอกจากนี้จากผลการทดลองของ Nimmo et al. (1979) ซึ่งได้ใช้เวลาตลอดช่วงชีวิตของครัสเตเชียน Mysidopsis bahia ศึกษาผลของสารไดฟลูเบนซูรอนต่อระบบการสืบพันธุ์โดยใช้ระดับความเข้มข้นต่ำถึง ๐.๐75 ไมโครกรัม

ต่อลิตร พบว่ามีผลต่อระบบสืบพันธุ์ของครัสเตเชียนชนิดนี้โดยทำให้จำนวนตัวอ่อนของแม่แต่ละตัว (young/female) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จึงแสดงให้เห็นว่าแม้แต่ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำมากจนไม่สามารถวัดได้จากเครื่อง HPLC และ UV absorption detection สารไดฟลูเบนซูรอนก็ยังมีผลต่อครัสเตเชียนชนิดนี้ จึงขอเสนอแนะให้มีการศึกษาวิจัยผลของสารไดฟลูเบนซูรอนและสารยับยั้งการสร้างไคติน (chitin inhibitors) ชนิดอื่น ๆ ที่ได้นำมาใช้ในประเทศไทยต่อสัตว์ที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบชนิดต่าง ๆ ต่อไป

1.4 <u>การศึกษาเบื้องต้นโครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในระยะต่าง ๆ ของรอบการลอกคราบ</u>

1.4.1 <u>การศึกษาโครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในระดับกล้องจุลทัศน์ธรรมดา</u>

จากการศึกษาโครงสร้างเปลือกที่ระยะ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 และ 72 พบโครงสร้างเปลือกมีชั้น epicuticle, exocuticle และชั้น endocuticle เหมือนกันทุกระยะ จากการสังเกตขณะทำการเก็บตัวอย่างพบว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจะลอกคราบระหว่างช่วงเวลา 24.00 ถึง 06.00 น. เท่านั้น ซึ่งตรงกับข้อมูลที่พบในปูวัยอ่อน <u>Rhithropanopeus harrisii</u> (Freeman and Costlow, 1980) ที่เริ่มมีการลอกคราบที่ 24.00 น. และหลังจาก 05.00 น. แล้วจะไม่มีการลอกคราบอีกซึ่งเป็นเวลาที่ใกล้เคียงกัน เมื่อนำช่วงระยะ 66 ถึง 72 ซึ่งเป็นช่วงระยะที่กุ้งแชบ๊วยมีการลอกคราบมาแบ่งให้ละเอียดขึ้นเพื่อจะได้เห็นโครงสร้างก่อนและหลังการลอกคราบชัดเจนขึ้นโดยตัดระยะบางระยะที่มีโครงสร้างเหมือนกันออกไป ได้เป็นระยะ 24, 48, 67.5, 68.0, 68.5, 69.0, 69.5, 70.0, 70.5 และ 71 พบว่าเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีโครงสร้างแตกต่างกัน 3 แบบคือ โครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนระยะหลังการลอกคราบ ระยะระหว่างการลอกคราบและระยะก่อนการลอกคราบ โดยระยะตัวเลขที่ตั้งขึ้นไม่สามารถนำมากำหนดเป็นเวลาหลังการลอกคราบที่แท้จริงได้ และในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถใช้ staging technique ของรอบการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยรุ่นที่ Longmuir (1983) ทำไว้เนื่องจากกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีขนาดเล็กกว่ามากเห็นลักษณะต่าง ๆไม่ชัดเจน จึงไม่ได้รายงานผลเป็นระยะ A, B, C และ D ตามที่ Drach (1939 อ้างตาม Travis, 1955) กำหนดไว้ และเมื่อนำระยะทั้ง 3 ระยะมาใช้กับระยะที่เป็นตัวอักษรของ Drach (1939 อ้างตาม Travis, 1955) จะได้ระยะหลังการลอกคราบเป็นระยะ A และ ระยะ B ระยะระหว่างการลอกคราบเป็นระยะ C และ

ระยะก่อนการลอกคราบเป็นระยะ D เมื่อนำการเปลี่ยนแปลงในรอบของการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมาเปรียบเทียบกับครัสเตเชียนชนิดต่าง ๆ (Passano, 1960; Scheer, 1960; Skinner, 1962; Kurup, 1964; Freeman and Costlow, 1980 และ Aiken, 1980) จะได้ดังนี้คือ ในระยะ A และ B ซึ่งเป็นระยะหลังการลอกคราบนั้นในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีชั้น epicuticle, exocuticle และ endocuticle โดยชั้น endocuticle ค่อนข้างบาง สำหรับในระยะหลังการลอกคราบใหม่ ๆ (A) เปลือกครัสเตเชียนจะนิ่มและมีการดูดซับน้ำเข้าลำตัว ครัสเตเชียนจะยังไม่กินอาหาร ต่อมาเมื่อเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบตอนปลาย (B) เปลือกจะแข็งขึ้นเล็กน้อยและเริ่มมีการสร้างชั้น endocuticle ในครัสเตเชียนหลายชนิด ระยะระหว่างการลอกคราบซึ่งตรงกับระยะ C เปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจะหนามากที่สุดมีชั้นต่าง ๆ ครบทุกชั้น ในระยะนี้ในครัสเตเชียนจะมีเปลือกแข็ง ชั้น endocuticle สร้างเสร็จตอนปลายระยะ C และโครงสร้างเปลือกจะสมบูรณ์เมื่อมีระยะ membranous layer ส่วนระยะ D ในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจะมีเปลือกซ้อนกันโดยเปลือกเก่าอยู่ใต้เปลือกใหม่ เปลือกเก่ามีชั้น epicuticle, exocuticle และ endocuticle ครบทุกชั้นแต่ endocuticle จะบางกว่าระยะระหว่างการลอกคราบซึ่งอาจเนื่องจากมีการดูดซับกลับเหมือนกับครัสเตเชียนชนิดอื่น ๆ ในระยะ D_3 สำหรับเปลือกใหม่ในระยะ D ในระดับกล้องจุลทัศน์ธรรมดาจะเห็นเฉพาะชั้น epicuticle และชั้น exocuticle เท่านั้น ระยะก่อนการลอกคราบนี้ในครัสเตเชียนมีการเปลี่ยนแปลงแบ่งเป็นระยะย่อย ๆ ได้หลายระยะ เริ่มจากมีการแยกของเซลเยื่อบุผิวออกจากเปลือก (D_0) ต่อมาเซลเยื่อบุผิวสร้างชั้น epicuticle (D_1) และชั้น exocuticle (D_2) และมีการดูดซับสาร (resorption) จากเปลือกเก่า (D_3) เปลือกเริ่มมีรอยแตกพร้อมที่จะลอกคราบ (D_4) แล้วเข้าสู่ระยะลอกคราบ (E) สำหรับกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถแยกละเอียดโครงสร้างเปลือกเป็นระยะย่อยดังกล่าวได้เนื่องจากเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนเกาะติดอยู่กับ epidermis อย่างบอบบางมาก ในการเตรียมตัวอย่างกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมักจะเกิดปัญหาจากการตัดเนื่องจากความแข็งของเปลือกกับความแข็งของเนื้อเยื่อที่อยู่ใต้เปลือกต่างกันเกิดมีการฉีกขาดระหว่างเปลือกกับชั้น epidermis ทำให้สับสนกับระยะที่มีการแยกของเซลเยื่อบุผิวออกจากเปลือก (D_0)

ในรอบการลอกคราบนอกจากมีการเปลี่ยนแปลงของชั้นต่าง ๆ ของเปลือกตามระยะที่กำหนดไว้ เซลเยื่อบุผิวก็มีการเปลี่ยนแปลงตามระยะของรอบการลอกคราบเช่นเดียวกัน สำหรับกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนระยะหลังการลอกคราบและระยะระหว่างการลอกคราบจะมีความสูงของเซลเยื่อบุผิวใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบขนาดของเซลจะขยายใหญ่ขึ้นเกือบ

2 เท่า ส่วนในปูวัยอ่อน Rhithropanopeus harrisii (Freeman and Costlow, 1980) เมื่อเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบเซลเยื่อบุผิวจะขยายใหญ่ขึ้น และมีขนาดลดลงเมื่ออยู่ในระยะระหว่างการลอกคราบ โดยในระยะก่อนการลอกคราบเซลเยื่อบุผิวจะขยายใหญ่อีกครั้งหนึ่งคาดว่าอาจเป็นการสะสมและสร้างสารตั้งต้นในการสร้างเปลือกเอาไว้ภายในเซล เซลเยื่อบุผิวของปูก้ามดาบในระยะก่อนการลอกคราบจะมีความสูงมากขึ้นและภายในเซลมี organelles ซับซ้อน (Green and Neff, 1972)

การติดสีในชั้น epicuticle ของเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน ถ้าย้อมด้วย H & E จะติดสีม่วงเข้มอมชมพู ส่วนในกุ้งมังกร Orconectes sanborni จะมีชั้น epicuticle ติดสีน้ำเงิน (Stevenson, 1968) ถ้าย้อมตามวิธี Mallory triple stain epicuticle ของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจะติดสีน้ำเงิน แต่ในปูและกุ้งมังกรติดสีแดง (Erri Babu et al., 1985 และ Stevenson, 1968) การติดสีต่างกันนี้คาดว่าเกิดเนื่องจากองค์ประกอบของสารที่อยู่ในชั้น epicuticle ในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนแตกต่างจากครัสเตเชียนชนิดอื่น และจากการทดสอบด้วย PAS ปรากฏว่า epicuticle ชั้นนอกของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนติดสีชมพูปนแดง ส่วนชั้นในติดสีม่วงจาง การติดสีของ epicuticle มีลักษณะแสดงว่ามีสารพวก carbohydrates อยู่ซึ่งตรงกับรายงานของ Erri Babu et al., 1985 แต่ค้านกับรายงานจากการศึกษาองค์ประกอบของโครงสร้างเปลือกที่ว่าชั้น epicuticle ไม่มีสารพวก carbohydrate แต่มีสาร lipoprotein (ตารางที่ 6) ชั้น exocuticle ของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจะติดสีน้ำเงินเข้มเมื่อย้อมด้วย H & E และเมื่อทำปฏิกริยากับ PAS ติดสีฟ้าใน Mallory triple stain และ Masson trichrome stain ซึ่งต่างกับ exocuticle ในปู Menippe rumphii ที่ติดสีน้ำเงินอมส้มเมื่อย้อมด้วย Mallory triple stain ส่วนชั้น endocuticle ของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนติดสีชมพูจางและชมพูเมื่อย้อมด้วย H & E และทำปฏิกริยากับ PAS ติดสีฟ้าอ่อนเมื่อย้อมด้วย Mollary triple stain และ Masson trichrome stain ซึ่งใกล้เคียงกับการติดสีของชั้น endocuticle ในปู Menippe rumphii ซึ่งติดสีน้ำเงินใน Mallory triple stain

1.4.2 การศึกษาโครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในระดับกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน

จากการกำหนดระยะการเก็บตัวอย่างเป็นระยะ 24, 48, 67.5, 68, 68.5, 69.0, 69.5, 70, 70.5 และ 72.0 พบโครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนแตกต่างกัน 3 แบบคือ ระยะโครงสร้างเปลือกหลังการลอกคราบใหม่ ๆ มีชั้น epicuticle, exocuticle และ endocuticle โดยชั้น endocuticle ในระยะนี้ค่อนข้างบาง (ภาพ 7,

8 และ 13) ระยะต่อมาเป็นระยะที่อยู่ระหว่างการลอกคราบ ในระยะนี้ชั้น endocuticle มีความหนามากขึ้น และเริ่มมีการสร้างชั้น membranous layer บ้างเล็กน้อย (ภาพ 11 และ 14) ในระยะสุดท้ายก่อนการลอกคราบเป็นระยะที่มีชั้นต่าง ๆ ครบทุกชั้น มีของเหลวที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบ (molting fluid) อยู่ระหว่างชั้นของ membranous layer และเซลเยื่อบุผิว

ชั้น epicuticle ของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน (ภาพที่ 9) มีชั้นย่อย 6 ชั้น เหมือนกับปูก้ามดาบ (Fiddler crab) (Green and Neff), 1972 และปูน้ำกร่อย Rhithropaneus harrisii (Christianson and Costlow, 1982) แต่แตกต่างกันตรงรายละเอียดของโครงสร้างในบางชั้น เช่น ชั้นนอกสุดในปูน้ำกร่อยจะมีส่วนที่ยื่นออกไปค่อนข้างยาวและแยกเป็นเส้นเห็นชัดเจนจากฐานที่ค่อนข้างเรียบติดสีเข้มตลอด แต่ในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจะมีลักษณะเป็นเส้นพันกันโดยตรงฐานของเส้นมี electron dense กลุ่มเล็ก ๆ มาเรียงต่อกันตลอดความยาว ในปูก้ามดาบโครงสร้างในชั้นย่อยแรกนี้ไม่เรียบเป็นเนื้อเดียวกันและไม่มีส่วนยื่นออกมา สำหรับชั้นย่อยที่ 6 ของชั้น epicuticle ในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจะค่อนข้างกว้างและมีเส้นใยที่เรียงกันไม่เป็นระเบียบ ติดสีเข้มกระจายอยู่ตามความยาวของชั้นนี้ แต่ในปูน้ำกร่อยชั้นย่อยที่ 6 จะมีลักษณะเรียบตามแนวนอน และในปูก้ามดาบชั้นย่อยที่ 6 ของชั้น epicuticle มีโครงสร้างลักษณะเป็นแท่งตามขวางติดสีทึบและระหว่างแท่งจะมีสีจางสลับกันไป ตรงปลายแท่งจะเรียวลงและมีปลายแหลมแทรกเข้าไปในส่วนบนของชั้น exocuticle ภายในแท่งมีแกนเล็ก ๆ (strands) ติดสีเข้มมาก สำหรับชั้นย่อย 3 ชั้นแรกของชั้น epicuticle ในครัสเตเซียนทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวอาจเปรียบเทียบได้กับชั้น cuticulin ในแมลง ส่วนชั้นย่อยที่ 4 - 6 เปรียบเทียบได้กับชั้น protein epicuticle (Locke, 1976b)

ชั้น exocuticle ของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีชั้นย่อยสีทึบและสีจางสลับกันเหมือนกับ decapods ชนิดอื่น ๆ (Green and Neff, 1972 และ Giraud-Guille, 1984) โดยจะมีการโค้งของ microfibrils จากชั้นย่อยสีทึบชั้นแรกมายังชั้นย่อยสีทึบถัดมาเกิดเป็นชั้นย่อยสีจางเรียกลักษณะการเรียงตัวแบบนี้ว่า helicoidal structure (Neville, 1970 อ้างตาม Romoser, 1981) นอกจากนี้ยังพบว่าชั้น exocuticle ของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีการเรียงตัวของ microfibrils ที่เป็นระเบียบมากกว่าชั้น exocuticle ในปูก้ามดาบ สำหรับในแมลงถัดจากชั้น epicuticle ลงมาจะเป็นชั้นใหญ่อีกเพียงชั้นเดียวเรียกว่า lamellar procuticle หรือ fibrous cuticle (Locke, 1976a และ 1976b) ซึ่งโดยทั่วไปจะมีลักษณะการเรียงตัวของ microfibrils แบบ helicoidal structure เช่นเดียวกับกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน

ชั้น endocuticle ของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีชั้นย่อยและมีการเรียงตัวของ microfibrils คล้ายกับชั้น exocuticle โดยชั้นย่อยของชั้น exocuticle จะหนากว่าชั้นย่อยในชั้น endocuticle และมีสีเข้มกว่า (ภาพที่ 7) แต่จำนวนชั้นย่อยของชั้น exocuticle จะน้อยกว่าชั้นย่อยในชั้น endocuticle ลักษณะความหนาของชั้นย่อยของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนนี้จะแตกต่างกับปูก้ามดาบและปูชายฝั่งแอตแลนติก (Green and Neff, 1987 และ Giraud-Guille, 1984) ตรงที่ชั้นย่อยในชั้น endocuticle ของปูจะหนากว่าชั้นย่อยของชั้น exocuticle

membranous layer เป็นชั้นที่อยู่ด้านในสุดของเปลือกติดกับเซลเยื่อบุผิว ในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนลักษณะชั้นย่อยของชั้น membranous layer มีความหนาน้อยกว่าชั้น exocuticle และ endocuticle และแต่ละชั้นย่อยของ membranous layer จะหนาใกล้เคียงกัน ซึ่งลักษณะนี้คล้ายกับชั้น membranous layer ของปูชายฝั่งแอตแลนติก (Giraud-Guille, 1984) และกุ้งมังกร Homarus (Aiken, 1980)

นอกจากนี้โครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนยังมี plasma membrane plaques และ pore canal ซึ่งพบทั้งในครัสเตเชียนและในแมลง (Green and Neff, 1972; Giraud-Guille, 1984 และ Locke, 1976a และ b) plasma membrane plaques ในแมลงมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเรียง (deposition) ของชั้น cuticulin และชั้น fibrous cuticle (Locke, 1976a) ส่วน pore canal เป็นท่อที่เชื่อมระหว่างชั้น epicuticle และเซลเยื่อบุผิว (Locke, 1976b และ Filshie, 1982) ภายในมีสารที่ส่งออกมาจากเซลเยื่อบุผิวซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการสร้างเปลือก

2. ผลของสารไดฟลูเบนซูรอนต่อโครงสร้างเปลือกระยะต่าง ๆ ในรอบการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน

สำหรับการศึกษาผลของสารไดฟลูเบนซูรอนต่อโครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนภายใต้กล้องจุลทัศน์ธรรมดาพบว่า กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีระยะ 3 ระยะเหมือนกับกลุ่มควบคุม ส่วนความแตกต่างทางด้านโครงสร้างเปลือกพบว่าชั้น endocuticle ของเปลือกของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนทุกระยะมีความหนาน้อยกว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในหน่วยควบคุม ซึ่งจะได้เด่นชัดเจนจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน

การเก็บตัวอย่างกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในระยะ 67.5 ถึงระยะ 72 นั้นปรากฏว่าจำนวนกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่ลอกคราบแล้วและจำนวนที่ยังไม่ได้ลอกคราบมีข้อแตกต่างกันระหว่างกุ้งแชบ๊วยใน

กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เลี้ยงด้วยสารไดฟลูเบนซูรอน (ตารางที่ 23 และ 25) เนื่องจากในกลุ่มควบคุมกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนเริ่มลอกคราบตั้งแต่ระยะ 67.5 (1.30 น.) แต่ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยสารไดฟลูเบนซูรอนจะเริ่มลอกคราบที่ระยะ 70.5 (4.30 น.) ซึ่งมีเวลาห่างกันถึง 3 ชั่วโมง การที่มีเวลาลอกคราบห่างกันดังกล่าวนี้ไม่น่าจะเกิดความแปรปรวนของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนแต่ละตัว (individual variation) เนื่องจากกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่ใช้ทดลองมาจากชุดเดียวกัน จึงสันนิษฐานว่า การที่กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยสารไดฟลูเบนซูรอนลอกคราบช้าลงอาจเนื่องจากสาเหตุดังนี้คือ

1. โครงสร้างเปลือกที่สร้างใหม่อ่อนแอทำให้มีปัญหาในการพยายามที่จะสลัดเปลือกเก่าออกเนื่องจากการทำงานของกล้ามเนื้อและเปลือกไม่สัมพันธ์กัน

2. จากที่มีการให้สารไดฟลูเบนซูรอนตั้งแต่หลังจากกุ้งแชบ๊วยลอกคราบใหม่ ๆ (ตอนที่นำมาจัดกลุ่มเป็นระยะต่าง ๆ) ซึ่งในระยะนั้นการสร้างเปลือกยังไม่เสร็จสมบูรณ์ ดังนั้นเปลือกที่สร้างในช่วงนั้นอาจจะมีปัญหาเกิดขึ้นเมื่อใส่สารไดฟลูเบนซูรอนลงไป ซึ่งตามที่ Locke (1970a อ้างตาม Locke, 1976a) กล่าวไว้ว่าในช่วงระยะระหว่างการลอกคราบ (intermolt) fibrous cuticle (lamellate cuticle) จะมีการวางตัว (deposition) อย่างต่อเนื่อง และเมื่อถึงเวลาที่จะเริ่มการลอกคราบใหม่อีกครั้งหนึ่งสมองจะสั่งงานไปที่ prothoracic gland ทำให้มีการสร้างเปลือกอย่างรวดเร็ว ต่อจากนั้นจะมีการสร้าง ecdysial droplets ซึ่งมีสารที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเปลือกเก่าเพื่อเตรียมการลอกคราบครั้งใหม่อีกครั้งหนึ่ง แต่ถ้าสารไดฟลูเบนซูรอนไปหยุดยั้งการสร้างไคตินในเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาในการสร้างเปลือกตามขั้นตอนดังกล่าว จึงอาจจะเกิดความไม่พร้อมในการลอกคราบครั้งใหม่ทำให้กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนลอกคราบช้ากว่าปรกติได้

ในการทดลองนี้พบว่าสารไดฟลูเบนซูรอนมีผลต่อโครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนทั้งในระยะหลังการลอกคราบใหม่ ๆ (postmolt) และระยะระหว่างการลอกคราบ (intermolt) ในระยะหลังการลอกคราบใหม่ ๆ โครงสร้างเปลือกที่ผิดปรกติจะพบในชั้น exocuticle และชั้น endocuticle เหมือนกับที่เกิดขึ้นกับในปูวัยอ่อน Rhithropanopeus harrisii (Christiansen and Costlow, 1982) คือในชั้น exocuticle จะมีลักษณะการเรียงของ microfibrils ไม่เป็นระเบียบ โดย Christiansen และ Costlow (1982) ได้อธิบายว่ามีการบวมของชั้น exocuticle ส่วนชั้น endocuticle มีความหนาน้อยกว่าในกลุ่มควบคุม และ Mulder and Gijswijt (1973) ทดลองในแมลงพบว่าถ้าให้สารไดฟลูเบนซูรอนแก่แมลงวัยอ่อนก่อนการลอกคราบ 24 ชั่วโมง จะทำให้แมลงวัยอ่อนที่ลอกคราบใหม่มีเปลือก

เฉพาะชั้น epicuticle และชั้น exocuticle เท่านั้น สำหรับลักษณะโครงสร้างรูปร่างกลม (globular bodies) ซึ่งเกิดขึ้นในชั้น endocuticle ของแมลงวัยอ่อน (Mulder and Gijswijt, 1973) และ Binnington, 1985) นั้นไม่พบทั้งในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนและปูวัยอ่อน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าการให้ระดับความเข้มข้นสารไดฟลูเบนซูรอนค่อนข้างสูงในแมลงวัยอ่อน (ระดับมิลลิกรัมต่อลิตร) จึงทำให้พบลักษณะความผิดปรกติแตกต่างออกไป

นอกจากนี้ผลของสารไดฟลูเบนซูรอนต่อกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนยังเกิดขึ้นในระยะระหว่างการลอกคราบด้วย ในการทดลองนี้เมื่อกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนลอกคราบ (มีเปลือกอยู่ในขวดเวลา ๐๖.๐๐ น.) แล้วจึงใส่สารไดฟลูเบนซูรอนลงไป ดังนั้นระยะที่ใส่สารไดฟลูเบนซูรอนจะเป็นระยะหลังการลอกคราบใหม่ ๆ ซึ่งตามปรกติในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในกลุ่มควบคุมจะมีโครงสร้างชั้น epicuticle exocuticle และ endocuticle โดยพบชั้น endocuticle ค่อนข้างบางและจะต้องมีการสร้างชั้น endocuticle ต่อไปอีกในระยะระหว่างการลอกคราบ เมื่อมีสารไดฟลูเบนซูรอนมาเข้าสู่ระบบอาจจะทำให้การสร้างเปลือกหยุดชะงัก สิ่งที่น่าจะเกิดขึ้นคือ ชั้น endocuticle จะบางกว่าในกลุ่มปรกติ ส่วนชั้น epicuticle และชั้น exocuticle ที่สร้างไปแล้วไม่น่าจะมีผลอะไร จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารไดฟลูเบนซูรอนมีผลทำให้เปลือกในชั้น endocuti บางลงตามที่คาดไว้ พร้อมทั้งการเรียงตัวของ microfibrils มีความผิดปรกติทั้งในชั้น exocuticle และชั้น endocuticle การเกิดความผิดปรกติในชั้น exocuticle ซึ่งสร้างเสร็จก่อนการลอกคราบหรือก่อนการใส่สารไดฟลูเบนซูรอนนี้อาจเกิดจากหลังการลอกคราบใหม่ ๆ ซึ่งการวางตัวของ microfibrils หรือโครงสร้างในชั้น exocuticle ยังไม่มีแข็งแรงเพียงพอ เนื่องจากการสร้างความแข็งของเปลือกครัสเตเชียนด้วยสารอนินทรีย์ (mineralization) (Passano, 1960) และสารอินทรีย์ (sclerotization) (Summers, 1967) จะเกิดขึ้นในระยะหลังการลอกคราบ สารไดฟลูเบนซูรอนจึงอาจมีผลทำให้การเรียงตัวของ microfibrils และโครงสร้างเปลือกผิดปรกติไปเนื่องจากเปลือกยังไม่แข็งพอ