บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

ก. อุปกรณ์ เทคนิค และสภาวะที่ใช้ในการวิจัย

1. การเตรียมน้ำทะเล

นำน้ำทะเลมาปรับให้ได้ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วนด้วยน้ำประปา (ที่ทิ้งไว้ 7 วัน พร้อมทั้งให้อากาศเพื่อให้คลอรีนระเหยไป) แล้วจึงนำมากรองด้วยแผ่นกรอง GF/C เพื่อกำจัดสิ่งแขวนลอยในน้ำ อุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเพื่อฆ่าเชื้อโรคบางชนิดเช่น Zoothamnium spp. เป็นต้น ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วให้อากาศเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 7 วัน เก็บไว้เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ขอความอนุเคราะห์กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน (post larva) อายุประมาณ 1 - 5 วัน จากสถานีประมงน้ำจืดฉะเชิงเทรา ทำการขนส่งจากสถานีประมงมายังห้องทดลองของภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล โดยใส่ถุงพลาสติกขนาด 40 x 60 เซนติเมตร จำนวนประมาณ 1000 ตัวต่อ 1 ถุงแล้วอัดออกซิเจน นำมาบรรจุในถังและลดอุณหภูมิลง 1 - 3 องศาเซลเซียสโดยใช้น้ำแข็งผสมกับขี้เลื่อยใส่ระหว่างถุงพลาสติก เมื่อถึงห้องทดลองนำกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมาเลี้ยงในตู้กระจก (aquarium) ขนาด 100 ลิตร จากนั้นค่อย ๆ ปรับอุณหภูมิและความเค็มให้อยู่ในสภาวะที่จะทดลองโดยเพิ่มหรือลดความเค็มครั้งละ 1 ส่วนในพันส่วนและอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียสต่อ 1 วัน เพื่อให้ได้ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วนและอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นสภาวะปรกติที่ปรากฏในการอนุบาลกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนโดยทั่วไป แล้วจึงเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนให้คุ้นกับอุณหภูมิและความเค็มดังกล่าวอย่างน้อย 7 วัน ตลอดระยะเวลาที่เลี้ยงจะให้ไรน้ำเค็มวัยอ่อน Artermia salina เป็นอาหารวันละ 2 ครั้งคือตอนเช้าเวลา 8.00 น. และตอนเย็นเวลา 16.00 น. โดยในตู้กระจกที่ใช้เลี้ยงจะให้อากาศตลอดเวลา เปลี่ยนน้ำทุกวัน ๆ ละ 2 ใน 3 ของปริมาตรน้ำในถังพร้อมทั้งดูดตะกอนและเศษอาหารออก

ก่อนวันทดลองเลือกเอากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนขนาดประมาณ 10 มิลลิเมตร (P_{10-15}) มาใส่ในขวดทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 8.5 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุน้ำที่ใช้ในการทดลอง 50 มิลลิลิตร ใส่กุ้งขวดละ 1 ตัว จนครบตามจำนวนที่ต้องการแล้วจึงนำมาตั้งเรียงกันในถาดขนาดกว้าง 10 เซนติเมตร ยาว 160 เซนติเมตร สูง 16 เซนติเมตร และใช้เครื่องปรับอุณหภูมิ (thermostat) ปรับอุณหภูมิของน้ำในถาดให้เป็น 28 องศาเซลเซียส ให้เวลาของแสงกลางวัน : กลางคืนเท่ากับ 12 : 12 และให้อาหารวันละ 2 ครั้งตามเวลาเดิม ในวันถัดมาเวลา 06.00 น. จะเลือกเอากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่ลอกคราบแล้ว (พบคราบเปลือกภายในขวด) มาจัดเป็นหน่วยของการทดลองต่อไป

3. <u>สารไดฟลูเบนซูรอน</u>

ขอความอนุเคราะห์สารไดฟลูเบนซูรอนมาตรฐานที่เปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ 99.5 % จากกองวัตถุมีพิษการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อใช้ในการทดลอง โดยเตรียม stock solution ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรในตัวทำละลายอะซิโตน (acetone) เมื่อถึงวันที่ทดลองในแต่ละวันจะเตรียมความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรจาก stock solution โดยใช้น้ำทะเลที่เตรียมไว้เป็นตัวเจือจางเพื่อเตรียมความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดลองโดยจะเปลี่ยนน้ำใหม่ในปริมาณ 2 ใน 3 ของขวดทุกวัน

การวิเคราะห์ปริมาณสารไดฟลูเบนซูรอนที่มีอยู่จริงในน้ำจะทำเฉพาะในการทดลองความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่มีผลต่อการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนเท่านั้น โดยนำน้ำที่ความเข้มข้นเดียวกันในแต่ละขวดมารวมกันให้ได้ 1 ลิตรในวันสุดท้ายของการทดลอง นำน้ำปริมาณดังกล่าวมาสกัดด้วย diethyl ether และ petroleum ether ในอัตราส่วน 1 : 1 และวิเคราะห์ปริมาณสารโดยใช้ High Pressure Liqued Chromatography (HPLC) ที่มี UV-absorption detector (Nimmo et al., 1979)

4. <u>การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์ธรรมดา</u> มีขบวนการดังต่อไปนี้

นำกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมาดองในน้ำยาดอง Bouin นาน 24 ชั่วโมง

↓

ล้างด้วย 50 % ethyl alcohol หลาย ๆ ครั้งจนไม่มีสีเหลืองติดที่ลำตัวกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน

เก็บที่ 70 % ethyl alcohol

↓

นำตัวอย่างมาผ่านขบวนการต่าง ๆ เพื่อเตรียมศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์ธรรมดา โดยนำเข้าเครื่อง automatic tissue processor ซึ่งมีน้ำยาตามลำดับดังนี้

↓

70 % ethyl alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง

↓

95 % ethyl alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง

↓

100 % ethyl alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง

↓

xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง

↓

infiltrate ด้วย paraplast ที่ 54 องศาเซลเซียส (2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง)

↓

ฝังตัวอย่าง (embed) ในก้อนพาราฟิน

↓

ตัดตามยาว (longitudinal section) ด้วยเครื่อง microtome ที่ความหนา 6 ไมครอน

↓

ใช้แผ่นสไลด์ช้อนชิ้นตัวอย่างขึ้น แล้วนำมาวางให้ปลายด้านหนึ่งของแผ่นสไลด์ติดกับกระดาษซับรอจนแผ่นสไลด์แห้ง

↓

นำไปใส่ตู้ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียสเพื่อละลายพาราฟินบางส่วนในชิ้นเนื้อเยื่อออก

↓

นำตัวอย่างบนแผ่นสไลด์ไปย้อมสี 4 ชนิดคือ hematoxylin & eosin, Masson trichrome stain, Mallory triple stain และทำปฏิกริยากับ Periodic Acid/Schiff (PAS) (Humason, 1979)

↓

นำสไลด์ที่ย้อมสีแล้วไปศึกษาโครงสร้างเปลือกภายใต้กล้องจุลทัศน์ธรรมดา

5. <u>การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน</u>

นำเอา carapace ของกุ้งแชบ๊วยมาตัดส่วนด้านหน้าออกเพื่อให้น้ำยาดองแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อกุ้งได้เร็วขึ้นโดยขณะที่ตัดชิ้นกุ้งจะแช่อยู่ในน้ำยาดอง (2.5 % glutaraldehyde ใน 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 ซึ่งเตรียมจากน้ำทะเลและน้ำกลั่นอย่างละ 50 %) ตลอดเวลา ตัดชิ้นเนื้อเยื่อให้ได้ขนาด 1 x 1 ตารางมิลลิเมตร แช่ในน้ำยาดองอีก 4 ชั่วโมง โดยใช้น้ำยาดองอย่างน้อย 10 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

↓

ล้างตัวอย่างที่ดองแล้วด้วย 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

↓

นำมาดองครั้งที่ 2 (postfix) ใน 1 % osmium tetroxide (O_sO_4) ใน 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

↓

ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

↓

ย้อมด้วย 5 % uranyl acetate 2 ชั่วโมง

↓

เอาน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยใช้ ethyl alocohol ที่ความเข้มข้นจากน้อยไปหามากดังนี้

↓

30 % 15 นาที

↓

50 % 15 นาที

↓

70 % 15 นาที

↓

80 % 15 นาที

95 % 15 นาที

↓

100 % 5 นาที

↓

100 % 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

↓

แล้วนำตัวอย่างแช่ใน propylene oxide ซึ่งเป็นตัวละลายกลาง (intermediate solvent) ระหว่าง ethyl alcohol และ Araldite (จากการทดลองเบื้องต้นพบว่า araldite เป็น embedding medium ที่เหมาะสมที่สุด) 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

↓

ใช้สาร araldite แทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อตัวอย่างโดยค่อย ๆ แทนที่ propylene oxide ทีละน้อย (infiltration) ตามขบวนการดังนี้

propylene oxide : araldite (1 : 1) เหวี่ยงใน rotator 3 ชั่วโมง

↓

ดูดเอา propylene oxide : araldite (1 : 1) ออกครึ่งหนึ่งแล้วเติม araldite เข้าไปแทนที่ในปริมาณเท่ากัน เหวี่ยงใน rotator 4 ชั่วโมง

↓

ดูดสารเคมีจากขั้นตอนข้างต้นออกหมดแล้วเติม araldite เหวี่ยงใน rotator 1 ชั่วโมง

↓

นำเข้า vacuum dessicator เพื่อช่วยการแทรกซึมให้เร็วขึ้น ทิ้งค้างคืน (12 ชั่วโมง)

↓

นำออกจาก vacuum dessicator เหวี่ยงด้วย rotator 6 ชั่วโมง

↓

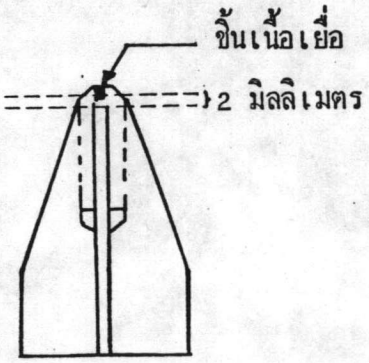
ฝังตัวอย่างใน araldite โดยใช้ beam capsule เป็นแบบ (mould)

↓

อบเพื่อให้เกิดการโพลีเมอไรซ์ (polymerize) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

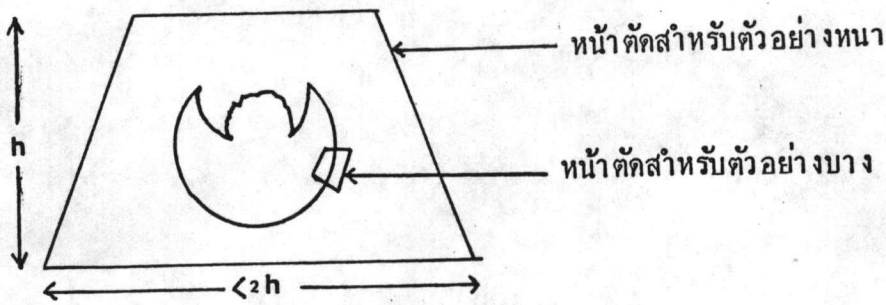
ตัดตัวอย่างโดยใช้มีดแก้ว (glass knife) ซึ่งเตรียมโดยการนำแท่งแก้ว (glass strips) มาทำความสะอาดด้วยน้ำอุ่นและผงซักฟอกโดยระวังไม่ให้ขอบของแก้วไปกระทบกับสิ่งอื่น ๆ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น เช็ดด้วยผ้าที่ไม่มีขนแล้วใช้เครื่องทำมีด (glass knife breaker) ตัดแท่งแก้วออกเป็นรูปสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาดประมาณ 1 x 1 นิ้ว แล้วตัดแก้วรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสอีกครั้งตามแนวเส้นทะแยงมุมออกเป็น 2 ส่วน จะได้มีดแก้วเป็นรูปสามเหลี่ยม 2 ชิ้น ชิ้นทางขวานำไปใช้ตัดตัวอย่างหนา (thick section) ส่วนชิ้นทางซ้ายเก็บไว้ตัดตัวอย่างบาง (Ultrathin section)

นำตัวอย่างมาใส่ในเครื่องมือยึดตัวอย่าง (specimen holder) โดยให้ส่วนของก้อน block ตัวอย่างยื่นออกมาจากเครื่องมือยึดตัวอย่างประมาณ 2 มิลลิเมตร (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การวางตัวอยางในที่จับตัวอย่าง

ในขั้นแรกตัดพลาสติกส่วนเกินออกไปก่อน (block trimming) โดยมองตัวอย่างผ่านกล้องจุลทัศน์ที่ใช้ตัดตัวอย่าง (disecting microscope) ยึดตัวอย่างไว้ให้แน่น จากนั้นใช้มีดโกน (ที่เช็ดด้วยอะซิโตน เพื่อละลายไขมันที่เคลือบใบมีดอยู่ออก) เฉือนพลาสติกส่วนหน้าตัดที่คลุมอยู่บนเนื้อเยื่อออกไปก่อน แล้วเริ่มเฉือนส่วนข้างของตัวอย่างให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู ให้ความยาวด้านฐานน้อยกว่า 1.5 มิลลิเมตร สำหรับการตัดตัวอย่างหนา ดังแสดงตามรูปที่ 2 เมื่อตัดได้รูปตามต้องการแล้วนำตัวอย่างไปตัดแต่งทุกด้านให้เรียบอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ ultramicrotome ตัดตัวอย่างหนา ให้ได้ความหนา 1 - 2 ไมครอน จากนั้นนำมาวางบนสไลด์แล้วย้อมด้วย Toluidene blue เลือกตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่ต้องการโดยศึกษาแผ่นตัวอย่าง (รูปที่ 2) ภายใต้กล้องจุลทัศน์ธรรมดา เมื่อได้ตำแหน่งแล้วจะทำการตัดแต่งตัวอย่างอีกครั้งหนึ่งโดยให้ฐานของสี่เหลี่ยมคางหมูยาวไม่มากกว่า 0.5 มิลลิเมตร และมีความสูง (h) ประมาณ 0.3 มิลลิเมตร



รูปที่ 2 หน้าตัดคางหมูของตัวอย่างหนา (thick section) และตัวอย่างบาง (ultrathin section)

ตัดตัวอย่างบาง (ultrathin section) ที่ความหนาประมาณ 60 ถึง 90 นาโนเมตร (nm) จะสังเกตได้โดยมองแผ่นตัวอย่างบางผ่านกล้องจุลทัศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microsope) แผ่นตัวอย่างบางที่ลอยอยู่บนผิวน้ำจะเป็นสีเทาเงินหรือสีทอง ใช้ปากคีบปลายแหลม (fine curved tipped forceps) แล้วจับตรงขอบ grid ช้อนขึ้นตัวอย่างขึ้นจากน้ำ ซับ grid ด้านไม่มีตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง

ย้อมแผ่นตัวอย่างบน grid ด้วย uranyl acetate 45 นาที และ lead citrate 15 นาที นำตัวอย่างมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน JEM 200 CX (วิธีการเตรียมตัวอย่างได้ประยุกต์มาจาก อุไรวรรณ สุทธิพงษ์, 2526; Hayat, 1970 และ Christiansen and Costlow, 1982)

ข. วิธีการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การศึกษาเบื้องต้น

1.1 การทดลองวิธีการหาปริมาณสารไดฟลูเบนซูรอน

1.1.1 ใช้วิธีของ Nimmo et al. (1979) หาปริมาณสารไดฟลูเบนซูรอน โดยใช้สารไดฟลูเบนซูรอนที่ความเข้มข้น 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับการทดลองหาความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่มีผลต่อการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนโดยเตรียมสารไดฟลูเบนซูรอนเหมือนกับการทดลองทุกประการ

1.1.2 การตรวจหาระดับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่เครื่อง HPLC ที่มี UV-absorption detector สามารถวัดหาปริมาณได้ โดยการละลายสารไดฟลูเบนซูรอนลงในสารที่ใช้สกัดคือ diethyl ether : petroleum ether (1 : 1) โดยตรง แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ซึ่งมี 10 % iso-propanol ใน iso-octane เป็น mobile phase และจะฉีดสารละ 3 ครั้ง ปริมาณครั้งละ 10 ไมโครลิตรตามลำดับดังนี้

1.1.2.1 mobile phase

1.1.2.2 diethyl ether

1.1.2.3 petroleum ether

1.1.2.4 diethyl ether : petroleum ether (1 : 1)

1.1.2.5 ไดฟลูเบนซูรอน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.1.2.6 ไดฟลูเบนซูรอน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.1.2.7 ไดฟลูเบนซูรอน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.1.2.8 ไดฟลูเบนซูรอน 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.1.2.9 ไดฟลูเบนซูรอน 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.1.2.10 ไดฟลเบนซูรอน 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.1.2.11 ไดฟลูเบนซูรอน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 การหาเวลาของรอบการลอกคราบในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน

หาเวลาของรอบการลอกคราบในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนโดยทำการศึกษาว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนขนาดความยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร ซึ่งมีอายุระหว่าง P_{10} ถึง P_{15} ใช้เวลากี่วันจึงจะลอกคราบ 1 ครั้ง เพื่อจะนำผลการทดลองส่วนนี้ไปใช้ในการวางแผนการทดลองในข้อ 1.3, 1.4 และ 2 ต่อไป ในการทดลองนี้ใช้กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน 100 ตัว เริ่มจากปรับสภาวะการทดลองให้ได้ตามต้องการแล้วนำกุ้ง 500 ตัวจากตู้กระจก (ได้อธิบายไว้ในหัวข้ออุปกรณ์เทคนิคและสภาวะที่ใช้ในการวิจัย) มาใส่ขวดละ 1 ตัว เหตุที่ต้องใช้กุ้งแชบ๊วยถึง 500 ตัว เนื่องจากในวันรุ่งขึ้นจะได้กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่ลอกคราบเพียงบางส่วนเท่านั้น วันต่อมาเวลา 06.00 น. ทำการคัดเลือกเอากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่ลอกคราบแล้ว (สังเกตคราบเปลือกภายในขวด) มา 100 ตัวแล้วให้หมายเลขประจำขวดตั้งแต่ 1 - 100 จากนั้นสังเกตคราบเปลือกในเวลา 06.00 น. ทุกวัน จดบันทึกวันที่กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนทั้งหมด 100 ตัวลอกคราบอีกครั้ง จะได้ช่วงเวลาระหว่างการลอกคราบครั้งที่ 1 และการลอกคราบครั้งที่ 2 เป็นเวลาของรอบการลอกคราบในกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน

1.3 การทดลองหาระดับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่มีผลต่อการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน

การทดลองนี้เป็นการทดลองหาระดับความเข้มข้นที่มีผลต่อการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในรอบการลอกคราบ โดยความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนบางตัวตายเพราะไม่สามารถลอกคราบเก่าออกได้แต่บางตัวก็อาจสามารถลอกคราบผ่านไปได้ นอกจากนี้จะต้องเป็นระดับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่สูงพอที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเปลือกของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนซึ่งเป็นวัตถุประสงค์หลักในการวิจัยครั้งนี้โดยจะนำไปใช้ในการทดลองข้อ 2 ต่อไป ส่วนผลที่ได้จากการทดลองนี้รองลงมาคือสามารถเปรียบเทียบผลของสารไดฟลูเบนซูรอนต่อกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และสามารถทราบระดับความเข้มข้นที่เริ่มมีผลต่อรอบการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าเมื่อใช้สารไดฟลูเบนซูรอนที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตรในเวลา 72 ชั่วโมงไม่พบการตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน ส่วนความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร จะทำให้กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนตายหมด จึงได้ใช้ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นต่ำสุดและ 1.0 ไมโครกรัม

ต่อลิตรเป็นความเข้มข้นสูงสุดเพื่อจะได้ทราบถึงระดับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่เริ่มมีผลต่อการลอกคราบและการตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน และทราบถึงระดับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนที่เริ่มทำให้กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนตายหมด จึงได้แบ่งการทดลองออกดังนี้คือ ø (ใช้น้ำทะเลเป็นหน่วยควบคุม) A (ใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายสารไดฟลูเบนซูรอนและจะใช้ในปริมาณที่เตรียมไดฟลูเบนซูรอนความเข้มข้น 1.ø ไมโครกรัมต่อลิตร) สารไดฟลูเบนซูรอนที่ความเข้มข้น ø.1, ø.3, ø.5, ø.7 และ 1.ø ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังนั้นจึงมีกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน 7 กลุ่ม โดยมีกลุ่มควบคุม (control groups) 2 กลุ่ม ส่วนอีก 5 กลุ่มเป็นกุ้งแชบ๊วยที่จะทดลองผลของสารไดฟลูเบนซูรอนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (treatment groups) แต่ละกลุ่มจะมีหน่วยทดลองคือกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่ลอกคราบแล้ว (โดยสังเกตจากคราบเปลือกในชวดที่เวลา ø6.øø น. ของวันที่เริ่มต้นการทดลองจำนวน 2ø ตัว) และจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ (replicates) ดังนั้นในแต่ละกลุ่มจะใช้กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจำนวน 6ø ตัว ใช้เวลาของรอบการลอกคราบจากข้อ 1.2 มากำหนดจำนวนวันในการทดลองครั้งนี้ โดยให้เลยเวลาของรอบการลอกคราบครั้งแรกไปประมาณ 2 - 3 วัน เพื่อจะได้ครอบคลุมเวลาของรอบการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในการทดลองครั้งนี้ทั้งหมด สำหรับการรายงานผลการทดลองในส่วนนี้จะใช้แบบต่อไปนี้

1.3.1 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ของเปอร์เซนต์การตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนเปรียบเทียบการตายเนื่องจากลอกคราบไม่ได้และการตายขณะไม่ได้ลอกคราบในแต่ละกลุ่มของการทดลอง

1.3.2 ใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมี 2 ตัวประกอบ (two-way classification) (ตารางที่ 7) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนการตายของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารไดฟลูเบนซูรอน

1.3.3 ใช้สถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยซึ่งเป็นการคำนวณต่อเนื่องมาจากข้อ 1.3.2 เมื่อการวิเคราะห์ความแปรปรวนได้ผลว่ามีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญแล้วจึงใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นคู่โดยใช้หน่วยควบคุมเป็นหลัก

1.4 <u>การศึกษาเบื้องต้นโครงสร้างเปลือกของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในระยะต่าง ๆ ของรอบการลอกคราบ</u>

ผลของการทดลองครั้งนี้จะใช้เป็นแนวทางในการกำหนดเวลาการเก็บตัวอย่างสำหรับ

ระยะต่าง ๆ ในรอบการลอกคราบในข้อ 2 และยังเป็นการศึกษาโครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนซึ่งยังไม่มีผู้ใดรายงานไว้ นอกจากนี้ผลการทดลองส่วนนี้ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับกุ้งแชบ๊วยซึ่งเป็นชนิดที่มีอยู่ในประเทศไทยได้อีกด้วย

การแบ่งระยะของรอบการลอกคราบในครัสเตเชียนมีอยู่ 2 แบบคือใช้ช่วงเวลาและใช้การเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอก (Travis, 1955) การเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอกนั้นจะแบ่งเป็นระยะหลัก ๆ 5 ระยะคือ A, B, C, D และ E (Drach, 1939 อ้างตาม Travis, 1955) โดยใช้วิธีเรียกว่า staging technique staging technique นี้จะต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ สำหรับกุ้งแชบ๊วย Longmuir (1983) ได้ศึกษาการสร้างหนาม (setal development) ของขาว่ายน้ำ (pleopod) ในกุ้งแชบ๊วยวัยรุ่น จึงได้นำข้อมูลจากรายงานนี้มาทดลองใช้กับกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อน พบว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่จะใช้ในการทดลองนี้มีขนาดเล็กกว่ามากจนเห็นลักษณะต่าง ๆ ได้ไม่ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทัศน์ธรรมดา จึงไม่สามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้เพราะอาจจะเกิดความผิดพลาดได้ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จะใช้ช่วงเวลาหลังการลอกคราบซึ่งเป็นวิธีที่ Travis (1955) ใช้กับกุ้งมังกร Panulirus argus (spiny lobster) และ Christiansen และ Costlow (1982) ใช้กับปูน้ำกร่อย Rhithropanopeus harrisii (estuarine crab) โดยนำเวลาของรอบการลอกคราบในข้อ 1.2 มาแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ มีช่วงเวลาห่างกัน 6 ชั่วโมง เริ่มจากการสังเกตคราบเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนในขวดเวลา 06.00 น. เมื่อพบคราบเปลือกแสดงว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนได้ลอกคราบแล้วจึงนำมาจัดเป็นหน่วยทดลองระยะต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้คือ 0, 6, 12, 18, 24, 30, ...72 ที่ 0 หมายถึงระยะพบคราบเปลือกที่เวลา 06.00 น. ที่ 6 เป็นระยะที่ห่างจากระยะ 0 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กำหนดเป็นระยะจนครบรอบการลอกคราบ 1 รอบตามข้อมูลในข้อ 1.2 และในแต่ละระยะจะใช้กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจำนวน 20 ตัว เก็บตัวอย่างทุกระยะเพื่อนำไปศึกษาโครงสร้างเปลือกโดยใช้กล้องจุลทัศน์ธรรมดาและกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

2. <u>การศึกษาผลของสารไดฟลูเบนซูรอนต่อโครงสร้างเปลือกระยะต่าง ๆ ในรอบการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วย</u>

การทดลองส่วนนี้เป็นจุดประสงค์หลักในการวิจัยโดยจะใช้ข้อมูลเวลาของรอบการลอกคราบจากข้อ 1.2 ผลการศึกษาเบื้องต้นโครงสร้างเปลือกในระยะต่าง ๆ ของรอบการลอกคราบจากข้อ 1.4 และระดับความเข้มข้นของสารไดฟลูเบนซูรอนจากข้อ 1.3 ซึ่งจากผล

การทดลองข้อ 1.2 พบว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมีเวลาของรอบการลอกคราบมากที่สุดที่ 2 และ 3 วัน ส่วนโครงสร้างเปลือกในข้อ 1.4 ที่ระยะ ๐, 6, 12, 18, ..., 72 จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทัศน์ธรรมดาพบว่ามีโครงสร้างเหมือนกันทุกระยะ และจากการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมงในข้อ 1.3 ทำให้ทราบว่ากุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจะลอกคราบอยู่ในช่วงระยะ 66 ถึง 72 เท่านั้นซึ่งเป็นช่วงเวลาตั้งแต่ 24.๐๐ น. ถึง ๐6.๐๐ น. ดังนั้นจึงคาดว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเปลือกอาจจะอยู่ในช่วงเวลานี้ และระดับความเข้มข้นที่มีผลต่อการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนนั้นที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 1.๐ ไมโครกรัมต่อลิตรปรากฏว่าในรอบการลอกคราบครั้งแรกมีทั้งกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนที่ลอกคราบแล้วตายเนื่องจากลอกคราบไม่ออกหรือลอกคราบได้เพียงบางส่วนและลอกคราบแล้วไม่ตายแต่จะมาตายในวันหลัง ๆ ของการทดลอง จากผลการทดลองในข้อ 1.2, 1.3 และ 1.4 ดังกล่าวจึงเลือกใช้เวลาของรอบการลอกคราบเป็น 3 วัน และเก็บตัวอย่างที่ระยะ 24, 48, 67.5, 68, 68.5, 69, 69.5, 7๐, 7๐.5 และ 71 โดยใช้ความเข้มข้นสูงสุดคือ 1.๐ ไมโครกรัมต่อลิตรเนื่องจากคาดหวังว่าความเข้มข้นนี้น่าจะมีผลต่อโครงสร้างเปลือกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนมากที่สุด ทำการทดลองโดยเก็บตัวอย่างระยะ 2๐ ตัวจนครบทุกระยะโดยทำการทดลองแบบเดียวกัน 2 ครั้ง เพื่อเก็บตัวอย่างศึกษาทั้งในระดับกล้องจุลทัศน์ธรรมดาและกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่านตามลำดับและแต่ละครั้งจะมีหน่วยควบคุมเป็นน้ำทะเลที่ใช้กุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนจำนวนเท่ากันคือ 2๐ ตัว

ตารางที่ 7 สูตรการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมี 2 ตัวประกอบ

source of variation	df	SS	MS	F
row means	r - 1	$SSR = \sum_{i=1}^{r} \frac{T^2_{i..}}{cn} - \frac{T^2_{...}}{rcn}$	$MSR = \frac{SSR}{r-1}$	$\frac{MSR}{MSE}$
column means	c - 1	$SSC = \sum_{j=1}^{c} \frac{T^2_{j..}}{rn} - \frac{T^2}{rcn}$	$MSC = \frac{SSC}{c-1}$	$\frac{MSC}{MSE}$
interaction	(r-1) (c-1)	$SS(RC) = \sum_{i=1}^{r}\sum_{j=1}^{c} \frac{T^2_{ij}}{n} - \sum_{j=1}^{r} \frac{T^2_{i..}}{cn} - \sum_{j=1}^{c} \frac{T^2_{j}}{rn} + \frac{T^2_{...}}{rcn}$	$MS(RC) = \frac{SS(RC)}{(r-1)(c-1)}$	$\frac{MS(RC)}{MSE}$
error	rc (n - 1)	$SSE = SST - SSR - SSC - SS(RC)$	$MSE = \frac{SSE}{rc(n-1)}$	
Total	rcn - 1	$SST = \sum_{i=1}^{r}\sum_{j=1}^{c}\sum_{k=1}^{n} X^2_{ijk} - \frac{T^2_{...}}{rcn}$		